

Міністерство охорони здоров'я України
Тернопільський національний медичний університет
імені І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України

Міністерство освіти і науки України
Національний університет біоресурсів і природокористування України

*Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису*

ЯРЕМЧУК ОЛЬГА ЗЕНОВІВНА

УДК 547.172.6/.495.9:616-005.6]-092.9

ДИСЕРТАЦІЯ

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

03.00.04 – Біохімія

09 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ О. З. Яремчук

Науковий консультант:
Посохова Катерина Андріївна,
доктор медичних наук, професор

Тернопіль – 2021

АНОТАЦІЯ

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

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України, Тернопіль, 2021.

Національний університет біоресурсів і природокористування України Міністерства освіти і науки України, Київ, 2021.

Дисертаційна робота присвячена з'ясуванню ролі системи нітроген оксиду та біохімічних механізмів реалізації дії модуляторів системи нітроген оксиду при ураженні головного мозку, печінки та нирок вагітних та невагітних мишей лінії BALB/c за умов антифосфоліпідного синдрому.

Для досягнення мети роботи були використані: попередник нітроген оксиду L-аргінін та інгібітор індукцибельної ізоформи синтази нітроген оксиду аміногуанідин (окреме та комбіноване їх введення), миші-самки лінії BALB/c, модель антифосфоліпідного синдрому у вагітних та невагітних мишей. Проведено оцінку: стану системи нітроген оксиду – за вмістом ендотеліальної та індукцибельної ізоформ синтази нітроген оксиду в сироватці крові та печінці, за вмістом стабільних метаболітів нітроген оксиду нітрит-аніона та нітрат-аніона у сироватці крові, тканинах мозку (мозочка та півкуль великого мозку), печінки та нирок; стану судинного ендотелію – за електронномікроскопічними змінами, кількістю циркулюючих десквамованих ендотеліальних клітин; показників системи гемостазу; процесів реалізації апоптозу – за визначенням кількості апоптотичних і некротичних клітин, рівнем активних форм кисню в лейкоцитах крові та вмістом каспази-3 в печінці; показників цитокінового профілю – за концентрацією IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-4 та IL-10; стану структур центральної нервової системи (мозочка та півкуль великого мозку) – за вмістом гліальних протеїнів (гліального фібрилярного кислого протеїну та основного

протеїну мієліну), вмістом аутоантитіл до протеїнів головного мозку; процесу розвитку оксидативного стресу в тканинах мозочка та півкуль великого мозку, печінки та нирок – за показниками вільнорадикального окиснення, активності та вмісту компонентів системи антиоксидантного захисту; енергозабезпечувальних процесів у мітохондріях – за активністю сукцинатдегідрогенази та цитохромоксидази.

Встановлено зниження вмісту ендотеліальної ізоформи синтази нітроген оксиду у сироватці крові (в 1,2 та 1,7 раза) і печінці (в 1,7 та 1,8 раза) невагітних та вагітних мишей за умов АФС, порівняно з показниками тварин контрольних груп, що призводить до дисбалансу вмісту стабільних метаболітів нітроген оксиду. Отримані результати можна пояснити тим, що антифосфоліпідні антитіла інгібують активність ендотеліальної ізоформи синтази нітроген оксиду. Водночас підвищення вмісту індукцйбельної ізоформи синтази нітроген оксиду у сироватці крові (в 4,1 та 4,5 раза) і печінці (у 2,2 та 3,5 раза) може бути спричинене зростанням продукції прозапальних цитокінів IL-1 β , IL-6 та TNF- α .

Показано, що у сироватці крові та печінці мишей за умов антифосфоліпідного синдрому виникає відносна недостатність нітроген оксиду, який синтезується під впливом ендотеліальної ізоформи синтази нітроген оксиду, на фоні загальної гіперпродукції нітроген оксиду. Встановлено підвищення рівня синтезу нітроген оксиду в мозочку і нирках вагітних та невагітних мишей з антифосфоліпідним синдромом. Відмічено зростання вмісту нітрит-аніону та нітрат-аніону у півкулях великого мозку невагітних тварин з антифосфоліпідним синдромом та їх зниження у вагітних мишей із цим синдромом.

Встановлено, що у крові невагітних мишей з антифосфоліпідним синдромом кількість циркулюючих десквамованих ендотеліоцитів збільшується в 1,6 раза відносно інтактних тварин, а у вагітних мишей з антифосфоліпідним синдромом – у 2,4 раза, порівняно з показниками вагітних тварин без антифосфоліпідного синдрому, що є однією із причин розвитку ендотеліальної дисфункції у мишей з антифосфоліпідним синдромом.

При проведенні електронномікроскопічних досліджень встановлено, що за умов антифосфоліпідного синдрому при значних порушеннях мікроциркуляції і транскапілярного обміну відбуваються глибокі пошкодження ультраструктури ендотеліоцитів.

Встановлено зменшення кількості тромбоцитів, зростання концентрації фібриногену, скорочення активованого часткового тромбопластинового часу та зниження міжнародного нормалізованого відношення, що свідчить про гіперкоагуляцію та ризик тромбоутворення у вагітних та невагітних самок з антифосфоліпідним синдромом, що є одним із важливих маркерів антифосфоліпідного синдрому. Ці зміни супроводжуються зменшенням життєздатності лейкоцитів крові, збільшенням кількості гранулоцитів і дефіцитом продукування активних форм кисню у гранулоцитах та агранулоцитах. Про активацію апоптозу в печінці невагітних та вагітних мишей за умов антифосфоліпідного синдрому свідчить зростання вмісту активної форми каспази-3 (в 1,5 та 2,9 рази).

Встановлено зростання загального вмісту гліального фібрилярного кислого протеїну (в 2,8 та 1,9 рази) і вмісту його ізоформи (37 kDa) (в 6,4 та 12,9 рази) у мозочку невагітних та вагітних мишей з антифосфоліпідним синдромом. У зразках півкуль великого мозку невагітних та вагітних тварин з антифосфоліпідним синдромом зростають загальний вміст гліального фібрилярного кислого протеїну (в 1,2 та 1,6 рази) і вміст його ізоформи (37 kDa) (в 1,6 та 1,4 рази). Водночас за цих умов підвищується вміст основного протеїну мієліну в досліджуваних структурах центральної нервової системи, що вказує на розвиток реактивного астрогліозу й активацію процесів ремієлінізації. Одночасно збільшується вміст аутоантитіл до протеїнів головного мозку в трьох поліпептидних зонах (120 kDa, 150 kDa та >170 kDa).

Показано, що у тканинах мозочка, півкуль великого мозку, печінки і нирок невагітних та вагітних мишей з антифосфоліпідним синдромом відбуваються активація оксидативного стресу і процесів вільнорадикального окиснення, порушення рівноваги в системі прооксиданти – антиоксиданти, що проявляється

накопиченням продуктів пероксидного окиснення ліпідів (гідропероксидів ліпідів, ТБК-активних продуктів), дискоординацією активності та вмісту компонентів антиоксидантного захисту (супероксиддисмутази, каталази, відновленого глутатіону) та супроводжується зниженням активності ензимів електронотransпортного ланцюга мітохондрій (сукцинатдегідрогенази, цитохромоксидази).

Попередник нітроген оксиду L-аргінін у невагітних та вагітних мишей при антифосфоліпідному синдромі сприяє зростанню вмісту в сироватці крові ендотеліальної ізоформи синтази нітроген оксиду (в 1,5 та 1,9 раза) та нітрат-аніону і нітрит-аніону, порівняно з показниками групи мишей з антифосфоліпідним синдромом. Водночас вміст індукцйбельної ізоформи синтази нітроген оксиду у крові достовірно не змінюється. Встановлено нормалізацію кількості циркулюючих десквамованих ендотеліоцитів та життєздатності лейкоцитів крові, відновлення показників системи гемостазу, відновлення рівноваги між кількістю гранулоцитів та агранулоцитів крові до рівня контролю і нормалізацію вмісту активних форм оксигену в гранулоцитах та агранулоцитах, зниження концентрації IL-1 β , IL-6, TNF- α і зростання концентрації IL-4, IL-10.

При введенні L-аргініну в мозочку невагітних мишей з антифосфоліпідним синдромом зростає загальний вміст гліального фібрилярного кислого протеїну та його ізоформи (37 kDa), а у вагітних мишей при антифосфоліпідному синдромі під впливом L-аргініну він знижується. Введення L-аргініну не впливає на вміст основного протеїну мієліну (95–110 kDa) в мозочку та півкуль великого мозку невагітних та вагітних мишей з антифосфоліпідним синдромом. При застосуванні L-аргініну встановлено збільшення вмісту аутоантитіл до протеїнів головного мозку в трьох поліпептидних зонах (120 kDa, 150 kDa, >170 kDa) у невагітних мишей лінії BALB/c з антифосфоліпідним синдромом, проте у вагітних мишей при антифосфоліпідному синдромі під впливом попередника нітроген оксиду L-аргініну знижується вміст аутоантитіл 120 та 150 kDa і зростає вміст аутоантитіл >170 kDa.

Введення L-аргініну невагітним мишам з антифосфоліпідним синдромом супроводжується поглибленням оксидативного стресу в мозочку, проте на 18-й день вагітності L-аргінін сприяє пригніченню активності процесів переокиснення мембранних ліпідів. Встановлено, що L-аргінін за умов антифосфоліпідного синдрому проявляє гепатопротекторні властивості, його дія спрямована на зниження рівня пероксидного окиснення ліпідів, відновлення активності та вмісту компонентів системи антиоксидантного захисту, ензимів електронотransпортного ланцюга мітохондрій у печінці при експериментальному антифосфоліпідному синдромі. Введення L-аргініну невагітним та вагітним мишам з антифосфоліпідним синдромом сприяє зростанню у печінці вмісту ендотеліальної ізоформи синтази нітроген оксиду (в 1,9 та 3,7 раза) та нітрит-аніону і нітрат-аніону, порівняно з показниками груп мишей з антифосфоліпідним синдромом. Встановлено зменшення вмісту індукцибельної ізоформи синтази нітроген оксиду: у печінці невагітних тварин з антифосфоліпідним синдромом – на 21 %, у вагітних мишей із цим синдромом – на 26 %. Під впливом L-аргініну в печінці тварин з антифосфоліпідним синдромом знижується вміст каспази-3. Ймовірно, що зниження вмісту каспази-3 у печінці вагітних та невагітних тварин з антифосфоліпідним синдромом, яким вводили L-аргінін, опосередковується цГМФ-залежною кіназою.

Отримані дані щодо здатності L-аргініну проявляти нефропротекторні властивості за умов антифосфоліпідного синдрому підтверджуються результатами гістологічних та субмікроскопічних досліджень тканини нирки. Встановлено, що за умов антифосфоліпідного синдрому при застосуванні L-аргініну в структурних компонентах нефрона відбувається реорганізація, що характерна для відносної регенерації і оновлення.

Встановлено, що аміногуанідин сприяє зниженню вмісту індукцибельної ізоформи синтази нітроген оксиду у сироватці крові (у 2,4 та 4,0 раза) і печінці (у 2,1 та 3,2 раза), порівняно з показниками мишей з антифосфоліпідним синдромом, і вмісту стабільних метаболітів

нітроген оксиду в сироватці крові та досліджуваних органах (мозочку, півкулях великого мозку, печінці, нирках) невагітних та вагітних мишей з антифосфоліпідним синдромом. Під його впливом відбувається прогресування змін коагулограми, які свідчать про зростання схильності до тромбоутворення. Водночас введення аміногуанідину супроводжується зниженням концентрації TNF- α (в 1,6 й 1,4 раза) у невагітних та вагітних мишей з антифосфоліпідним синдромом.

Встановлено, що аміногуанідин сприяє нормалізації життєздатності лейкоцитів, відновленню рівноваги між кількістю гранулоцитів та агранулоцитів крові до рівня контролю і нормалізації вмісту активних форм оксигену у гранулоцитах та агранулоцитах у вагітних та невагітних мишей з антифосфоліпідним синдромом.

Нейропротекторний вплив аміногуанідину при антифосфоліпідному синдромі проявляється зменшенням оксидативного стресу в мозочку та півкулях великого мозку. При його введенні вагітним та невагітним тваринам з антифосфоліпідним синдромом в мозочку і півкулях великого мозку зменшується загальний вміст гліального фібрилярного кислого протеїну та його ізоформи (37 kDa). Водночас аміногуанідин не впливає на вміст основного протеїну мієліну (95–110 kDa) в мозочку та півкулях великого мозку невагітних мишей з антифосфоліпідним синдромом. Аміногуанідин сприяє зменшенню вмісту антитіл до протеїнів головного мозку в тварин із антифосфоліпідним синдромом. Нейропротекторна роль аміногуанідину може реалізуватися через інгібування активності індукцибельної ізоформи синтази нітроген оксиду, пригнічення утворення активних форм оксигену, інгібування пероксидації ліпідів у клітинах і тканинах та запобігання апоптозу.

У печінці та нирках мишей з антифосфоліпідним синдромом, яким вводили аміногуанідин, спостерігається подальша інтенсифікація вільнорадикального окиснення, що поєднується з активацією антирадикального й антиоксидантного захисту. Застосування аміногуанідину призводить до зменшення вмісту каспази-3 у печінці вагітних мишей із цим синдромом.

Позитивний вплив попередника нітроген оксиду L-аргініну й інгібітора індукцибельної ізоформи синтази нітроген оксиду аміногуанідину при антифосфоліпідному синдромі проявляється більшою мірою при їх комбінованому застосуванні, ніж при окремому введенні. При цьому зростає вміст ендотеліальної ізоформи синтази нітроген оксиду у сироватці крові (в 1,4 та 2,2 рази) і печінці (у 2,4 та 4,1 рази) з одночасним зниженням вмісту індукцибельної ізоформи синтази нітроген оксиду у сироватці крові (в 3,2 та 3,8 рази) і печінці (у 2,3 та 3,3 рази), що супроводжується нормалізацією вмісту нітрит-аніону і нітрат-аніону. За умов комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину при антифосфоліпідному синдромі нормалізується кількість циркулюючих десквамованих ендотеліоцитів, відмічено відновлення показників системи гемостазу і балансу про- та протизапальних цитокінів.

Встановлено, позитивний вплив комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину вагітним та невагітним мишам з антифосфоліпідним синдромом на показники реалізації апоптозу, що супроводжується зростанням показників життєздатності лейкоцитів, відновленням рівноваги між кількістю гранулоцитів та агранулоцитів крові до рівня контролю, нормалізацією вмісту активних форм кисню у гранулоцитах та агранулоцитах, зниженням вмісту каспази-3 в печінці.

Відмічено нейропротекторний вплив комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину за умов антифосфоліпідного синдрому, про що свідчить зниження загального вмісту гліального фібрилярного кислого протеїну та його ізоформи (37 kDa) у мозочку вагітних та невагітних мишей з антифосфоліпідним синдромом. Комбіноване введення L-аргініну й аміногуанідину не впливає на вміст основного протеїну мієліну (95–110 kDa) в мозочку та півкулях великого мозку невагітних мишей з антифосфоліпідним синдромом. Проте на 18-й день вагітності в мозочку тварин з антифосфоліпідним синдромом при комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину знижується вміст основного протеїну мієліну (95–110 kDa) на 31 %, порівняно з показниками вагітних мишей із антифосфоліпідним синдромом. Також при

застосуванні комбінації L-аргініну та аміногуанідину встановлено зменшення вмісту нейроспецифічних аутоантитіл до протеїнів головного мозку в тварин з антифосфоліпідним синдромом.

Комбіноване застосування попередника нітроген оксиду й інгібітора індукцйбельної ізоформи синтази нітроген оксиду супроводжується нейро-, гепато- і нефропротекторним ефектом, що підтверджується пригніченням розвитку оксидативного стресу, зокрема, зниженням активності процесів пероксидного окиснення ліпідів, підвищенням активності та вмісту компонентів антиоксидантної системи, відновленням активності ензимів електронотранспортного ланцюга мітохондрій у мозочку, півкулях великого мозку, печінці й нирках.

Позитивний вплив L-аргініну та аміногуанідину при їх комбінованому застосуванні на стан печінки та нирок за умов антифосфоліпідного синдрому підтверджено гістологічними та субмікроскопічними дослідженнями. Встановлено відновлення структури часточок печінки, ниркових тілець та епітеліоцитів каналців нефрона нирки, гепатоцитів та нефроцитів паренхіми досліджуваних органів, мембранних компонентів органел, ядерних і плазматичних мембран ендотеліоцитів, покращення процесів мікроциркуляції.

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 індукцйбельної 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 індукцибельної 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 індукцибельної 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.

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.

SUMMARY

Yaremchuk O.Z. Mechanisms of action of the nitric oxide system modulators in experimental antiphospholipid syndrome. – Manuscript.

Thesis for the scientific degree of Doctor of Biological Sciences in specialty 03.00.04 – Biochemistry – I. Horbachevsky Ternopil National Medical University, Ternopil, 2021. National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. Kyiv, 2021.

Determination of the role of the nitric oxide system and biochemical mechanisms of the nitric oxide system modulators influence on brain, liver and kidney damage caused by experimental antiphospholipid syndrome in pregnant and non-pregnant mice is presented in the thesis.

L-arginine (nitric oxide precursor) and aminoguanidine (an inhibitor of the inducible isoform of the enzyme nitric oxide synthase) in a single and combined administration were used to achieve the objective on the model of antiphospholipid syndrome in female BALB/c mice. The following parameters were evaluated: the nitric oxide system – by the content of endothelial and inducible isoform of the enzyme nitric oxide synthase in blood serum and liver, by the content of nitric oxide metabolites: nitrite and nitrate anion in blood serum, brain (cerebellum and cerebral hemispheres), liver and kidneys tissues; the vascular endothelium changes – by electron microscopy examination, the number of circulating desquamated endothelial cells; the hemostasis system parameters; the apoptosis processes – by determining the number of apoptotic and necrotic cells, the level of reactive oxygen species in blood leukocytes and the content of caspase-3 in the liver; the cytokine profile – by concentration of IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-4 and IL-10; the condition of the central nervous system structures (cerebellum and cerebral hemispheres) – the content of glial proteins (glial fibrillar acidic protein and myelin basic protein), the content of autoantibodies to brain proteins; oxidative stress development in the tissues of cerebellum and cerebral hemispheres, liver and kidneys – by the parameters of free radical oxidation, activity and content of the components of the antioxidant system; the mitochondria energy supply – by the activity of succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase.

A decrease of the endothelial nitric oxide synthase content in the serum (in 1.2 and 1.7 times) and in liver (in 1.7 and 1.8 times) in pregnant and non-pregnant mice with antiphospholipid syndrome was established compare to the animals of the control group that led to imbalance in the content of nitric oxide stable metabolites. These results could be explained by the fact that antiphospholipid antibodies inhibit endothelial nitric oxide synthase. At the same time, an increase

the inducible nitric oxide synthase content in the serum (in 4.1 and 4.5 times) and liver (in 2.2 and 3.5 times) might have been caused by increased production of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α .

It was established that in the serum and liver of mice with antiphospholipid syndrome it was observed a relative deficiency of nitric oxide induced by endothelial nitric oxide synthase in the presence of total hyperproduction of nitric oxide. An increase of nitric oxide synthesis in the cerebellum and kidneys of non-pregnant mice with antiphospholipid syndrome and on the 18th day of pregnancy was evidenced. An increase in the content of nitrite and nitrate anion in the cerebral hemispheres of the brain in non-pregnant animals with antiphospholipid syndrome and its decrease in the pregnant mice with this syndrome was proved.

It was found that the number of circulating desquamated endothelial cells increased in 1.6 times in the blood of non-pregnant mice with antiphospholipid syndrome compare to the intact animals. In the pregnant mice with antiphospholipid syndrome – it was higher in 2.4 times compared to the pregnant animals without antiphospholipid syndrome, which was one of the causes of development of endothelial dysfunction in the mice with antiphospholipid syndrome. Electron microscopic studies revealed that in antiphospholipid syndrome with underlying significant disorders of microcirculation and transcapillary metabolism a significant impairment of the ultrastructure of endothelial cells takes place.

We found significant evidenced of hypercoagulation and risk of thrombosis in the mice with antiphospholipid syndrome (both pregnant and non-pregnant) that was one of markers of antiphospholipid syndrome: a decrease in platelet count, increase in fibrinogen concentration, reduction of activated partial thromboplastin and prothrombin time, increase in prothrombin index and decrease in international normalized ratio were established. These changes followed by a decrease in the viability of blood leukocytes, an increase in the number of granulocytes and deficiency in production of reactive oxygen species in granulocytes and agranulocytes. Activation of apoptosis in the liver of the non-pregnant

and pregnant mice with antiphospholipid syndrome was proved by an increasing the content of the active form of caspase-3 (in 1.5 and 2.9 times).

An increase in the total content of glial fibrillar acidic protein (in 2.8 and 1.9 times) and the content of its isoform (37 kDa) (in 6.4 and 12.9 times) in the cerebellum of the non-pregnant mice with antiphospholipid syndrome and pregnant mice with antiphospholipid syndrome was established. In the samples of the cerebral hemispheres, the total content of glial fibrillar acidic protein increased (in 1.2 and 1.6 times) as well as the content of its isoform (37 kDa) (in 1.6 and 1.4 times) respectively. At the same time, the content of the myelin basic protein in the studied structures of the central nervous system increased that evidenced of development of reactive astrogliosis and activation of re-myelination processes. Simultaneously, the content of autoantibodies to brain proteins in three polypeptide zones (120 kDa, 150 kDa and > 170 kDa) increased.

It was found out that in the tissues of the cerebellum, cerebral hemispheres, liver and kidneys of the non-pregnant and pregnant mice with antiphospholipid syndrome an activation of oxidative stress and free radical oxidation processes, imbalance in the prooxidant-antioxidant system took place. It was manifested by accumulation of the products of lipid peroxidation (lipid hydroperoxides, TBA-active products), discoordination of the activity and content of antioxidant defense components (superoxide dismutase, catalase, and reduced glutathione) and was followed by a decrease in the activity of enzymes of the electron transport chain of mitochondria (succinate dehydrogenase).

L-arginine in the non-pregnant and pregnant mice with antiphospholipid syndrome stimulated increase of endothelial isoform of the enzyme nitric oxide synthase content (in 1.5 and 1.9 times) and nitrite and nitrate anion in the serum compare to the group of mice with antiphospholipid syndrome. At the same time, the serum inducible isoform of the enzyme nitric oxide synthase content did not change significantly. Regulation of the number of circulating desquamated endotheliocytes and viability of blood leukocytes, normal hemocoagulation parameters, balance between the number of granulocytes and agranulocytes to the control level and normal

reactive oxygen species content in granulocytes and agranulocytes, decreased concentration of IL-1 β , IL-6, TNF- α , and increased concentration of IL-4, IL-10 was evidenced.

L-arginine introduction caused increase of the total content of glial fibrillar acidic protein and its isoform (37 kDa) in the cerebellum of the non-pregnant mice with antiphospholipid syndrome before pregnancy, while in pregnant mice with antiphospholipid syndrome it decreased. Administration of L-arginine did not affect the content of the myelin basic protein (95-110 kDa) in the cerebellum and cerebral hemispheres of non-pregnant and pregnant mice with antiphospholipid syndrome. L-arginine administration caused increase in the content of autoantibodies to brain proteins in three polypeptide zones (120 kDa, 150 kDa, >170 kDa) in the BALB/c non-pregnant mice with antiphospholipid syndrome, but in those with antiphospholipid syndrome and underlying pregnancy the content of autoantibodies 120 and 150 kDa decreased and the content of autoantibodies >170 kDa increased under the influence of the nitric oxide precursor.

Administration of L-arginine to the non-pregnant mice with antiphospholipid syndrome was followed by activation of oxidative stress in the cerebellum, but on the 18th day of pregnancy, the L-arginine caused inhibition of membrane lipid peroxidation. It was found out that L-arginine in antiphospholipid syndrome had hepatoprotective properties: we observed reducing the level of oxidative stress, restoring the activity and content of the antioxidant system components, enzymes of the electron transport chain of mitochondria in the liver in antiphospholipid syndrome. The introduction of L-arginine to the non-pregnant mice with antiphospholipid syndrome and in pregnancy caused an increase of endothelial nitric oxide synthase content in the liver (in 1.9 and 3.7 times) and nitrite and nitrate anion compare to the groups of mice with antiphospholipid syndrome. A decrease in inducible nitric oxide synthase content was evidenced in the liver of animals with antiphospholipid syndrome in non-pregnant mice – by 21%, in the pregnant mice – by 26%. Under the influence of L-arginine in the liver of animals with antiphospholipid syndrome the content of caspase-3 decreased.

The attained results on the ability of L-arginine for nephroprotective properties in antiphospholipid syndrome were confirmed by the histological and submicroscopic examinations of kidney tissue. It was established that with administration of L-arginine in antiphospholipid syndrome, reorganization in structural components of a nephron took place that was specific of relative regeneration and renovation.

It was found out that aminoguanidine, an inhibitor of inducible nitric oxide synthase, caused a decrease in content of inducible nitric oxide synthase in the serum (in 2.4 and 4.0 times) and liver (in 2.1 and 3.2 times) compare to the mice with antiphospholipid syndrome, as well as the content of stable metabolites of nitric oxide in the serum and organs (cerebellum, cerebral hemispheres, liver, kidneys) of the non-pregnant mice with antiphospholipid syndrome and on the 18th day of pregnancy. It caused development of changes of the coagulogram which evidenced of a tendency to thrombosis. At the same time, administration of aminoguanidine caused a decrease in the concentration of TNF- α (in 1.6 and 1.4 times) in the non-pregnant and pregnant animals with antiphospholipid syndrome.

It was established that aminoguanidine caused regulation of leukocytes viability, re-establishment of the balance between the number of granulocytes and blood agranulocytes to the control level and control of reactive oxygen species content in granulocytes and agranulocytes in pregnant and non-pregnant mice with antiphospholipid syndrome.

The neuroprotective effect of aminoguanidine in antiphospholipid syndrome was manifested by a decrease in oxidative stress parameters in the cerebellum and cerebral hemispheres. With its administration to the pregnant and non-pregnant mice with antiphospholipid syndrome, the total content of glial fibrillar acidic protein and its isoform (37 kDa) decreased in the cerebellum and cerebral hemispheres. At the same time, aminoguanidine did not affect the content of the myelin basic protein (95–110 kDa) in the cerebellum and cerebral hemispheres of the non-pregnant mice with antiphospholipid syndrome. However, on the 18th day of pregnancy in the cerebellum of the animals with antiphospholipid syndrome under the influence of aminoguanidine, the content of the myelin basic protein (95-110 kDa) decreased

by 43% compare to the pregnant mice with this syndrome. Aminoguanidine caused decrease in the content of antibodies to brain proteins in antiphospholipid syndrome in both non-pregnant and pregnant mice. The neuroprotective effect of aminoguanidine could be implemented by inhibiting of inducible isoform of the enzyme nitric oxide synthase, impeding formation of reactive oxygen species, inhibiting lipid peroxidation in cells and tissues and preventing apoptosis.

It was noted that in the liver and kidneys of the mice with antiphospholipid syndrome administered with aminoguanidine a further intensification of free radical oxidation combined with activation of anti-radical and antioxidant defense was present. Aminoguanidine implementation led to a decrease in the content of caspase-3 in the liver of the pregnant mice with this syndrome.

A positive effect of nitric oxide precursor, L-arginine, and an inhibitor of inducible nitric oxide synthase, aminoguanidine, on the pathobiochemical changes in antiphospholipid syndrome (in non-pregnant and pregnant mice) was more significant in their combined use. In that case the content of endothelial nitric oxide synthase in the serum increased (in 1.4 and 2.2 times) and in the liver (in 2.4 and 4.1 times) with a simultaneous decrease in the content of inducible nitric oxide synthase in the serum (in 3.2 and 3.8 times) and liver (in 2.3 and 3.3 times) that was followed by regulation of nitrite and nitrate anion. With a combined use of L-arginine and aminoguanidine in pregnant and non-pregnant mice with antiphospholipid syndrome, the number of circulating desquamated endothelial cells was regulated, normal hemostasis and balance of pro- inflammatory and anti-inflammatory cytokines was re-established.

The positive effect of the combined use of L-arginine and aminoguanidine in pregnant and non-pregnant mice with antiphospholipid syndrome on the implementation of apoptosis followed by improved leukocyte viability, restored balance between the number of granulocytes and agranulocytes to the control level, normal content of granulocytes and agranulocytes, decreased content of caspase-3 in the liver was established.

The neuroprotective effect of the combined use of L-arginine and aminoguanidine in antiphospholipid syndrome was established, as evidenced by a decrease in the total content of glial fibrillar acidic protein and its isoform (37 kDa) in the cerebellum in pregnant and non-pregnant mice with antiphospholipid syndrome. The combined administration of L-arginine and aminoguanidine did not affect the content of the myelin basic protein (95–110 kDa) in the cerebellum and cerebral hemispheres of the non-pregnant mice with antiphospholipid syndrome. However, on the 18th day of pregnancy in the cerebellum of the animals with antiphospholipid syndrome with the combined use of L-arginine and aminoguanidine the content of myelin basic protein (95-110 kDa) decreased by 31% compare to the pregnant mice with antiphospholipid syndrome. Also, the combination of L-arginine and aminoguanidine caused a decrease in the content of neurospecific autoantibodies to brain proteins in pregnant and non-pregnant animals with antiphospholipid syndrome.

The combined use of a nitric oxide precursor and an inhibitor of inducible nitric oxide synthase was followed by neuro-, hepato- and nephroprotective effect that was confirmed by inhibition of oxidative stress, in particular by reduced lipid peroxidation, increased activity and content of antioxidant system components, restored activity of enzymes of the electron transport chain of mitochondria in the cerebellum, cerebral hemispheres, liver and kidneys.

The positive effect of combined L-arginine and aminoguanidine on the liver and kidneys in antiphospholipid syndrome has been confirmed by histological and submicroscopic studies. Restoration of the structure of liver particles, renal corpuscles and epitheliocytes of renal nephron tubules, hepatocytes and nephrocytes of the parenchyma of the studied organs, membrane components of organelles, nuclear and plasma membranes of endotheliocytes, as well as improvement of microcirculation processes has been established.

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

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ 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 аміногуанідину 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 аміногуанідину на вміст каспази-3 та β -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 И. А., Курило К. И., Цибульская 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).

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 амингуанидина 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 аміногуанідину 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 аміногуанідину 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. 9th 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).*

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	34
ВСТУП.....	36
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	45
1.1. Епідеміологія, етіологія, класифікація та діагностика антифосфоліпідного синдрому.....	45
1.2. Молекулярні механізми розвитку антифосфоліпідного синдрому.....	52
1.2.1. Роль ендотелію та системи нітроген оксиду в патогенезі антифосфоліпідного синдрому.....	52
1.2.2. Роль антифосфоліпідних антитіл у механізмах розвитку тромбозу судин при антифосфоліпідному синдромі та під час вагітності...	59
1.2.3. Дисрегуляція цитокінового балансу як один із факторів розвитку антифосфоліпідного синдрому.....	64
1.2.4. Апоптоз при антифосфоліпідному синдромі, вплив нітроген оксиду на процеси реалізації апоптозу.....	70
1.3. Роль антифосфоліпідних антитіл у формуванні акушерських ускладнень при антифосфоліпідному синдромі.....	75
1.4. Поліорганні ураження при антифосфоліпідному синдромі	80
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	90
2.1. Відбір тварин для дослідження та експериментальна модель.....	90
2.2. Реакція мікропреципітації з кардіоліпіновим антигеном.....	93
2.3. Дослідження показників системи зсідання крові та кількості тромбоцитів.....	93
2.4. Методи дослідження цитокінового статусу.....	93
2.4.1. Визначення концентрації інтерлейкіну-1 β	93
2.4.2. Визначення концентрації інтерлейкіну-6	94
2.4.3. Визначення концентрації фактору некрозу пухлин- α	94
2.4.4. Визначення концентрації інтерлейкіну-10	94

2.4.5. Визначення концентрації інтерлейкіну-4	94
2.5. Методи дослідження нітрооксидативного стресу та ендотеліальної дисфункції.....	95
2.5.1. Визначення вмісту ендотеліальної NO-синтази	95
2.5.2. Визначення вмісту індукцибельної NO-синтази	95
2.5.3. Визначення вмісту нітрит-аніонів.....	95
2.5.4. Визначення вмісту нітрат-аніонів	96
2.5.5. Визначення кількості вільноциркулюючих десквамованих ендотеліоцитів.....	97
2.6. Методи дослідження оксидативного стресу.....	98
2.6.1. Визначення активності супероксиддисмутази	98
2.6.2. Визначення активності каталази	99
2.6.3. Визначення вмісту відновленого глутатіону	100
2.6.4. Визначення вмісту гідропероксидів ліпідів.....	100
2.6.5. Визначення вмісту ТБК-активних продуктів	101
2.6.6 Методи визначення окиснювальних процесів у мітохондріях...	102
2.6.6.1. Виділення мітохондрій.	102
2.6.6.2. Визначення активності сукцинатдегідрогенази	102
2.6.6.3. Визначення активності цитохромоксидази	103
2.6.7. Оцінка продукції активних форм кисню	104
2.7. Методи дослідження реалізації апоптозу.....	105
2.7.1. Оцінка апоптозу клітин	105
2.7.2. Визначення вмісту каспази-3 та β -актину.....	106
2.8. Методи виявлення та ідентифікації протеїнів.....	107
2.8.1. Методи визначення загальної кількості протеїнів.....	107
2.8.1.1. Метод Бредфорда.....	107
2.8.1.2. Метод Лоурі.....	108
2.8.2. Дослідження вмісту гліального фібрилярного кислого протеїну та основного протеїну мієліну	109

2.8.3. Визначення аутоантитіл проти протеїнів головного мозку	110
2.9. Визначення активності амінотрансфераз у сироватці крові.....	111
2.9.1. Визначення активності аланінамінотрансферази.....	111
2.9.2. Визначення активності аспартатамінотрансферази	112
2.10. Визначення концентрації креатиніну та сечовини в сироватці крові..	112
2.10.1. Визначення концентрації креатиніну	112
2.10.2. Визначення концентрації сечовини	112
2.11. Гістологічні та субмікроскопічні дослідження	113
2.12. Методи математичного аналізу.....	114
РОЗДІЛ 3. ЗМІНИ МЕТАБОЛІЧНИХ ПРОЦЕСІВ У ВАГІТНИХ ТА НЕВАГІТНИХ МИШЕЙ ПРИ АНТИФОСФОЛІПІДНОМУ СИНДРОМІ.....	115
3.1. Дослідження вмісту аутоантитіл до протеїнів головного мозку та наявності антикардіоліпінових антитіл у крові невагітних та вагітних мишей при антифосфоліпідному синдромі.....	115
3.2. Стан системи гемостазу при антифосфоліпідному синдромі у невагітних та вагітних мишей	117
3.3. Стан системи нітроген оксиду при антифосфоліпідному синдромі у невагітних та вагітних мишей	120
3.4. Цитокіневий профіль при антифосфоліпідному синдромі у невагітних та вагітних мишей	124
3.5. Показники процесу апоптозу, продукції активних форм кисню у лейкоцитах крові та вміст каспази-3 і β -актину у печінці невагітних та вагітних мишей при антифосфоліпідному синдромі	126
3.6. Роль оксидативного стресу у механізмах ураження мозочка, півкулях великого мозку, печінки та нирок невагітних та вагітних мишей при антифосфоліпідному синдромі	131
3.7. Вміст гліальних протеїнів у мозочку та півкулях великого мозку невагітних та вагітних мишей при антифосфоліпідному синдромі	140

РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ МОДУЛЯТОРІВ СИНТЕЗУ НІТРОГЕН ОКСИДУ НА СТАН МОЗКУ, ПЕЧІНКИ ТА НИРОК ПРИ ЕСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ АНТИФОСФОЛІПІДНОМУ СИНДРОМІ.....	148
4.1. Вплив L-аргініну та аміногуанідину на вміст аутоантитіл до протеїнів головного мозку у крові невагітних та вагітних мишей при антифосфоліпідному синдромі	149
4.2. Вплив L-аргініну та аміногуанідину на показники системи гемостазу при антифосфоліпідному синдромі у невагітних та вагітних мишей	153
4.3. Вплив L-аргініну та аміногуанідину на розвиток ендотеліальної дисфункції та нітрооксидативного стресу при антифосфоліпідному синдромі у невагітних та вагітних мишей	158
4.4. Вплив L-аргініну та аміногуанідину на цитокіновий профіль при антифосфоліпідному синдромі у невагітних та вагітних мишей	167
4.5. Вплив L-аргініну та аміногуанідину на показники процесу апоптозу та продукції активних форм кисню у лейкоцитах крові та вміст каспази-3 у печінці невагітних та вагітних мишей при антифосфоліпідному синдромі	172
4.6. Вплив L-аргініну та аміногуанідину на показники системи прооксиданти – антиоксиданти у мозочку, півкулях великого мозку, печінці та нирках невагітних та вагітних мишей при антифосфоліпідному синдромі	181
4.7. Вплив L-аргініну та аміногуанідину на вміст деяких гліальних протеїнів у мозочку та півкулях великого мозку невагітних та вагітних мишей при антифосфоліпідному синдромі	203
РОЗДІЛ 5. МОРФОЛОГІЧНІ ТА СУБМІКРОСКОПІЧНІ ЗМІНИ У ПЕЧІНЦІ ТА НИРКАХ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ АНТИФОСФОЛІПІДНОМУ СИНДРОМІ ТА ЗАСТОСУВАННІ МОДУЛЯТОРІВ СИНТЕЗУ НІТРОГЕН ОКСИДУ	218

5.1. Гістологічні зміни печінки мишей за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому та при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину.....	218
5.2. Гістологічні зміни нирки мишей за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому та при застосуванні L-аргініну та аміногуанідину	222
5.3. Субмікроскопічні дослідження печінки за умов антифосфоліпідного синдрому та при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину	227
5.4. Електронномікроскопічні дослідження нирки за умов антифосфоліпідного синдрому та при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину	238
РОЗДІЛ 6. АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	252
ВИСНОВКИ.....	298
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ	304
ДОДАТКИ.....	350
Додаток А. Список праць, опублікованих за темою дисертації.....	350
Додаток Б. Апробація результатів дослідження.....	359
Додаток В. Акти впровадження.....	363
Додаток Г. Патент на корисну модель.....	387

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АОС – антиоксидантна система;
АТФ – аденозинтрифосфат;
АФО – активні форми кисигену;
аКЛ – антикардіоліпінові антитіла;
аФЛ – антифосфоліпідні антитіла;
АФС – антифосфоліпідний синдром;
АЧТЧ – активований частковий тромбопластинний час;
ВА – вовчаковий антикоагулянт;
ВАФС – вторинний антифосфоліпідний синдром;
ГПЛ – гідропероксици ліпідів
ГП – глікопротеїн;
КАТ – каталаза;
КАФС – катастрофічний антифосфоліпідний синдром;
КЛ – кардіоліпін;
МНВ – міжнародне нормалізоване відношення;
МВР – основний протеїн мієліну;
ПАФС – первинний антифосфоліпідний синдром;
ПІ – протромбіновий індекс;
ПОЛ – пероксидне окиснення ліпідів;
ПЧ – протромбіновий час;
РДС – респіраторний дистрес-синдром;
РМП – реакція мікропреципітації;
СОД – супероксиддисмутаза;
СЧВ – системний червоний вовчак;
ТБК – тіобарбітурова кислота;
ТБК-АП – продукти реакції з тіобарбітуровою кислотою;
ФЛ – фосфоліпиди;
цГМФ – циклічний гуанозинмонофосфат;

ЦХО – цитохромоксидаза;
apoER2 – рецептор аполіпопротеїну E2;
AV – анексин V;
 β 2ГПІ – β 2-глікопротеїн I;
cNOS – конститутивна ізоформа синтази нітроген оксиду;
eNOS – ендотеліальна ізоформа синтази нітроген оксиду;
GFAP – гліальний фібрилярний кислий протеїн;
G-SH – відновлений глутатіон;
IAP – інгібітор білка апоптозу;
IL-4 – інтерлейкін-4;
IL-6 – інтерлейкін-6;
IL-10 – інтерлейкін-10;
IFN – інтерферон;
iNOS – індукцйбельна ізоформа синтази нітроген оксиду;
L – NAME – метиловий ефір L – N⁶ – нітроаргініну.
NO – нітроген оксид;
NO₂⁻ – нітрит-аніон;
NO₃⁻ – нітрат-аніон;
NOS – синтаза нітроген оксиду;
PI – пропідій йодид;
TF – тканинний фактор;
TNF- α – фактор- α некрозу пухлин

ВСТУП

Актуальність теми. Вивчення системи гемостазу є однією із актуальних проблем сьогодення та необхідною передумовою для кращого розуміння перебігу фізіологічних процесів, розробки методів корекції патологічних станів та їх ускладнень [15]. Порух системи зсідання крові викликає взаємодія антифосфоліпідних антитіл з фосфоліпідами мембран, а також зв'язаними з цими фосфоліпідами глікопротеїнами [67, 291, 407]. Однією з аутоімунних причин звичного невиношування вагітності є антифосфоліпідний синдром [118, 194], який виявляють у 27–42 % випадків серед пацієнток із невиношуванням вагітності, при цьому в 90 % жінок без адекватного лікування ембріон гине [3, 20, 100]. Антифосфоліпідні антитіла активують прокоагуляційний стан, спричиняють високий ризик виникнення тромбозів, плацентарної недостатності, внутрішньоутробної затримки росту плода, прееклампсії, завмирання плоду на пізніх термінах вагітності [6, 32, 47, 199, 239, 364]. Нещодавно було підтверджено утворення антифосфоліпідних антитіл під час гострої фази COVID-19, проте не завжди це супроводжувалося розвитком тромбозу [213, 422, 298]. При антифосфоліпідному синдромі спостерігається порушення функцій внутрішніх органів, ураження центральної нервової системи, легень, нирок, ендокринних залоз, печінки тощо [36, 108, 119, 289, 371]. Артеріальні тромбози у хворих із антифосфоліпідними антитілами виникають у різних органах, часто в артеріях головного мозку, що призводить до ішемічного інсульту [200, 230, 295]. 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, на 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 [59, 72, 157, 239, 273]. Важливе значення в механізмах розвитку антифосфоліпідного синдрому має ендотеліальна дисфункція, що проявляється порушенням антитромботичної і протизапальної активності ендотелію [395, 404]. Однією з ланок, що відіграють роль у механізмах розвитку антифосфоліпідного синдрому, є система нітроген оксиду [153]. Проте є лише поодинокі дослідження, суперечливого змісту, про порушення синтезу і біодоступності нітроген оксиду в ендотелії за умов антифосфоліпідного синдрому [153, 188, 285, 355]. Відомо, що гіперпродукування нітроген оксиду, опосередковане індукційною ізоформою синтази нітроген оксиду, збільшує маткові скорочення і ризик невиношування вагітності. Проте значне зниження його рівня призводить до передчасних пологів [188]. Механізм, за допомогою якого антифосфоліпідні антитіла спричиняють втрату вагітності при антифосфоліпідному синдромі, вивчено недостатньо [341]. Одним із важливих компонентів патогенезу антифосфоліпідного синдрому, що сприяють дисфункції імунокомпетентних клітин і синтезу аутоантитіл, є оксидативний стрес [325]. При взаємодії антифосфоліпідних антитіл із фосфоліпідами мембран розвивається дисбаланс компонентів цитокінових і кінінових каскадів, реалізуються процеси апоптозу та некрозу [383]. 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 5 нових випадків на 100 тис. осіб на рік [119, 189].

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 нас 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 [238], крім безпосереднього вивчення компонентів його системи при антифосфоліпідному синдромі, у своїй роботі ми зосередили 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 антифосфоліпідного синдрому та його ускладнень. Відповідно, важливим і перспективним напрямком 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. Дисертаційна робота є фрагментом міжкафедральних 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» (№ держреєстрації 0112U000542), «Біохімічні механізми порушень метаболізму за умов надходження до організму токсикантів різного генезу» (№ держреєстрації 0116U003353), в яких дисертант здійснила дослідження із встановлення ролі системи нітроген оксиду у патобіохімічних механізмах розвитку експериментального АФС до вагітності та на фоні вагітності, в тому числі в ураженні центральної нервової системи, печінки, нирок, дисбалансі компонентів системи гемостазу, цитокінового статусу, зміні показників апоптозу у лейкоцитах крові, порушеннях прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу та ефективності використання попередника NO L-аргініну та інгібітора індукцибельної NOS аміногуанідину для корекції виявлених порушень.

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 синтази нітроген оксиду з одночасним зниженням вмісту індукцйбельної 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 індукцибельної 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. Автором 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 роботи. Результати роботи було представлено на: 9th 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 об'єм дисертації. Дисертаційна робота викладена на 392 сторінках комп'ютерного тексту і складається з анотації, 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 та 72 рисунками.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Епідеміологія, етіологія, класифікація та діагностика антифосфоліпідного синдрому

Антифосфоліпідний синдром (АФС) – дифузне захворювання сполучної тканини, що характеризується пошкодженням інтими судин мікроциркуляторного русла внаслідок утворення аутоімунних антитіл до фосфоліпідів (ФЛ) мембран клітин, які включають в себе вовчаковий антикоагулянт (ВА), антитіла до кардіоліпіну (КЛ) і антитіла до β 2-глікопротеїну I (β 2ГПІ) [6, 108, 208, 209, 231, 247]. Поширеність АФС у популяції точно не встановлена. Антифосфоліпідні антитіла (аФЛ) виявляють у середньому в 4–6 % здорових людей. Оскільки в основі АФС лежить незапальна тромботична васкулопатія, яка уражає судини будь-якого калібру і локалізації, від капілярів до великих судин, включаючи аорту, спектр клінічних проявів надзвичайно різноманітний [108]. При цьому тромбоутворення є причиною смерті 37 % пацієнтів з АФС, незважаючи на антитромботичну терапію. Рецидивні тромбози трапляються у третини хворих, та продовжують прогресувати після відміни препаратів [98, 105]. Клінічно АФС проявляється у 30 % хворих з ВА і у 30–50 % пацієнтів, що мають помірний або високий рівень антитіл до кардіоліпіну (аКЛ). Антифосфоліпідні антитіла виявляють у 21 % осіб молодого віку, які перенесли інфаркт міокарда, у 42 % хворих, які перенесли інсульт, і у третини пацієнтів із системним червоним вовчаком (СЧВ). При наявності аФЛ на фоні СЧВ ризик розвитку тромбозів становить 60–70 %. Венозний тромбоз є найчастішим проявом АФС. Тромби частіше локалізуються у глибоких венах нижніх кінцівок, нерідко також у печінкових, порталних, поверхневих та інших венах [67, 100, 273, 371]. За даними [98], порушення кровообігу в нервовій системі внаслідок тромбозу призводить до інсультів (20 %), транзиторних ішемічних атак (11 %), епілептичних нападів

(7 %), головного болю й мігрені (20 %), судомного синдрому (7 %), деменції (3 %), хореї (1,3 %), мієлопатії (менше 1 %) і периферійної нейропатії.

У розвитку АФС важливу роль відіграють такі фактори: спадковий, інфекційний і гендерний [108]. Найчастіше АФС розвивається при ревматоїдних та аутоімунних захворюваннях, переважно при СЧВ. Підвищений рівень аФЛ спостерігають при інфекціях (стрепто- і стафілококи, мікобактерії туберкульозу, ВІЛ, сифіліс, хвороба Лайма, цитомегаловірус, гепатити В і С, вірус Епштейна – Барр) [100, 365]. Захворювання розвивається переважно в молодому віці, описане у дітей і навіть у новонароджених [39]. Є дані про імуногенетичну детермінованість до АФС, засновані на виявленні більш високої частоти аФЛ у сім'ях пацієнтів із АФС. Описані випадки розвитку АФС у членів однієї родини [86, 100].

АФС поділяють на первинний (ПАФС) і вторинний (ВАФС). ПАФС – це симптомокомплекс, при якому клінічні прояви будь-якого іншого захворювання відсутні [12, 19, 32, 108]. Виникнення ВАФС пов'язане з СЧВ або з іншими хворобами аутоімунної природи (ревматоїдний артрит, синдром Шегрена), лімфопроліферативними захворюваннями (парапротеїнемічні гемобластози, гострий і хронічний лімфолейкоз), інфекціями (сифіліс, хвороба Лайма, СНІД), застосуванням деяких лікарських засобів (гідралазин, фенітоїн, хлорпромазин, новокаїнамід). Частка ПАФС становить 53 %, ВАФС – 47 % [100].

Найтяжчий перебіг АФС, незалежно від його варіанту, спостерігається на фоні тромбоцитопенії [86]. Серед інших клінічних варіантів виділяють катастрофічний АФС (КАФС), який є найтяжчою формою АФС [100]. Він проявляється тромбозами життєво важливих органів і розвитком поліорганної недостатності на фоні високого титру аФЛ [8]. Випадки, коли клінічна картина відповідає проявам АФС, однак циркуляція антитіл до кардіоліпіну, антитіл до $\beta 2$ ГПІ і ВА відсутня, узагальнені в літературі поняттям аФЛ-негативний АФС, або «серонегативний АФС», перша згадка про нього (в 2003 р.) належить також Г. Р. Хьюзу [47].

Взаємозв'язок між СЧВ і АФС досі залишається суперечливим, тому що невідомо, яка патологія є первинною, оскільки у 30–40 % пацієнтів, хворих на СЧВ, виявляють в крові аФЛ [8, 98, 276, 365]. Діагноз певного типу АФС встановлюють за наявності у пацієнта хоча б одного клінічного й одного лабораторного критерію згідно з Міжнародними Сіднейськими діагностичними критеріями АФС [19, 114, 216].

До клінічних критеріїв належать судинні тромбози та патологія вагітності:

а) один або більше клінічних випадків тромбозу венозних, артеріальних або дрібних внутрішньоорганних судин будь-якої локалізації, які підтверджено за допомогою інструментальних методів або морфологічно (тромбози глибоких вен кінцівок, тромботичні ураження легеневої артерії, поверхневі тромбофлебії, сітчасте ліве до; ураження мікросудин – поширені некрози шкіри, тромботична мікроангіопатія в нирках);

б) один або більше випадків внутрішньоутробної смерті морфологічно нормального плода на 10-му тижні вагітності або після;

в) один або більше епізодів передчасних пологів морфологічно нормального новонародженого до 34-го тижня вагітності внаслідок еклампсії або тяжкої прееклампсії, яку діагностовано на основі стандартних критеріїв або діагностичних ознак плацентарної недостатності;

г) три або більше послідовних спонтанних абортів до 10 тижнів гестації за відсутності у матері анатомічних і гормональних порушень та при виключенні хромосомних причин з материнської або батьківської ліній [19, 100, 159, 183].

Лабораторні критерії:

а) антитіла до кардіоліпіну IgG або IgM, які виявляються в плазмі або сироватці крові в середніх або високих титрах двічі протягом 12 тижнів за допомогою стандартизованого імуноферментного методу;

б) антитіла до β 2ГПІ IgG або IgM, які виявляються в плазмі або сироватці крові в середніх або високих титрах двічі з інтервалом не менше 12 тижнів за допомогою стандартизованого імуноферментного методу.

в) вовчаковий антикоагулянтв плазмі, в двох або більше випадках дослідження з проміжком не менше 12 тижнів, що визначається відповідно до рекомендацій Міжнародного Товариства тромбозу і гемостазу [19, 237]

Антифосфоліпідні антитіла – родина аутоантитіл, спрямованих проти конформаційних епітопів плазмових білків, які утворюються в результаті їх взаємодії з аніонними фосфоліпідами [103]. Ця родина включає антитіла, спрямовані проти фосфоліпідозв'язуючих, або «кофакторних», білків, а саме а β 2ГПІ, анексину V і протромбіну. Також виділяють антитіла до негативно заряджених фосфоліпідів – до кардіоліпіну, фосфатидилгліцеролу, фосфатидилінозитулу, фосфатидилсерину, фосфатидилової кислоти, і нейтрально заряджених фосфоліпідів – фосфатидилетаноламіну, фосфатидилхоліну [26, 31, 103, 110, 111, 239, 299, 354]. Виявлення аКЛ і а β 2ГПІ в якості діагностичного показника включено до лабораторних критеріїв АФС, а детекція аКЛ – до лабораторних критеріїв СЧВ. Проте аФЛ виявляють у пацієнтів з іншими аутоімунними, інфекційними і лімфопроліферативними захворюваннями, а також у здорових донорів, у яких не проявляються тромбози або акушерська патологія [103].

Взаємодія аФЛ з фосфоліпідами є складним процесом, в реалізації якого важливу роль відіграють кофактори. Встановлено, що аКЛ зв'язуються з кардіоліпіном в присутності аКЛ-кофактора, яким є β 2ГПІ, що циркулює в плазмі разом з ліпопротеїнами. β 2ГПІ має природну антикоагулянтну активність. Антитіла, присутні в сироватці хворих АФС, розпізнають антигенні детермінанти не аніонних фосфоліпідів, а конформаційні епітопи (неоантигени), що формуються в процесі взаємодії β 2ГПІ з фосфоліпідами. Навпаки, при інфекційних захворюваннях присутні переважно антитіла, які реагують із фосфоліпідами за відсутності β 2ГПІ [67].

Клінічні прояви АФС тісно пов'язані з наявністю в крові певних аутоантитіл [86]. Розрізняють категорії пацієнтів з більш ніж одним лабораторним критерієм у будь-якій комбінації – тільки ВА, тільки аКЛ, або тільки анти- β 2ГПІ антитіла. Вважають також, що одночасне виявлення

аКЛ і анти- β 2ГПІ-антитіл (переважно IgG) зустрічається у пацієнтів з високим ризиком. Пацієнтки, позитивні тільки за аКЛ і анти- β 2ГПІ, без ВА, страждають винятково від акушерських ускладнень. Пацієнти, в яких позитивний тільки ВА, найчастіше не мають клінічних проявів, особливо це характерно для осіб старшого віку [114].

Виділяють дві групи аФЛ: перша – антитіла до фосфоліпідів мембран клітин, так звані транзиторні, утворюються після перенесеного інфекційного захворювання і повністю зникають після одужання; друга група – антитіла, асоційовані з аутоімунним процесом [98].

Важливу роль у процесі взаємодії аФЛ і ендотеліальних клітин відіграє β 2ГПІ [375]. β 2ГПІ – один із білків плазми крові, що має в своїй структурі 5 доменів. П'ятий домен відповідає за зв'язування β 2ГПІ з ліпідною мембраною клітини за допомогою залишків лізину, а саме, з фосфатидилсерином. Приєднання β 2ГПІ до фосфатидилсерину відбувається під впливом ензиму амінофосфоліпідтранслокази, після цього він іммобілізується і залишається недоступним для антитіл. Однак при пошкодженні клітини, її активації або апоптозі фосфатидилсерин транслокується на зовнішню поверхню клітинної мембрани і утворює справжній антиген, що викликає відповідну реакцію з боку організму [98, 209].

β 2ГПІ може зв'язуватися з негативно зарядженими ділянками макромолекул: ліпопротеїнів, тромбоцитів, мітохондрій, гепарину. Як відомо, негативно заряджені макромолекули здатні запускати внутрішній шлях згортання крові, в зв'язку з чим було висловлено припущення про роль β 2ГПІ як фізіологічного нейтралізатора коагуляції. Окрім того, β 2ГПІ пригнічує АДФ-залежну агрегацію тромбоцитів. Пізніше було виявлено, що β 2ГПІ є складовою частиною хіломікронів, ліпопротеїнів дуже низької і високої щільності, виявлена його роль у метаболізмі ліпідів (активація ліпопротеїніпази). Хоча в фізіологічних умовах β 2ГПІ зв'язується з аніонними фосфоліпідними мембранами досить слабо, при наявності анти- β 2ГПІ антитіл утворюється комплекс перехресно пов'язаних β 2ГПІ і антитіл, який може мати

високу здатність зв'язуватися з фосфоліпідною мембраною. При утворенні таких комплексів афінність $\beta 2$ ГПІ до фосфоліпідів збільшується більш ніж у 100 разів. Ці комплекси зменшують кількість аніонних фосфоліпідних поверхонь і проявляють ефект інгібування фосфоліпідозалежних коагуляційних реакцій *in vitro* [59].

ВА перешкоджає взаємодії фосфоліпідів з факторами коагуляції, *in vitro* призводить до подовження часу, необхідного для процесу згортання крові. Однак *in vivo* спостерігається зворотна реакція, яка є наслідком пригнічення активності протеїнів C і S [66, 98].

Антипротромбінові антитіла – це гетерогенна група, що включає антитіла проти протромбіну і антитіла проти фосфатидилсерин-протромбінового комплексу [114]. Антипротромбінові антитіла виявляються у 50–90 % аФЛ-негативних пацієнтів. Антипротромбінові антитіла складають більшу частину антитіл, що об'єднуються під загальною назвою ВА, у хворих із АФС. Антитіла, перехресно пов'язані з протромбіном, мають велику зв'язувальну здатність до аніонних фосфоліпідних мембран, витісняючи інші коагуляційні фактори і фосфоліпідозв'язуючі протеїни (анексин V, анексин II тощо). Феномен ВА пов'язаний саме з наявністю антитіл до комплексу протромбін/фосфоліпід. Антипротромбінові антитіла гальмують активацію фактора X, яка здійснюється при взаємодії останнього з факторами Va і VIIIa і яка необхідна для перетворення протромбіну в тромбін. Механізм розвитку тромбозів і ускладнень вагітності у пацієнтів із антипротромбіновими антитілами залишається до кінця не з'ясованим [59]. Антипротромбінові антитіла підвищують кількість протромбіну на поверхні ендотелію, що є наслідком іммобілізації протромбіну на поверхні клітинної мембрани і прямою передумовою до розвитку тромбозів [59, 98]. У 80 % хворих з АФС одночасно виявляють ВА і протромбінові антитіла [6].

Останнім часом одну з провідних ролей у патогенезі АФС відводять антитілам до анексину V. Анексин V має потужні антикоагулянтні властивості *in vitro*, обумовлені високою афінністю до аніонних фосфоліпідів. Анексин V

бере участь в утворенні на поверхні мембрани захисного щита, який блокує здатність фосфоліпідів до реакцій коагуляції. Тромбофілія при АФС є наслідком зменшення кількості анексину V на апікальній поверхні плацентарного трофобласта і судинних ендотеліальних клітин. Руйнування анексинового щита в умовах АФС є причиною тромбозів і репродуктивних втрат. При активації і пошкодженні ендотелію і тромбоцитів активується експресія аніонних фосфоліпідів. З ділянкою ушкодження зв'язується анексин V, запобігаючи коагуляції. Мономерний $\beta 2$ ГПІ має меншу афінність, ніж анексин V. В умовах АФС спочатку відбувається зв'язування $\beta 2$ ГПІ з фосфоліпідами. В результаті експресується епітоп G40-R43 $\beta 2$ ГПІ, що викликає конформаційні зміни в молекулі $\beta 2$ ГПІ. Молекула $\beta 2$ ГПІ набуває здатності зв'язуватися з двома антигенами. Це призводить до підвищення афінності $\beta 2$ ГПІ до фосфоліпідів, витіснення анексину V і активації коагуляції [8, 9, 321]. Проте інші дослідники зробили висновок про відсутність прогностичної значимості наявності антитіл IgG та IgM до анексину V і не рекомендують використовувати вказане обстеження при оцінці ризику невиношування вагітності [47].

У загальній популяції аФЛ виявляють в 4–6 %. Антифосфоліпідні антитіла можуть утворюватися і у безсимптомних пацієнтів-носіїв без розвитку АФС [19]. У більшості пацієнтів, позитивних за аФЛ, лише іноді розвиваються тромбози. Гіпотеза «подвійного удару» дає можливе пояснення цього феномена. Відповідно до цієї гіпотези, крім підвищеного ризику тромбозу, який індукують аФЛ через активацію клітинної коагуляційної ланки («перший удар»), потрібні ще й інші фактори, щоб запустити тромбоутворення («другий удар»). Після прийняття Міжнародної Сіднейської класифікації критеріїв АФС [308] увага приділяється вродженим або набутим факторам ризику тромбозу, які включають вік, розвиток серцево-судинних захворювань, уроджені тромбофілії, застосування оральних контрацептивів, нефротичний синдром, новоутворення, хірургічні втручання. Можливу генетичну схильність до розвитку АФС та продукції аФЛ вивчали в сімейних і популяційних дослідженнях. Описаний зв'язок АФС і аФЛ із людськими лейкоцитарними антигенами DR і DQ та з

поліморфізмом β 2ГПІ, а також з генетичними дефектами імунної системи, такими як системи IgA і комплементу [114].

Численність та різноманітність клінічної симптоматики АФС і часте його поєднання з іншими патологічними станами, що також перебігають із тромботичними ураженнями багатьох органів із системною запальною відповіддю (синдром дисемінованого внутрішньосудинного згортання, тромботична тромбоцитопенічна пурпура), розвиток атеросклеротичного ураження судин при АФС, відсутність вірогідних лабораторних показників, за якими можна прогнозувати рецидиви тромбозів, привертають увагу дослідників до необхідності пошуку специфічних імунологічних і молекулярно-біологічних характеристик синдрому [100, 231].

1.2. Молекулярні механізми розвитку антифосфоліпідного синдрому

1.2.1. Роль ендотелію та системи нітроген оксиду в патогенезі антифосфоліпідного синдрому

Ендотелій є головною клітинною мішенню аФЛ за умов АФС. Антифосфоліпідні антитіла розпізнають не фосфоліпіди, а зв'язані з аніонною поверхнею білки плазми крові. Білки плазми виконують роль кофакторів у процесі взаємодії аФЛ із фосфоліпідами. Важливу роль у процесі взаємодії аФЛ і ендотеліальних клітин відіграє β 2ГПІ [153, 246, 375, 410]. β 2ГПІ-залежне зв'язування аФЛ та інтими судин призводить до активації клітин ендотелію (гіперекспресії клітинних молекул адгезії, збільшення прилипання моноцитів до клітин ендотелію), індукує їх апоптоз, що, в свою чергу, збільшує прокоагулянтну активність ендотелію. Мішенню для аФЛ можуть бути і білки, що регулюють коагуляційний каскад (протеїни C, S і тромбомодулін) та експресуються на мембрані клітин ендотелію. аФЛ здатні перехресно реагувати з компонентами ендотелію, включаючи фосфатидилсерин та інші негативно заряджені молекули (гепаринсульфат протеоглікану, хондроїтинсульфатний

компонент тромбомодуліну) [67]. При цьому порушується функціонування ендотелію кровоносних судин, що супроводжується утворенням тромбів [153, 171, 343, 303]. Ендотелій відіграє важливу роль у регуляції системи гемостазу. Активація ендотеліальних клітин відбувається шляхом підвищення експресії молекул адгезії [9]. У 1995 році продемонстровано, що аФЛ або анти- $\beta 2$ ГПІ-антитіла підвищують експресію молекул адгезії. Встановлено кореляційні зв'язки між зв'язуванням АФЛ з ІЛ-1а, з індукцією ІЛ-6, з продукуванням ІЛ-1 β , який підвищує експресію молекул адгезії [9].

Основними патобіохімічними механізмами розвитку тромбофілії за умов АФС, які пов'язані з пошкодженням функції ендотелію, є [9, 67]:

а) пригнічення синтезу ендотеліальними клітинами простагліцину – природного інгібітора агрегації тромбоцитів і вазодилатора;

б) синтез антиендотеліальних антитіл;

в) пригнічення гепаринзалежної активації антитромбіну-III і гепаринопосередкованого утворення антитромбін-III-тромбінового комплексу, посилення синтезу фактора активації тромбоцитів клітинами ендотелію;

г) пошкодження мембран ендотеліальних клітин з експозицією аніонних фосфоліпідів і індукція синтезу тканинного фактора (TF), що призводить до запуску внутрішнього шляху згортання крові;

д) активовані ендотеліоцити синтезують у великих кількостях фактор фон Віллебранда і фібронектин;

е) активовані ендотеліоцити індукують апоптоз і порушення фібринолізу (стимуляція утворення інгібітора тканинного активатора плазміногену, гальмування фактор-ХІІ-залежного фібринолізу);

є) формування прозапального фенотипу ендотелію (взаємодія аФЛ з ендотелієм призводить до активації ендотеліальних клітин, що проявляється збільшенням експресії молекул адгезії (Е-селектину, ICAM-1, VCAM-1), продукції прозапальних цитокінів (TNF-а, IL-1b, IL-6).

ж) «тромбіновий парадокс». При низьких концентраціях тромбіну відбувається переважно активація природного антикоагулянта – протейну С.

Коли формується більше тромбіну, фібриноген перетворюється на фібрин, а FVa і FVIIIa активуються: тромбін проявляє протромботичні властивості [9].

При ендотеліальній дисфункції порушуються синтез та біодоступність NO [188, 212, 257, 319, 366, 394, 395, 404].

У фізіологічних умовах NO утворюється трьома ізоформами синтази нітроген оксиду (NOS), включаючи ендотеліальну (eNOS), нейрональну (nNOS) та індукцибельну NOS (iNOS) [34, 44, 197, 234, 334]. Ці NOS мають чітку структуру та функції й в основному існують у різних клітинах. eNOS існує в ендотеліальних клітинах, а nNOS – у нейронах. Ці дві ізоформи мають подібний регулювальний механізм, який активується збільшенням внутрішньоклітинної концентрації кальцію, натомість iNOS, активність якої не залежить від концентрації кальцію, в основному функціонує в імунній системі [227, 282, 335]. NO в основному виробляється з L-аргініну [271]. Після синтезу за участю NOS NO дифундує в інші тканини чи органи, де опосередковує різні види діяльності, хоча NO не є стабільною сполукою, період його напівжиття становить лише 1–5 секунд *in vivo*. Коли внутрішньоклітинна концентрація кальцію підвищується, Ca^{2+} потрапляє у клітини та бере участь у синтезі комплексу кальцій-кальмодулін, який активує NOS із наступним перетворенням L-аргініну на NO та L-цитрулін [27, 34, 255].

NO – відносно нестійкий вільний радикал, який може вироблятися різними типами клітин у багатоклітинних організмах і функціонувати як ефектор або месенджер у багатьох міжклітинних комунікаціях чи внутрішньоклітинних сигнальних шляхах [52, 300]. При його надлишковому синтезі NO стає шкідливим [255]. Ці ефекти в основному опосередковуються реакційною здатністю NO з різними видами кисневих радикалів, які знешкоджуються антиоксидантними ензимами. Крім того, NO може безпосередньо змінювати біологічні молекули за допомогою S-нітрозилування та призводити до пошкодження сигнальних відповідей. NO відіграє подвійну роль, залежно від кількості, клітинного типу та біологічного середовища [419].

NO регулює численні фізіологічні процеси, включаючи процеси тромбоутворення, адгезію лейкоцитів, проникність судин та міграцію клітин крові, бере участь у регуляції судинного тонуусу і коагуляційних властивостей крові [153, 255, 261, 309]. Судинні ефекти NO опосередковуються специфічними рецепторами (пряма вазодилатація), інгібуванням вазоконстрикторних впливів ангіотензину II та симпатичної іннервації (непряма вазодилатація). Антитромботична дія здійснюється через пригнічення адгезії тромбоцитів до ендотелію [261, 314]. Протизапальний ефект NO реалізується через інгібування адгезії лейкоцитів на судинному ендотелії та перехоплення супероксидного аніона [309].

Роль NO в патогенезі АФС обумовлена як прямою, так і опосередкованою дією. Активуючи розчинну гуанілатциклазу, NO підвищує активність Ca^{2+} -АТФази і сприяє виходу Ca^{2+} в цитоплазму. Вільний Ca^{2+} активує ряд протеаз. Відповідно, коли продукція або біодоступність NO пригнічені, виникають вазоконстрикція, тромбози, запальні процеси, гіпертрофія і стеноз судин. Важливу роль у підтриманні судинного тонуусу та запобіганні тромбоутворенню відіграє активність ендотеліальної NO-синтази [309].

аФЛ інгібують eNOS, що супроводжується зменшенням синтезу NO, зростанням адгезії лейкоцитів до ендотелію судин і формуванням тромбів [343].

При первинному АФС середній рівень NO^{2-} у плазмі крові знижується, тоді як середній вміст нітротирозину підвищується. Рівень нітратів плазми крові обернено пропорційний титрам аФЛ [153]. Встановлено також, що у пацієнтів з АФС рівень аФЛ перебуває у зворотному зв'язку з кількістю метаболітів NO, які виділяються з сечею. Доведено, що при АФС вміст NO^{2-} у крові знижується [153]. З іншого боку, встановлено, що антикардіоліпінові антитіла індукували продукування NO через посилену експресію iNOS [212]. Рівень нітратів сироватки крові підвищувався у пацієнтів із активним СЧВ та у хворих на АФС із тяжкими тромботичними ускладненнями [85]. Проте на експериментальних моделях у мишей при АФС встановлено зниження вмісту метаболітів NO у плазмі [171]. Доведено високу специфічність і чутливість визначення стабільних

метаболітів NO – NO₂⁻, NO₃⁻ у сироватці крові та шийці матки, зниження рівня яких супроводжується підвищенням скоротливої активності міометрія та може бути діагностичним критерієм загрози передчасних пологів [240].

eNOS і NO модулюють важливі судинні процеси, які пошкоджуються при АФС. Повідомляється про потенційний зв'язок між АФС та змінами біодоступності NO як у моделях на мишах, так і у людей [277, 304]. У моделях на мишах введення поліклональних аФЛ, виділених від пацієнтів, або моноклональних антитіл до β2ГПІ знижує плазмові концентрації метаболітів NO. У людей рівень аФЛ у плазмі крові обернено корелює з виділенням метаболітів NO з сечею, а у пацієнтів з АФС спостерігається нижчий рівень нітритів у плазмі крові, порівняно з контролем [153]. За даними J. Delgado Alves et al. при експериментальному АФС встановлено посилення зниження рівня NO у плазмі крові [212]. Таким чином, дані, отримані в експериментах на мишах та при патології в людей, доводять пряму роль порушення продукції NO у патогенезі АФС.

При АФС особливо тісно корелюють з тромботичними ускладненнями високі титри аФЛ щодо β2ГПІ [357]. Взаємодія аФЛ з β2ГПІ впливає на трансмембранні рецептори, включаючи рецептор аполіпропротеїну E2 (apoER2), що супроводжується змінами внутрішньоклітинної сигналізації та пошкодженням цільових клітин аФЛ. На культурі ендотеліальних клітин та у дослідях на мишах було показано, що повне видалення apoER2 у мишей забезпечує захист від тромбозу, спричиненого аФЛ, також було виявлено, що критичним кінцевим етапом тромбоутворення є антагонізм з eNOS і дефіцит антитромботичної сигнальної молекули NO, що виникає внаслідок цього [302, 304, 343].

Трансмембранний білок apoER2, який відіграє важливу роль у розвитку нейронів як рецептор трансдукції сигналу, опосередковує спричинене аФЛ гальмування eNOS, що сприяє розвитку тромбозів при АФС. Дослідження ізольованих тромбоцитів показали, що їх активація, індукована димеризованою формою β2ГПІ, також вимагає apoER2 [356]. Було виявлено молекулярні зв'язки

між взаємодією аФЛ із $\beta 2$ ГПІ та інгібуванням eNOS. При зв'язуванні аФЛ з $\beta 2$ ГПІ відбувається димеризація $\beta 2$ ГПІ та взаємодія його з α ER2, що спричиняє, через ряд проміжних ланок, гальмування активності eNOS та дефіцит NO, що провокує тромбоз [277, 302, 343].

Роль $\beta 2$ ГПІ в антагонізмі аФЛ щодо eNOS була доведена при порівнянні дії аФЛ за наявності або відсутності $\beta 2$ ГПІ на поверхні ендотеліальних клітин [343]. Коли клітини були позбавлені $\beta 2$ ГПІ, аФЛ не викликали гальмування активності eNOS, що вказує на необхідність $\beta 2$ ГПІ для дії аФЛ. Дослідження на культивованих ендотеліальних клітинах показують, що для антагонізму з eNOS необхідна додаткова димеризація $\beta 2$ ГПІ [211].

У дослідженнях *in vitro* стимуляція адгезії моноцитів за допомогою аФЛ супроводжувалась зниженням біодоступності NO [153].

На сьогодні відсутні переконливі докази ефективності та доцільності застосування модуляторів синтезу NO для запобігання передчасним пологам при АФС, незважаючи на те, що модулятори синтезу NO входять до сучасної класифікації засобів, які застосовуються у медичній практиці для зменшення скоротливої активності міометрія [267].

Збільшення вмісту NO в клітині через додавання аргініну, інгібування аргінази (КФ 3.5.3.1), інгібування діоксигенази NO або індукції NOS інтерфероном призводило до генерування позаклітинного синглетного кисню та реактивованій апоптоз [167]. Дисбаланс між рівнями NO та АФО (пригнічення сигналізації NO – цГМФ та підвищення відповідно рівнів АФО) призводить до апоптозу та подальшої герметичності ендотелію, що підтверджено в умовах *in vivo* та *in vitro* [362].

На думку [67], збільшення вмісту нітратів у пацієнтів з АФС і тяжкими рецидивними тромбозами може відображати порушення функцій ендотелію (ендотелійзалежної вазодилатації), характерних для цієї патології і, ймовірно, пов'язане з оксидативним стресом. Відомо, що однією з причин дисфункції ендотелію є порушення біодоступності NO. Це може бути пов'язано з виробленням супероксиданіона, який швидко зв'язує і інактивує NO. Крім того,

в результаті взаємодії супероксиданіона та NO утворюється високотоксичний пероксинітрит, який активує пероксидне окиснення ліпідів (ПОЛ), синтез альдегідів, сприяючи атерогенній модифікації ліпопротеїдів низької густини [67, 177, 234].

АФО беруть участь у патобіохімічних механізмах розвитку АФС [212, 233]. Відомо, що у результаті окисно-відновних реакцій в організмі постійно підбувається генерація АФО ($O_2^{\cdot-}$, OH^- , RO_2 , OH_2 , H_2O_2 та ін.), які відіграють важливу роль у багатьох фізіологічних і біохімічних процесах: регуляції тонусу судин, клітинній проліферації, синтезі простагландинів, передачі сигналів від міжклітинних сигнальних молекул на регуляторні системи, як вторинні месенджери, які контролюють експресію генів.

При оксидативному стресі відбувається зниження рівня АТФ, гіперпродукція АФО – супероксидних, пероксидних та гідропероксидних радикалів, NO [249, 280, 342, 353, 369]. Пошкоджувальній дії АФО протистоїть антиоксидантна система, яка запобігає утворенню, забезпечує зв'язування та модифікацію вільних радикалів, руйнування пероксидів, екранування функціональних груп білків та інших молекул [256, 325, 338].

Отже, ключовим механізмом патогенезу АФС є прогресуюче пошкодження ендотелію, розвиток запальної відповіді і активація процесів коагуляції з розвитком тромбозів [60]. Підтверджено важливу роль зменшення синтезу NO ендотеліальними клітинами, індукцію запальних та прокоагулянтних процесів, збільшення проліферації ендотелію та порушення судинного ремоделювання та ангіогенезу при АФС [396].

Отже, дослідження патобіохімічних механізмів розвитку АФС, зокрема встановлення ролі системи нітроген оксиду в розвитку цієї патології, та пошук ефективних методів його лікування є актуальною і соціально значимою проблемою.

1.2.2. Роль антифосфоліпідних антитіл у механізмах розвитку тромбозу судин при антифосфоліпідному синдромі та під час вагітності

Відомо декілька основних механізмів розвитку тромбозу судин при АФС [18, 72, 239, 273]: пряма взаємодія між аФЛ і протеїнами, що регулюють фібринолітичні і коагуляційні шляхи; активація ендотеліальних клітин, моноцитів і тромбоцитів за допомогою взаємодії між аФЛ і фосфоліпідозв'язуючими протеїнами плазми крові; активація антитіл до $\beta 2$ ГПІ, які взаємодіють з мембранами і їх рецепторами [221]. аФЛ можуть безпосередньо зв'язуватися з тромбіном, блокуючи його взаємодію з антитромбіном, а також з протеїном С і протеїном S, інгібуючи їх антикоагуляційну функцію. аФЛ можуть стимулювати активацію тромбоцитів, що супроводжується підвищенням біосинтезу глікопротеїну 2b-3a і тромбоксану A2. аФЛ можуть взаємодіяти з ендотеліальними клітинами і моноцитами, індукуючи в ендотелії утворення молекул адгезії. Активація системи комплементу під впливом аФЛ призводить до розвитку тромбозів та виникнення клінічних симптомів [72, 191, 239, 270, 273, 339].

Антитіла проти $\beta 2$ ГПІ можуть викликати у моноцитах і ендотеліальних клітинах активацію тканинного фактора, який відіграє важливу роль в ініціації зовнішнього коагуляційного каскаду [18, 296]. Відомо, що аФЛ зв'язуються з активованими факторами згортання, включаючи тромбін, активованими факторами IX і X, запобігаючи їх інактивації та знижуючи фібриноліз [291]. Комплекси антитіл з $\beta 2$ ГПІ можуть активувати утворення C5a комплементу, який, у свою чергу, індукує розвиток запалення. C5a може активувати нейтрофіли, що призводить до експресії тканинного фактора, який взаємодіє з фактором VIIa, активації фактора X, синтезу тромбіну і, в результаті, до тромбоутворення [72, 239, 273, 347].

$\beta 2$ ГПІ зв'язує аніонні фосфоліпіди і може пригнічувати фосфоліпідзалежні коагуляційні реакції, що дозволяє вважати $\beta 2$ ГПІ фізіологічним антикоагулянтом [111]. $\beta 2$ ГПІ може взаємодіяти з фXI згортання крові *in vitro*

і блокувати його активацію тромбіном і фХIIa. β 2ГПІ також бере участь у регуляції системи фібринолізу. β 2ГПІ є субстратом для плазміну, який у фізіологічних умовах може розривати поліпептидний ланцюг β 2ГПІ між амінокислотними залишками Lys-317 і Thr-318. Такий укорочений β 2ГПІ має значно меншу спорідненість до фосфоліпідів мембран і аФЛ, проте набуває здатності взаємодіяти з плазміногеном, блокуючи активацію попередника тканинного активатора плазміногену і встановлюючи негативний зворотний зв'язок у системі біосинтезу плазміну. β 2ГПІ може безпосередньо взаємодіяти з тканинним активатором плазміногену і в 20 разів підвищувати активацію плазміногену [72]. β 2ГПІ пригнічує протромбіназну активність і АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів. аФЛ зв'язуються з ендотеліальними клітинами і тромбоцитами тільки в присутності β 2ГПІ [111].

Нещодавно був запропонований новий механізм розвитку АФС за участю β 2ГПІ, в якому бере участь тромбоцитарний фактор 4 (PF4). PF4 є представником С-Х-С-сімейства хемокінів, який синтезується мегакаріоцитами і зберігається в α -гранулах тромбоцитів. PF4 присутній у кровотоці у вигляді тетрамера і після взаємодії з ним β 2ГПІ димеризується. Утворюються білкові комплекси, що складаються з димера β 2ГПІ і тетрамера PF4, що мають високу спорідненість до аФЛ, взаємодіють з мембранами тромбоцитів і моноцитів, активуючи ці клітини і викликаючи їх агрегацію, а також індукують аутоімунну відповідь організму [72, 323].

аФЛ знижують продукцію простагліну ендотеліальними клітинами, інгібуючи фосфоліпазу A_2 , протеїн S, сприяючи тромбоутворенню [22, 76]. Антитіла до фосфатидилсерину, взаємодіючи з фосфоліпідами мембран тромбоцитів і ендотеліальних клітин судин, викликають їх порушення, розвиток тромбозів та тромбоемболій [22]. Пряма дія аФЛ на компоненти системи зсідання крові є важливим фактором гіперкоагуляції [72]. аФЛ безпосередньо зв'язуються з тромбіном, блокуючи його взаємодію з антитромбіном, а також з протеїном С і протеїном S, інгібуючи їх антикоагуляційну функцію. аФЛ впливають на тромбоцити і можуть стимулювати їх активацію,

що супроводжується підвищенням біосинтезу глікопротеїну 2b-3a і тромбоксану A2. аФЛ можуть взаємодіяти з ендотеліальними клітинами і моноцитами, індукуючи в ендотелії утворення молекул адгезії [72, 239, 273].

При вагітності на фоні захворювань, що перебігають із порушенням системи гемостазу, ризик тромбоутворення в судинах організму вагітної та фетоплацентарного комплексу зростає [58, 89]. Зміни в системі гемостазу у вагітних жінок насамперед пов'язані з появою нового кола кровообігу – матково-плацентарного, необхідного для повноцінного забезпечення плода киснем і поживними речовинами [28].

У період вагітності в системі гемостазу відбуваються зміни, спрямовані на посилення активності факторів згортання крові. У стінках судин, що забезпечують плацентарний кровотік, немає шару, який дозволяє запобігти згортанню крові всередині судин. На тканинах плаценти регулярно накопичуються нитки фібрину, які повинні розчинятися, щоб вони не порушували кровообіг. Саме тому показники, які відображають рівні коагуляції і фібринолізу, у здорових жінок під час вагітності підвищені [37].

За даними літератури [28] відомо, що у I триместрі вагітності суттєвих змін в системі гемостазу не відбувається, проте в II і III триместрах спостерігається гіперкоагуляція і збільшення фібринолітичної активності, порівняно з показниками здорових невагітних жінок. При наявності високого рівня аФЛ пошкодження судин нарастають в результаті додаткового впливу специфічних аФЛ на ендотелій судинної стінки [28]. Наявність аФЛ підтверджується у 40 % жінок зі звичними викиднями. аФЛ активують прокоагуляційний стан і спричиняють високий ризик виникнення тромбозів, плацентарної недостатності, внутрішньоматкової затримки росту плода, прееклампсії, завмирання плода на пізніх термінах вагітності [57, 183, 210, 364].

У нормі у вагітних утворюються антитіла до ендотелію судинної стінки: перший пік наростання титру антитіл пов'язаний із плацентацією, другий – з васкуляризацією, міграцією і старінням плаценти, а третій – з пологами. Постійне наростання титру антитіл до ендотелію є станом, який передуює

підвищенню титру аФЛ. Ще одна особливість змін в імунній системі матері при вагітності – це поява фетальних антитіл з аналогічним гестаційним піком наростання. При аутоімунних процесах виникає дисбаланс між виробленням антигенів і їх зв'язуванням, в імунній відповіді беруть участь система гемостазу, нейроендокринна і протеазно-інгібіторна системи. При цьому розвиваються порушення процесу згортання крові і фібринолізу [28].

Клінічні прояви АФС залежать від лабораторного титру аФЛ та терміну вагітності, під час якого вони утворюються. Наявність антитіл до фосфоліпідів у першому триместрі вагітності може спровокувати виникнення спонтанного аборту [58, 337, 347]. Антифосфоліпідні антитіла пригнічують синтез судинного кофактора тромбомодуліну, на який багаті ворсини хоріона, що несприятливо позначається на формуванні плаценти. Антифосфоліпідні антитіла змінюють адгезивні характеристики (заряд) передімплантаційної морули; підсилюють протромботичні механізми та десинхронізують процеси фібринолізу і фібриноутворення, що призводить до дефектів імплантації та зниження глибини децидуальної інвазії трофобласта. Антифосфоліпідні антитіла безпосередньо взаємодіють із синцитіотрофобластом і цитотрофобластом та інгібують міжклітинне злиття клітин трофобласта. Крім того, аФЛ пригнічують продукцію ХГ і підсилюють реакції згортання [31]. Другий триместр вагітності у жінки, яка страждає АФС, перебігає з ознаками внутрішньоутробної затримки розвитку плода і виникненням преєклампсії. Третій триместр небезпечний розвитком таких ускладнень як внутрішньоутробна загибель плода або передчасні пологи [58].

Процеси гіперкоагуляції у вагітних з АФС, ймовірно, пов'язані з тим, що з 24 тижня гестації починається формування третього кола кровообігу, в зв'язку з чим відбувається компенсоване пошкодження судинної стінки. Стан фізіологічної гіперкоагуляції в материнському організмі нейтралізується багатьма факторами [28].

Протромбін – глікопротеїн, який синтезується в печінці і бере участь у згортанні крові. Протромбін забезпечує утворення на мембрані пошкоджених

клітин комплексу факторів Va, Ха. В результаті цього в присутності іонів Ca^{2+} утворюється протромбіназний комплекс, який здійснює розщеплення протромбіну до тромбіну, що згодом призводить до перетворення фібриногену на фібрин. Антитіла, які є причиною виникнення ефекту вовчакового антикоагулянта (подовження часу фосфоліпідзалежних коагуляційних тестів), вимагають присутності плазмових протеїнів – $\beta_2\text{ГПІ}$ або протромбіну. Припускають, що зв'язування протромбіну з фосфоліпідами клітинних мембран збільшується в присутності антитіл до протромбіну, в результаті чого інші фактори коагуляції не можуть зв'язатися з фосфоліпідами; можливо, цим і пояснюється подовження часу фосфоліпідзалежних коагуляційних тестів. Є й інша точка зору, згідно з якою протромбін при наявності антитіл перехресно реагує з плазміногеном, унаслідок чого фібриноген не може бути перетворений на фібрин. Підвищений рівень антитіл до протромбіну, особливо у пацієнтів з АФС, збільшує ризик розвитку тромбозу глибоких вен. Антитіла до протромбіну інгібують фактори коагуляції, що призводить до подовження часу фосфоліпідзалежних коагуляційних тестів. Наявність антитіл до протромбіну асоціюється з тромбоемболією легеневої артерії і передчасним перериванням вагітності [110].

Тромбоцитопенія, що супроводжується агрегацією тромбоцитів, є одним із основних механізмів АФС та СЧВ [115, 166, 329, 370, 410]. Після слабкої активації тромбоцитів негативно заряджені фосфоліпіди експонуються на їх поверхні. Фосфоліпідозв'язуючі протеїни, наприклад $\beta_2\text{ГПІ}$, зв'язуються з негативно зарядженими фосфоліпідами на поверхні тромбоцитів, утворюючи антигенну мішень. аФЛ стабілізують цей зв'язок шляхом утворення комплексу з антигенною мішенню і додатково шляхом утворення зв'язку між $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ -рецептором із Fc-частиною антитіла, що призводить до трансдукції сигналу і активації тромбоцитів з реакцією звільнення і гіперагрегації. Пряма взаємодія $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ -рецептора з Fc-частиною антитіла неможлива: необхідний «посередник», який виступає в якості антигенної мішені для антитіла і локалізований на поверхні тромбоцита. Відбувається трансдукція сигналу і активація

тромбоцитів у результаті сигнал-обумовленої мобілізації кальцію з тубулярної системи в цитоплазму і активації фосфоліпази A₂, що веде до запуску арахідонового каскаду з утворенням значних кількостей тромбоксану A₂. Тромбоксан A₂ обумовлює розвиток інтенсивної незворотної внутрішньосудинної агрегації тромбоцитів, вазоконстрикції і призводить до порушень у мікроциркуляторному руслі [7, 9, 339]. Гіпотеза щодо активності β₂ГПІ, зв'язування аФЛ з тромбоцитами і активації тромбоцитів була запропонована J. Arnout і J. Vermilen. Відповідно до цієї гіпотези, попередня активація тромбоцитів, що продукуються при фізіологічних або патологічних станах, призводить до експресії ФЛ на поверхні тромбоцитів [9].

Отже, АФС є однією з аутоімунних причин звичного невиношування вагітності, що характеризується порушенням згортання крові, тромбоцитопенією. Патогенетичними механізмами втрати вагітності, яка опосередкована аФЛ, є тромбози, дефекти плацентації та місцеве запалення [57].

1.2.3. Дисрегуляція цитокінового балансу як один із факторів розвитку антифосфоліпідного синдрому

Окрім патогенної ролі аФЛ, значну роль у механізмах розвитку АФС відіграють цитокіни [373]. Цитокіни є необхідними трансмітерами міжклітинної взаємодії в нормі і при патології, вони утворюють систему комунікативних сигналів між клітинами імунної системи й клітинами інших органів і тканин, відіграють важливу роль у регуляції запальних реакцій, міжклітинних взаємодій в ендометрії, реалізації ендокринних ефектів, визначають процес інвазії трофобласта [57, 99, 118].

Основними джерелами цитокінів є CD4⁺ Т-лімфоцити, які поділяють на Т-хелпери типу 1 (Th1), які зумовлюють формування клітинної імунної відповіді, і типу 2 (Th2), які синтезують ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-6, ІЛ-9, ІЛ-10 і зумовлюють розвиток гуморальної імунної відповіді. При аутоімунних захворюваннях в основному

виявляється активація Th1-клітинної відповіді [8, 59, 151]. Цитокіни, синтезуючись у вогнищі запалення, впливають практично на всі клітини, які беруть участь у розвитку запалення, включаючи гранулоцити, макрофаги, фібробласти, клітини ендотелію, епітелію, Т- та В-лімфоцити [57]. Цитокіни зв'язуються зі специфічними рецепторами на цитоплазматичній мембрані клітин-мішеней, активуючи каскад реакцій, що веде до індукції, посилення або пригнічення активності регульованих ними генів [99]. Процеси запалення контролюють прозапальні (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , IFN) та протизапальні (IL-4, IL-10) цитокіни [297].

Однією з ланок патогенезу АФС є дисрегуляція цитокінового балансу. За даними літератури, розвиток АФС асоціюється з Th1 типом імунної відповіді. Ключова роль належить синтезу прозапальних цитокінів (Th1), насамперед TNF- α , IL-6, IL-1, які обумовлюють прояви системної відповіді на запалення при АФС, активують ендотеліальні клітини і макрофаги, індукуючи експресію молекул адгезії, регулюють синтез NO ендотеліальними клітинами [2].

Інтерлейкін-1 (IL-1) активує цитотоксичні Т-лімфоцити і NK-клітини (природні кілери); впливає на диференціювання Т- і В-лімфоцитів та інших імунокомпетентних клітин; бере участь у регуляції продукції IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулювального фактора (GM-CSF) та інших цитокінів. У родину інтерлейкіну-1 об'єднують IL-1 α , IL-1 β , рецепторний антагоніст IL-1 (IL-1Ra), рецептори IL-1R [99].

Експресія iNOS, яка регулюється на етапі транскрипції може відрізнитися залежно від типу клітини або виду. Прозапальні цитокіни, такі як інтерлейкін-1 (IL-1), фактор некрозу пухлин α (TNF- α), IFN- γ та LPS зв'язуються з рецепторами на клітинній поверхні та активують кінази, що призводить до фосфорилування різних внутрішньоклітинних білків та подальшої активації специфічних факторів транскрипції, включаючи фактори транскрипції ядерного фактора κ B, таких як перетворювач ядерного фактора 1 та активатор транскрипції 1 α . Потім активні фактори транслокуються в ядро, де вони зв'язуються з промоторною ділянкою гена iNOS та індукують експресію iNOS [197]. Експресія гена IL-1 у

гліальних клітинах викликає вторинну експресію гена iNOS, що призводить до гіперпродукції NO, інгібування ензимів дихального ланцюга мітохондрій та циклу Кребса, виснаження запасів нікотинамідаденіндинуклеотиду і аденозинтрифосфату, загибелі нейронів шляхом некрозу або апоптозу. Доведено, що секреція IL-1 β індукує синтез IL-6, S100B, α 1-антихімотрипсину та активує ензими iNOS, що призводить до підвищеного синтезу NO [96, 419].

IL-1 β і TNF- α є потужними регуляторами-індукторами молекул лейкоцитарно-ендотеліальної адгезії, які активують IL-8 та відіграють вирішальну роль у запуску міграції лейкоцитів із судинного просвіту в зону фокальної ішемії з інфільтрацією ними пошкодженої тканини [99]. IL-1, TNF- α та ендотоксини індукують експресію TF у клітинах ендотелію, моноцитах, макрофагах, сприяючи згортанню крові [57, 381]. Інгібіторами продукції IL-1 є IL-4, IL-10, IL-12, TNF- α [99].

Одним із головних регуляторів імунної відповіді, реакцій гострої фази запалення і гемопоезу є інтерлейкін 6 (IL-6). IL-6 виконує роль медіатора захисних процесів від інфекції і пошкодження тканин, а його продукція стимулюється іншими цитокінами: IL-1, IL-2, TNF- α [118]. IL-6 діє і як прозапальний цитокін, і як протизапальний міокін. Протизапальний ефект IL-6 реалізується через інгібування синтезу TNF- α і IL-1 β та активацію IL-1Ra і IL-10 [96]. З іншого боку, IL-6 індукує продукцію гострофазних білків, сприяє активації Т-лімфоцитів антигенпрезентуючими клітинами, посилює В-клітинну проліферацію та індукує утворення імуноглобулінів, стимулює гемопоез та утворення тромбоцитів [99].

TNF- α продукується обома типами Т-хелперів, тому може відігравати як захисну, так і ушкоджувальну роль. TNF- α активує ендотелій, сприяє адгезії лейкоцитів, активує лейкоцити, індукує продукцію інших прозапальних цитокінів: IL-1, IL-6, IFN, GM-CSF, які мають синергічну з TNF- α дію [2, 99, 174, 381]. TNF- α і розчинний TNF- α -рецептор 1 (pTNF α R1) беруть участь у розвитку аутоімунних захворювань, апоптозу [91].

Активация В2ГПІ, який зв'язують аФЛ, відбувається за посередництвом TNF- α , IL-3, IFN- γ [57]. За результатами дослідження Н. В. Середавкиної [91] встановлено підвищену концентрацію IL-6 і TNF- α у хворих з АФС, порівняно з контрольною групою. Після активізації ендотеліальних клітин регуляція TF може бути додатково посилена синергетичним ефектом TNF- α та фактора Ха, відбувається експресія молекул адгезії (ICAM-1, VCAM-1, селектини E і P) [381]. Прозапальні цитокіни TNF- α , IFN- γ , IL-2 індукують синтез iNOS [116]. Водночас в експериментальних умовах показано, що TNF- α може проявляти антитромбоцитарну активність [381]. Збільшення концентрації TNF- α пов'язують із невиношуванням вагітності при АФС [91], активацією ендотеліоцитів і ампліфікацією хемокінів, що призводить до субендотеліальної акумуляції лейкоцитів, дисфункції ендотелію, порушення мікроциркуляції [99].

Різні імунокомпетентні клітини регулюють прозапальний каскад, що призводить до цитокінового дисбалансу та активованого циркулюючого лімфоцитарного пулу при АФС. Цей прозапальний процес призводить до ендотеліальної дисфункції, розвитку артеріальних та венозних тромбозів. IL-4 стимулює В- та Т-клітинну проліферацію. Пошкодження балансу між запальним процесом та протизапальною відповіддю може призводити до імуносупресії [297]. IL-10 пригнічує секрецію IL-4, IL-5 та IFN, факторів росту та хемокінів, а тому діє як ключовий регулятор аутоімунних процесів [373]. Однією з функцій IL-10 є пригнічення синтезу прозапальних цитокінів (IL-1, IL-6, IL-12 і TNF α) через STAT3-залежний механізм [254] та посилення експресії антагоніста рецептора IL-1 [96]. Знижений рівень IL-10 у сироватці крові при АФС, порівняно з контролем, підтверджує факт, що при АФС процеси, опосередковані IL-10, є порушеними, що призводить до пошкодження судин [373].

При АФС, СЧВ, ревматоїдному артриті виявляється порушення як у ланці Th1, так і в ланці Th2. У патогенезі катастрофічного АФС ключова роль належить активації прозапальних цитокінів, насамперед TNF- α , IL-6, IL-1, які обумовлюють розвиток проявів системної відповіді на запалення [8, 59].

Згідно з сучасними уявленнями про механізми розвитку АФС, його клінічні прояви під час вагітності можуть бути реалізованими не лише через надлишкове тромбоутворення [13, 242]. Сьогодні вважають, що нормальний перебіг вагітності визначається співвідношенням імуномодулювальних та імуносупресивних ефектів в організмі матері, в реалізації яких безпосередню участь беруть регуляторні протеїни – компоненти системи цитокінів, які впродовж гестаційного періоду здійснюють регуляторну функцію за допомогою різних механізмів, спрямованих на збереження і розвиток вагітності [118].

Імунологічні зміни, які виникають при вагітності, частково можна пояснити зміною гормонального рівня, включаючи прогестерон, естрадіол, простагландини. У той час як вагітність в основному характеризується протизапальною імунологічною толерантністю, запальні процеси відбуваються під час різних фаз вагітності, включаючи імплантацію, плацентацію та підготовку до пологів [184]. Відомо, що при фізіологічній вагітності переважає Th2-клітинна відповідь, тоді як підвищення продукції прозапальних цитокінів асоціюється з розвитком невиношування вагітності і гестозів [107, 184].

АФС є однією із причин перинатальної смертності, пов'язаної з такими патологічними станами як затримка внутрішньоутробного розвитку плода, передчасні пологи, гестоз [8, 9, 59, 311]. При спонтанному розвитку загрози переривання вагітності найчастіше відбувається активація IL-1, IL-6, TNF- α , IL-8 [118].

Антитіла проти β 2ГПІ активують продукцію цитокінів у першому триместрі вагітності [57]. Під час другої імунологічної фази вагітності материнський організм, плацента і плід адаптуються один до одного і переважає протизапальний імунологічний стан. Умовною концепцією цього протизапального стану є перехід від продукції запальних цитокінів Th1 до протизапальних цитокінів Th2. Спостерігається активація цитокінів IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, що мінімізує активацію цитокінів типу Th1. У нормі перебіг

вагітності характеризується як Th2-домінантний стан. Точний механізм, за допомогою якого імунні фактори спричиняють повторний викидень, є невизначеним, але може включати модуляцію або дисбаланс між різними клітинами імунної системи [151, 419].

Домінування прозапальних цитокінів викликає патологію розвитку плаценти та плода і може зумовити його внутрішньоматкову загибель. Проте, вони також можуть запобігати патологічному розростанню трофобласта, а TNF- α здатний захищати фетоплацентарний комплекс [57]. аФЛ-індуковане запалення трофобластів призводить до синтезу прозапальних IL-1 β та IL-8 за допомогою активації Toll-подібного рецептора 4 та його адаптерного протеїну MyD88 [147]. Ендотеліальні клітини одночасно є продуцентами та ефекторами IL-1, IL-6, IL-8 і при активації впливають на синтез цих цитокінів. IL-1 стимулює продукцію простагландинів децидуальною оболонкою міометрія [118].

Роль експресії IL-6 під час вагітності, а також її прогностичне значення для результату вагітності, вивчені недостатньо [151]. У нормі спостерігається мінімальна продукція IL-6, який є маркером інфекції під час вагітності [118].

Визначена провідна роль TNF- α як одного з головних медіаторів запальної відповіді у розвитку акушерських ускладнень при АФС [8, 59]. аФЛ викликають швидке підвищення децидуальних та системних рівнів TNF- α . TNF- α – це посередник, який зв'язує взаємодію комплементу C5a-C5aR та аФЛ з ураженням плода [147]. Відомі різні механізми, через які TNF- α може спричиняти втрату вагітності. TNF- α підсилює синтез простагландинів, що призводить до скорочення матки [118]. Інший механізм – це участь TNF- α у процесах апоптозу. Підвищений рівень TNF- α негативно впливає на імплантацію ембріона і зменшує приплив крові до нього, що призводить до тромбозу в судинах. Висока концентрація TNF- α може бути пов'язана з розвитком таких ускладнень як гестоз та гестаційний цукровий діабет [151].

Успішна вагітність залежить від балансу між Th1 і Th2, які беруть участь у рості та розвитку плода. У дослідженні на здорових вагітних було встановлено зниження прозапальних цитокінів, таких як TNF- α , IL-1 β , та збільшення

концентрації протизапальних цитокінів, таких як IL-10 [151]. За даними І. Б. Венцківської [13], вагітні з АФС мали вірогідно менші концентрації протизапальних IL-4 та IL-10, ніж пацієнтки контрольної групи.

Під час вагітності відбувається ряд змін, спрямованих на її збереження і запобігання відторгненню плідного яйця. До цих змін належить посилення гуморального імунітету і продукції цитокінів Th2 (IL-4, IL-10) [118]. За даними І. Б. Венцківської [13] роль протизапальних цитокінів при вагітності, крім пригнічення клітинної ланки імунної системи, полягає ще й в антагонізмі з прозапальними цитокінами відносно сполучнотканинних компонентів шийки матки.

Отже, важливим фактором імунопатогенезу АФС є дисрегуляція цитокінового балансу із збільшенням синтезу прозапальних цитокінів. Незважаючи на існування ряду наукових досліджень, присвячених цьому питанню, патобіохімічні зміни рівня цитокінів за умов АФС залишаються недостатньо з'ясованими, як і роль системи NO у підтриманні їх балансу під час вагітності при АФС.

1.2.4. Апоптоз при антифосфоліпідному синдромі, вплив нітроген оксиду на процеси реалізації апоптозу

Апоптоз, або програмована загибель клітин, – значно поширене явище, що стосується будь-якого ядерного типу клітин та є головним елементом гомеостазу імунної системи. Різні подразники фізіологічного або патогенного характеру можуть спровокувати апоптоз через зовнішній шлях рецептора смерті або внутрішній мітохондріальний шлях. Індукція та реалізація апоптозу вимагають співпраці низки молекул, включаючи сигнальні молекули, рецептори, ензими та гени, що регулюють білки. Серед них життєво важливою у механізмах апоптозу є сигнальна система каскаду каспаз, яка регулюється різними молекулами, такими як інгібітор білка апоптозу (IAP), білки родини Bcl-2 та кальпаїн [24, 204].

Каспази, родина аспартат-специфічних цистеїнових протеаз, мають вирішальне значення в ініціації та здійсненні апоптозу. Каспази, що беруть участь в апоптозі, зазвичай поділяють на дві категорії: ініціаторні каспази, до яких належать каспаза-2, -8, -9 та -10, і ефекторні каспази, до яких належать каспаза-3, -6 та -7 [190, 204].

Усі каспази синтезуються в клітинах як каталітично неактивні зимогени і повинні пройти протеолітичну активацію під час апоптозу. Активація ефекторної каспази (наприклад, каспази-3 або -7) виконується ініціаторною каспазою (такою, як каспаза-9) шляхом розщеплення на специфічних внутрішніх залишках аспарагінової кислоти. Ініціаторні каспази аутоактивуються. Оскільки активація каспази-ініціатора в клітинах неминуче запускає каскад активації каспаз, вона жорстко регулюється і часто вимагає участі багатьох компонентів апоптозу.

Активації прокаспази-9 сприяють Араф-1 і цитохром С, які утворюють комплекс, що називається апоптосомою, за участі дезоксиаденозинтрифосфату або аденозинтрифосфату. Після активації ефекторні каспази відповідають за протеолітичне розщеплення широкого спектра клітинних мішеней, що зрештою призводить до загибелі клітин.

Відомі клітинні субстрати каспаз – це різноманітні внутрішньоклітинні поліпептиди, включаючи основні структурні елементи цитоплазми та ядра (такі як актин та ядерний ламін), компоненти ДНК, регуляторні білки та ряд протеїназ. У результаті ці процеси руйнують механізми виживання та дезорганізують важливі архітектурні компоненти клітини, викликаючи типові морфологічні та біохімічні зміни, що характеризують апоптотичну загибель клітин. Ключовим фактором апоптозу вважають каспазу-3 [204, 345].

Активність каспаз піддається гальмуванню родиною білків ІАР. Ідентифіковано вісім чітких ІАР ссавців, мішенню для яких є ініціаторна каспаза-9 та ефекторні каспази-3 та -7. Ці інгібітори апоптозу не впливають на інші каспази: -6 або -8. Дослідження топології ліпідів у клітинах еукаріотів демонструє фізіологічну асиметрію розподілу фосфоліпідів у клітинних

мембранах. Фосфатидилхолін та сфінгомієлін розташовані у зовнішньому шарі плазматичної мембрани, тоді як фосфатидилсерин та 70 % фосфатидилетаноламіну розташовані у внутрішньому шарі. Кардіоліпін (КЛ) у нормі здебільшого знаходиться в мітохондріальній мембрані. аКЛ IgG, отриманий з сироватки пацієнтів з АФС, зв'язується з КЛ на поверхні апоптотичних клітин. Вивільнення TNF- α може посилити цей процес, викликаючи подальший апоптоз [281].

Показано, що мішенню багатьох аФЛ є комплекс між аніонним ФЛ та β 2ГПІ [248]. Хоча аніонні ФЛ на зовнішній поверхні клітинних мембран зазвичай відсутні, при апоптозі вони перерозподіляються від внутрішнього до зовнішнього шару біомембрани. β 2ГПІ селективно зв'язується з поверхнею апоптотичних, але не життєздатних, клітин, при цьому утворюється епітоп, який розпізнається аФЛ від пацієнтів як з первинним АФС, так і з СЧВ [169].

аФЛ сприяють порушенню плацентації внаслідок прямого пошкодження клітин, індукції апоптозу, пригнічення проліферації і утворення синцитію, порушення інвазії трофобласта, блокування ендометріального ангиогенезу, і знижують продукцію хоріонічного гонадотропіну [64].

Специфічні зміни ліпідного складу відбуваються не тільки на плазматичній мембрані, а й у внутрішньоклітинних мембранах. Одним із важливих аспектів апоптотичних змін клітинних ліпідів є перерозподіл специфічного для мітохондрій фосфоліпиду – КЛ, який переважно знаходиться у внутрішній мітохондріальній мембрані [290]. Після стимуляції рецепторів смерті КЛ концентрується у мітохондріальних «raft-like» мікродоменах у місцях контактів між внутрішньою та зовнішньою мітохондріальними мембранами, що призводить до локальної олігомеризації проапоптотичних білків. Це пов'язано із шляхами ремоделювання КЛ, які взаємодіють із мембранними потоками, залежними від бета-актину клітинного цитоскелета. При АФС під час опосередкованого рецептором смерті апоптозу КЛ переміщується на клітинну поверхню, де реагує з сироватковими аутоантитілами. Під час апоптозу КЛ та його метаболіти переміщуються

з мітохондрій в інші внутрішньоклітинні органели з перетворенням на немітохондріальні ліпіди [281, 290, 336].

NO має як про-, так і антиапоптотичну дію, що визначаються його концентрацією, джерелом синтезу та біологічним середовищем. NO індукує апоптоз за допомогою модуляції численних рецепторів сигнальних шляхів, включаючи обидва – рецептор смерті і мітохондріальні шляхи. Fas (APO-1 / CD95) належить до суперродини рецептора фактора некрозу пухлин. Зв'язування Fas-ліганду з цим рецептором за участі NO ініціює утворення сигнального комплексу, який індукує смерть, активує протеолітичні каскади каспази-8 і запускає апоптоз. Дослідники виявили, що NO може модифікувати цитоплазматичний домен Fas шляхом S-нітрозилювання залишків цистеїну 199 та 304. Bcl-2 є ключовим регуляторним білком апоптозу мітохондріального шляху, експресія якого значною мірою контролюється посттрансляційними модифікаціями. Bcl-2 зазнає S-нітрозилювання ендogenous NO у відповідь на численні апоптотичні медіатори [279, 328, 418].

І мітохондріально залежні, і незалежні апоптотичні сигнальні шляхи опосередковують дихотомічну клітинну відповідь на NO. Молекулярні механізми, що стоять за цими ефектами, є складними і включають ряд молекул, пов'язаних з NO, які більш реактивні, ніж сам NO. Місцеве клітинне середовище відіграє динамічну роль у визначенні природи та концентрації цих молекул. До важливих компонентів мікросередовища належать: клітинний окиснювально-відновний стан, глутатіон, перехідні метали та наявність інших радикалів. Зокрема, редокс-чутливі нітрозуючі сполуки сприятливо генеруються у фізіологічних умовах і здатні модифікувати декілька клітинних сигнальних шляхів за допомогою зворотних реакцій S-нітрозування [360].

Вивільнення цитохрому C із мітохондрій є важливим механізмом активації каспази-3 та ініціювання загибелі клітин у відповідь на «внутрішні» проапоптотичні подразники. У свою чергу, каспази та пов'язані з мітогеном протеїн-кінази можуть модулювати вивільнення цитохрому C завдяки їх впливу на білки родини Bcl-2. Клітинне середовище відіграє важливу роль у визначенні

ролі NO та здатності S-нітрозування регулювати мітохондріально-залежний апоптоз [195].

NO-опосередкована ініціація активації каспаз була виявлена в клітинах гладкої мускулатури судин і гангліях сітківки ока. Механізми її пов'язані з інактивацією інгібітора апоптозу (XIAP) [345]. XIAP – це найширше експресований інгібітор апоптозу, який регулює виживання клітин за рахунок зв'язування з каспазами. Дослідники продемонстрували, що S-нітрозилювання XIAP погіршує його здатність інгібувати активність каспази-3. Антиапоптотична дія NO включає як рецептор смерті, так і мітохондріальні шляхи апоптозу. Активність каспази-3 інгібується її посттрансляційним S-нітрозилюванням [360].

Активацію каспаз, індукцію iNOS та рівень апоптозу досліджували в клітинній культурі, обробленій TNF- α [176]. Інкубація з TNF- α призвела до активації каспазного каскаду і супроводжувалася апоптозом. Одночасно, TNF- α стимулював індукцію iNOS та генерацію NO. Інгібітори каспази ефективно гальмували активацію каспаз та запобігали апоптозу.

Загибель апоптотичних клітин зменшилась до аналогічного ступеня після інгібування iNOS L-нітро-аргінін-метил-ефіром (L-NAME). Пригнічення загибелі клітин шляхом інгібування каспаз не призвело до зниження активності iNOS. Також профілактика апоптозу, залежна від L-NAME, не була пов'язана з інактивацією каспаз. У підсумку, TNF- α індукує апоптоз у клітинній культурі, ініціюючи двосторонній ефекторний шлях, що включає індукцію iNOS та активацію каспази-1 та -3. Обидва механізми, ймовірно, однаково важливі для здійснення апоптозу [176].

Деякі вчені [383] постулюють більш високі рівні у плазмі залежного від TNF-фактора ліганду, що індукує апоптоз (sTRAIL), IL-10 та TNF- α в осіб з первинним АФС, порівняно зі здоровими людьми, але відмічають відсутність значної різниці в апоптозі лімфоцитів/моноцитів у крові між пацієнтами з первинним АФС та здоровим контролем.

NO відіграє важливу роль у апоптозі клітин печінки. Існує зв'язок між зниженням рівня NO та пригніченням апоптозу гепатоцитів під час ураження печінки [284, 401]. Показано зв'язок між підвищеним рівнем NO та апоптозом гепатоцитів під час ураження печінки. Доведено, що зниження рівня NO може впливати на апоптоз печінки, сприяючи або інгібуючи сигнальний шлях за участю родини каспаз, Bcl-2, мітохондрій, окисного стресу, рецепторів смерті та протеїназ, активованих мітогеном тощо. NO, що утворюється ендогенними синтазами NO або при застосуванні донорів NO, може сприяти або запобігати апоптозу, індукованому різними проапоптотичними стимулами, в моделях клітинної культури [163].

Отже, NO чинить суперечливі ефекти у регуляції апоптозу. Частково причина полягає в тому, що дія NO опосередковується різними шляхами і активується різними концентраціями NO. Проапоптотичні ефекти, ймовірно, пов'язані з патофізіологічними станами, коли iNOS виробляє велику кількість NO. Навпаки, продукція NO за допомогою eNOS та nNOS пригнічує апоптоз і спричиняє фізіологічні ефекти NO.

Таким чином, молекули кардіоліпіну можуть експресуватися на клітинній поверхні після появи апоптотичних стимулів. Доведена потенційна роль окиснення в генеруванні епітопів, які відповідають за розпізнавання та індукцію аФЛ. Апоптотичні клітини можуть відігравати подвійну роль в АФС: (I) як імуногени для індукції аФЛ (етіологія) та (II) як мішені для аФЛ, що призводить до хронізації запалення та розвитку аутоімунних захворювань (патогенез) [155].

1.3. Роль антифосфоліпідних антитіл у формуванні акушерських ускладнень при антифосфоліпідному синдромі

Серед аутоімунних причин невиношування вагітності перше місце займає АФС [3, 20, 26, 106].

До проблем репродукції, асоційованих із циркуляцією аФЛ, належать звичне невиношування вагітності, гестоз, прееклампсія, плацентарна недостатність і внутрішньоутробна затримка розвитку плода, передчасне відшарування нормально розташованої плаценти, невдалі спроби екстракорпорального запліднення [117, 384]. Частота прееклампсії в загальній популяції становить приблизно 10 %, а у вагітних із АФС цей показник коливається від 17 до 50 %. Фетоплацентарна недостатність у жінок із аФЛ трапляється у 13–30 % випадків, передчасні ж пологи відмічаються у майже 22 % вагітних із АФС [101]. У жінок з втратою вагітності поширеність аФЛ в середньому становить 16 %. Встановлено, що у пацієток з АФС може спостерігатися судинний тромбоз без ускладнень вагітності або, навпаки, тільки акушерські прояви АФС [64]. У жінок із безпліддям і обтяженим анамнезом виявляли антитіла до фосфатидилсерину – у 10 %, антитіла до фосфатидилінозиту – у 8 %, антитіла до фосфатидилової кислоти – у 7 %, антитіла до анексину V – у 14 %, антитіла до протромбіну – у 7 % випадків [47, 49]. У всіх новонароджених дітей, що народилися у жінок з АФС, у першу добу життя виявляють циркуляцію аФЛ у крові, що підтверджує їх плацентарну передачу [39].

Етіологія невиношування вагітності різноманітна і залежить від численних факторів, що діють одночасно або послідовно. Однією з причин репродуктивних втрат є порушення імунних механізмів, що забезпечують нормальне запліднення яйцеклітини, імплантацію і плацентацію, інвазію трофобласта. АФС, поєднуючись з іншими порушеннями, ускладнює перебіг вагітності. Вважають, що в основі внутрішньоутробної загибелі плода лежить гіпоксія, зумовлена недостатнім матково-плацентарним кровотоком унаслідок тромбозу судин плаценти і порушення імплантації ембріона [26].

Патогенез АФС, включаючи акушерські ускладнення, універсальний і реалізується через порушення мікроциркуляції, гемостазу і патологію судинної стінки. Однак саме при вагітності виникає унікальна, комплексно функціонуюча

система трьох ендотеліальних поверхонь – фетоплацентарного ендотелію, ендотелію судин матки і ендотелію трофобласта [9].

Основні механізми розвитку акушерської патології при АФС [9, 55]:

1. Пригнічення синтезу простагліну і порушення в системі простагліну-тромбоксан А₂ з переважанням останнього. Простаглін є потужним вазодилатором і найсильнішим ендогенним інгібітором агрегації тромбоцитів, виробляється клітинами ендотелію судин і міометрія. аФЛ здатні знижувати активність фосфоліпази А₂ і порушувати зв'язування ензиму з фосфоліпідною поверхнею ендотелію. Підвищується продукція тромбоксану А₂, що призводить до гіперагрегації тромбоцитів.

2. Ендотеліальні пошкодження сприяють зниженню активності антитромбіну ІІІ, який є природним потужним інгібітором згортання, на частку якого припадає 75 % антикоагулянтної активності (він синтезується у печінці, накопичується в ендотелії судин, нейтралізує тромбін, активні фактори XII, XI, X, IX, калікреїн тощо).

3. Порушення ендотелію викликає експресію ендотеліальних прокоагулянтів: тканинного фактора, фактора Віллебранда, фактора активації тромбоцитів, активатора інгібітора плазміногену типу 1.

4. Велика частка тромбогенного ефекту аФЛ реалізується через пригнічення системи протеїну С. Протеїн С – вітамін К-залежний протеїн, що синтезується у печінці, конвертується в активну форму тромбіном в присутності кофактора ендотелію тромбомодуліну. При цьому відбувається не тільки активація протеїну С, а й втрата тромбіном його здатності активувати тромбоцити і перетворювати фібриноген на фібрин. Активований протеїн С блокує фактори VIII і V і пригнічує активацію ІАР-1, посилюючи фібринолітичну активність. Антикоагулянтний і фібринолітичний ефекти активованого протеїну С посилюються його кофактором – протеїном S [175].

Крім тромботичних механізмів, патогенез акушерських ускладнень при АФС обумовлений і нетромботичними ефектами аФЛ: змінюються адгезивні характеристики передімплантаційного ембріона; порушується злиття синцитію;

знижується глибина інвазії трофобласта; пригнічується продукція хоріонічного гонадотропіну, що стимулює вироблення в плаценті відповідального за підтримку вагітності плацентарного прогестерону [9].

Під час вагітності при АФС спочатку пошкоджуються матково-плацентарні судини, і лише потім – ворсини плаценти. Через порушення згортання крові трапляються тромбози спіральних судин, судин плода і хоріона, надмірне відкладання фібрину на трофобласті [3, 113].

Механізм, за допомогою якого аФЛ призводять до втрати вагітності у пацієнок з АФС, вивчений недостатньо. Спочатку вважали, що це пов'язано в основному з внутрішньоплацентарним тромбозом, втім, ці дані є суперечливими. аФЛ впливають на імплантацію ембріона в матку, пригнічують міграцію клітин трофобласта та порушення експресії маркерів диференціації ендометрія. Трофобласт експресує $\beta 2$ ГПІ, а екзогенний $\beta 2$ ГПІ може зв'язуватися з поверхнею клітин трофобласта. Таким чином, аФЛ можуть зв'язуватися з $\beta 2$ ГПІ на трофобласті та чинити патогенну дію [341]. Висока частота виявлення комплексу $\beta 2$ ГПІ з аКЛ на мембранах трофобласта та на ендотелії судин плаценти у жінок з несприятливим завершенням вагітності свідчить про роль $\beta 2$ ГПІ у розвитку патологічних процесів у плаценті [389].

При взаємодії аФЛ з ендометрієм та ембріоном спостерігаються порушення імплантації, плацентації, виникнення мікротромбозів у спіральних артеріях, плацентарна недостатність [38].

У процесі підготовки до імплантації під впливом прогестерону в ендометрії відбувається підвищення вмісту інгібітора активатора плазміногену 1, тканинного фактора і зниження вмісту активаторів плазміногену тканинного і урокіназного типів, зниження металопротеїназ матриксу та вазоконстриктора ендотеліну-1. Ці механізми регуляції гемостазу, фібринолізу, екстрацелюлярного матриксу і судинного тонузу запобігають утворенню геморагій при інвазії трофобласта. Ембріон синтезує активатори плазміногену тканинного і урокіназного типів і протеази, які необхідні для руйнування екстрацелюлярного матриксу в процесі імплантації [9].

Антифосфоліпідні антитіла змінюють адгезивні властивості передімплантаційної морули, підсилюють протромботичні механізми та десинхронізують процеси фібринолізу й фібриноутворення, підвищуючи експресію інгібітора активатора плазміногену 1 і тканинного фактора, що призводить до виникнення дефектів імплантації та зменшення глибини інвазії трофобласта. При наявності аФЛ порушується процес інвазії трофобласта в спіральні артерії, який пов'язаний з продукцією ацетилгліцеринового ефіру фосфатидилхоліну. Антифосфоліпідні антитіла інгібують синтез судинного кофактора тромбомодуліну, на який багаті ворсини хоріона, та пригнічують продукцію хоріонічного гонадотропіну [101]. Однією з мішеней для аФЛ може бути фосфатидилсерин, який експресується на поверхні клітин трофобласта в період диференціації та інвазії. Антифосфоліпідні антитіла здатні пригнічувати проліферацію та диференціацію трофобласта [389].

Відомо, що анти- β 2ГПІ-антитіла у пацієнтів з АФС впливають на життєздатність та вироблення цитокінів у трофобластах [341].

У вагітних з АФС встановлено зниження рівня інтерлейкіну-3 (ІЛ-3), який є активним чинником зростання трофобласта, сприяє імплантації і розвитку плаценти, а також має регуляторну дію на фібринолітичні процеси в ендометрії (за рахунок активації урокінази, що перетворює плазміноген на плазмін) [9]. Антифосфоліпідні антитіла зумовлюють розвиток гострого запалення, спричиняючи міграцію нейтрофілів [55, 165, 389, 410].

В умовах циркуляції аФЛ спостерігається постійна активація системи комплементу, механізми захисту виявляються неспроможними, що призводить до формування запальних процесів і тканинного пошкодження у плода. Компонент С5а сприяє залученню моноцитів, нейтрофілів, з яких вивільняється велика кількість медіаторів запалення, включаючи хемокіни, цитокіни, протеолітичні ензими, АФО. Протеази, які секретуються клітинами у локусі запалення, безпосередньо розщеплюють С5 і сприяють подальшій активації комплементу. У досліджах на мишах було показано, що пасивне перенесення людських аФЛ IgG викликає активацію комплементу, посилює розвиток

тромбозу, тоді як при інгібуванні системи комплементу вдається запобігти втратам плода і внутрішньоутробній затримці росту плода [9, 158, 191, 270].

При АФС відбувається зниження активності анексину-V через блокування його транспорту на мембрану трофобласта, а також шляхом його видалення з трофобласта з подальшим протеолізом [3]. аФЛ в присутності β 2ГПІ здатні знижувати експресію анексину-V на поверхні мембран [67]. Інфаркт плаценти також пов'язують із аФЛ-залежним зниженням експресії анексину-V на поверхні плацентарних ворсинок, здатністю аФЛ перехресно реагувати з клітинами трофобласта [26, 101, 384].

Оскільки для АФС характерний високий ризик рецидиву тромбозів, більшість пацієнок потребує проведення тривалої профілактичної антикоагулянтної терапії. Специфічні методи терапії імунopatологічних порушень, що лежать в основі АФС, не розроблені. Для запобігання та лікування ускладнень вагітності у пацієнок з АФС продовжують використовувати антиагреганти (найчастіше кислоту ацетилсаліцилову) та антикоагулянти прямої (в тому числі низькомолекулярні гепарини) та непрямої дії [29, 67, 87, 150, 159, 210, 311, 340, 364].

Своєчасна діагностика і адекватна терапія АФС у вагітних, контроль за лабораторними показниками системи гемостазу, регулярні спостереження за станом плода дозволяють поліпшити перебіг вагітності, пологів та післяпологового періоду [20].

1.4. Поліорганні ураження при антифосфоліпідному синдромі

Поліорганні ураження найяскравіше проявляються при КАФС, який характеризується швидким розвитком та супроводжується розвитком поліорганної недостатності на фоні високого титру антитіл до фосфоліпідів [108, 295]. Хоча КАФС розвивається у менш ніж 1 % пацієнтів з АФС, він є загрозливим для життя станом і вимагає невідкладної терапії [8]. Необхідно зазначити, що оптимальне лікування КАФС не розроблено і смертність

при ньому сягає 50 %. Вивченню цього синдрому в останні роки приділяється пильна увага, але часто він не діагностується, а тому не застосовуються необхідні методи терапії [36]. КАФС розвивається як у жінок, так і в чоловіків. У жінок він трапляється удвічі частіше, а перебіг та наслідки гірші у чоловіків. У 45 % випадків КАФС є першим проявом захворювання [108].

Під впливом аФЛ відбувається формування прокоагулянтного і прозапального потенціалу, на фоні якого під дією додаткових провокуючих чинників розвивається КАФС, тобто реалізується декомпенсація системи гемостазу, запускається системна запальна відповідь і формується поліорганна недостатність [8]. Провокуючими факторами для розвитку КАФС можуть стати інфекція, хірургічні втручання (наприклад, гістеректомія, кесарів розтин, холецистектомія), навіть невеликі (екстракція зуба, біопсія), відміна антикоагулянтів, використання деяких лікарських препаратів (найчастіше оральних контрацептивів), онкологічні захворювання. При КАФС за короткий проміжок часу (протягом 1 тижня) відбувається розвиток множинних тромбозів різних органів. На противагу некатастрофічним АФС, спостерігається множинна оклюзія судин дрібного калібру (хоча можуть залучатися і більші судини) [8, 108].

Дані Міжнародного реєстра КАФС поки не дозволяють зрозуміти причини його виникнення. На сьогодні відсутні дослідження, які пояснюють механізм розвитку КАФС. З одного боку, тромбоз може бути наслідком тривалої оклюзії, підвищеного утворення тромбіну, зниження фібринолізу. З іншого боку, поліорганне пошкодження при КАФС може бути обумовлено розвитком синдрому системної запальної відповіді в результаті надмірного виділення цитокінів з ішемічних і некротичних тканин [86].

Активація ендотеліальних клітини, ймовірно, сприяє утворенню підготовчого сигналу для КАФС – комплексу імунних стимулів, що включає цитокіни (TNF- α , IL-1 β , IFN), компоненти комплементу (C3b, C3b і C5a, C5b-9) і аутоантитіла [180, 270, 344]. аФЛ мають прокоагулянтну і прозапальну активність, реалізуючи свій вплив на гуморальному і клітинному рівнях.

Антитіла до $\beta 2$ ГПІ забезпечують транслокацію фактора транскрипції NF- κ B в ядро ендотеліальної клітини, що призводить до активації експресії прозапальних цитокінів (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8) і прокоагулянтних факторів (TF, інгібітора активатора плазміногену PAI-1) [344].

Отже, КАФС є тромботичним мікроангіопатичним станом, що характеризується дифузною тромботичною мікрovasкулопатією. Подібні порушення можуть виникати і при таких захворюваннях як **тромботична тромбоцитопенічна пурпура**, гемолітичний уремичний синдром, злаякісна гіпертензія, HELLP-синдром, післяпологова ниркова недостатність і прееклампсія. Тромботична мікроангіопатія, що супроводжується наявністю аФЛ у крові, описана при всіх перерахованих вище станах, що дозволило сформулювати концепцію «мікроангіопатичного антифосфоліпід-асоційованого синдрому». Однак джерело і патогенетичний потенціал аФЛ у таких хворих залишаються невідомими. Вважають, що аФЛ можуть викликати пошкодження ендотеліальних клітин, що призводить до катастрофічних наслідків. Своєчасна ідентифікація хворих з АФС із високим ризиком розвитку КАФС може мати велике значення для запобігання катастрофічним випадкам у хворих з аФЛ [86, 218, 269].

На 10-му Міжнародному конгресі з АФС (Сицилія, 2002) були прийняті критерії класифікації КАФС: клінічні прояви оклюзії судин трьох або більше органів; розвиток клінічних проявів одночасно або з проміжком не більше одного тижня; гістологічне підтвердження оклюзії судин дрібного калібру щонайменше в одному органі; лабораторне підтвердження наявності аФЛ (ВА, і/або аКЛ, і/або $\beta 2$ ГПІ). КАФС характеризується високим ризиком атипових тромбозів (кісткового мозку, органів репродуктивної системи), розвитком тромбозів за короткий період часу (менше одного тижня), поліорганної недостатності, синдрому системної запальної відповіді, утворенням тромбів у дрібних судинах. Ряд авторів вважають, що такі акушерські ускладнення як HELLP-синдром, еклампсія, передчасне відшарування нормально розташованої плаценти можуть бути проявами КАФС [8, 36, 156, 359].

Для КАФС найхарактерніші ниркові, легеневі, церебральні та гастроінтестинальні тромбози. У незначної кількості пацієнтів з КАФС розвиваються тромбози великих судин (вен нижніх кінцівок, коронарних і церебральних артерій), тобто прояви, характерні для класичного АФС [108].

При АФС порушуються функції ЦНС, нирок, печінки, ендокринних залоз, серцево-судинної системи, шлунково-кишкового тракту [108]. Неврологічна дисфункція може бути пов'язана з безліччю імуноопосередкованих судинних, запальних та прямих нейронних ефектів. аФЛ можуть активувати ендотеліальні клітини, тромбоцити та каскади згортання крові. Зокрема, аФЛ індукують прозапальні та прокоагулянтні процеси в ендотеліальних клітинах мікроциркуляторного русла мозку [272, 313]. У багатьох хворих з АФС спостерігаються неврологічні порушення, зумовлені пошкодженням головного мозку [41, 230, 244, 295, 351]. При експериментальному АФС у мишей розвивається дисфункція головного мозку: відбувається зв'язування аФЛ із ендотелієм судин мозку, викликаючи мікротромбоз, дисфункцію ендотелію та витікання IgG через гематоенцефалічний бар'єр; продукування цитокінів запальними клітинами призводить до подальшого порушення гематоенцефалічного бар'єру [262]. Зв'язування аФЛ з β 2ГПІ супроводжується пригніченням цереброваскулярного атерогенезу. В експериментальних моделях це призводить до пошкодження мембран нейронів та астроцитів і знижує життєздатність клітин. аФЛ також деполяризують синаптичні екстракти мозку, чинять нейротоксичний вплив на клітини через перенапруження рецепторів глутамату або шляхом прямої реакції з ліпідами головного мозку [313].

Неврологічні прояви АФС найчастіше представлені цереброваскулярними порушеннями – рецидивними ішемічними атаками та ішемічними інсультами [90]. Частота ішемічних інсультів, зумовлених синтезом антитіл до фосфоліпідів, у молодих пацієнтів складає 11–13 % [41]. Цереброваскулярні порушення при АФС у 75 % випадків супроводжуються ішемічними інсультами. Ризик повторного інсульту в молодих пацієнтів із антитілами до фосфоліпідів у вісім разів вищий, ніж у пацієнтів, в яких не виявлено цих антитіл. У пацієток із АФС

інсульту можуть виникати під час вагітності, після пологів або медичних абортів [108]. Інсульти при АФС трапляються переважно у жінок. Деякі порушення мозкового кровообігу перебігають безсимптомно і їх випадково виявляють при магнітно-резонансній томографії. Множинні мікроінфаркти призводять до атрофії кори. Рецидивні інсульти призводять до розвитку мультиінфарктної деменції. Психічні порушення при АФС перебігають за типом прогресуючого недоумства: погіршуються пам'ять і когнітивні здібності, порушуються емоційний контроль і соціальна поведінка.

Ряд неврологічних порушень при АФС не пов'язані з ішемією, а є наслідком первинного імуніопосередованого пошкодження мозку і периферійної нервової системи [90, 187]. З цим механізмом пов'язане виникнення епілептичних нападів, головного болю, хореї, синдрому, що імітує розсіяний склероз, невропатій та деяких інших розладів [40, 90, 376].

Епілептичні напади є другим за частотою неврологічним проявом АФС. Їх частота серед клінічних проявів АФС, за даними літератури, становить 4–29 % [12]. Епілептичні напади частіше виникають у жінок, ніж у чоловіків. Очевидно, мають значення і гормональні порушення, а саме перевага естрогенів над прогестероном, що призводить до підвищення судомної готовності мозку. Найчастіше епілептичні напади при АФС виникають після 20–30 років. Цереброваскулярні порушення, ішемічна хвороба серця, тромбози периферійних вен, тромбоцитопенія й ускладнений акушерський анамнез є у 80 % хворих з АФС до моменту розвитку першого епілептичного нападу [12, 370, 376].

Неврологічні прояви АФС, що імітують розсіяний склероз, нерідко помилково розцінюють як розсіяний склероз. Вони розвиваються в осіб молодого віку, проявляються рецидивним виникненням різних неврологічних симптомів і ураженням білої речовини головного мозку за даними магнітно-резонансної томографії [40]. Питання про те, чому в одних випадках у хворих із АФС розвиваються типові порушення мозкового кровообігу, а в інших – неврологічні прояви, що імітують розсіяний склероз, потребує подальшого дослідження. Мабуть, має значення відмінність профілю аФЛ,

що представляють гетерогенну групу [40]. Нещодавно було показано [40], що при АФС за умов неврологічних проявів, які імітують розсіяний склероз, часто (69 %) виробляються антитіла до нейтральних фосфоліпідів – фосфатидилетаноламіну, тоді як у хворих із АФС з порушеннями мозкового кровообігу вони виявляються рідше (29 %), що, ймовірно, вказує на їх роль у патогенезі пошкодження білої речовини головного мозку.

У травному тракті при АФС можливий розвиток ішемії, ерозій та некрозу стравоходу, шлунка та кишечника. Описані випадки розвитку гострого холециститу, тромбозу печінкової вени й оклюзії судин селезінки [120, 154, 322, 371].

У хворих з АФС виділяють такі форми патології печінки: синдром Бадда–Кіарі; обструкція дрібних печінкових вен; вузлова регенераторна гіперплазія; інфаркт печінки (у вагітних при HELLP-синдромі або в післяпологовому періоді); хронічний гепатит, аутоімунні захворювання печінки [152, 156, 218, 236, 266, 269, 318, 349, 359, 371]. Ураження печінки при АФС супроводжується, в основному, непрохідністю печінкових вен або нижньої порожнистої вени, вузловою регенераторною гіперплазією, яка асоціюється з наявністю аФЛ. При ушкодженні гепатоцитів реалізуються процеси апоптозу та некрозу. При взаємодії аФЛ із фосфоліпідами мембран гепатоцитів розвивається дисбаланс компонентів коагуляційно-фібринолітичних цитокінових і кінінових каскадів [154, 220, 383].

Нирки є одним із основних органів-мішеней при всіх клінічних формах АФС. Частота ураження нирок становить 25–68 % при первинному і вторинному АФС, також при цій патології зростає кількість хворих із ознаками пошкодження мікроциркуляторного русла нирок. Ураження нирок є одним із найчастіших проявів КАФС [149, 348, 385–387].

Ураження нирок при АФС зумовлено розвитком тромботичної мікроангіопатії внаслідок тромбозів капілярів клубочків і позагломерулярних судин. У більшості пацієнтів спостерігають безсимптомну помірну протеїнурію без порушення функції нирок. У деяких хворих знижується швидкість

клубочкової фільтрації за нормального рівня креатиніну. До розвитку ниркової недостатності призводять такі ускладнення АФС як тромбоз ниркової артерії та вени, капілярів клубочків, ниркова тромботична мікроангіопатія [120, 391].

Для васкулопатії при АФС характерний широкий спектр морфологічних змін уражених ділянок судин. Як вже зазначалося, у патогенезі АФС важливу роль відіграє порушення коагуляції і/або пошкодження ендотелію судин [67, 396]. Пошкодження ендотелію ниркових судин є проявом системної ендотеліальної дисфункції у хворих з АФС та супроводжується гіперпродукцією судинного ендотеліального фактора росту (VEGF), ендотеліну-1, Е-селектину, пошкодженням капілярів клубочків та артеріол нирок [73]. Генералізовані судинні зміни поєднуються з патологією строми і паренхіми різних органів. Розшарування і розрив судин можуть призводити до крововиливів у білу речовину головного мозку, в інтерстицій нирок і строму печінки [67].

Залежно від локалізації тромбозів у судинному руслі нирок, тривалості та швидкості розвитку процесу тромбоутворення, клінічні прояви АФС-нефропатії варіюють від гострого пошкодження нирок і тяжкої артеріальної гіпертензії до мінімального сечового синдрому і повільного прогресування порушення функції нирок. Клінічні прояви, пов'язані з АФС-нефропатією, під час вагітності складно відрізнити від прееклампсії і HELLP-синдрому, які мають загальні прояви з АФС-нефропатією – гіпертензія, протеїнурія, тромбоцитопенія. Ураження нирок при АФС є результатом реноваскулярних тромбозів ниркових артерій, внутрішньопаренхіматозних артерій, клубочкових капілярів або ниркових вен із розвитком так званої тромботичної мікроангіопатії внутрішньониркових судин. Це призводить до розвитку ішемії нирок і прогресуючої ниркової недостатності внаслідок наростання нефросклерозу [18, 205, 310, 315, 391, 406].

Незважаючи на існування ряду наукових досліджень щодо патогенезу АФС-нефропатії та механізмів розвитку тромбозу при АФС, на сьогодні залишаються недостатньо вивченими роль системи нітроген оксиду в механізмах

ураження нирок та ремоделювання їх структурних компонентів за цього синдрому.

У більшості випадків при АФС нефропатія поєднується з ураженням центральної нервової системи, серця, судин або з акушерською патологією [385, 387]. Наявність аФЛ є важливим фактором ризику гострої дисфункції ниркового трансплантата [307, 368].

У понад половини пацієнтів із КАФС спостерігається ураження серця. Типовим є ураження клапанів серця, яке супроводжується фіброзом та кальцинозом мітрального й аортального клапанів, які могли сформуватися раніше на фоні АФС або СЧВ [108]. При АФС спостерігається розвиток первинної патології коронарних артерій, гострого коронарного синдрому й інфаркту міокарда у пацієнтів віком до 45 років. Описано випадки внутрішньоплуночкового тромбозу при утворенні аФЛ і тромбоцитопенії. При АФС важливо диференціювати ураження серця від інфекційного ендокардиту та кардіоміопатії [373]. АФС також може викликати пошкодження міокарда, дисфункцію шлуночків [19].

У пацієнтів із первинним АФС ураження клапанів серця обумовлено більшою мірою артеріальними мікротромбозами. Ураження клапанів у пацієнтів з АФС є фактором ризику розвитку ішемічного інсульту. Гострий коронарний синдром може бути першим тромботичним проявом АФС. Частота виявлення аФЛ у пацієнтів із гострим інфарктом міокарда коливається від 5 до 15 %.

Найчастішою причиною смерті пацієнтів з АФС із ураженням серцево-судинної системи є хронічні рецидивні тромбози периферійних глибоких вен. Венозні тромбоемболії, включаючи тромбоз глибоких вен і подальшу легеневу емболію, є найпоширенішими тромботичними проявами АФС [19]. Причиною тромбоемболії можуть бути тромби з глибоких вен нижніх кінцівок, нижньої порожнистої вени, ниркової артерії та правобічні внутрішньосерцеві тромби. Інколи ураження легень розвиваються у вигляді альвеолярних геморагій, легеневого капіляриту, мікросудинного тромбозу аж до виникнення «шокової легені» [120].

Поширеним ускладненням АФС є артеріальна гіпертензія, яка часто поєднується з сітчастим ліведо і ураженням церебральних артерій при синдромі Снеддона. У хворих із АФС виникають застійні виразки шкіри, псевдоваскулітні та васкулітні ураження (некротизуюча пурпура, еритема, вузлики, пустули), множинні крововиливи в нігтьове ложе, гангрена пальців рук і ніг тощо. Характерною особливістю ураження шкіри у хворих із АФС є наявність незапальних тромбозів артерій і вен малого калібру дерми та гіподерми без васкуліту. Ураження шкіри може бути однією з перших клінічних ознак АФС [120, 363].

Отже, аналіз сучасних поглядів на профілактику і лікування ускладнень АФС підтверджує актуальність подальшого поглибленого вивчення цього питання і необхідність наукового пошуку шляхів вирішення проблеми. Вагітність, яка розвивається на фоні АФС, часто супроводжується звичним невиношуванням вагітності, передчасними пологами. Провідним моментом розвитку ускладнень АФС є утворення антифосфоліпідних антитіл, що призводить до патологічних змін у системі гемостазу, порушень матково-плацентарного та плодово-плацентарного кровообігів унаслідок процесів тромбоутворення, формування тяжкої гіпоксії плода, поліорганної недостатності.

Відомо, що нітроген оксид, який продукується у судинному ендотелії, є одним із визначальних факторів, які забезпечують нормальний тонус судин, запобігають процесам згортання крові. Суперечливість наявних даних про участь системи NO у розвитку АФС та ускладнень вагітності при АФС, обмежені відомості про роль модуляторів синтезу NO в редукції проявів даної патології зумовлюють необхідність подальшого вивчення впливу змін активності цієї системи на патобіохімічні процеси при АФС та встановлення можливостей корекції його ускладнень за допомогою модуляторів NO.

Отже, встановлення механізмів розвитку ускладнень антифосфоліпідного синдрому, в тому числі під час вагітності, зокрема, ролі системи нітроген оксиду у виникненні цієї патології, та пошук серед модуляторів синтезу NO ефективних

засобів для корекції змін, що виникають у головному мозку, печінці, нирках вагітних та невагітних мишей за умов АФС, є актуальною проблемою, вирішенню якої присвячено дане дисертаційне дослідження. Важливість пошуку в цьому напрямку також підтверджується зростанням частоти АФС та відсутністю єдиного погляду на роль системи нітроген оксиду в його розвитку.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Відбір тварин для дослідження та експериментальна модель

Дослідження проводили на 406 мишах самках лінії BALB/c масою 25–30 г, яких утримували на стандартних світловому, харчовому та температурному режимах віварію відповідно до санітарно-гігієнічних норм.

Експерименти виконано на базі Центральної науково-дослідної лабораторії (Свідоцтво про атестацію вимірювальної лабораторії на проведення вимірювань у сфері поширення державного метрологічного нагляду в галузі охорони здоров'я – № 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 Інституту біохімії імені О. В. Палладіна НАН України. Проведення гістологічних та електронномікроскопічних досліджень виконано за участі завідувача кафедри гістології та ембріології Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України професора Небесної З. М. Визначення кількості десквамованих ендотеліоцитів проведено за участі завідувача кафедри патологічної анатомії з секційним курсом та судовою медициною Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України професора Боднара Я. Я.

Усі маніпуляції з експериментальними тваринами проводили із дотриманням правил відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей, Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження», Науково-практичних рекомендацій з утримання лабораторних тварин та роботи з ними [45] та Директиви Європейського Союзу 2010/10/63 EU щодо експериментів

на тваринах. Комісія з біоетики Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України порушень морально-етичних норм при проведенні науково-дослідної роботи не виявила.

АФС моделювали за допомогою кардіоліпіну (Sigma, США), який вводили внутрішньом'язово чотири рази (30 мкг на 1 ін'єкцію, проміжки між ін'єкціями становили 14 діб) [35]. Для підвищення ефективності імунної відповіді кардіоліпін для першої ін'єкції емульгували в 75 мкл повного ад'юванту Фрейнда («Difco Laboratories», США), наступні ін'єкції проводили з неповним ад'ювантом Фрейнда («Difco Laboratories», США). АФС формувався через 2 тижні після останньої ін'єкції кардіоліпіну. Для підтвердження розвитку АФС проводили реакцію мікропреципітації з кардіоліпіновим антигеном із використанням тест-системи «Антиген кардіоліпіновий, для реакції мікропреципітації» («Біолік», Україна).

Піддослідних тварин поділили на 10 груп: I, Ia (контроль) – тварини без АФС; II, IIa – тварини з експериментальним АФС, III, IIIa – тварини з АФС, яким вводили L-аргініну гідрохлорид (L-аргінін), IV, IVa – тварини з АФС, яким вводили аміногуанідин, V, Va – тварини з АФС, яким вводили L-аргінін в комбінації з аміногуанідином (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

Розподіл тварин на серії дослідів

Серія дослідів	Кількість тварин	
	до вагітності	на 18-й день вагітності
Контроль	48	40
Антифосфоліпідний синдром (АФС) – контрольна патологія	48	40
АФС+L-аргінін	40	40
АФС+аміногуанідин	40	40
ГП+L-аргінін+ аміногуанідин	40	30

L-аргінін («Sigma», USA, 25 мг/кг) та аміногуанідин («Хімлабораторреактив», Україна, 10 мг/кг) вводили внутрішньочеревно один раз на день, повторно, упродовж 10 діб після формування АФС і 17 діб вагітності [68, 76, 82]. Тварини контрольних груп отримували внутрішньочеревно ідентичні об'єми розчинника. Дози для тварин розраховували виходячи з коефіцієнта видової чутливості.

Через 10 діб з моменту підтвердження АФС тварин I, II, III, IV та V груп виводили з експерименту в умовах тіопентал-натрієвого наркозу (введення 1 % розчину з розрахунку 50 мг/кг маси тварини внутрішньочеревно). Через 10 діб після початку введення коригуючих чинників проводили спарювання самок Ia, IIa, IIIa, IVa та Va груп із самцями та виводили з експерименту на 18-й день вагітності в умовах тіопентал-натрієвого наркозу. Для підтвердження вагітності вивчали вагінальні мазки [35]. Мазки брали з піхви самок, забарвлювали їх метиленовим синім та проводили мікроскопію. При переважанні в мазках плоских зроговілих поверхневих клітин констатували фазу еструсу і самок підсаджували до самців. На наступний день при виявленні у мазку спермій констатували нульовий день вагітності.

Для дослідження використовували сироватку крові, плазму, популяцію лейкоцитів крові, гомогенати мозочка, півкуль великого мозку, печінки та нирок. Сироватку отримували у результаті центрифугування крові при 3000 об./хв протягом 15 хв. Плазму отримували у результаті центрифугування крові, яка містила цитрат натрію, у співвідношенні об'ємів крові і цитрату 9:1, при 3000 об./хв протягом 15 хв. Лейкоцити отримували з гепаринізованої периферійної крові шляхом гемолізу еритроцитів. Гомогенати органів готували за допомогою магнітного гомогенізатора SilentCrusher S (Heidolph, Germany) після попередньої перфузії у фізіологічному розчині.

2.2 Реакція мікропреципітації з кардіоліпіновим антигеном

Реакцію мікропреципітації (РМП) з кардіоліпіновим антигеном проводили за допомогою тест-системи «Антиген кардіоліпіновий, для РМП» («Біолік», Україна). У здорових мишей в нормі реакція негативна. У мишей з експериментальним АФС спостерігається позитивна реакція мікропреципітації [35].

2.3 Дослідження показників системи зсідання крові та кількості тромбоцитів

Дослідження показників системи зсідання крові (активованій частковий тромбопластиновий час – АЧТЧ, протромбіновий час – ПЧ та протромбіновий індекс – ПІ, міжнародне нормалізоване відношення – МНВ) та концентрації фібриногену проводили на двоканальному напівавтоматичному коагулометрі Humaclot Duo Human.

Визначення кількості тромбоцитів проводили на автоматичному гематологічному аналізаторі ABX Micros 60.

2.4. Методи дослідження цитокінового статусу

2.4.1. Визначення концентрації інтерлейкіну-1 β

Визначення концентрації інтерлейкіну-1 β (IL-1 β) проводили методом імуноферментного аналізу, використовуючи стандартний набір реактивів, адаптованих для мишей «Mouse IL-1 β ELISA Assay» (Express Biotech International, USA), відповідно до інструкції фірми-виробника. Концентрацію IL-1 β у сироватці крові виражали у пг/мл.

2.4.2. Визначення концентрації інтерлейкіну-6

Визначення концентрації інтерлейкіну-6 (IL-6) проводили методом імуноферментного аналізу, використовуючи стандартний набір реактивів, адаптованих для мишей «Mouse IL-6 ELISA Assay» (Express Biotech International, USA), відповідно до інструкції фірми-виробника. Концентрацію IL-6 у сироватці крові виражали у пг/мл.

2.4.3. Визначення концентрації фактора некрозу пухлин- α

Визначення концентрації фактора некрозу пухлин- α (TNF- α) проводили методом імуноферментного аналізу, використовуючи стандартний набір реактивів, адаптованих для мишей «Mouse TNF- α ELISA Assay» (Express Biotech International, USA), відповідно до інструкції фірми-виробника. Концентрацію TNF- α у сироватці крові виражали у пг/мл.

2.4.4. Визначення концентрації інтерлейкіну-10

Визначення концентрації інтерлейкіну-10 (IL-10) проводили методом імуноферментного аналізу, використовуючи стандартний набір реактивів, адаптованих для мишей «Mouse IL-10 ELISA Assay» (Express Biotech International, USA), відповідно до інструкції фірми-виробника. Концентрацію IL-10 у сироватці крові виражали у пг/мл.

2.4.5. Визначення концентрації інтерлейкіну-4

Визначення концентрації інтерлейкіну-4 (IL-4) проводили методом імуноферментного аналізу, використовуючи стандартний набір реактивів, адаптованих для мишей «Mouse IL-4 ELISA Assay» (Express Biotech International, USA), відповідно до інструкції фірми-виробника. Концентрацію IL-4 у сироватці крові виражали у пг/мл.

2.5. Методи дослідження нітрооксидативного стресу та ендотеліальної дисфункції

2.5.1. Визначення вмісту ендотеліальної NO-синтази

Визначення вмісту ендотеліальної NO-синтази (eNOS, КФ 1.14.13.39) у сироватці крові та печінці проводили методом імуноферментного аналізу, використовуючи стандартні набори реактивів, адаптовані для мишей «Mouse NOS3/eNOS (Nitric Oxide Synthase 3, Endothelial) ELISA Kit» (Express Biotech International, USA), відповідно до інструкції фірми-виробника.

Вміст eNOS у сироватці крові виражали у пг/мл, у гепатоцитах – в пг/мл (1 мл – 10^6 клітин).

2.5.2. Визначення вмісту індукцибельної NO-синтази

Визначення вмісту індукцибельної NO-синтази (iNOS, КФ 1.14.13.39) у сироватці крові та печінці проводили методом імуноферментного аналізу, використовуючи стандартні набори реактивів, адаптовані для мишей «Mouse NOS2/iNOS (Nitric Oxide Synthase 2, Inducible) ELISA Kit» (Express Biotech International, USA), відповідно до інструкції фірми-виробника.

Вміст iNOS у сироватці крові виражали у нг/мл, у гепатоцитах – в нг/мл (1мл – 10^6 клітин).

2.5.3. Визначення вмісту нітрит-аніонів

Вміст нітрит-аніонів (NO_2^-) у сироватці крові, гомогенатах печінки, нирок, мозочка, півкуль великого мозку визначали високоспецифічним спектрофотометричним методом Гріна за даними кольорової реакції з реактивом Гріса [245].

Сироватку крові, гомогенат тканини мозочка, півкуль великого мозку, печінки і нирок депротейнізували додаванням до 0,4 мл досліджуваного розчину

0,8 мл 0,5 н. розчину NaOH і 0,8 мл 10 % розчину сульфату цинку. Вміст пробірки перемішували протягом 30 с і центрифугували протягом 15 хв при 9000 об./хв. Після цього 1,5 мл надосадової рідини змішували з однаковим об'ємом реактиву Гріса (складається із суміші розчинів: 1 % сульфаніламід, 0,1 % нафтилендіаміну, 2,5 % фосфорної кислоти) й інкубували 10 хв при кімнатній температурі. Абсорбцію розчину вимірювали при $\lambda = 546$ нм на спектрофотометрі СФ-46. Як стандарт використовували розчин натрій нітриту.

Вміст нітрит-аніонів розраховували за формулою (2.1):

$$C = C_{\text{ст}} \times D_1 / D_2, \quad (2.1)$$

де C – вміст нітрит-аніонів, мкмоль/л чи мкмоль/кг;

$C_{\text{ст}}$ – вміст нітрит-аніонів у стандартному розчині, мкмоль/л;

D_1 – оптична густина досліджуваного розчину;

D_2 – оптична густина стандартного розчину.

2.5.4. Визначення вмісту нітрат-аніонів

Вміст нітрат-аніонів (NO_3^-) у сироватці крові, гомогенатах мозочка, півкуль великого мозку, печінки та нирок визначали за методом [43]. Відновлення нітратів до нітритів проводили металічним цинком в оцтовокислому розчині, іони NO_2^- виявляли діазореакцією з реактивом Гріса з наступним колориметричним визначенням [43, 245].

У пробірку з 0,4 мл досліджуваного розчину додавали 2 мл 10 % оцтової кислоти і вносили на кінчику скальпеля (не більше 30 мг) суміш цинкового пилу з сірчаноокислим марганцем (1 г цинкового пилу попередньо змішували з 100 г сірчаноокислого марганцю). Пробірку струшували 30 с і центрифугували протягом 15 хв при 9000 об./хв. Потім у пробірку додавали 1 мл реактиву Гріса, перемішували її вміст і через 10 хв колориметрували розчин на спектрофотометрі при 538 нм.

Щоб визначити вміст нітрат-аніонів, від суми нітрат- і нітрит-аніонів віднімали кількість нітрит-аніонів.

Вихідний розрахунок нітрат-аніонів проводили за формулою (2.2):

$$X = C_1 - C_2 \times 1,3 \quad (2.2)$$

де X – вміст нітрат-аніонів іонів в аналізованому взірці, мкмоль/л чи мкмоль/кг,

C_1 – сума аніонів NO_3^- та NO_2^- ,

C_2 – кількість нітрит-аніонів, NO_2^- ,

1,3 – коефіцієнт перерахунку нітрит-аніонів в нітрат-аніони.

2.5.5. Визначення кількості вільноциркулюючих десквамованих ендотеліоцитів

Кількісний аналіз вільноциркулюючих ендотеліальних клітин у крові досліджуваних мишей проводили за способом Hladovec J. [252] у модифікації Сівак В. В. та ін. [93].

Як стабілізатор до крові додавали 3,8 % лимоннокислого натрію у співвідношенні 1:9. Для отримання збагаченої тромбоцитами плазми відразу після забору кров центрифугували 10 хв при 200 g. Потім 0,1 мл плазми змішували з 0,04 мл адреналіну в концентрації 0,18 %. Отриману суміш механічно перемішували впродовж 10 хв обережним струшуванням пробірок, після чого знову центрифугували при 200 g протягом 15 хв для осадження ендотеліальних клітин. Далі надосадову рідину обережно видаляли, а отриманий осад ресуспендували в 0,1 мл 0,9 % розчину NaCl і перемішували скляною паличкою. Готовою суспензією заповнювали камеру Горяєва. Кількість десквамованих ендотеліоцитів підраховували в 2 сітках камери методом фазово-контрастної мікроскопії. Враховуючи співвідношення між кількістю клітин у сітці, об'ємом камери Горяєва, об'ємом отриманої суспензії і об'ємом плазми, при підрахуванні кількості ендотеліальних клітин результат множили на $10^4/\text{л}$.

2.6. Методи дослідження оксидативного стресу

2.6.1. Визначення активності супероксиддисмутази

Активність супероксиддисмутази (СОД, КФ 1.15.1.1) визначали за методом [112], який ґрунтується на здатності інгібувати відновлення нітротетразолію синього при наявності НАДН₂. Для дослідження брали по 1 мл гомогенату мозочка, півкуль великого мозку, печінки, нирок, приготовленого на фосфатному буфері (рН=7,4) у співвідношенні 1:10. Проводили попередню обробку досліджуваного матеріалу за допомогою суміші хлороформу та спирту з додаванням КН₂РО₄ із наступним центрифугуванням при 12000 об./хв протягом 15 хв. До 0,2 мл супернатанту додавали 1,3 мл фосфатного буфера (рН=8,3) з молярною концентрацією 0,1 моль/л, 1 мл розчину нітротетразолію синього, 0,3 мл розчину феназинметасульфату і 2 мл розчину НАДН₂ з молярною концентрацією 0,2 ммоль/л. Проби 10 хв витримували у темряві й фотометрували (СФ-46) при $\lambda = 540$ нм у кюветі з довжиною оптичного шляху 10,0 мм проти проб, до яких не додавали НАДН₂. Контролем слугували проби, в яких замість гомогенату знаходилося 0,2 мл фосфатного буфера. Активність ензиму визначали за його здатністю інгібувати відновлення нітротетразолію синього.

Відсоток інгібування розраховували за формулою (2.3):

$$T = (E_k - E_d) \times 100 / E_k, \quad (2.3)$$

де Т – відсоток інгібування;

E_k – екстинкція контрольної проби;

E_d – екстинкція дослідної проби.

Активність ензиму розраховували за формулою (2.4):

$$A_{\text{сод}} = T / (100 \% - T) / C, \quad (2.4)$$

де $A_{\text{сод}}$ – активність супероксиддисмутази;

Т – відсоток інгібування, %;

C – вміст протеїну, мг.

Активність супероксиддисмутази виражали в умовних одиницях на 1 мг протеїну.

2.6.2. Визначення активності каталази

Активність каталази (КАТ, КФ 1.11.1.6) визначали за методом М. А. Корольок і співавт. [48], який ґрунтується на здатності пероксиду гідрогену утворювати з молібдатом амонію стійкий забарвлений комплекс. Досліджували тканини мозочка, півкуль великого мозку, печінки, нирок, з яких на холоді готували гомогенати (у співвідношенні 1:10) у 50 мМ трис-НСІ буфері (рН=7,8). В аліквоті (0,1 мл) супернатанту визначали активність каталази, ініціюючи реакцію 2 мл 0,03 % розчину H_2O_2 . За 10 хв реакцію зупиняли додаванням 1 мл 4 % розчину $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$. У холосту пробу замість зразка вносили 0,1 мл дистильованої води. Інтенсивність забарвлення вимірювали на спектрофотометрі (СФ-46) при довжині хвилі $\lambda = 410$ нм проти контрольної проби, в яку замість пероксиду гідрогену додавали 2 мл води. Активність КАТ розраховували за формулою (2.5):

$$A_{\text{КАТ}} = (E_x - E_d) / V \times t \times K, \quad (2.5)$$

де $A_{\text{КАТ}}$ – активність каталази;

E_x і E_d – екстинкції холостої і дослідної проб;

V – об'єм внесеної проби, мл;

t – час інкубації, с;

K – коефіцієнт мілімолярної екстинкції пероксиду гідрогену, який дорівнює $22,2 \times 10^{-3} \text{ ммоль}^{-1} \times \text{с}^{-1}$.

Активність каталази виражали у $\text{нмоль } \text{H}_2\text{O}_2 / \text{хв} \times 1 \text{ мг протеїну}$.

2.6.3. Визначення вмісту відновленого глутатіону

Вміст відновленого глутатіону (G-SH) визначали 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 [222].

До 0,5 мл гомогенату мозочка, півкуль великого мозку, печінки, нирок додавали 1,3 мл дистильованої води, 0,2 мл 25 % сульфосаліцилової кислоти і центрифугували при 5000 об./хв протягом 10 хв. Отриманий центрифугат (0,5 мл) при додаванні 2,5 мл трис-HCl буферау і 0,05 мл розчину Елмана змінював колір на жовто-зелений через 10 хв при кімнатній температурі. Покази знімали на спектрофотометрі СФ-46 при $\lambda = 412$ нм. Вміст G-SH розраховували, виходячи з коефіцієнта молярної екстинкції для тіонітрофенільного аніона, який дорівнює $11400 \text{ моль}^{-1} \text{ с}^{-1}$, і виражали у мкмоль/г тканини мозочка, півкуль великого мозку, печінки, нирок.

2.6.4. Визначення вмісту гідропероксидів ліпідів

Визначення вмісту гідропероксидів ліпідів (ГПЛ) ґрунтується на здатності екстрагованих гептан-ізопропіловою сумішшю ГПЛ інтенсивно поглинати світло при $\lambda = 233$ нм [16].

До 0,2 мл гомогенату мозочка, півкуль великого мозку, печінки, нирок додавали 4 мл суміші гептан-ізопропанолу (1:1) і струшували протягом 15 хв на лабораторному струшувачі АВ-30. Потім у пробірки додавали по 1 мл розчину HCl (рН=2,0) і по 2 мл гептану, інтенсивно струшували і після відстоювання та розшарування суміші (через 30 хв) відбирали гептановий шар і вимірювали його оптичну щільність на спектрофотометрі (СФ-46, дейтерієва лампа) при $\lambda = 233$ нм. Як контроль використовували пробу, яка замість досліджуваного матеріалу містила 0,2 мл дистильованої води.

Розрахунок вмісту ГПЛ проводили у відносних одиницях за формулою (2.6):

$$C_{\text{ГПЛ}} = 10 \times E \times V_1 / V_2, \quad (2.6)$$

де E – оптична щільність гептанового шару проби;

V_1 – кінцевий об'єм гептанового екстракту, л,

V_2 – об'єм досліджуваного матеріалу, л.

Вміст ГПЛ виражали в умовних одиницях екстинкції на грам тканини мозочка, півкуль великого мозку, печінки, нирок (ум. од./г тканини).

2.6.5. Визначення вмісту ТБК-активних продуктів

Принцип методу визначення вмісту ТБК-активних продуктів (ТБК-АП) полягає у здатності вторинних продуктів пероксидного окиснення ліпідів при взаємодії з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) при високій температурі в кислому середовищі утворювати забарвлений комплекс, інтенсивність якого відповідає вмісту ТБК-АП [4]. Дослідження проводили у гомогенатах мозочка, півкуль великого мозку, печінки, нирок.

У центрифужні пробірки наливали по 1 мл дистильованої води, 1 мл 10 % гомогенату, 2 мл 30 % розчину трихлороцтової кислоти, 0,2 мл HCl концентрацією 5 моль/л, 2 мл 0,8 % водного розчину ТБК і витримували 15 хв у киплячій водяній бані. Проби охолоджували, осад відділяли центрифугуванням при 3000 об./хв протягом 10 хв. Вимірювали оптичну густину супернатанту на фотоелектроколориметрі КФК-2 при $\lambda = 535$ нм проти контролю, який містив 2 мл дистильованої води, 2 мл 30 % трихлороцтової кислоти і 2 мл ТБК. Розрахунок проводили, враховуючи коефіцієнт молярної екстинкції для ТБК-АП, який дорівнює $1,56 \times 10^5 \text{ моль}^{-1} \times \text{см}^{-1}$.

Вміст ТБК-АП у гомогенатах мозочка, півкуль великого мозку, печінки, нирок виражали в нмоль/г тканини.

2.6.6 Методи визначення окиснювальних процесів у мітохондріях

2.6.6.1. Виділення мітохондрій

Мітохондрії виділяли методом диференціального центрифугування гомогенату мозочка, півкуль великого мозку, печінки, нирок, приготовленого у середовищі 0,25 М сахарози, 10 мМ трис-НСІ, та 10 мМ ЕДТА, у співвідношенні 1:10. Мітохондріальну фракцію отримували, центрифугуючи без'ядерний супернатант протягом 10 хв при 6500 об./хв. Отриманий осад мітохондрій ресуспендували в середовищі виділення. Всі операції проводили на холоді. Для приготування розчинів використовували бідистильовану воду [42].

2.6.6.2. Визначення активності сукцинатдегідрогенази

Визначення активності сукцинатдегідрогенази (СДГ, КФ 1.3.99.1) проводили за методом [33], який ґрунтується на відновленні фериціаніду калію, розчин якого має жовте забарвлення, до безбарвного фероціаніду калію сукцинатом під дією СДГ. Активність ензиму пропорційна кількості відновленого фериціаніду.

До 1 мл фосфатного буфера з молярною концентрацією 0,1 моль/л додавали по 0,1 мл розчинів бурштинової кислоти, ЕДТА, азиду натрію, дистильованої води і 0,5 мл суспензії мітохондрій мозочка, півкуль великого мозку, печінки, нирок. Проби інкубували протягом 5 хв за кімнатної температури. Реакцію запускали додаванням 0,1 мл розчину фериціаніду калію. Проби знову інкубували при температурі 30 °С протягом 10–15 хв. Після інкубування реакцію зупиняли зануренням проб у лід та додаванням до них по 2 мл 20 % трихлороцтової кислоти. В контрольні проби трихлороцтову кислоту додавали перед внесенням суспензії мітохондрій. Після центрифугування (при 2000 об./хв протягом 15 хв) надосадову рідину

фотометрували на спектрофотометрі (СФ-46) при $\lambda = 420$ нм проти контролю. Активність ензиму розраховували виходячи з коефіцієнта молярної екстинкції для фериціаніду калію (2.7):

$$A_{\text{СДГ}} = m / 2 \times M \times a \times t, \quad (2.7)$$

де m – кількість відновленого фериціаніду в пробі (за калібрувальною кривою), мг;

M – відносна молекулярна маса $K_3[Fe(CN)_6]$;

a – вміст протеїну в пробі, мг;

t – час інкубації, хв;

2 – 1 моль сукцинату відновлює 2 моль фериціанату.

Активність СДГ виражали в нмоль сукцинату на мг протеїну за хвилину.

2.6.6.3 Визначення активності цитохромоксидази

Визначення активності цитохромоксидази (ЦХО, КФ 1.9.3.1) проводили за методом [50], який ґрунтується на здатності ЦХО окиснювати диметил-пара-фенілендіамін і α -нафтол з утворенням індофенолового синього. Кількість утвореного пігменту пропорційна цитохромоксидазній активності мітохондрій.

У пробірки наливали по 0,5 мл фосфатного буфера рН=7,38, додавали по 1 мл суспензії мітохондрій мозочка, півкуль великого мозку, печінки, нирок, 1 мл 0,1 % водного розчину диметил-пара-фенілендіаміну і по 0,5 мл 0,2 % теплового (37 °С) розчину α -нафтолу. Вміст пробірок ретельно змішували і залишали в темряві на 30 хв, струшуючи через кожні 10 хв. Потім додавали по 12 мл етилового спирту, змішували і залишали ще на 30 хв. Після фільтрування фотоколориметрували забарвлення, що утворилося, проти спирту, при $\lambda = 670$ нм. Стандартом служив розчин індофенолового синього з розрахунку 0,5 мг в 15 мл 96° етилового спирту. Розрахунок проводили за калібрувальним графіком, цитохромоксидазну активність виражали в мкмоль індофенолового синього на мг протеїну за хв.

2.6.7. Оцінка продукції активних форм оксигену

Оцінку продукції активних форм оксигену в лейкоцитах крові проводили методом проточної лазерної цитофлуориметрії, використовуючи 2',7'-дихлорофлуоресцеїн діацетат (2',7'-Dichlorofluorescein diacetate MW 485.27, 35845, Sigma-Aldrich) у кінцевій концентрації 25 мкмоль, згідно з методикою [25]. Під дією естераз 2',7'-дихлорофлуоресцеїн діацетат пасивно проникає в клітину і, відщеплюючи ацетатну групу, перетворюється на полярну сполуку, яка втрачає здатність до дифузії з клітини. Взаємодіючи з активними формами оксигену, в основному після реакції з гідроген пероксидом, 2,7-дигідродихлорфлуоресцеїн окиснюється до 2,7-дихлорфлуоресцеїну, який є флуоресціюючою сполукою [223].

Лейкоцити отримували з гепаринізованої периферійної крові мишей шляхом гемолізу еритроцитів. Для цього до 100 мкл крові додавали 5,0 мл дистильованої води та, через 20 с, 5,0 мл 1,8 % розчину NaCl. Осаджували клітини при центрифугуванні 400 g при 12 °C протягом 5 хв та повторювали процедуру ще один раз. Зливали надосад, доводили об'єм до 10 мл фізіологічним розчином. Осаджували клітини при 400 g при 12 °C протягом 5 хв. Зливали надосад, а клітини ресуспендували у 500 мкл фосфатно-сольового буфера PBS (Phosphate buffered saline, pH 7,2).

У полістеринову пробірку додавали 90 мкл суспензії лейкоцитів (5×10^6 клітин в 1 мл) і 10 мкл робочого розчину 2',7'-дихлорофлуоресцеїн діацетату. Після інкубації (+37 °C) протягом 45 хв у захищеному від сонячних променів місці клітини промивали 10 мл буфером PBS та осаджували лейкоцити при центрифугуванні (400 g при 12°C протягом 5 хв). Після цього осад ресуспендували у 500 мкл фосфатно-сольового буфера PBS. Інтенсивність випромінювання досліджуваних зразків реєстрували за каналом log FL1 (515-53 нм) на протоковому цитофлуориметрі COULTER EPICS XL (Beckman Coulter, США), оснащеному аргоновим лазером (λзбудж. = 488 нм.) Було проаналізовано більше 10 000 подій із кожного зразка. Обробку результатів

проводили за допомогою програми FCS Express V3. Оцінку перерозподілу між різними популяціями лейкоцитів проводили з використанням двох параметрів протокового цитофлуориметра COULTER EPICS XL (Beckman Coulter, США): за величиною прямого (FS, розмір клітин) та бічного світлорозсіювання (SS, гранулярність клітин). Значення досліджуваного параметра виражали в ум.од.

2.7. Методи дослідження реалізації апоптозу

2.7.1. Оцінка апоптозу клітин

Оцінку апоптозу в популяції лейкоцитів крові проводили використовуючи анексин V (AV) кон'югований з GFP (green fluorescent protein) та пропідій йодид (PI) згідно з методикою [352].

Лейкоцити промивали фосфатним буфером PBS (Phosphate buffered saline) та, після осадження клітин при 400 g протягом 7 хв, відбирали надосад, а клітини ресуспендували в 1 мл анексин-зв'язуючого буфера (10 моль/л HEPES, 140 моль/л NaCl, 2,5 моль/л CaCl₂) і повторно осаджували при 400 g 7 хв. Відбирали надосад, а клітини ресуспендували в 500 мкл анексин-зв'язуючого буфера з додаванням анексин-GFP у кінцевій концентрації 0,6 мкг/мл та PI у кінцевій концентрації 5,0 мкг/мл. Вміст перемішали на вортексі та інкубували при кімнатній температурі протягом 15 хв. Зразки аналізували за допомогою протокового цитофлуориметра COULTER EPICS XL (Beckman Coulter, США) з аргоновим лазером. Флуоресцентні сигнали досліджуваних зразків реєстрували за каналом FL1 (515–535 нм) для анексину V-GFP та FL3 (620–630 нм) для PI. Було проаналізовано більше 20 000 подій із кожного зразка. Оцінку перерозподілу між різними популяціями лейкоцитів проводили з використанням двох параметрів протокового цитофлуориметра COULTER EPICS XL (Beckman Coulter, США): за величиною прямого

(FS, розмір клітин) та бічного світлорозсіювання (SS, гранулярність клітин). Обробку результатів проводили за допомогою програми FCS Express V3.

Отримані результати представляли у відсотках.

2.7.2. Визначення вмісту каспази-3 та β -актину

Визначення вмісту каспази-3 та β -актину у тканині печінки виконували методом Вестерн-блот аналізу [186, 390]. Наважку тканини печінки (100 мг) гомогенізували у рідкому азоті. Після гомогенізації наважку переносили у пробірку типу Eppendorf 1,5 мл та додавали 0,9 мл буфера екстракції протеїнів RIPA (20 mM трис-HCl, pH 7,5; 1 % тритону X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % дезоксихолату натрію та 9 мкл суміші інгібіторів протеїназ і фосфатаз (Protease Inhibitor Cocktail, P8340, Sigma). Зразок переносили на лід та додатково обробляли ультразвуковим дезінтегратором (цикли – 50, амплітуда – 80). Залишали екстрагуватися на льоду протягом 20 хв. Нерозчинну в детергенті фракцію осаджували центрифугуванням при 14 000 g протягом 20 хв за температури 4 °C. У пробірки типу Eppendorf 1,5 мл відбирали супернатант та окремо відбирали 100 мкл на визначення вмісту протеїну. До відібраного супернатанту додавали буфер 5 x Леммлі (60 mM трис-HCl, pH 6,8, 2 % SDS, 10 % гліцерол, 5 % β -меркаптоетанол, 0,01 % бромфеноловий синій) та прогрівали на водяній бані 5 хвилин за температури +95 °C. Вміст загального протеїну лізатів визначали за методом Bradford [181].

Електрофоретичне розділення протеїнів лізатів у поліакриламідному гелі (ПААГ) (12,5 %) проводили в буферній системі Леммлі (100 мкг протеїну на лунку) при силі струму 20 mA – концентруючий гель, 30 mA – розділяючий гель за методом Laemmli [275]. Електрофоретично розділені протеїни з ПААГ переносили на нітроцелюлозну мембрану протягом 1 год при 350 mA у буфері, що містив: 25 mM трис, 192 mM гліцин, pH 8,3, 0,1 % додецилсульфату натрію, 20 % метанолу. Вільні центри зв'язування блокували протягом 1 год 5 % розчином знежиреного молока в PBS-буфері з 0,05 % Tween-20. Після кожного

етапу інкубування мембрану тричі по 5 хв відмивали PBST-буфером (PBS з 0,1 % Tween-20). Для детектування каспази-3 мембрану інкубували протягом ночі при +4°C з первинними моноклональними анти каспази-3 антитілами (sc-373730, Santa Cruz Biotechnology, USA) у розведенні 1:300. Як вторинні антитіла використовували anti-mouse антитіла (A9917, Sigma, USA), кон'юговані з пероксидазою хрому (HRP) у розведенні 1:40 000, з якими мембрану інкубували протягом 1 год при кімнатній температурі. Для контролю однакового вмісту протеїнів у пробах мембрану інкубували з моноклональними анти- β -актин антитілами у розведенні 1:40 000. Імунореактивні сигнали на мембрані виявляли за допомогою інкубування мембрани з реактивами для посиленої хемілюмінесценції. Мембрану експонували на рентгенівську плівку, яку проявляли й фіксували стандартними фотопроявником та фіксажем. Інтенсивність сигналів на рентгенівських плівках обраховували за допомогою програми GELPRO32.

2.8. Методи виявлення та ідентифікації протеїнів

2.8.1. Методи визначення загальної кількості протеїнів

2.8.1.1. Метод Бредфорда

Принцип методу визначення загального вмісту протеїнів за методом Бредфорда ґрунтується на реакції барвника Кумасі діамантового блакитного G-250 з макромолекулами поліпептидів за рахунок електростатичних взаємодій сульфонільних груп барвника з амінокислотними залишками протеїну. Зв'язана форма має блакитне забарвлення з максимумом поглинання при 595 нм. Максимум поглинання комплексу в видимій ділянці не збігається з максимумом поглинання для барвника, що й дозволяє проводити кількісне вимірювання комплексів, які утворюються [181].

До 0,2 мл розчину барвника додавали 0,02 мл розчину протеїну, перемішували та через 2 хв вимірювали оптичну щільність.

Вміст протеїну (мкг/мл) визначали за формулою (2.8):

$$C = X \times R / 0,1, \quad (2.8)$$

де С – вміст протеїну в тканині, мкг/мл;

Х – кількість протеїну у розведених зразках, знайдена за калібрувальним графіком, мкг;

Р – розведення гомогенатів.

2.8.1.2. Метод Лоурі

Принцип методу визначення загального вмісту протеїнів методом Лоурі заснований на їх властивості утворювати забарвлені комплекси синього кольору при сумісній дії двох кольорових реакцій – біуретової та реакції Фоліна [287].

У дослідну пробірку вносили 0,4 мл розчину протеїну, а в контрольну – 0,4 мл фізіологічного розчину. В обидві пробірки додавали по 2 мл біуретового реактиву. Через 10 хв додавали по 0,2 мл реактиву Фоліна і через 30 хв вимірювали інтенсивність забарвлення, що з'явилося в дослідній пробірці проти контролю при 750 нм на спектрофотометрі. Для розрахунків використовували діапазон лінійної залежності оптичної густини від вмісту протеїну (~30–80 мкг). Вміст протеїну визначали з урахуванням розведення за формулою (2.9):

$$C = X \times R / 0,1, \quad (2.9)$$

де С – вміст протеїну в тканині, мкг/мл;

Х – кількість протеїну у розведених зразках, знайдена за калібрувальним графіком, мкг;

Р – розведення гомогенатів тканини.

2.8.2. Дослідження вмісту гліального фібрилярного кислого протеїну та основного протеїну мієліну

Підготовка зразків для аналізу. Наважки тканин мозочка та півкуль великого мозку мишей контрольних та експериментальних груп масою 0,1 г гомогенізували у 50 мМ трис-НСІ-буфері (рН 7,4), що додатково містив 0,135 М NaCl, 1 % додецилсульфату натрію (SDS), 2,5 мМ ЕДТА, 6,5 мкМ апротиніну, 1,5 мкМ пепстатину А, 23 мкМ лейпептину, 1 мМ фенілметилсульфонілфлуориду (PMSF), 5 мкг/мл соєвого інгібітора трипсину, 1 мкМ ортованадату натрію. Співвідношення тканина – буфер (m/v) становило 1:5. Гомогенати додатково обробляли ультразвуком (30 с) за допомогою ультразвукового дезінтегратора Sartorius (Labsonic® М, Геттінген, Німеччина) та центрифугували при 16 тис. g протягом 60 хв. Надосадову рідину відбирали та визначали вміст загального протеїну спектрофотометрично.

Електрофорез у поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію (SDS-PAGE) [275]. Екстракти головного мозку змішували у співвідношенні 1:2 з відновлюючим буфером Леммлі (160 мМ Tris-НСІ, рН 6,8, 4 % SDS, 20 % гліцерол, 4 % β -меркаптоетанол) та нагрівали при 95 °С протягом 5 хв. Зразки наносили на пластину 10 % PAGE у розрахунку 50 мкг загального протеїну на доріжку. Електрофорез проводили у mini-gel камері виробництва BioRad в електродному буфері такого складу: 25 мМ Трис-НСІ (рН 8,3), 0,192 М гліцин, 0,1 % SDS при напрузі 100 V. Для визначення молекулярної маси протеїнів паралельно наносили забарвлені протеїни-маркери виробництва Fermentas (# SM0671).

Вестерн-блот аналіз гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP) та основного протеїну мієліну (MBP) проводили за методикою [186, 390]. З метою імунохімічної детекції GFAP та MBP після закінчення електрофорезу протеїни переносили з гелю на нітроцелюлозні мембрани (GE Healthcare, Amersham Bioscience, RPN 203D, діаметр пор 0,45 мкм) методом електроблоту. Перенос проводили у камері BioRad у буфері такого складу: 25 мМ tris-НСІ, рН 8,3,

0,192 М гліцин, 25 % метанол, 2 М сечовина, за напруги 30 В протягом 120 хв. Активні зони мембрани, які не були задіяні при переносі протеїнів із поліакриламідного гелю, в процесі трансферу блокували 5 % розчином знежиреного молока («Carnation», США) протягом 120 хв при 37 °С. Після блокування мембрани обробляли відповідними кролячими антитілами проти GFAP (anti-GFAP, Santa Cruz Biotechnology, sc-9065) у розведенні 1:2500, мишачими антитілами проти MBP (sc-66064, Santa Cruz Biotechnology) у розведенні 1:1000 при 4 °С протягом ночі. Після інкубування з первинними антитілами мембрани відмивали у 5 змінах забуференого фізіологічного розчину, що містив 0,1 % Tween-20 (PBS-T). Далі нітроцелюлозні мембрани обробляли відповідними вторинними антитілами проти імуноглобуліну G кроля, кон'югованими з пероксидазою хрому (Sigma Aldrich, США, A0545), взятими у розведенні 1:5000, та проти імуноглобуліну G миші, кон'югованими з пероксидазою хрому (A9044, Sigma Aldrich), взятими у розведенні 1:7000, протягом 90 хв при 37 °С. Візуалізацію комплексу антиген-антитіло проводили з використанням субстрату пероксидази (0,02 % H_2O_2) та хромогену (0,01 % діамінобензидину). Після проведення реакції мембрани промивали водою, ретельно висушували і сканували для отримання цифрового зображення. Денситометричний аналіз імунореактивних зон проводили із застосуванням програми TotalLab TL120 (Nonlinear Inc, США). Вміст GFAP та MBP виражали в умовних одиницях.

2.8.3. Визначення аутоантитіл проти протеїнів головного мозку

Із екстрактів тканин півкуль великого мозку інтактних мишей, отриманих так, як описано в пункті 2.8.2, відбирали рівні кількості протеїну, об'єднували та змішували з нередукуючим буфером Леммлі (1:2) (160 mM Tris-HCl, pH 6,8, 4 % SDS, 20 % гліцерол) та нагрівали при 95 °С протягом 5 хв. Об'єднаний зразок вносили до комірок 10 % PAGE у кількості 100 мкг на доріжку і проводили електрофоретичне розділення [275]. Вестерн-блот аналіз

аутоантитіл проти протеїнів головного мозку проводили за методикою [186, 390]. Після електрофорезу протеїни переносили на нітроцелюлозну мембрану шляхом електроблоту. Активні зони мембрани, які не були задіяні при переносі протеїнів із поліакриламідного гелю в процесі трансферу блокували 5 % розчином знежиреного молока. Після блокування мембрану розрізали вертикально на стрипи. Сироватки крові мишей кожної групи об'єднували, і далі стрипи обробляли отриманими пулованими сироватками в якості джерела аутоантитіл. Сироватки розводили у 5 % розчині сухого молока 1:500, інкубацію проводили при 4 °C протягом ночі. Потім мембрани відмивали у 5 змінах PBS-T та інкубували з відповідними вторинними антитілами проти імуноглобуліну G миші, кон'югованими з пероксидазою хрому (Abscam, США, ab97046), взятими у розведенні 1:5000, протягом 90 хв при 37 °C. Після відмивання від неспецифічно зв'язаних вторинних антитіл візуалізацію поліпептидних зон, з якими зв'язалися аутоантитіла, проводили з використанням субстрату пероксидази (0,02 % H_2O_2) та хромогену (0,01 % діамінобензидину). Після проведення реакції мембрани промивали водою, ретельно висушували і сканували для отримання цифрового зображення. Денситометричний аналіз імунореактивних зон проводили із застосуванням програми TotalLab TL120 (Nonlinear Inc, США).

2.9. Визначення активності амінотрансфераз у сироватці крові

2.9.1. Визначення активності аланінамінотрансферази

Визначення активності аланінамінотрансферази (АлАТ) ґрунтується на здатності L-аланіну вступати в реакцію амінування з 2-оксоглутаровою кислотою під дією АлАТ. В результаті реакції утворюються L-глутамінова та піровиноградна кислоти. Визначення ґрунтується на вимірюванні оптичної щільності 2,4-динітрофенілгідразону піровиноградної кислоти, який в лужному середовищі дає коричнево-червоне забарвлення, інтенсивність якого пропорційна кількості утвореної піровиноградної кислоти.

Визначення активності АЛАТ проводили за методом Райтмана-Френкеля, використовуючи стандартний набір реактивів «Lachema» на біохімічному аналізаторі Humalyzer 2000, відповідно до інструкції фірми виробника.

Активність АЛАТ у сироватці крові виражали у Од/л.

2.9.2. Визначення активності аспартатамінотрансферази

Визначення активності аспартатамінотрансферази (АсАТ) ґрунтується на здатності L-аспарагінової кислоти вступати в реакцію амінування з 2-оксоглутаровою кислотою під дією АсАТ. В результаті реакції утворюються L-глутамінова та щавелевооцтова кислоти, остання самовільно декарбоксилюється з утворенням піровиноградної кислоти. Визначення ґрунтується на вимірюванні оптичної щільності 2,4-динітрофенілгідрозону піровиноградної кислоти, який в лужному середовищі дає коричнево-червоне забарвлення, інтенсивність якого пропорційна кількості утвореної піровиноградної кислоти.

Визначення активності АсАТ проводили за методом Райтмана-Френкеля, використовуючи стандартний набір реактивів «Lachema» на біохімічному аналізаторі Humalyzer 2000, відповідно до інструкції фірми виробника.

Активність АсАТ у сироватці крові виражали у Од/л.

2.10. Визначення концентрації креатиніну та сечовини в сироватці крові

2.10.1. Визначення концентрації креатиніну

Принцип методу визначення концентрації креатиніну ґрунтується на здатності пікринової кислоти у лужному середовищі утворювати з креатиніном продукт жовто-червоного кольору (похідне 2,4,6-три-нітроциклогексادیєну). Інтенсивність забарвлення досліджуваного розчину прямопропорційна концентрації креатиніну у пробі.

У сироватці крові креатинін досліджують після депротейнування розчином трихлороцтової кислоти.

Визначення концентрації креатиніну проводили, використовуючи стандартний набір реактивів «Lachema» на біохімічному аналізаторі Humalyzer 2000, відповідно до інструкції фірми виробника.

Концентрацію креатиніну в сироватці крові виражали у мкмоль/л.

2.10.2. Визначення концентрації сечовини

Визначення концентрації сечовини в сироватці крові ґрунтується на здатності сечовини утворювати з діацетилмонооксимом у присутності іонів заліза і тіосемікарбазиду комплекс червоного кольору, інтенсивність забарвлення якого пропорційна вмісту сечовини в сироватці крові.

Визначення концентрації сечовини проводили діацетилмонооксимним методом, використовуючи стандартний набір реактивів «Lachema» на біохімічному аналізаторі Humalyzer 2000, відповідно до інструкції фірми виробника.

Концентрацію сечовини в сироватці крові виражали у ммоль/л.

2.11. Гістологічні та субмікроскопічні дослідження

Для гістологічних досліджень використовували печінку та нирки піддослідних тварин. Зразки органа фіксували в 10 % розчині формаліну, дегідратували у спиртах зростаючої концентрації та заливали у парафінові блоки за загальноприйнятими методиками. Виготовлені зрізи, завтовшки 5–6 мкм, фарбували гематоксиліном та еозином [21]. Огляд мікропрепаратів проводили за допомогою світлового мікроскопа MIKROmed SEO SCAN та фотодокументували за допомогою відеокамери Vision CCD Camera з системою виведення зображення гістологічних препаратів.

Для електронномікроскопічних досліджень маленькі шматочки органа фіксували в 2,5 % розчині глутаральдегіду, постфіксували в 1 % розчині тетраокису осмію на фосфатному буфері рН 7,2–7,4, зневоднювали в спиртах і пропіленоксиді та заливали в суміш епоксидних смол з аралдитом [21]. Ультратонкі зрізи, виготовлені на ультрамікротомі LKB-3 (Швеція), контрастували ураніацетатом та цитратом свинцю за методом Рейнольдса і вивчали за допомогою електронного мікроскопа ПЕМ-125К.

2.12. Методи математичного аналізу

Статистичну обробку даних виконували за допомогою програм Statistica 10 (StatSoft, США), Origin 7.5 (Origin Lab Corp., США) та Microsoft Excel XP (США). Для перевірки нормальності вибірок використовували критерій Шапіро–Уїлка. Отриманий цифровий матеріал обробляли із застосуванням загальноприйнятих методів варіаційного аналізу з використанням критерію Колмогорова–Смірнова, тесту Левайна для визначення нормальності та гомогенності дисперсії, критерію Манна–Уїтні. За умови нормального розподілу та гомоскедантичності вибірок використовували однофакторний дисперсійний аналіз із апостеріорними попарними t-тестами. В інших випадках використовували аналіз Краскела–Уолліса з апостеріорними попарними тестами Манна–Уїтні з поправкою Бонфероні та однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA. Дані вказані як середні арифметичні величини (M) та похибки середніх арифметичних (m). Зміни вважали достовірними при $p \leq 0,05$.

РОЗДІЛ 3

ЗМІНИ МЕТАБОЛІЧНИХ ПРОЦЕСІВ У ВАГІТНИХ ТА НЕВАГІТНИХ МИШЕЙ ПРИ АНТИФОСФОЛІПІДНОМУ СИНДРОМІ

Метою досліджень, виконаних на 176 мишах-самках лінії BALB/c, результати яких представлені у цьому розділі, було встановлення рівня синтезу нітроген оксиду у сироватці крові, структурах центральної нервової системи (мозочку, півкулях великого мозку), печінці та нирках, показників системи гемостазу, концентрації прозапальних та протизапальних цитокінів, вмісту аутоантитіл до протеїнів головного мозку у сироватці крові, показників реалізації апоптозу у лейкоцитах крові, вмісту гліальних протеїнів у мозочку та півкулях великого мозку, особливостей функціонування прооксидантно-антиоксидантної системи, енергозабезпечувальних процесів мітохондрій у мозочку, півкулях великого мозку, печінці та нирках вагітних та невагітних мишей за умов антифосфоліпідного синдрому.

3.1. Дослідження вмісту аутоантитіл до протеїнів головного мозку та наявності антикардіоліпінових антитіл у крові невагітних та вагітних мишей при антифосфоліпідному синдромі

АФС – аутоімунне захворювання, що характеризується наявністю в крові антитіл до негативно заряджених фосфоліпідів мембран, які містяться в плазмі крові – фосфатидилсерину, кардіоліпіну, а також зв'язаними з цими фосфоліпідами глікопротеїнами [22, 239]. У результаті проведених досліджень, при визначенні наявності аКЛ за допомогою реакції мікропреципітації з кардіоліпіновим антигеном встановлено, що у тварин контрольних груп реакція мікропреципітації була негативною. У групах мишей лінії BALB/c, в яких моделювали АФС, реакція мікропреципітації з кардіоліпіновим антигеном була позитивною, що підтверджувало розвиток АФС. Отже, наявність аКЛ у крові тварин досліджуваних груп підтверджує

валідність використаної експериментальної моделі АФС [35]. Важливе прогностичне значення, як критерій оцінки стану здоров'я жінок під час вагітності, має використання показників визначення аутоантитіл у сироватці крові до протеїнів нервової тканини (MBP, S100, GFAP, АСВР 14/18, МР65) [95]. Імуноблотинг протеїнів головного мозку мишей лінії BALB/с, оброблених сироватками крові експериментальних та контрольних мишей, представлено на рисунку 3.1.

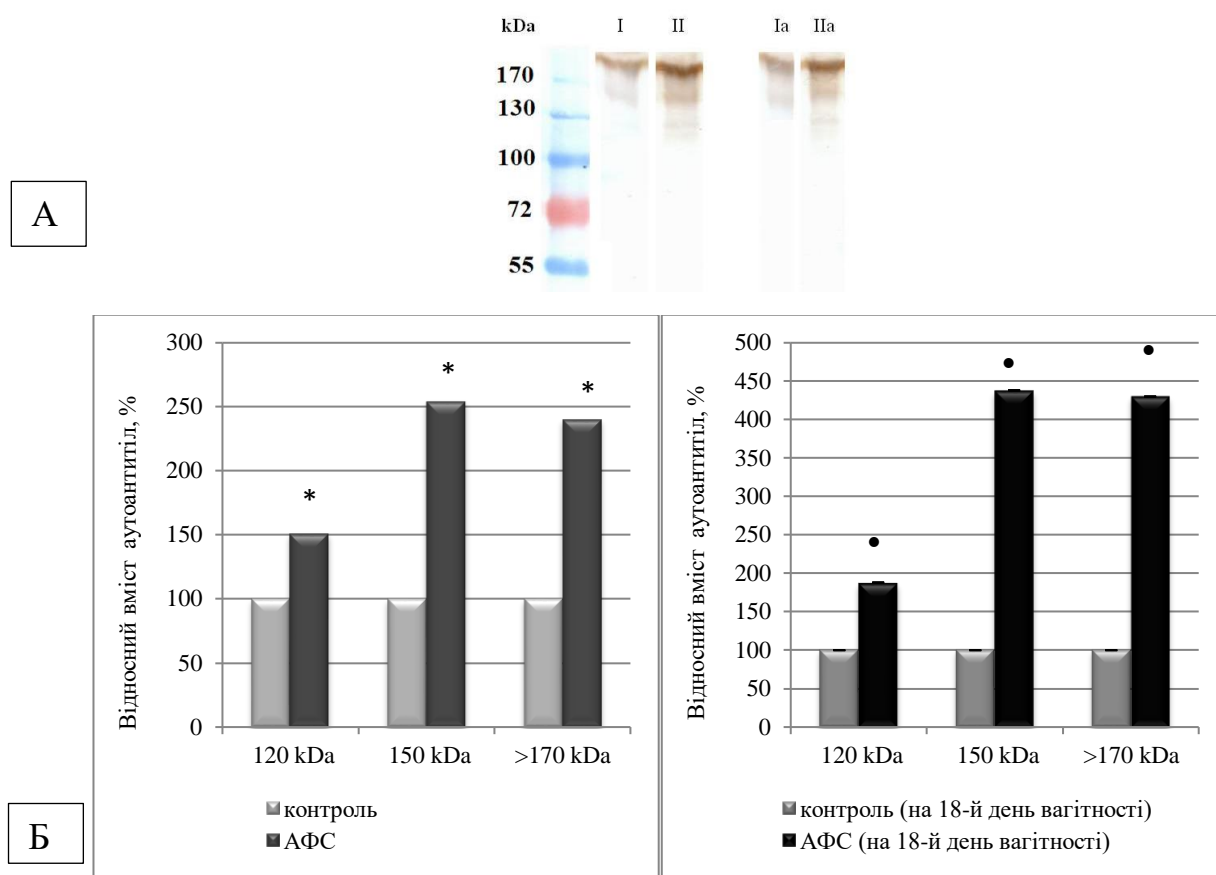


Рис. 3.1. Вестерн-блот аналіз протеїнів головного мозку, що реагують із аутоантитілами контрольних мишей лінії BALB/с та мишей із АФС до вагітності та на 18-й день вагітності: блотограма (А) та результати денситометрії (Б). Дані наведено у відсотках від контролю (n=10)

Примітка. Тут і в наступних рисунках даного розділу. Умовні позначення: I – контроль; II – АФС; Ia – контроль (на 18-й день вагітності); IIa – АФС (на 18-й день вагітності); * – достовірна відмінність від відповідних значень у контрольній групі ($p < 0,05$); • – достовірна відмінність від відповідних значень у контрольній групі (на 18-й день вагітності) ($p < 0,05$).

У результаті проведених досліджень виявлено три поліпептидні зони із величинами молекулярних мас приблизно 120 kDa, 150 kDa та >170 kDa, які зв'язували молекули IgG, що містилися у сироватці крові мишей. Отримані результати свідчать про наявність антитіл до власних протеїнів головного мозку. Результати денситометричного аналізу показали, що у сироватці крові мишей BALB/c з АФС зростав вміст аутоантитіл 120 kDa в 1,5 раза, 150 kDa – в 2,5 раза та >170 kDa – в 2,4 раза, порівняно з контролем (див. рис. 3.1).

Встановлено, що у сироватці крові вагітних мишей із АФС зростав вміст аутоантитіл 120 kDa в 1,9 раза, 150 kDa – в 4,4 раза та >170 kDa – в 4,3 раза, порівняно з аналогічними показниками у групі вагітних тварин без АФС (див. рис. 3.1).

Отримані результати свідчать про збільшення вмісту антитіл до власних протеїнів головного мозку у вагітних мишей BALB/c із АФС на 18-й день вагітності, причому їх кількість переважає таку в інтактних тварин та вагітних тварин без АФС.

Отже, фактором, що ініціює невиношування вагітності, виникнення фетоплацентарної недостатності і різноманітних вад розвитку плода при АФС може бути зростання продукції материнських аутоантитіл. Антитіла класу IgG, синтезовані в організмі вагітної жінки при АФС, проникають через плацентарний бар'єр та вважаються «ембріотропними» [74, 95].

3.2. Стан системи гемостазу при антифосфоліпідному синдромі у невагітних та вагітних мишей

Антифосфоліпідні антитіла, взаємодіючи з фосфоліпідами мембран тромбоцитів і ендотеліальних клітин судин та факторами згортання крові, сприяють тромбоутворенню, викликають посилення синтезу тромбоксану, підвищення концентрації цитозольного кальцію, що призводить до збільшення агрегації тромбоцитів, зв'язуються з мембраною активованих тромбоцитів, що пришвидшує руйнування останніх [22, 201, 273].

У результаті виконаних досліджень встановлено зниження кількості тромбоцитів у групі тварин з АФС на 12 %, порівняно з інтактними (рис. 3.2).

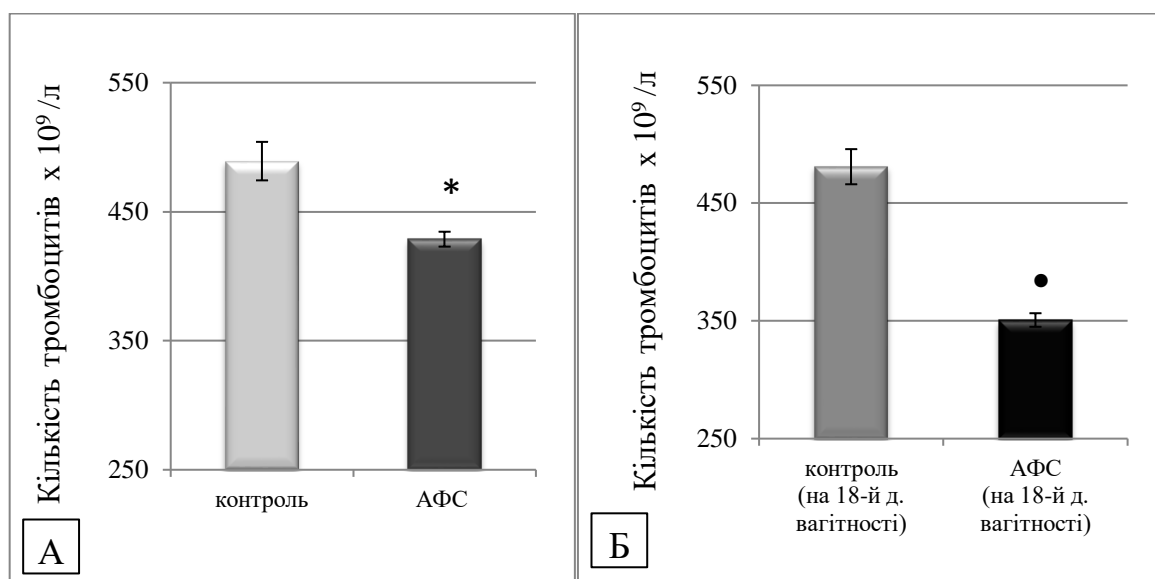


Рис. 3.2. Кількість тромбоцитів у крові контрольних мишей лінії BALB/с та мишей з АФС до вагітності (А) та на 18-й день вагітності (Б) ($M \pm m$, $n=10$)

У вагітних мишей з АФС встановлено подальше зниження кількості тромбоцитів на 27 %, порівняно з аналогічними показниками групи вагітних тварин без АФС.

У групі тварин із АФС спостерігається підвищення концентрації фібриногену на 21 %, порівняно із показниками групи інтактних тварин (рис. 3.3 А). У вагітних мишей лінії BALB/с із АФС виявлено зростання концентрації фібриногену на 43 %, порівняно з групою вагітних тварин без АФС (рис. 3.3 Б).

Встановлено, що у мишей з АФС відбувається вкорочення активованого часткового тромбопластинового часу (АЧТЧ) на 19 %, порівняно з показниками групи інтактних тварин (див. рис. 3.3 А), що свідчить про підвищену здатність до тромбоутворення [88]. Встановлено, що у вагітних мишей з АФС відбувається вкорочення АЧТЧ на 46 %, порівняно з групою вагітних тварин без АФС (див. рис. 3.3 Б).

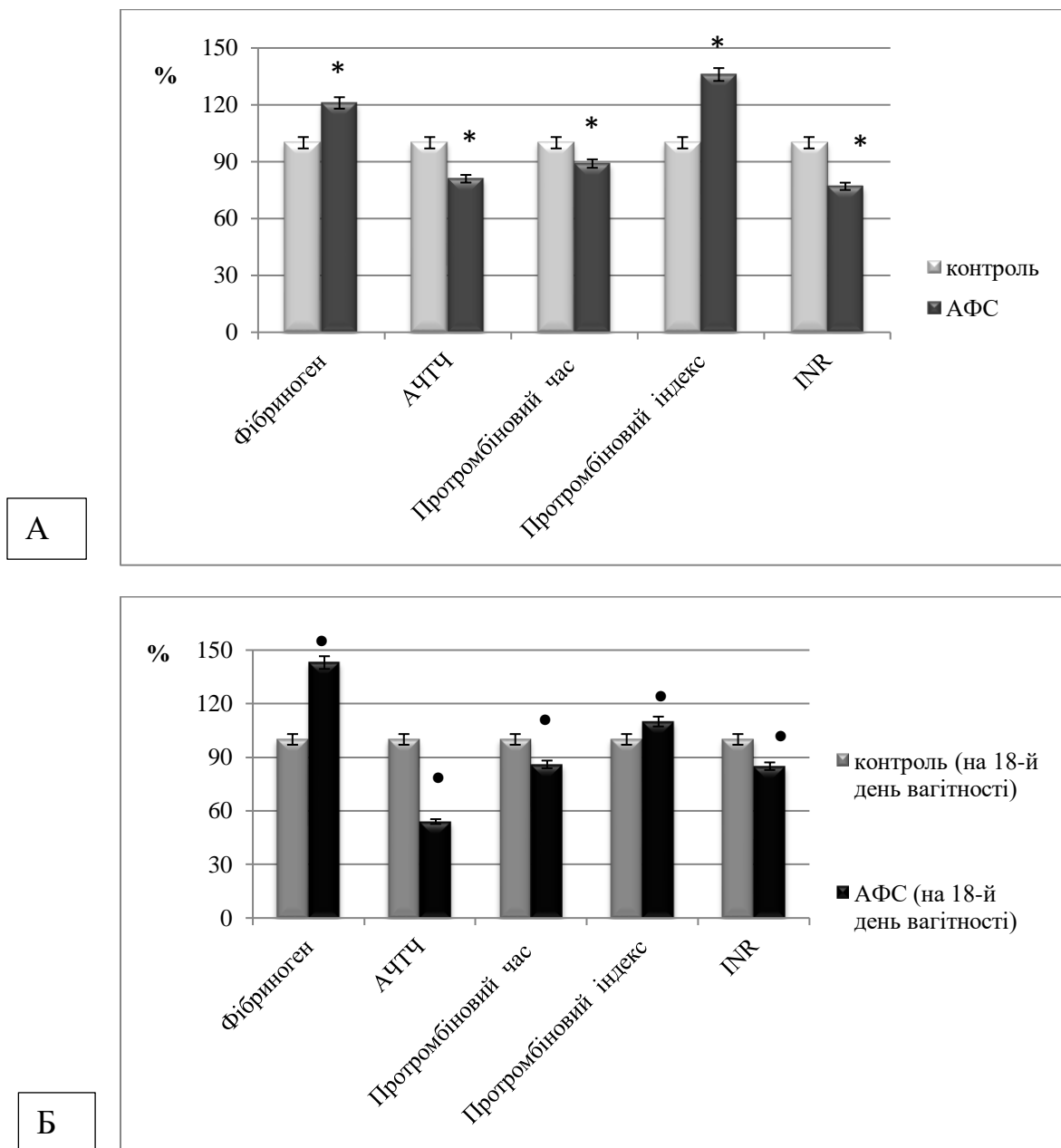


Рис. 3.3. Показники системи зсідання крові у мишей лінії BALB/c за умов АФС до вагітності (А) та на 18-й день вагітності (Б) (n=10)

Встановлено, що у групі мишей з АФС знижується протромбіновий час на 21 %, порівняно з інтактними тваринами (див. рис. 3.3 А). Спостерігається підвищення протромбінового індексу на 36 %, порівняно з показниками тварин контрольної групи. Водночас у тварин з АФС встановлено зниження міжнародного нормалізованого відношення на 23 %.

Встановлено, що у групі мишей з АФС на 18-й день вагітності відбувається зниження протромбінового часу на 14 %, підвищення протромбінового індексу на 10 % та зниження міжнародного нормалізованого відношення на 15 %, порівняно з групою вагітних тварин без АФС (див. рис. 3.3 Б).

Отже, підвищення концентрації фібриногену, сорочення протромбінового часу, підвищення протромбінового індексу та зниження міжнародного нормалізованого відношення свідчать про гіперкоагуляцію та ризик тромбоутворення у вагітних та невагітних самок з антифосфоліпідним синдромом, що є одним із провідних патогенетичних моментів невиношування вагітності при цій патології.

3.3. Стан системи нітроген оксиду при антифосфоліпідному синдромі у невагітних та вагітних мишей

Ендотеліальна дисфункція, що поєднується з рецидивним тромбозом, є одним із основних та найнебезпечніших проявів АФС [319, 395, 404]. Однією з причин розвитку ендотеліальної дисфункції у мишей з АФС стало підвищення кількості циркулюючих десквамованих ендотеліоцитів. Встановлено, що у тварин з АФС до вагітності кількість десквамованих ендотеліоцитів зростає в 1,6 раза, порівняно з інтактними, а у вагітних мишей з АФС – у 2,4 раза. Розвиток ендотеліальної дисфункції супроводжується порушенням синтезу та біодоступності NO [188, 212, 257].

Однією з ланок, що беруть участь у патобіохімічних механізмах розвитку АФС, є система NO [153, 343, 380]. Роль NO в патогенезі АФС обумовлена як прямою, так і опосередкованою дією. Відповідно, коли продукція або біодоступність NO пригнічені, виникають вазоконстрикція, тромбози, запальні процеси, гіпертрофія і стеноз судин. Важливу роль у підтриманні судинного тону та запобіганні тромбоутворенню відіграє ендотеліальна NO-синтаза [285, 309, 314].

У результаті проведених досліджень встановлено, що у мишей з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності знижується вміст eNOS у крові (на 23 % та 67 %) (рис. 3.4 А) та у печінці (на 66 % та 81 %) (рис. 3.4 Б), порівняно із показниками тварин контрольних груп). Отримані результати узгоджуються з даними інших авторів про інгібування eNOS під впливом аФЛ [343].

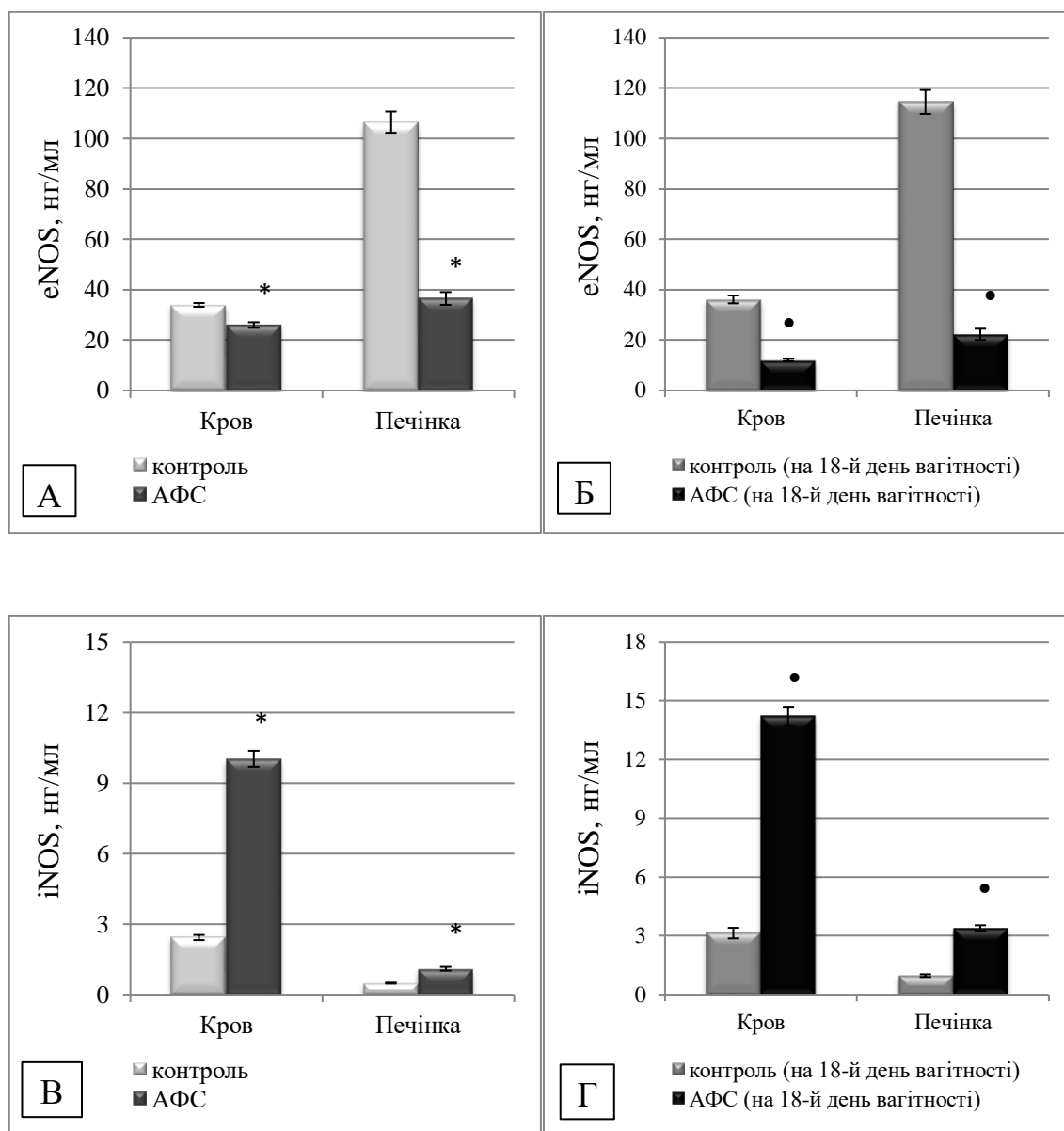


Рис. 3.4. Вміст ендотеліальної та індукційної ізоформ синтази нітроген оксиду в сироватці крові (А, В) та печінці (Б, Г) вагітних та невагітних мишей лінії BALB/c з антифосфоліпідним синдромом та при введенні L-аргініну й аміногуанідину ($M \pm m$, $n=10$)

Встановлено також зростання вмісту iNOS у крові (в 4,1 та 4,5 рази) (рис. 3.4 В) та у печінці (у 2,2 та 3,5 рази) (рис. 3.4 Г) невагітних та вагітних тварин з АФС. Підвищення активності iNOS, ймовірно, може бути спричинено зростанням продукції прозапальних цитокінів IL-1 β , IL-6 та TNF- α [380].

За умов АФС до вагітності та на 18-й день вагітності відбувалося зменшення у сироватці крові вмісту NO₂⁻ (на 26 % та 45 %), а вміст NO₃⁻ зростав (на 75 % та 60 %), порівняно з показниками контрольних груп (табл. 3.1). Отримані нами результати щодо зниження вмісту NO₂⁻ [153] та збільшення вмісту NO₃⁻ у сироватці крові за умов АФС узгоджуються з даними інших науковців [67].

NO виконує роль інтегруючого елемента в функціонуванні нервової системи. NO – ефективний регулятор нейронів, глії та судин, включаючи капіляри мозку [34, 62, 70, 286, 327, 399, 418]. За даними літератури, підвищений синтез NO в головному мозку супроводжується підвищенням рівнів NO₂⁻ та NO₃⁻ у крові та лікворі пацієнтів [84]. Встановлено, що у групі тварин з АФС відбувається зростання вмісту стабільних метаболітів нітроген оксиду NO₂⁻ на 46 % та NO₃⁻ на 41 % у мозочку, порівняно із показниками інтактних тварин (табл. 3.1).

У мишей BALB/c із АФС на 18-й день вагітності у мозочку зареєстровано зростання вмісту стабільних метаболітів нітроген оксиду NO₂⁻ на 54 % та NO₃⁻ на 65 %, порівняно із показниками вагітних тварин контрольної групи. У півкулях великого мозку мишей BALB/c з АФС встановлено зростання NO₂⁻ на 28 % та NO₃⁻ та 20 % відповідно, відносно контролю (табл. 3.1).

Проте у зразках півкуль великого мозку вагітних мишей BALB/c за умов АФС відбувається достовірне зниження вмісту NO₂⁻ на 15 % та NO₃⁻ на 19 %, порівняно з контролем. Отримані нами результати узгоджуються з даними літератури про те, що синтез і біодоступність NO порушуються при акушерському АФС [76]. Це може бути пов'язано як із недостатністю

субстрату для синтезу NO L-аргініну, так і з утворенням підвищеного рівня супероксиданіона, який швидко зв'язує й інактивує NO [67, 285].

Таблиця 3.1

Вміст NO_2^- та NO_3^- у сироватці крові, мозочку, півкулях великого мозку, печінці та нирках контрольних мишей лінії BALB/c та мишей з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності ($M \pm m$, $n=10$)

Показник	Група тварин			
	до вагітності		на 18-й день вагітності	
	контроль	АФС	контроль	АФС
	Сироватка крові			
NO_2^- , мкмоль/л	2,23±0,10	1,65±0,15 $p<0,05$	1,99±0,08	1,10±0,07 $p<0,001$
NO_3^- , мкмоль/л	11,22±0,48	19,65±0,97 $p<0,001$	9,57±0,58	15,29±0,66 $p<0,005$
	Мозочок			
NO_2^- , мкмоль/кг	3,37±0,08	4,90±0,14 $p<0,001$	3,45±0,07	5,31±0,14 $p<0,001$
NO_3^- , мкмоль/кг	16,76±0,45	23,71±0,83 $p<0,001$	17,73±0,77	29,29±1,28 $p<0,001$
	Півкулі великого мозку			
NO_2^- , мкмоль/кг	2,79±0,08	3,57±0,15 $p<0,005$	2,86±0,09	2,43±0,10 $p<0,05$
NO_3^- , мкмоль/кг	14,78±0,34	17,69±0,52 $p<0,005$	15,48±0,81	12,56±0,33 $p<0,05$
	Печінка			
NO_2^- , мкмоль/кг	1,55±0,05	1,35±0,05 $p<0,05$	2,11±0,08	0,68±0,04 $p<0,001$
NO_3^- , мкмоль/кг	9,17±0,35	11,01±0,51 $p<0,05$	9,72±0,31	18,94±0,78 $p<0,001$
	Нирки			
NO_2^- , мкмоль/кг	0,63±0,03	1,19±0,07 $p<0,001$	0,72±0,04	1,41±0,04 $p<0,001$
NO_3^- , мкмоль/кг	7,20±0,19	15,89±0,89 $p<0,001$	7,46±0,19	13,70±0,59 $p<0,001$

Примітка. Тут і в наступних таблицях даного розділу. p – достовірно відмінне від відповідних значень у контрольній групі.

Встановлено, що за умов АФС до вагітності та на 18-й день вагітності відбувається зниження вмісту NO_2^- у печінці (на 13% та 68%), а рівень NO_3^- зростає (на 20% та 95%), відносно показників контрольних груп (табл. 3.1). Зростання рівня NO_3^- у печінці, ймовірно, зумовлено активацією iNOS [251]. Водночас, незважаючи на гіперпродукцію NO, виникає відносна його недостатність на рівні внутрішньопечінкової мікроциркуляції [69, 403], що узгоджується із зареєстрованим зниженням вмісту NO_2^- у печінці.

Встановлено, що за умов АФС у нирках вміст NO_2^- зростав на 88%, а NO_3^- – в 2,2 рази, відносно контролю (див. табл. 3.1). У мишей BALB/c з АФС на 18-й день вагітності у нирках відбувалося збільшення вмісту стабільних метаболітів нітроген оксиду NO_2^- на 94% та NO_3^- на 84%, порівняно з показниками вагітних тварин із АФС.

Отже, результати проведених нами досліджень свідчать, що при АФС у сироватці крові та печінці вагітних та невагітних мишей BALB/c виникає відносна недостатність NO, який синтезується під впливом eNOS, на фоні загальної гіперпродукції NO, який синтезується під впливом iNOS. Встановлено підвищення рівня синтезу NO у мозочку та нирках невагітних та вагітних мишей BALB/c з АФС. У півкулях великого мозку невагітних тварин з АФС встановлено зростання вмісту NO_2^- та NO_3^- і зниження вмісту NO_2^- та NO_3^- у вагітних мишей з АФС.

3.4. Цитокінетичний профіль при антифосфоліпідному синдромі у невагітних та вагітних мишей

За даними літератури, при АФС відбувається активація імунної відповіді за Th1 типом. Процеси запалення контролюють прозапальні (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF, IFN) та протизапальні (IL-4, IL-10) цитокіни [2].

Результати досліджень показали, що при АФС у мишей BALB/c відбувається зростання концентрації IL-1 β у 3,2 рази та IL-6 у 2,3 рази, порівняно

із показниками інтактних тварин (табл. 3.2). Секреція IL-1 β індукує синтез IL-6, S100B, α 1-антихімотрипсину та активує ензим iNOS, що призводить до підвищеного синтезу нітроген оксиду [96].

Як свідчать отримані нами результати, вміст TNF- α у сироватці крові мишей BALB/c із АФС зростає в 4,5 рази відносно контролю (див. табл. 3.2). Отримані нами результати щодо підвищення концентрації прозапальних цитокінів (IL-1 β , IL-6, TNF- α) у сироватці крові при АФС узгоджуються з даними інших авторів [91, 170, 225, 232]. TNF- α і розчинний TNF α -рецептор 1 (pTNF α R1) беруть участь у розвитку аутоімунних захворювань, апоптозу, збільшення концентрації TNF- α пов'язують із втратою плода при АФС [91].

Таблиця 3.2

Вміст цитокінів у сироватці крові контрольних мишей лінії BALB/c та мишей з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності ($M \pm m$, $n=10$)

Показник	Група тварин			
	до вагітності		на 18-й день вагітності	
	контроль	АФС	контроль	АФС
IL-1 β , пг/мл	14,22 \pm 0,55	46,11 \pm 2,86 $p < 0,001$	12,64 \pm 0,69	58,72 \pm 2,22 $p < 0,001$
IL-6, пг/мл	8,23 \pm 0,22	19,02 \pm 0,79 $p < 0,001$	9,96 \pm 0,47	34,97 \pm 1,63 $p < 0,001$
TNF- α , пг/мл	16,39 \pm 0,89	73,88 \pm 1,78 $p < 0,001$	13,94 \pm 0,70	66,90 \pm 2,33 $p < 0,001$
IL-4, пг/мл	29,46 \pm 1,01	15,81 \pm 0,88 $p < 0,001$	77,35 \pm 5,18	36,33 \pm 1,61 $p < 0,001$
IL-10, пг/мл	67,88 \pm 4,44	30,59 \pm 1,57 $p < 0,001$	117,13 \pm 4,73	67,37 \pm 2,05 $p < 0,001$

Встановлено зниження концентрації протизапальних цитокінів IL-4 в 1,9 рази та IL-10 у 2,2 рази у сироватці крові мишей BALB/c з АФС, порівняно із показниками контролю (див. табл. 3.2).

Цитокіни відіграють важливу роль у збереженні вагітності, беруть участь в ембріогенезі, процесі закладки та розвитку ряду органів, у тому числі й імунної системи [379].

У мишей BALB/c з АФС на 18-й день вагітності встановлено зростання концентрації прозапальних цитокінів IL-1 β у 4,6 раза, IL-6 – у 3,5 раза, TNF- α – у 4,8 раза, порівняно із показниками вагітних тварин без АФС (див. табл. 3.2).

У вагітних мишей BALB/c з АФС встановлено зниження концентрації протизапальних цитокінів: IL-4 – у 2,1 раза та IL-10 – в 1,7 раза, порівняно із показниками вагітних тварин без АФС (див. табл. 3.2). Отримані результати узгоджуються з даними інших науковців [13].

Під час вагітності відбувається ряд змін, спрямованих на її збереження і запобігання відторгненню плідного яйця, до яких належать посилення гуморального імунітету і продукції цитокінів Th2 (IL-4, IL-10) [118, 151].

Отже, встановлено, що у сироватці крові вагітних та невагітних мишей BALB/c за умов АФС відбувається зростання концентрації прозапальних цитокінів (IL-1 β , IL-6, TNF- α) та зниження концентрації протизапальних цитокінів (IL-4 та IL-10), порівняно із показниками контролю.

3.5. Показники процесу апоптозу, продукції активних форм оксигену у лейкоцитах крові та вміст каспази-3 і β -актину у печінці невагітних та вагітних мишей при антифосфоліпідному синдромі

Апоптоз – це запрограмований та генетично врегульований процес загибелі клітин [24]. Молекулярні білково-фосфоліпідні комплекси, що утворюються під час апоптозу, є мішенню для аФЛ. Зв'язування апоптотичних клітин цими аутоантитілами, ймовірно, ще більше посилює аФЛ-опосередковану імунну відповідь. аФЛ зазвичай відсутні на зовнішній поверхні клітинних мембран, при апоптозі вони перерозподіляються від внутрішньої до зовнішньої сторони біомембрани [281, 346].

У результаті проведених нами досліджень встановлено, що при АФС знижується життєздатність лейкоцитів крові вагітних та невагітних мишей лінії BALB/c, порівняно з контролем (рис. 3.5). Ймовірно, що їх смерть частково зумовлена активацією апоптозу, оскільки відомо, що лейкоцити гинуть унаслідок індукції апоптозу [25].

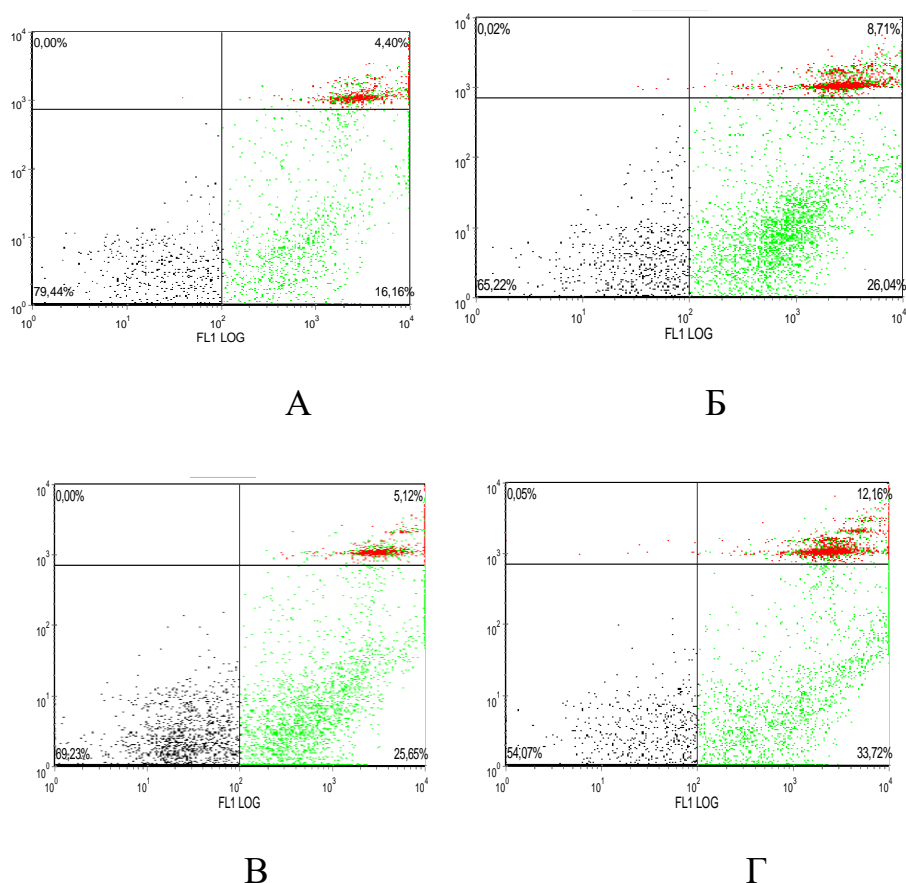


Рис. 3.5. Точкові діаграми розподілу апоптотичних і життєздатних клітин контрольних мишей лінії BALB/c (А, В) та мишей з АФС (Б, Г) до вагітності та при вагітності в режимі DotPlot (інтенсивність флуоресценції за каналом FL1 (515–535 нм) і FL3 (620–630 нм))

Примітка. Чорним кольором позначено живі клітини, червоним кольором – клітини PI-позитивні і анексин V-GFP-позитивні (некротичні), а зеленим – тільки анексин V-GFP позитивні (апоптотичні).

Отримані нами результати свідчать про перерозподіл між двома основними типами лейкоцитів у мишей за умов АФС (рис. 3.6). Спостерігалось збільшення кількості гранулоцитів у крові невагітних мишей при АФС на 48 % й під час вагітності на 55 %. Ймовірно, це пов'язано із активацією запальних процесів в організмі тварин. Зміни в перерозподілі лейкоцитів можуть бути обумовлені захворюваннями системи крові та розвитком запальної реакції при різних патологічних станах [25]. Отримані нами результати узгоджуються з даними інших авторів [207] про те, що розвиток запальних реакцій відіграє важливу роль у патогенезі АФС, незважаючи на те, що запалення не є ключовою особливістю клінічної картини розвитку АФС.

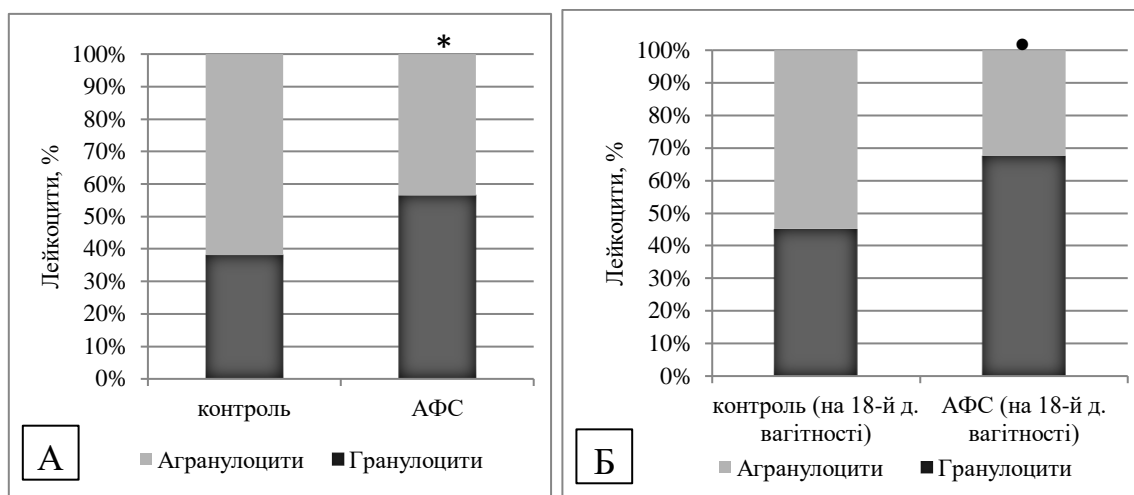


Рис. 3.6. Перерозподіл лейкоцитів крові у мишей лінії BALB/c за умов антифосфоліпідного синдрому до вагітності (А) та на 18-й день вагітності (Б)

Ключова роль у розвитку апоптозу належить каспазі-3 [24]. У результаті проведених досліджень встановлено зростання вмісту активної форми каспази-3 (p17) на 48 % в печінці мишей лінії BALB/c за умов АФС (рис. 3.7). У печінці вагітних мишей BALB/c за умов АФС вміст активної форми каспази-3 (p17) був вищим у 2,9 раза, ніж у печінці мишей контрольної групи (рис. 3.7).

Підвищення вмісту каспази-3, ймовірно, зумовлено активацією мітохондріального шляху апоптозу, який пов'язаний з надходженням проапоптогенних сигналів, до яких належать АФО [63].

Білки цитоскелета клітин та зв'язані з ними регуляторні протеїни необхідні для підтримання нормальної структури клітин та їх росту. β -актин – головний компонент цитоскелета, який відіграє важливу роль у багатьох цитоплазматичних і ядерних функціях клітини, зокрема у забезпеченні процесів сигнал/відповідь, моторики, ендоцитозу, функціонування органел [217, 224].

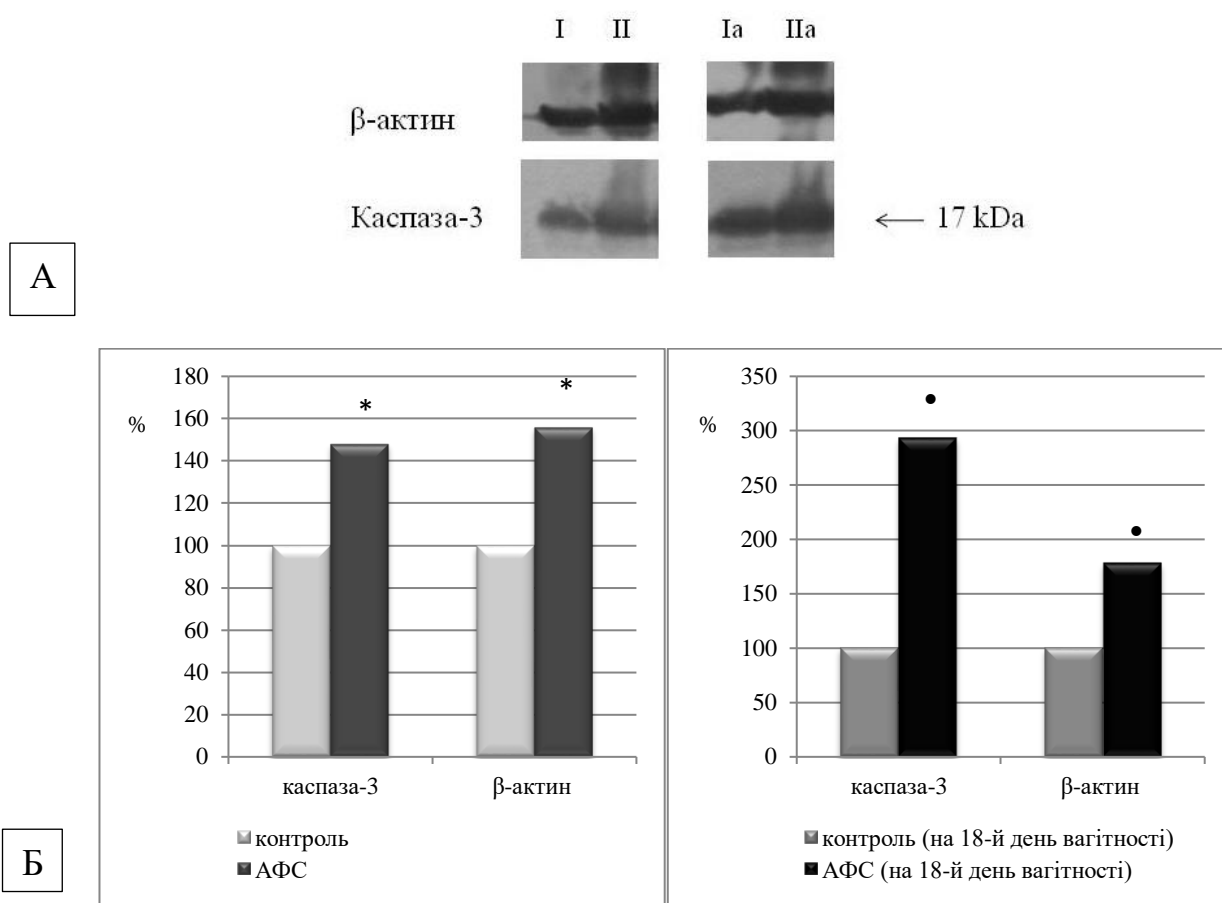


Рис. 3.7. Вестерн-блот аналіз вмісту активної форми каспази-3 та β -актину в печінці контрольних мишей лінії BALB/с та експериментальних мишей з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності: блотограма (А) та результати денситометрії (Б). Дані наведено у відсотках від контролю (n=10)

У результаті проведених нами досліджень встановлено, що у печінці мишей лінії BALB/c за умов АФС відбувається зростання вмісту β -актину в 1,6 раза, порівняно із показниками групи контрольних тварин (див. рис. 3.7). У печінці вагітних мишей BALB/c за умов АФС вміст β -актину був у 1,8 раза вищим, ніж у печінці вагітних мишей без АФС.

β -актин регулює апоптоз, стабілізуючи рецептори TNF- α [192]. У мітохондріях β -актин регулює транскрипцію mtDNA і підтримання їх мембранного потенціалу [409]. Ремоделювання β -актину необхідне для процесів міграції, інфільтрації лімфоцитів та апоптозу [192].

Одним із важливих компонентів патогенезу АФС, що сприяє дисфункції імунокomпетентних клітин і синтезу аутоантитіл, є утворення АФО [263, 264, 393]. Під час оцінки ступеня утворення АФО в лейкоцитах мишей BALB/c із АФС встановлено, що базальний рівень продукування АФО у гранулоцитах знижується на 27 %, а в агранулоцитах – на 19 %, порівняно із контрольною групою (рис. 3.8 А, 3.9 А). У групі вагітних мишей з АФС встановлено подальше зниження АФО в гранулоцитах на 36 % та в агранулоцитах на 22 %, відносно показників вагітних тварин (рис. 3.8 Б, 3.9 Б).

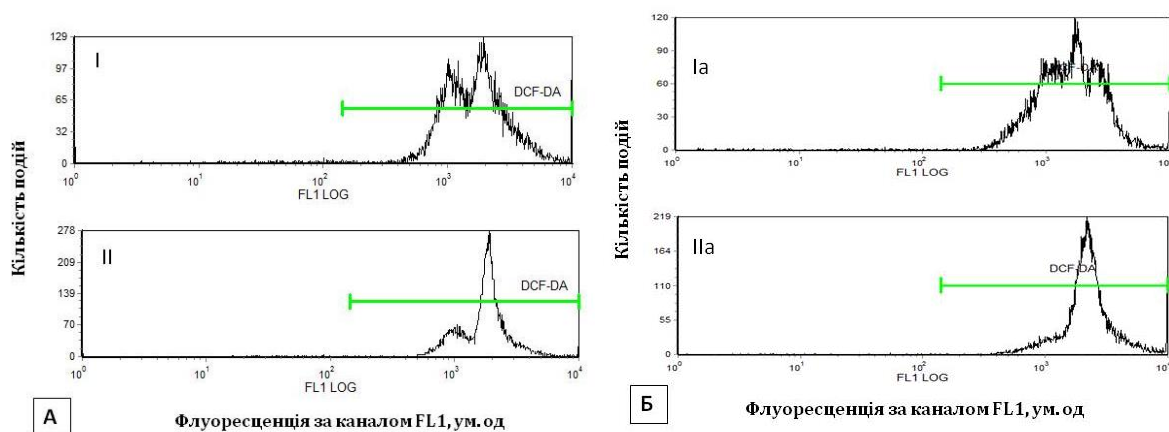


Рис. 3.8. Типові гістограми флуоресценції DCF-DA в зразках лейкоцитів крові контрольних мишей лінії BALB/c і експериментальних мишей з АФС до вагітності (А) та на 18-й день вагітності (Б) за каналом log FL1

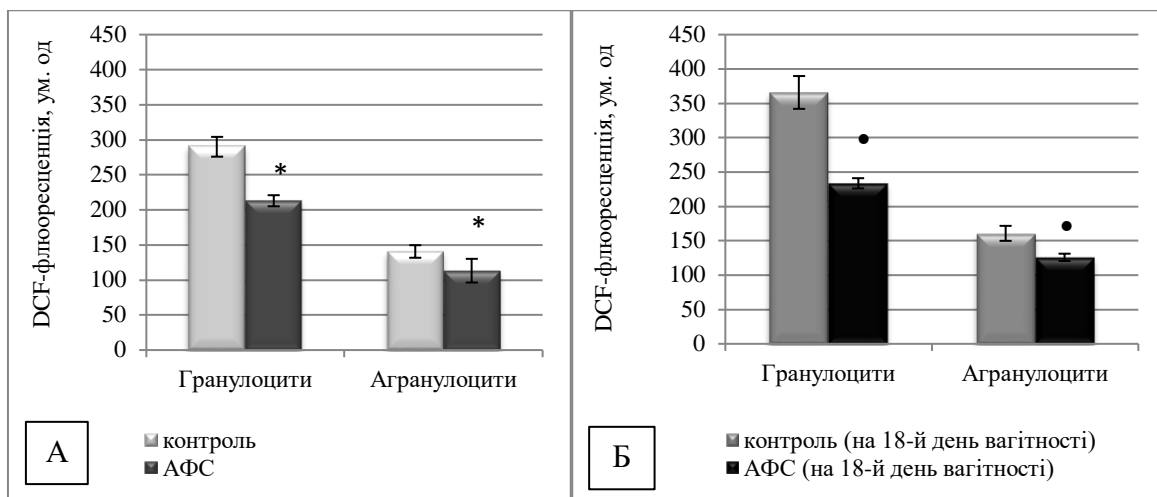


Рис. 3.9. Рівень АФО у лейкоцитах крові контрольних мишей лінії BALB/c та мишей з АФС до вагітності (А) та на 18-й день вагітності (Б) ($M \pm m$, $n=10$)

Таким чином, встановлено, що у вагітних та невагітних мишей при АФС відбувається перерозподіл між гранулоцитами та агранулоцитами із збільшенням кількості гранулоцитів. Розвиток АФС супроводжується дефіцитом продукування АФО в гранулоцитах та агранулоцитах у мишей лінії BALB/c. Встановлено, що при АФС знижується життєздатність лейкоцитів крові вагітних та невагітних мишей, порівняно з контролем. Ймовірно, що їх смерть частково зумовлена активацією апоптозу. Про активацію апоптозу при АФС свідчить і зростання вмісту активної форми каспази-3 та β -актину у печінці вагітних та невагітних тварин.

3.6. Роль оксидативного стресу у механізмах ураження мозочка, півкулях великого мозку, печінки та нирок невагітних та вагітних мишей при антифосфоліпідному синдромі

Відомо, що оксидативний стрес бере участь у патобіохімічних механізмах розвитку АФС [53, 212, 325, 372].

Установлено, що в досліджуваних відділах головного мозку (мозочку та півкулях великого мозку) мишей лінії BALB/c з АФС до вагітності

та на 18-й день вагітності відбувається активація вільнорадикальних процесів. Встановлено збільшення вмісту ГПЛ на 96 % у мозочку мишей з АФС, відносно показників інтактних тварин (табл. 3.3).

Первинні продукти пероксидного окиснення ліпідів нестійкі і швидко розкладаються з утворенням вторинних продуктів: альдегідів, кетонів, спиртів [42, 161, 400]. Відповідно, спостерігається збільшення вмісту ТБК-АП – на 56 % у мозочку тварин з АФС відносно контролю (табл. 3.3). Основним компонентом ТБК-АП є малоновий діальдегід, який при взаємодії з SH- та CH₃-групами білків пригнічує активність ензимів, сприяє цитолізу, агрегації тромбоцитів та зменшенню синтезу простагландинів [42].

Таблиця 3.3

Показники системи прооксиданти – антиоксиданти та активності ензимів тканинного дихання у мозочку контрольних мишей лінії BALB/c та мишей з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності (M±m, n=10)

Показник	Група тварин			
	до вагітності		на 18-й день вагітності	
	контроль	АФС	контроль	АФС
ГПЛ, у.о./г тканини	8,04±0,56	15,76±0,54 p<0,001	11,83±0,33	19,75±0,60 p<0,001
ТБК-АП, нмоль/г тканини	4,28±0,12	6,78±0,22 p<0,001	7,24±0,41	14,17±0,45 p<0,001
СОД, у.о./мг протеїну	2,41±0,08	1,09±0,08 p<0,001	3,84±0,28	1,44±0,13 p<0,001
КАТ, нмоль/хв·мг протеїну	4,42±0,27	1,79±0,09 p<0,001	6,76±0,29	2,07±0,15 p<0,001
G-SH, мкмоль/г тканини	7,14±0,22	5,65±0,06 p<0,001	5,79±0,09	3,92±0,14 p<0,001
СДГ, нмоль/хв·мг протеїну	5,85±0,05	4,36±0,07 p<0,001	5,11±0,15	3,48±0,09 p<0,001
ЦХО, мкмоль/хв·мг протеїну	8,24±0,45	3,16±0,07 p<0,001	7,53±0,37	2,20±0,07 p<0,001

Відомо, що інтенсифікація вільнорадикального окиснення поєднується з дискоординацією в системі прооксиданти–антиоксиданти [17]. Порушення балансу між концентрацією АФО та АОС призводить до оксидативного стресу [226, 249, 288, 367, 421]. Окиснювальні пошкодження сприяють ішемічно-реперфузійним пошкодженням. Механізм, за допомогою якого відбувається збільшення АФО, на сьогодні вивчений недостатньо [196].

СОД каталізує перетворення супероксиданіон радикалу в H_2O_2 , відіграє важливу роль у пригніченні окислювальної інактивації NO, запобігаючи утворенню пероксинітриту та дисфункції ендотелію і мітохондрій [235]. Встановлено зниження активності антиоксидантних ензимів: СОД на 55 % та КАТ на 60 % у мозочку мишей за умов АФС, порівняно із показниками інтактних тварин. Функціональною основою системи антиоксидантного захисту є глутатіонова система, яка бере участь в інактивації пероксиду гідрогену та ліпопероксидів, виконує захисну функцію для SH-груп у протеїнах мембран [51, 292, 293, 350]. У мозочку мишей з АФС нами встановлено зниження вмісту G-SH на 21 %, порівняно з контрольною групою. Зниження рівня G-SH в органах і тканинах призводить до оксидативного стресу [65, 160].

Нагромадження продуктів ПОЛ призводить до пошкодження генетичного апарата клітин, гальмує клітинний поділ, пригнічує окисне фосфорилування [51, 325]. Джерелом електронів для одноелектронного відновлення молекулярного кисню з утворенням його активних форм (супероксидного аніон-радикала, пероксиду гідрогену і гідроксильного радикала) найчастіше є дихальний ланцюг мітохондрій і мікросомальна система [65, 317, 398]. У результаті досліджень у мозочку тварин з АФС виявлено порушення функціонування ензимів дихального ланцюга мітохондрій, про що свідчило зменшення активності СДГ на 25 % і ЦХО на 62 % відносно контролю.

Встановлено також, що у мозочку вагітних мишей з АФС відбувається підвищення вмісту ГПЛ на 67 %, ТБК-АП на 96 %, та зниження активності СОД на 63 %, КАТ на 69 %, пулу G-SH на 32 %, порівняно із показниками контролю (групи вагітних тварин без АФС). Вказані зміни супроводжувались порушенням

тканинного дихання, про що свідчило зменшення активності СДГ на 32 % та ЦХО на 71 %, порівняно з контролем.

У півкулях великого мозку мишей за умов АФС вміст ГПЛ зростав на 75 %, а кількість ТБК-АП збільшувалася на 44 % відносно контролю (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Показники системи прооксиданти – антиоксиданти та активності ензимів тканинного дихання у півкулях великого мозку контрольних мишей лінії BALB/c та мишей з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності ($M \pm m$, $n=10$)

Показник	Група тварин			
	до вагітності		на 18-й день вагітності	
	контроль	АФС	контроль	АФС
ГПЛ, у.о./г тканини	7,6 \pm 0,27	13,3 \pm 0,28 $p < 0,001$	8,8 \pm 0,25	12,4 \pm 0,67 $p < 0,005$
ТБК-АП, нмоль/г тканини	3,88 \pm 0,15	5,59 \pm 0,23 $p < 0,001$	4,81 \pm 0,15	9,24 \pm 0,20 $p < 0,001$
СОД, у.о./мг протеїну	4,08 \pm 0,29	2,11 \pm 0,14 $p < 0,001$	5,37 \pm 0,21	1,88 \pm 0,10 $p < 0,001$
КАТ, нмоль/хв·мг протеїну	6,07 \pm 0,13	2,67 \pm 0,21 $p < 0,001$	8,45 \pm 0,19	3,33 \pm 0,11 $p < 0,001$
G-SH, мкмоль/г тканини	6,85 \pm 0,31	4,19 \pm 0,10 $p < 0,001$	6,00 \pm 0,25	2,92 \pm 0,11 $p < 0,001$
СДГ, нмоль/хв·мг протеїну	5,64 \pm 0,09	4,64 \pm 0,08 $p < 0,001$	5,37 \pm 0,23	4,78 \pm 0,20 $p > 0,05$
ЦХО, мкмоль/хв·мг протеїну	7,44 \pm 0,29	3,60 \pm 0,11 $p < 0,001$	7,66 \pm 0,22	6,93 \pm 0,23 $p > 0,05$

Водночас, активність СОД зменшувалась на 48 %, функціональна здатність КАТ знижувалась на 56 % (див. табл. 3.4). Зростання швидкості утворення пероксиду гідрогену призводило до виснаження резервів каталази. В той же час відбувалось зниження вмісту G-SH у півкулях великого мозку на 39 % (див. табл. 3.4), порівняно з контрольною групою. G-SH бере безпосередню участь у знешкодженні вільних радикалів та їх токсичних продуктів, а також

у відновленні сульфгідрильних груп ензимів. Зниження вмісту G-SH може бути пов'язано як з інтенсифікацією процесів ПОЛ в ураженому органі, так і з підсиленням катаболізму глутатіону [65, 292, 293, 350].

Відомо, що при активації процесів переокиснення мембранних ліпідів знижується енергозабезпечення клітин унаслідок роз'єднання дихання і окисного фосфорилування в мітохондріях та розвитку їх дисфункції [56, 317]. У результаті досліджень при АФС виявлено порушення функціонування мітохондрій у великих півкулях головного мозку, про що свідчило зменшення активності СДГ на 18 % та ЦХО на 52 %, порівняно з показниками інтактних тварин.

Встановлено, що у півкулях великого мозку тварин з АФС на 18-й день вагітності відбувається збільшення вмісту ГПЛ на 42 % та ТБК-АП на 92 %, порівняно із показниками контрольної групи. Водночас встановлено зниження активності СОД на 65 % та КАТ на 61 %, вмісту G-SH на 51 %. Активність ензимів електронотransпортного ланцюга мітохондрій (СДГ та ЦХО) достовірно не змінювалася, порівняно з контролем (див. табл. 3.4).

Про розвиток цитолізу у печінці свідчило зростання активності АЛАТ (у 2,1 та 2,6 рази) та АсАТ (у 2,6 та 1,9 рази) у сироватці крові невагітних та вагітних мишей з АФС, порівняно із показниками контрольних груп (табл. 3.5).

Водночас у печінці тварин з АФС відбувалася активація вільнорадикальних процесів. Спостерігалось збільшення вмісту ГПЛ на 52 % та ТБК-АП – на 36 % у печінці тварин з АФС відносно показників групи інтактних тварин (табл. 3.6).

Відомо, що на початкових етапах розвитку оксидативного стресу збільшення супероксидного аніон-радикала може індукувати зростання активності СОД. Встановлено компенсаторне зростання активності СОД на 45 % у печінці при АФС, порівняно із показниками інтактних тварин (див. табл. 3.6). Отримані результати узгоджуються із даними [325].

Таблиця 3.5

Показники активності амінотрансфераз та вмісту сечовини та креатиніну у сироватці крові контрольних мишей лінії BALB/с та мишей з АФС

до вагітності та на 18-й день вагітності ($M \pm m$, $n=10$)

Показник	Група тварин			
	до вагітності		на 18-й день вагітності	
	контроль	АФС	контроль	АФС
АлАТ, Од/л	50,33 \pm 2,62	105,86 \pm 5,63 $p < 0,001$	54,56 \pm 3,74	140,87 \pm 7,94 $p < 0,001$
АсАТ, Од/л	119,57 \pm 7,52	306,59 \pm 13,53 $p < 0,001$	122,19 \pm 7,67	236,96 \pm 13,16 $p < 0,001$
Креатинін, мкмоль/л	23,70 \pm 0,49	44,40 \pm 1,60	24,85 \pm 1,59	54,82 \pm 2,67 $p < 0,001$
Сечовина, ммоль/л	6,41 \pm 0,21	11,27 \pm 0,51 $p < 0,001$	6,05 \pm 0,48	11,96 \pm 0,77 $p < 0,01$

Встановлено зростання активності КАТ на 26 % відносно контролю. Одержані результати можна пояснити підвищенням активності СОД, яка каталізує реакцію перетворення супероксид-аніона до пероксиду гідрогену, єдиного субстрату каталази. Утворений у мітохондріях і цитозолі пероксид гідрогену розкладається глутатіонпероксидазою, а у пероксисомах – каталазою [65, 258, 280]. У печінці мишей з АФС встановлено зменшення вмісту G-SH на 21 %, порівняно з контрольною групою. За даними літератури [65], відновно-окиснювальний потенціал пари GSH/GSSG наближається до термодинамічної рівноваги з тіоловими групами протеїну і необхідний для збереження функціональної цілісності клітини.

Також виявлено порушення функціонування ензимів дихального ланцюга мітохондрій у печінці тварин з АФС, про що свідчило зменшення активності СДГ на 24 % та ЦХО на 39 % відносно контролю (табл. 3.6).

Таблиця 3.6

Показники системи прооксиданти – антиоксиданти та активності ензимів
тканинного дихання у печінці контрольних мишей лінії BALB/c та мишей
з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності ($M \pm m$, $n=10$)

Показник	Група тварин (печінка)			
	до вагітності		на 18-й день вагітності	
	контроль	АФС	контроль	АФС
ГПЛ, у.о./г тканини	7,17±0,36	10,86±0,27 $p < 0,001$	7,71±0,49	11,47±0,56 $p < 0,01$
ТБК-АП, нмоль/г тканини	4,13±0,36	5,60±0,22 $p < 0,05$	4,35±0,17	9,06±0,81 $p < 0,001$
СОД, у.о./мг протеїну	3,01±0,21	4,36±0,23 $p < 0,01$	3,27±0,23	1,14±0,08 $p < 0,001$
КАТ, нмоль/хв·мг протеїну	13,59±1,01	17,13±0,79 $p < 0,05$	14,11±1,16	6,20±0,61 $p < 0,001$
G-SH, мкмоль/г тканини	4,09±0,17	3,24±0,17 $p < 0,05$	3,04±0,30	1,11±0,07 $p < 0,001$
СДГ, нмоль/хв·мг протеїну	7,78±0,39	5,92±0,30 $p < 0,01$	8,16±0,28	5,21±0,29 $p < 0,001$
ЦХО, мкмоль/хв·мг протеїну	7,05±0,48	4,29±0,14 $p < 0,01$	8,40±0,25	4,04±0,23 $p < 0,001$

При проведенні досліджень на 18-й день вагітності у печінці тварин із АФС встановлено зростання вмісту ГПЛ на 49 %, ТБК-АП у 2 рази (див. табл. 3.6). Водночас спостерігалось достовірне зниження активності ензимів системи антиоксидантного захисту: СОД – на 65 % і КАТ – на 56 % та вмісту G-SH на 63 %, порівняно з контрольною групою вагітних мишей. У групі вагітних тварин з АФС також виявлено порушення функціонування електронотранспортного ланцюга мітохондрій у печінці, про що свідчило зменшення активності СДГ на 36 % та ЦХО на 52 % (див. табл. 3.6).

Встановлено зростання вмісту сечовини (в 1,8 та 2,0 рази) та креатиніну (в 1,9 та 2,2 рази) у сироватці крові невагітних та вагітних мишей лінії BALB/c з АФС відносно показників контрольних груп (див. табл. 3.5), що свідчить про порушення видільної функції нирок.

Ураження нирок переважно пов'язані з розвитком оксидативного стресу [164]. Встановлено, що у нирках мишей з АФС також активуються процеси пероксидного окиснення ліпідів. Спостерігалось підвищення вмісту ГПЛ на 27 %, ТБК-АП на 57 %, порівняно із аналогічними показниками інтактних тварин (табл. 3.7).

Таблиця 3.7

Показники системи прооксиданти – антиоксиданти та активності ензимів тканинного дихання у нирках контрольних мишей лінії BALB/c та мишей з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності ($M \pm m$, $n=10$)

Показник	Група тварин (нирки)			
	до вагітності		на 18-й день вагітності	
	контроль	АФС	контроль	АФС
ГПЛ, у.о./г тканини	10,8±0,43	13,7±0,60 $p<0,01$	12,4±0,53	17, 2±0,58 $p<0,001$
ТБК-АП, нмоль/г тканини	4,97±0,21	7,79±0,53 $p<0,01$	6,48±0,26	12,13±0,26 $p<0,001$
СОД, у.о./мг протеїну	7,33±0,57	9,02±0,34 $p<0,05$	8,68±0,35	5,12±0,19 $p<0,001$
КАТ, нмоль/хв·мг протеїну	7,05±0,23	6,16±0,13 $p<0,05$	6,33±0,48	3,40±0,21 $p<0,01$
G-SH, мкмоль/г тканини	2,81±0,08	2,43±0,07 $p<0,05$	2,52±0,10	1,58±0,11 $p<0,01$
СДГ, нмоль/хв·мг протеїну	6,70±0,43	5,25±0,02 $p<0,05$	7,61±0,30	4,51±0,06 $p<0,001$
ЦХО, мкмоль/хв·мг протеїну	5,45±0,37	3,67±0,14 $p<0,01$	7,90±0,28	3,72±0,31 $p<0,001$

Водночас відбувалось зростання активності СОД на 23 % і зниження активності КАТ на 13 % та пулу G-SH на 14 %, порівняно із аналогічними показниками інтактних тварин. За даними літератури, збільшення активних форм кисню, зокрема супероксидного аніон-радикала, може індукувати зростання активності СОД на початкових етапах оксидативного стресу [212].

Вказані зміни супроводжувались порушенням тканинного дихання, про що свідчило зменшення активності СДГ на 22 % та ЦХО на 33 %, порівняно з контролем.

При проведенні досліджень на 18-й день вагітності у тварин з АФС встановлено зростання вмісту ГПЛ на 38 %, ТБК-АП на 87 % (див. табл. 3.7). Виявлено зниження активності та вмісту компонентів АОС у нирках вагітних мишей за умов АФС. Спостерігалось достовірне зниження активності ензимів системи антиоксидантного захисту: СОД на 41 % і КАТ на 46 % та вмісту G-SH на 38 %, порівняно з контрольною групою вагітних мишей (див. табл. 3.7).

У вагітних мишей з АФС також виявлено порушення функціонування електронотransпортного ланцюга мітохондрій у нирках, про що свідчило зменшення активності СДГ на 41 % та ЦХО на 53 %. Отримані результати узгоджуються із даними С. Perez-Sanchez та співавт. [325]. При активації процесів переокиснення мембранних ліпідів, у тому числі, знижується енергозабезпечення клітин унаслідок пошкодження мітохондрій [375].

Таким чином, за умов експериментального АФС у тканині мозочка, півкуль великого мозку, печінки та нирок мишей лінії BALB/c до вагітності та на 18-й день вагітності відбуваються розвиток оксидативного стресу, активація вільнорадикального окиснення, порушення рівноваги у системі прооксиданти-антиоксиданти, що супроводжується накопиченням продуктів пероксидного окиснення ліпідів, дискоординацією активності та вмісту компонентів антиоксидантного захисту та електронотransпортного ланцюга мітохондрій.

3.7. Вміст гліальних протеїнів у мозочку та півкулях великого мозку невагітних та вагітних мишей при антифосфоліпідному синдромі

Артеріальні тромбози у хворих з антитілами до фосфоліпідів розвиваються в різних органах, найчастіше в артеріях головного мозку [41, 230, 295]. Астроцити виконують різноманітні функції мозку, забезпечуючи структурну,

метаболічну та трофічну підтримку нейронів, беруть активну участь у модуляції синаптичної передачі [260].

Враховуючи те, що деякі клітини інших гістотипів здатні синтезувати GFAP, але лише в обмежених кількостях, цей протеїн використовується як специфічний молекулярний маркер астроглії [102, 260, 283, 326].

Блотограми зразків мозочка та півкуль великого мозку мишей BALB/c (антитіла проти GFAP) представлено на рисунку 3.10.

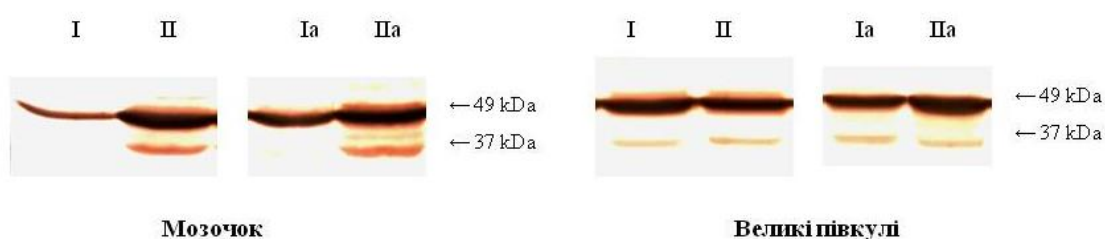


Рис. 3.10. Вестерн-блот аналіз зразків мозочка та півкуль великого мозку контрольних мишей лінії BALB/c та експериментальних мишей з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності (антитіла проти GFAP)

У результаті виконаних досліджень встановлено зростання загального вмісту GFAP у мозочку мишей з АФС у 2,8 раза, порівняно із показниками тварин контрольної групи (рис. 3.11).

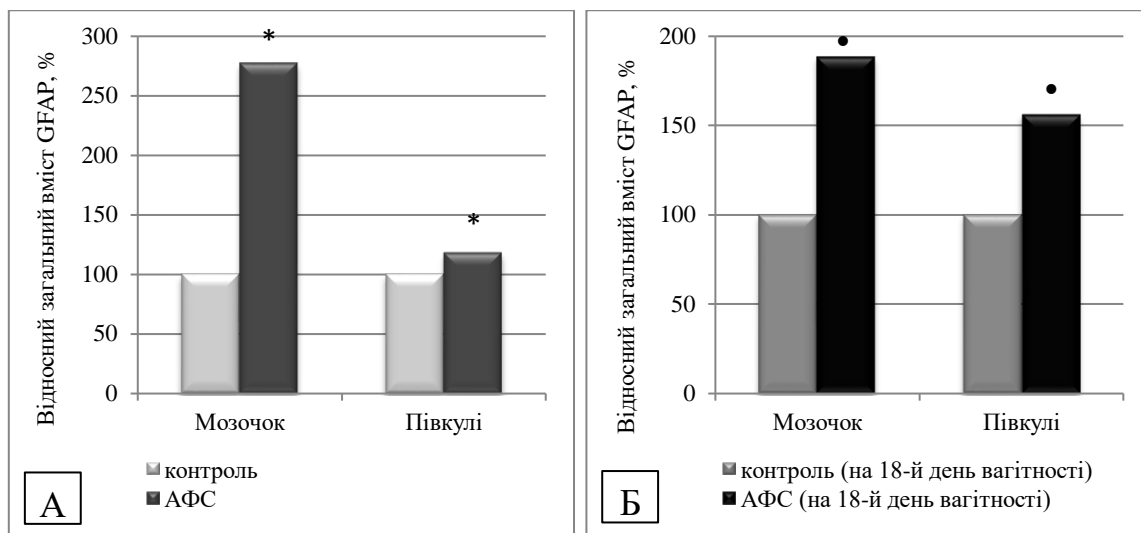


Рис. 3.11. Результати Вестерн-блот аналізу гліального фібрилярного кислого протеїну (загальний вміст GFAP) у зразках мозочка та півкуль великого мозку контрольних мишей лінії BALB/с та мишей з АФС до вагітності (А) та на 18-й день вагітності (Б). Дані наведено у відсотках від контролю (n=10)

Вказані зміни супроводжувались підвищенням вмісту ізоформи GFAP (37 kDa) у 6,4 раза, порівняно з показниками інтактних тварин (рис. 3.12). У мозочку вагітних мишей з АФС відмічено збільшення загального вмісту GFAP в 1,9 раза та GFAP (37 kDa) у 12,9 раза, порівняно із показниками вагітних тварин без АФС.

Встановлено, що загальний вміст GFAP у зразках півкуль великого мозку в групі тварин з АФС зростає на 18 %, порівняно з контролем (див. рис. 3.11). Водночас спостерігалось зростання GFAP (37 kDa) на 55 %, порівняно з показниками контрольної групи (рис. 3.12). У зразках півкуль великого мозку тварин з АФС на 18-й день вагітності зростає загальний вміст GFAP на 56 % та GFAP (37 kDa) на 44 %, порівняно із показниками вагітних тварин без АФС.

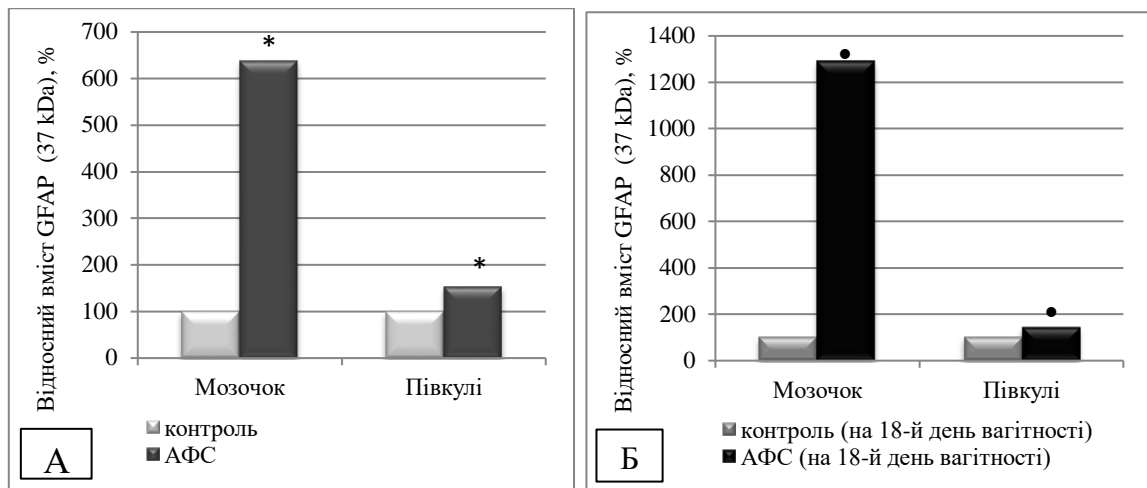


Рис. 3.12. Результати Вестерн-блот аналізу гліального фібрилярного кислого протеїну (вміст ізоформи GFAP (37 kDa) у зразках мозочка та півкуль великого мозку контрольних мишей лінії BALB/c та мишей з АФС до вагітності (А) та на 18-й день вагітності (Б). Дані наведено у відсотках від контролю (n=10)

Зростання вмісту GFAP у мозочку та півкулях великого мозку мишей BALB/c за умов АФС, порівняно з контрольними тваринами, вказує на виникнення реактивного астрогліозу у відповідь на розвиток патології [102, 265, 301].

Основний протеїн мієліну (MBP) є маркерним білком олігодендроглії. Деструкція білої речовини мозку супроводжується вивільненням MBP. Проникаючи крізь гематоенцефалічний бар'єр, MBP та його фрагменти стимулюють синтез антитіл до компонентів мієліну, що підтримує перебіг захворювання [172, 324].

Блотограми зразків мозочка та півкуль великого мозку (антитіла проти MBP) вагітних та невагітних мишей лінії BALB/c представлено на рисунку 3.13.

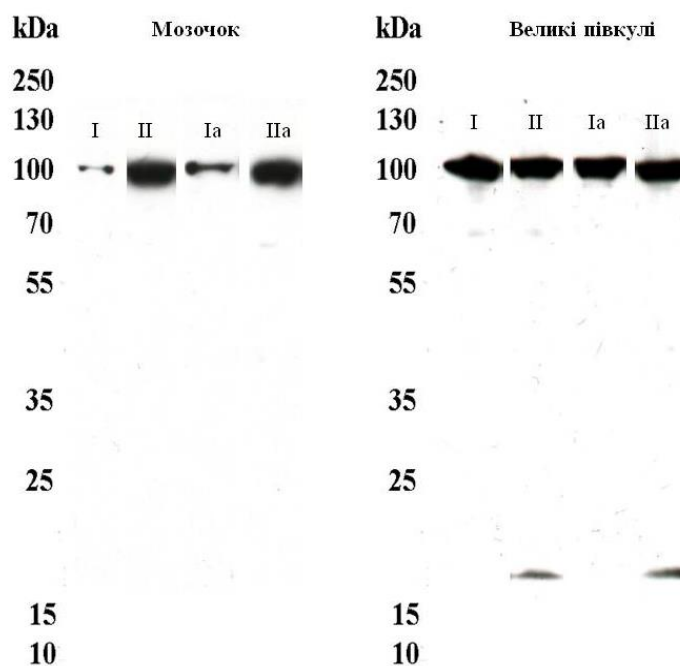


Рис. 3.13. Вестерн-блот аналіз зразків мозочка та півкуль великого мозку вагітних та невагітних контрольних мишей лінії BALB/c та мишей з АФС (антитіла проти основного протеїну мієліну)

У результаті проведеного Вестерн-блот аналізу встановлено, що у мозочку мишей лінії BALB/c за умов експериментального АФС рівень олігомерних форм МВР із молекулярною масою 95–110 kDa був збільшений у 5,3 раза, порівняно із контролем (рис. 3.14 А). Встановлено, що за умов АФС на 18-й день вагітності у мозочку мишей лінії BALB/c рівень МВР (95–110 kDa) зростав у 5,7 раза, порівняно із показниками вагітних тварин без АФС (рис. 3.14 Б), тоді як субодиницю МВР із молекулярною масою 18,4 kDa у мозочку невагітних та вагітних мишей виявлено у дуже незначній кількості.

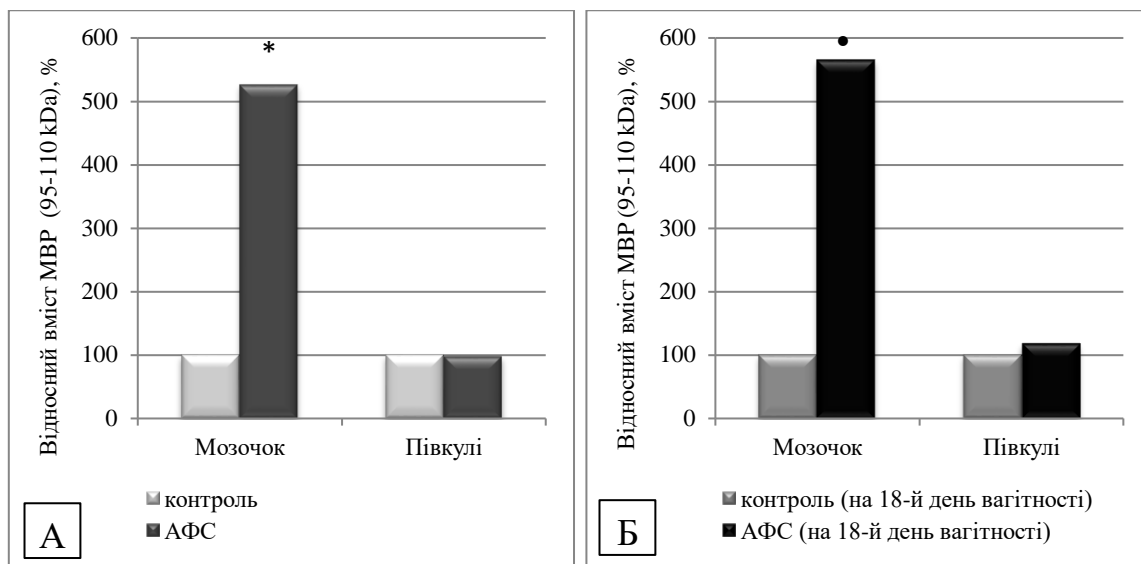


Рис. 3.14. Результати Вестерн-блот аналізу основного протеїну мієліну (95–110 kDa) у зразках мозочка та півкуль великого мозку контрольних мишей лінії BALB/c та мишей з АФС до вагітності (А) та на 18-й день вагітності (Б). Дані наведено у відсотках від контролю (n=10)

Імунореактивні зони у зразках півкуль великого мозку вагітних та невагітних мишей лінії BALB/c з АФС, виявлені антитілами проти МВР (95–110 kDa), достовірно не відрізнялися, порівняно із контрольними групами (див. рис. 3.14). Водночас встановлено значне зростання вмісту субодиниці МВР (18,4 kDa) – у 256 разів – у зразках півкуль великого мозку тварин з АФС, порівняно з контролем. У групі вагітних тварин з АФС встановлено зростання вмісту субодиниці МВР (18,4 kDa) в 1935 разів, порівняно із показниками вагітних тварин без АФС. Ці імунореактивні зони, ймовірно, можуть бути олігомерними формами МВР. Підсилення деградації МВР у тварин із експериментальним АФС на фоні розвитку реактивного астрогліозу може бути одним із шляхів активної перебудови компонентів пошкоджених мієлінових оболонок. Отримані дані можна пояснити тим, що демієлінізація, яка супроводжується запальним процесом, призводить до реактивації астроглії головного мозку [274].

Отже, у результаті виконаних досліджень встановлено зростання вмісту GFAP у мозочку та півкулях великого мозку вагітних та невагітних мишей лінії BALB/c за умов АФС, яке вказує на розвиток реактивного астрогліозу. Отримані нами показники вмісту MBR вказують на активацію процесів ремієлінізації у тварин із експериментальним АФС, що можна розглядати як компенсаторну відповідь на пошкодження.

На основі аналізу результатів досліджень, представлених у даному розділі, можна зробити такі висновки:

1. Під час експериментального АФС у невагітних та вагітних мишей знижується вміст eNOS у сироватці крові (на 23 % та 67 %) та у печінці (на 66 % та 81 %), порівняно із показниками тварин контрольних груп. Встановлено зростання вмісту iNOS у крові (в 4,1 та 4,5 раза) та у печінці (у 2,2 та 3,5 раза) невагітних та вагітних тварин з АФС. Водночас встановлено, що у невагітних тварин з АФС кількість десквамованих ендотеліоцитів зростає в 1,6 раза, порівняно з показниками групи інтактних тварин, а на 18-й день вагітності у мишей з АФС – в 2,4 раза, порівняно із показниками вагітних тварин без АФС.

2. У сироватці крові та печінці мишей лінії BALB/c за умов АФС виникає відносна недостатність NO, який синтезується під впливом eNOS, на фоні загальної гіперпродукції NO, який синтезується під впливом iNOS. Встановлено підвищення рівня синтезу NO у мозочку та нирках мишей BALB/c із АФС до вагітності та на 18-й день вагітності. У півкулях великого мозку тварин з АФС до вагітності встановлено зростання вмісту NO_2^- та NO_3^- , тоді як у вагітних тварин з АФС спостерігається зниження їх вмісту.

3. Антифосфоліпідний синдром супроводжується зниженням кількості тромбоцитів, підвищенням концентрації фібриногену, вкороченням активованого часткового тромбопластинового часу та протромбінового часу, підвищенням протромбінового індексу та зниженням міжнародного нормалізованого відношення, порівняно із показниками контрольної групи.

У вагітних мишей з АФС встановлено подальше зниження кількості тромбоцитів, підвищення концентрації фібриногену, вкорочення активованого часткового тромбопластинового часу, порівняно з показниками груп тварин із АФС до вагітності та вагітних тварин без АФС. Отримані результати свідчать про гіперкоагуляцію та ризик тромбоутворення у вагітних та невагітних самок з антифосфоліпідним синдромом.

4. У сироватці крові вагітних та невагітних мишей BALB/c за умов АФС відбувається зростання концентрації прозапальних цитокінів (IL-1 β , IL-6, TNF- α) та зниження концентрації протизапальних цитокінів (IL-4 та IL-10), порівняно із показниками контрольних тварин.

5. Під час АФС встановлено зниження життєздатності лейкоцитів крові вагітних та невагітних мишей, про що свідчать зростання показника AV-GFP+, який відповідає за ранній апоптоз, та вмісту PI+-клітин, які характеризують інтенсивність некротичних процесів, відносно показників контрольних груп. У вагітних та невагітних тварин з АФС спостерігається перерозподіл між двома основними типами лейкоцитів із збільшенням кількості гранулоцитів. Установлено зниження продукування активних форм кисню в гранулоцитах та агранулоцитах вагітних та невагітних мишей за умов АФС, порівняно з контролем.

6. У печінці вагітних та невагітних мишей при АФС відбувається активація процесів апоптозу, про що свідчить зростання вмісту активної форми каспази-3 та β -актину в органі.

7. При експериментальному АФС у тканинах мозочка, півкуль великого мозку, печінки та нирок вагітних та невагітних мишей лінії BALB/c відбуваються активація вільнорадикального окиснення, порушення рівноваги у системі прооксиданти–антиоксиданти, що підтверджується накопиченням продуктів пероксидного окиснення ліпідів (гідропероксидів ліпідів та ТБК-активних продуктів), дискоординацією активності та вмісту компонентів антиоксидантного захисту (супероксиддисмутази, каталази та відновленого

глутатіону) та активності ензимів електронотransпортного ланцюга мітохондрій (сукцинатдегідрогенази та цитохромоксидази).

8. Встановлено зростання вмісту гліального фібрилярного кислого протеїну та основного протеїну мієліну в мозочку та півкулях великого мозку вагітних та невагітних мишей за умов АФС, що вказує на розвиток реактивного астрогліозу, активацію процесів ремієлінізації. Встановлено збільшення вмісту аутоантитіл до протеїнів головного мозку вагітних та невагітних мишей з АФС.

Наведені в цьому розділі результати досліджень опубліковано в таких наукових працях [10, 11, 30, 77-81, 109, 121, 122, 124–145, 333, 413–417].

РОЗДІЛ 4

ВПЛИВ МОДУЛЯТОРІВ СИНТЕЗУ НІТРОГЕН ОКСИДУ НА СТАН МОЗКУ, ПЕЧІНКИ ТА НИРОК ПРИ ЕСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ АНТИФОСФОЛІПІДНОМУ СИНДРОМІ

У результаті досліджень, які описані у розділі 3, було встановлено, що при експериментальному АФС у мишей лінії BALB/c виникає відносна недостатність NO, який синтезується під впливом eNOS, на фоні загальної гіперпродукції NO, який синтезується під впливом iNOS. Для перевірки цієї тези ми вивчали вплив попередника NO L-аргініну та інгібітора індукцйбельної NOS аміногуанідину на показники функціонального стану мозку, печінки та нирок при АФС, що дозволило б з'ясувати роль системи нітроген оксиду в механізмах ураження досліджуваних органів у вагітних та невагітних мишей при АФС.

Метою досліджень, результати яких представлені в цьому розділі, було встановлення особливостей впливу L-аргініну та аміногуанідину на показники системи гемостазу (активованій частковий тромбопластиновий час, протромбіновий час, протромбіновий індекс, міжнародне нормалізоване відношення, концентрація фібриногену, кількість тромбоцитів); стан судинного ендотелію – за кількістю циркулюючих ендотеліальних клітин; за вмістом eNOS та iNOS у сироватці крові та печінці, за вмістом стабільних метаболітів NO нітрит-аніона (NO_2^-) та нітрат-аніона (NO_3^-) у сироватці крові, тканинах мозку (мозочка та півкуль великого мозку), печінки та нирок; процеси реалізації апоптозу методом визначення кількості апоптотичних і некротичних клітин та продукції активних форм кисену в лейкоцитах крові та каспази-3 печінки; показники цитокінового профілю; стан оксидативного стресу, вільнорадикального окиснення, стан антиоксидантної системи, активність ензимів енергозабезпечувальних процесів мітохондрій у тканинах мозочка та півкуль великого мозку, печінки та нирок; вміст гліального фібрилярного кислого протеїну та основного протеїну мієліну у мозочку та півкулях великого мозку; вміст аутоантитіл до протеїнів головного мозку.

Схема введення коригуючих чинників та розподіл тварин на серії експериментів представлені у розділі 2 (див. табл. 2.1).

4.1. Вплив L-аргініну та аміногуанідину на вміст аутоантитіл до протеїнів головного мозку у крові невагітних та вагітних мишей при антифосфоліпідному синдромі

АФС – аутоімунне захворювання, що характеризується наявністю в крові антитіл до негативно заряджених фосфоліпідів мембран [303, 356]. Концентрація ембріотропних антитіл у здорових жінок при вагітності підтримується у вузьких рамках, тоді як у жінок, які страждають невиношуванням вагітності, мали в анамнезі випадки загибелі плода або народження дітей з вадами розвитку, концентрація ембріотропних антитіл виходить за межі фізіологічної норми більш ніж у 90 % випадків [1]. Підвищення вмісту аутоантитіл пов'язане з невиношуванням вагітності, хронічною плацентарною недостатністю та гестозами [58, 74].

У результаті здійсненого нами Вестерн-блот аналізу протеїнів головного мозку мишей лінії BALB/c, оброблених сироватками крові контрольних мишей та мишей з АФС, виявлено три поліпептидні зони з величинами молекулярних мас приблизно 120 kDa, 150 kDa та >170 kDa, які зв'язували молекули IgG, що містилися у сироватці крові мишей (рис. 4.1). Отримані результати свідчать про наявність аутоантитіл до протеїнів головного мозку.

Результати денситометричного аналізу показали, що при введенні L-аргініну у сироватці крові мишей лінії BALB/c із АФС зростав вміст аутоантитіл 120 kDa на 26 %, 150 kDa на 20 % та >170 kDa на 27 % відносно групи тварин з АФС без корекції (рис. 4.2). У сироватці крові вагітних мишей лінії BALB/c із АФС, яким вводили L-аргінін, знижувався вміст аутоантитіл 120 kDa на 20 %, 150 kDa на 23 %, вміст аутоантитіл з молекулярною масою більше 170 kDa зростав на 43 %, порівняно з показниками групи вагітних тварин з АФС (рис. 4.3).

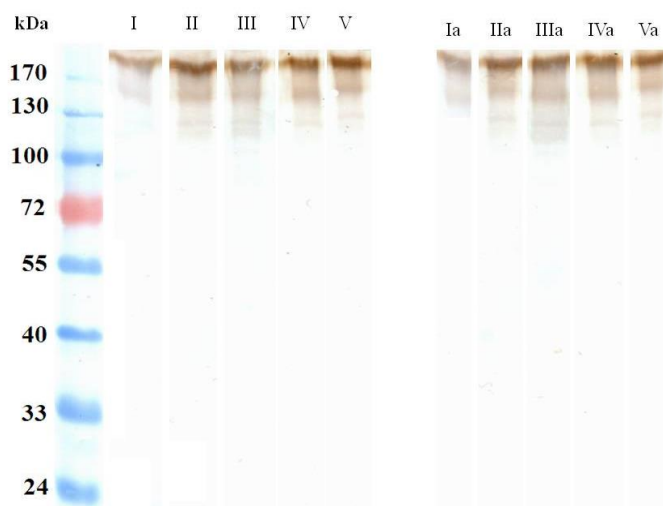


Рис. 4.1. Вестерн-блот аналіз протеїнів головного мозку, що реагують із аутоантитілами мишей лінії BALB/c із АФС до вагітності та на 18-й день вагітності та при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину

Примітка. Тут і в наступних рисунках розділу: I – Контроль; II – АФС; III – АФС + L-аргінін; IV – АФС + аміногуанідин; V – АФС + L-аргінін + аміногуанідин; Ia – контроль (вагітність); IIa – АФС (на 18-й день вагітності); IIIa – АФС + L-аргінін АФС (на 18-й день вагітності); IVa – АФС + аміногуанідин (на 18-й день вагітності); Va – АФС + L-аргінін + аміногуанідин (на 18-й день вагітності).

При введенні аміногуанідину у сироватці крові мишей з АФС знижувався вміст аутоантитіл 120 kDa на 16 %, 150 kDa на 19 %, вміст аутоантитіл з молекулярною масою більше 170 kDa достовірно не змінювався відносно показників групи тварин з АФС (рис. 4.2). У сироватці крові мишей з АФС на 18-й день вагітності, яким вводили аміногуанідин, знижувався вміст аутоантитіл 120 kDa на 10 %, 150 kDa на 11 %, вміст аутоантитіл з молекулярною масою більше 170 kDa достовірно не відрізнявся від показників групи вагітних тварин з АФС (рис. 4.3).

Установлено, що за комбінованого введення L-аргініну та аміногуанідину тваринам з АФС у сироватці крові відбувається зниження аутоантитіл 120 kDa на 26 %, 150 kDa на 28 % та >170 kDa на 31 %, відносно групи тварин з АФС (рис. 4.2). При порівнянні результатів, отриманих у групі тварин з АФС,

яким вводили L-аргінін у комбінації з аміногуанідином, із результатами у групах тварин з АФС, яким вводили окремо L-аргінін та окремо аміногуанідин, у сироватці крові встановлено зниження аутоантитіл 120 kDa (на 41 % та 12 %), 150 kDa (на 41 % та 12 %) та >170 kDa (на 46 % та 26 %) відповідно.

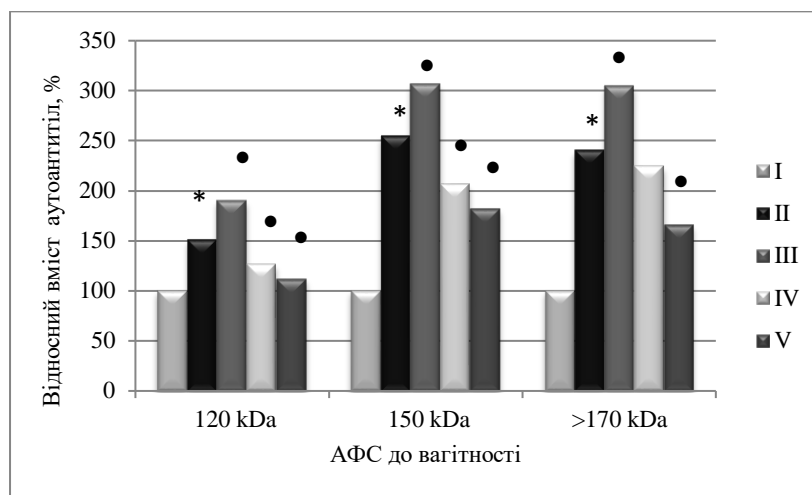


Рис. 4.2 Результати Вестерн-блот аналізу аутоантитіл до протеїнів головного мозку мишей лінії BALB/c з АФС та при застосуванні L-аргініну і аміногуанідину. Дані наведено у відсотках від контролю (n=10)

Примітка. Тут і в наступних рисунках розділу. * – достовірно відмінне від відповідних значень у контрольній групі ($p < 0,05$); • – достовірно відмінне від відповідних значень у групі тварин з АФС ($p < 0,05$).

У сироватці крові мишей з АФС на 18-й день вагітності за комбінованого введення L-аргініну та аміногуанідину відмічено зниження вмісту аутоантитіл 120 kDa на 29 %, 150 kDa на 24 % та >170 kDa на 53 %, порівняно з показниками групи вагітних тварин з АФС (рис. 4.3). При порівнянні отриманих результатів у групі тварин з АФС на 18-й день вагітності, яким вводили L-аргінін у комбінації з аміногуанідином, із групою тварин з АФС, яким вводили окремо L-аргінін, у сироватці крові спостерігалось зниження вмісту аутоантитіл 120 kDa на 12 % та >170 kDa на 67 %. Установлено, що за комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину в сироватці крові вагітних мишей з АФС

відбувається зниження вмісту аутоантитіл 120 kDa на 21 %, 150 kDa на 16 % та >170 kDa на 52 %, порівняно з показниками групи вагітних тварин з АФС, яким вводили аміногуанідин (рис. 4.3).

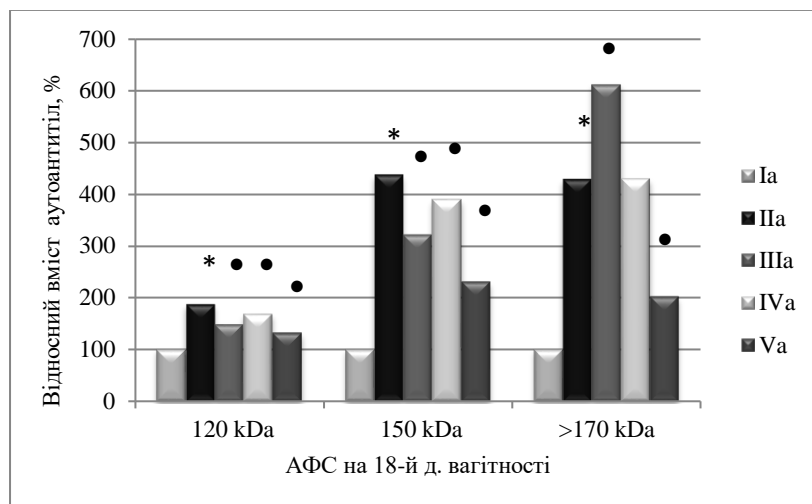


Рис. 4.3 Результати Вестерн-блот аналізу аутоантитіл до протеїнів головного мозку мишей лінії BALB/c із АФС на 18-й день вагітності та при застосуванні L-аргініну і аміногуанідину. Дані наведено у відсотках від контролю (n=10)

Отже, введення L-аргініну мишам лінії BALB/c із АФС супроводжувалося зростанням вмісту аутоантитіл до протеїнів головного мозку в трьох поліпептидних зонах (120 kDa, 150 kDa та >170 kDa), які зв'язували молекули IgG, що містилися у сироватці крові мишей до вагітності, та вмісту аутоантитіл з молекулярною масою більше 170 kDa на 18-й день вагітності. У сироватці крові вагітних мишей з АФС, яким вводили L-аргінін, знижувався вміст аутоантитіл 120 kDa та 150 kDa. При введенні аміногуанідину, окремо та у комбінації з L-аргініном, встановлено зниження вмісту антитіл до власних протеїнів головного мозку у тварин з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності.

4.2. Вплив L-аргініну та аміногуанідину на показники системи гемостазу при антифосфоліпідному синдромі у невагітних та вагітних мишей

Антифосфоліпідні антитіла мають здатність впливати на процеси регуляції гемостазу, а також, через систему комплементу, викликають імуноопосередковане порушення згортання крові [72, 320].

У результаті виконаних досліджень при введенні L-аргініну у тварин з АФС встановлено зростання кількості тромбоцитів на 51 %, порівняно з показниками в групі мишей з АФС (рис. 4.4).

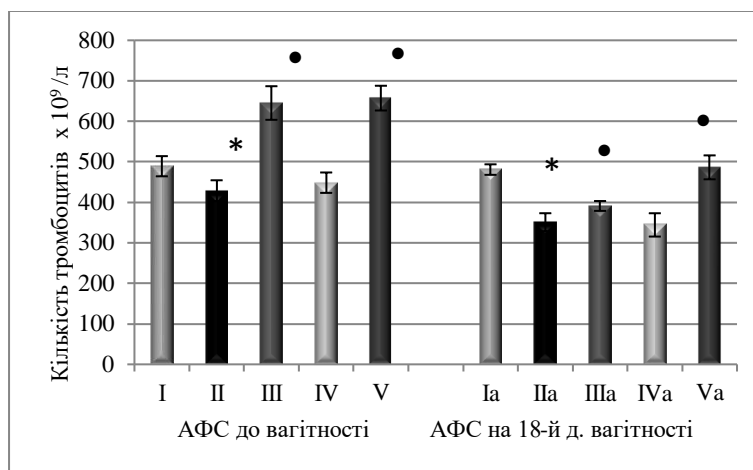


Рис 4.4. Кількість тромбоцитів у крові мишей лінії BALB/с з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності і при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину ($M \pm m$, $n=10$)

При введенні L-аргініну вагітним мишам з АФС встановлено зростання кількості тромбоцитів на 11 %, відносно вагітних тварин з АФС без корекції (див. рис. 4.4). На фоні введення L-аргініну у тварин з АФС встановлено зниження концентрації фібриногену на 14 %, відносно групи тварин з АФС (рис. 4.5).

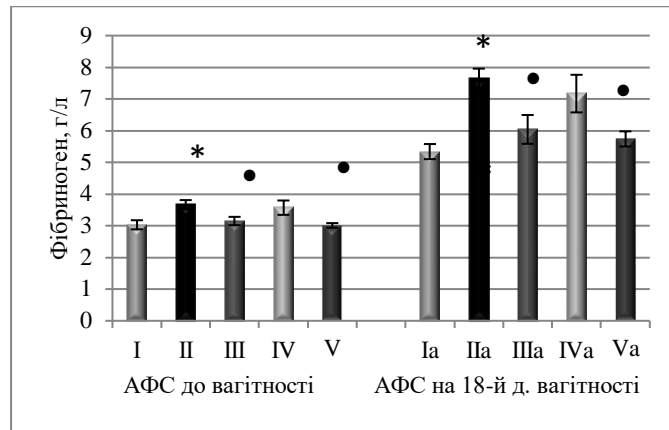


Рис 4.5. Концентрація фібриногену в крові мишей лінії BALB/c із АФС до вагітності та на 18-й день вагітності і при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину, ($M \pm m$, $n=10$)

Водночас у тварин з АФС, яким вводили L-аргінін, встановлено вкорочення АЧТЧ на 12 %, що свідчить про підвищену здатність до тромбоутворення (рис. 4.6). Введення L-аргініну мишам з АФС не призводило до достовірних змін показників протромбінового часу, протромбінового індексу та міжнародного нормалізованого відношення (рис. 4.7–4.9).

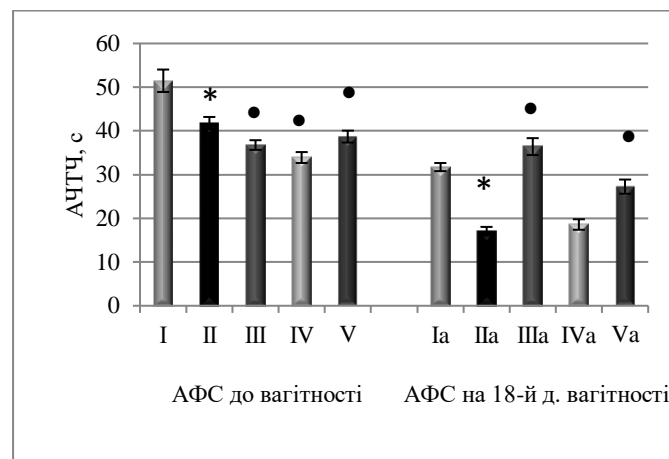


Рис 4.6. Активованний частковий тромбопластиновий час у мишей лінії BALB/c із АФС до вагітності та на 18-й день вагітності і при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину ($M \pm m$, $n=10$)

Введення L-аргініну вагітним мишам з АФС супроводжувалося зниженням концентрації фібриногену на 21 % (див. рис. 4.5), подовженням АЧТЧ у 2,1 раза (див. рис. 4.6), зростанням міжнародного нормалізованого відношення на 13 % (рис. 4.9), порівняно з показниками вагітних тварин з АФС.

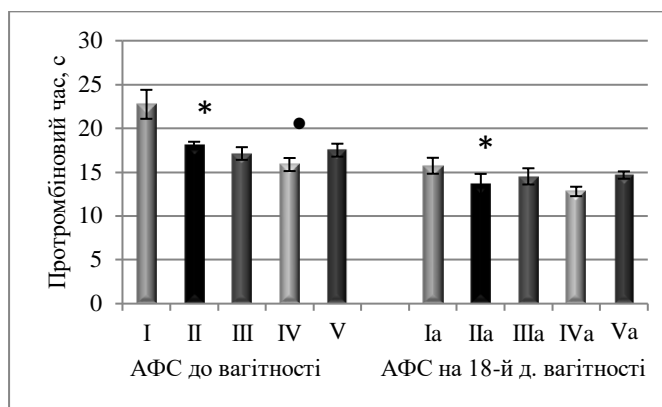


Рис 4.7. Протромбіновий час у мишей лінії BALB/с із АФС до вагітності та на 18-й день вагітності і при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину ($M \pm m$, $n=10$)

У групі тварин із АФС, яким вводили L-аргінін, на 18-й день вагітності не встановлено достовірних змін показників протромбінового часу та протромбінового індексу (рис. 4.7, 4.8).

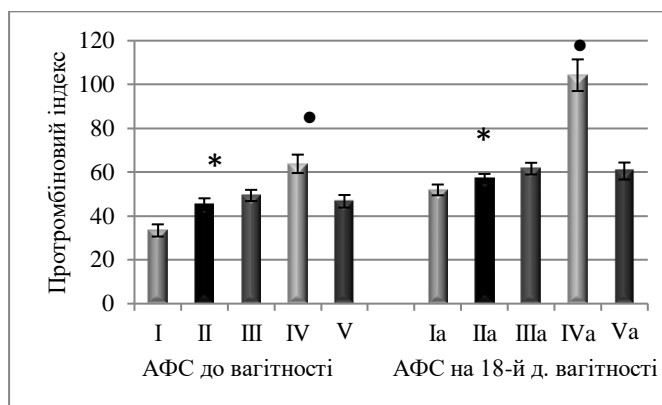


Рис 4.8. Протромбіновий індекс у мишей лінії BALB/с із АФС до вагітності та на 18-й день вагітності і при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину ($M \pm m$, $n=10$)

У групі тварин із АФС, яким вводили аміногуанідин, встановлено подальше вкорочення АЧТЧ на 19 % (див. рис. 4.6), зниження протромбінового часу на 12 % (див. рис. 4.7), зниження міжнародного нормалізованого відношення на 13 % та зростання протромбінового індексу на 40 % (див. рис. 4.8) відносно мишей з АФС.

Отримані результати вкорочення протромбінового часу, подовження протромбінового індексу та зниження міжнародного нормалізованого відношення свідчать про гіперкоагуляцію та ризик тромбоутворення у самок із АФС, яким вводили аміногуанідин.

Концентрація фібриногену та кількість тромбоцитів під впливом аміногуанідину в невагітних та вагітних тварин з АФС достовірно не змінювалися. Введення аміногуанідину тваринам з АФС на 18-й день вагітності супроводжувалося зростанням протромбінового індексу на 82 % (див. рис. 4.8) відносно вагітних мишей з АФС. У групі вагітних мишей з АФС, яким вводили аміногуанідин, не встановлено достовірних змін показників АЧТЧ, протромбінового часу, міжнародного нормалізованого відношення.

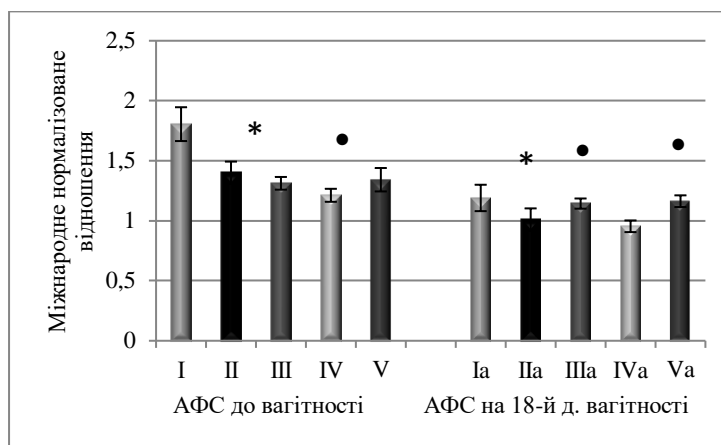


Рис 4.9. Міжнародне нормалізоване відношення у мишей лінії BALB/c з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності і при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину ($M \pm m$, $n=10$)

Наступним завданням нашого дослідження було встановлення впливу L-аргініну та аміногуанідину при їх комбінованому застосуванні на показники системи гемостазу вагітних та невагітних мишей лінії BALB/c за умов АФС.

За комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину у тварин з АФС встановлено зростання кількості тромбоцитів на 53 % (див. рис. 4.4), порівняно з показниками групи мишей з АФС. Водночас при комбінованому введенні L-аргініну та аміногуанідину у тварин з АФС концентрація фібриногену знижувалася на 18 % (див. рис. 4.5). Введення L-аргініну в комбінації з аміногуанідином мишам з АФС не супроводжувалося достовірними змінами показників АЧТЧ, протромбінового часу, протромбінового індексу та міжнародного нормалізованого відношення (див. рис. 4.6–4.9). При порівнянні результатів, отриманих у групі тварин з АФС, яким вводили L-аргінін у комбінації з аміногуанідином, із результатами групи тварин із АФС, яким вводили окремо L-аргінін, достовірних змін досліджуваних показників системи зсідання крові не виявлено. Встановлено зростання кількості тромбоцитів на 47 %, подовження АЧТЧ на 14 %, зниження концентрації фібриногену на 16 % та зниження протромбінового індексу на 27 %, порівняно із показниками групи тварин з АФС, яким вводили аміногуанідин.

На 18-й день вагітності у тварин з АФС встановлено зростання кількості тромбоцитів на 39 %, порівняно із показниками групи вагітних мишей з АФС (див. рис. 4.4). У групі тварин з АФС на 18-й день вагітності встановлено зниження концентрації фібриногену на 25 %, порівняно із показниками групи вагітних тварин з АФС (див. рис. 4.5). Установлено, що у вагітних мишей з АФС, яким вводили L-аргінін у комбінації з аміногуанідином, відбувається подовження АЧТЧ на 59 % (див. рис. 4.6) та зростання міжнародного нормалізованого відношення на 15 % (див. рис. 4.9), порівняно з показниками групи тварин з АФС на 18-й день вагітності. Введення L-аргініну в комбінації з аміногуанідином вагітним самкам з АФС не супроводжувалося достовірними змінами показників протромбінового часу та протромбінового індексу.

Проте при порівнянні отриманих результатів у групі тварин з АФС, яким вводили L-аргінін у комбінації з аміногуанідином, із групою тварин з АФС, яким вводили окремо L-аргінін, виявлено зростання кількості тромбоцитів на 24 %, вкорочення АЧТЧ на 25 %. Встановлено, що за комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину у вагітних мишей з АФС відбувається зростання кількості тромбоцитів на 41 %, подовження АЧТЧ на 47 %, зниження концентрації фібриногену на 20 %, збільшення протромбінового часу на 15 %, зниження протромбінового індексу на 42 %, зростання міжнародного нормалізованого відношення на 22 %, порівняно із показниками групи вагітних тварин із АФС, яким вводили аміногуанідин.

Отже, попередник нітроген оксиду L-аргінін сприяє відновленню показників системи гемостазу, нормалізації кількості тромбоцитів у вагітних та невагітних мишей за умов АФС. Введення аміногуанідину мишам з АФС призводить до прогресування змін коагулограми, які свідчать про зростання схильності до тромбоутворення. Встановлено позитивний вплив застосування L-аргініну та аміногуанідину при їх комбінованому введенні на показники системи гемостазу в невагітних та вагітних мишей за умов АФС.

4.3. Вплив L-аргініну та аміногуанідину на розвиток ендотеліальної дисфункції та нітрооксидативного стресу при антифосфоліпідному синдромі у невагітних та вагітних мишей

Установлено, що при введенні попередника NO L-аргініну тваринам з АФС до вагітності спостерігається зниження кількості циркулюючих десквамованих ендотеліоцитів у крові в 1,4 раза, порівняно з показниками групи мишей з АФС (рис. 4.10).

При введенні L-аргініну тваринам з АФС на 18-й день вагітності у крові встановлено зниження кількості циркулюючих десквамованих ендотеліоцитів у 1,8 раза, порівняно з показниками групи вагітних мишей з АФС.

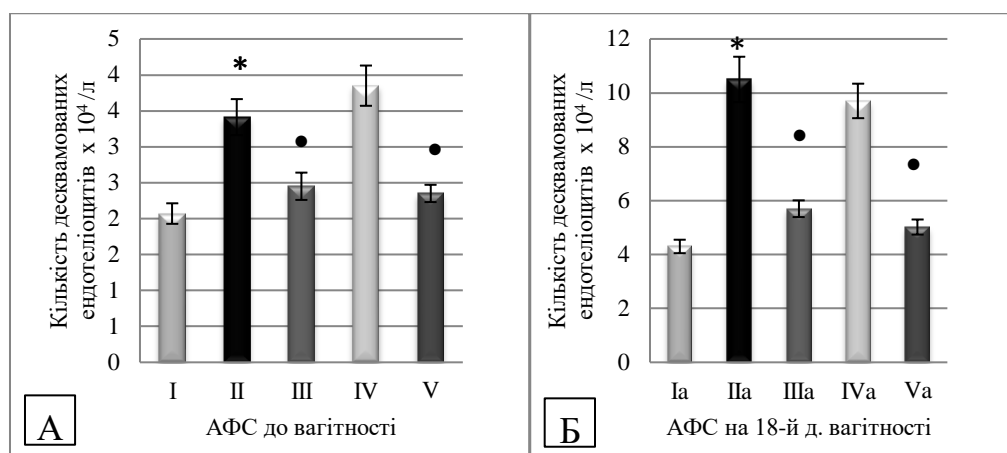


Рис 4.10. Рівень циркулюючих десквамованих ендотеліоцитів у крові мишей лінії BALB/c з АФС до вагітності (А) та на 18-й день вагітності (Б) і при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину ($M \pm m$, $n=10$)

Порушення синтезу та біодоступності NO при АФС в ендотелії можуть бути пов'язані як із недостатністю субстрату для синтезу NO – L-аргініну, так і з утворенням підвищеного рівня $O_2^{\cdot-}$, який швидко зв'язує й інактивує NO [67, 188, 285, 377, 394]. Відповідно, логічно було дослідити, як екзогенне постачання субстрату для реакції утворення NO вплине на вміст цієї сполуки та вміст ізоформ NO-синтази, залучених до її утворення.

Нами встановлено, що при введенні попередника NO L-аргініну тваринам з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності відбувалось зростання вмісту eNOS у крові (на 54 % та 92 %) та у печінці (в 1,9 раза та 3,7 раза), порівняно з показниками груп мишей з АФС відповідно до термінів дослідження (рис. 4.11).

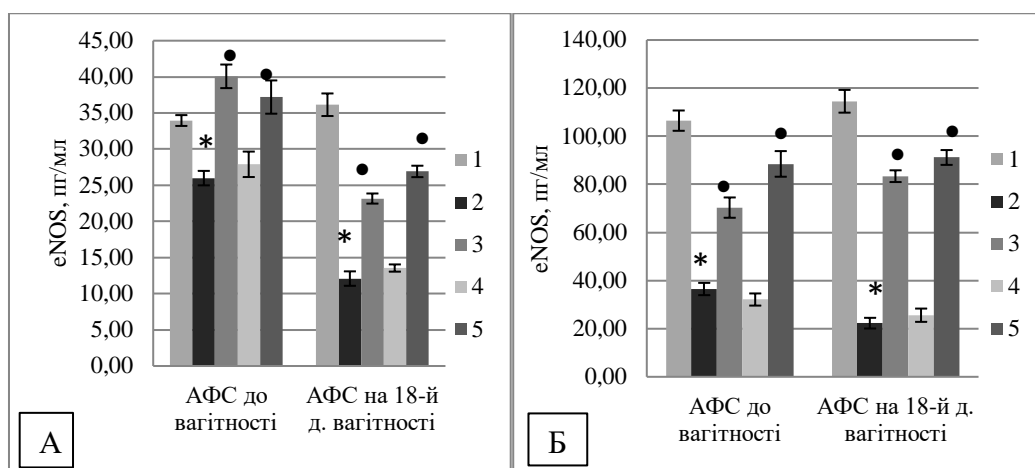


Рис. 4.11. Вміст eNOS у сироватці крові (А) та печінці (Б) мишей лінії BALB/c із АФС до вагітності та на 18-й день вагітності і при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину ($M \pm m$, $n=10$)

Примітка. Тут і на рис. 4.12. Умовні позначення груп тварин: 1 – Контроль; 2 – Антифосфоліпідний синдром (АФС); 3 – АФС + L-аргінін; 4 – АФС + аміногуанідин; 5 – АФС + L-аргінін + аміногуанідин.

Водночас вміст iNOS у крові невагітних і вагітних мишей з АФС, яким вводили L-аргінін достовірно не змінювався (рис. 4.12).

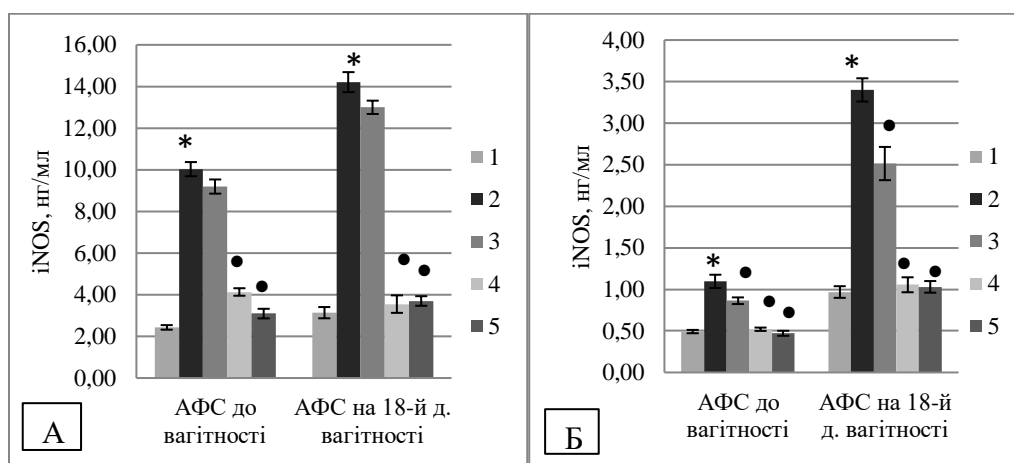


Рис. 4.12. Вміст iNOS у сироватці крові (А) та печінці (Б) мишей лінії BALB/c з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності і при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину ($M \pm m$, $n=10$)

У печінці виявлено зменшення вмісту iNOS у тварин з АФС до вагітності на 21 % та у тварин з АФС на 18-й день вагітності на 26 %, порівняно з показниками груп мишей з АФС відповідно до термінів дослідження.

При введенні L-аргініну у сироватці крові невагітних та вагітних мишей лінії BALB/c з АФС встановлено зростання вмісту NO_2^- (на 42 % та 30 %) та NO_3^- (на 55 % та 60 %), порівняно з показниками тварин з АФС (табл. 4.1).

Таблиця 4.1

Вміст NO_2^- та NO_3^- у сироватці крові мишей лінії BALB/c за умов антифосфоліпідного синдрому до вагітності та на 18-й день вагітності та при застосуванні L-аргініну і аміногуанідину ($M \pm m$, $n=10$)

Група тварин	АФС до вагітності		АФС на 18-й день вагітності	
	NO_2^- , мкмоль/л	NO_3^- , мкмоль/л	NO_2^- , мкмоль/л	NO_3^- , мкмоль/л
АФС	$1,65 \pm 0,15$ $p < 0,05$	$19,65 \pm 0,97$ $p < 0,001$	$1,10 \pm 0,07$ $p < 0,001$	$15,29 \pm 0,66$ $p < 0,01$
АФС+ L-аргінін	$2,35 \pm 0,09$ $p_1 < 0,01$	$30,50 \pm 2,12$ $p_1 < 0,01$	$1,43 \pm 0,10$ $p_1 < 0,05$	$24,44 \pm 1,51$ $p_1 < 0,01$
АФС + аміногуанідин	$1,84 \pm 0,10$ $p_1 > 0,05$	$8,63 \pm 0,30$ $p_1 < 0,001$	$1,04 \pm 0,04$ $p_1 > 0,05$	$7,65 \pm 0,37$ $p_1 < 0,001$
АФС +L-аргінін + аміногуанідин	$2,06 \pm 0,05$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 > 0,05$	$12,82 \pm 1,04$ $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,01$	$1,51 \pm 0,11$ $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,05$	$10,82 \pm 0,53$ $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,01$

Примітка. Тут і в наступних таблицях розділу. p_1 – достовірно відмінне від відповідних значень у контрольній групі; p_2 – достовірно відмінне від відповідних значень у групі тварин з АФС, яким вводили L-аргінін; p_3 – достовірно відмінне від відповідних значень у групі тварин з АФС, яким вводили аміногуанідин.

У мозочку мишей з АФС при введенні L-аргініну встановлено подальше зростання вмісту NO_2^- на 24 % та NO_3^- на 14 %, порівняно з показниками тварин

із АФС. Введення L-аргініну вагітним тваринам з АФС у мозочку не супроводжувалося змінами вмісту NO_2^- , а вміст NO_3^- зростав на 13 % (табл. 4.2).

Таблиця 4.2

Вміст NO_2^- та NO_3^- у мозочку мишей лінії BALB/c за умов антифосфоліпідного синдрому до вагітності та на 18-й день вагітності та при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину ($M \pm m$, $n=10$)

Група тварин	До вагітності		На 18-й день вагітності	
	NO_2^- , мкмоль/кг	NO_3^- , мкмоль/кг	NO_2^- , мкмоль/кг	NO_3^- , мкмоль/кг
АФС	$4,90 \pm 0,14$ $p < 0,001$	$23,71 \pm 0,83$ $p < 0,001$	$5,31 \pm 0,14$ $p < 0,001$	$29,29 \pm 1,28$ $p < 0,001$
АФС + L-аргінін	$5,58 \pm 0,18$ $p_1 < 0,05$	$29,49 \pm 0,88$ $p_1 < 0,01$	$5,62 \pm 0,18$ $p_1 > 0,05$	$33,19 \pm 0,86$ $p_1 < 0,05$
АФС + аміногуанідин	$3,22 \pm 0,08$ $p_1 < 0,001$	$18,13 \pm 0,45$ $p_1 < 0,01$	$3,65 \pm 0,17$ $p_1 < 0,001$	$20,60 \pm 0,47$ $p_1 < 0,01$
АФС + L-аргінін + аміногуанідин	$3,55 \pm 0,08$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,05$	$19,73 \pm 0,91$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,001$ $p_3 > 0,05$	$3,79 \pm 0,13$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 > 0,05$	$21,82 \pm 0,85$ $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,001$ $p_3 > 0,05$

При введенні L-аргініну у півкулях великого мозку вміст NO_2^- достовірно не змінювався, а вміст NO_3^- збільшувався на 13 %, порівняно з показниками тварин із АФС (табл. 4.3). У півкулях великого мозку тварин з АФС на 18-й день вагітності, яким вводили L-аргінін, вміст NO_2^- збільшувався на 29 %, а вміст NO_3^- – на 36 %, порівняно з показниками вагітних мишей з АФС.

У печінці тварин з АФС, яким вводили L-аргінін встановлено зростання вмісту NO_2^- на 39 % та NO_3^- на 45 %, порівняно з показниками групи мишей з АФС (табл. 4.4). На 18-й день вагітності у печінці тварин з АФС, яким вводили L-аргінін, встановлено зростання вмісту NO_2^- на 92 % та NO_3^- на 19 %, порівняно з показниками вагітних мишей з АФС.

Таблиця 4.3

Вміст NO_2^- та NO_3^- у півкулях великого мозку мишей лінії BALB/c за умов антифосфоліпідного синдрому до вагітності та на 18-й день вагітності та при застосуванні L-аргініну і аміногуанідину ($M \pm m$, $n=10$)

Група тварин	До вагітності		На 18-й день вагітності	
	NO_2^- , мкмоль/кг	NO_3^- , мкмоль/ кг	NO_2^- , мкмоль/ кг	NO_3^- , мкмоль/ кг
АФС	$3,57 \pm 0,15$ $p < 0,005$	$17,69 \pm 0,52$ $p < 0,01$	$2,43 \pm 0,10$ $p < 0,05$	$12,56 \pm 0,33$ $p < 0,05$
АФС + L-аргінін	$3,41 \pm 0,05$ $p_1 > 0,05$	$20,02 \pm 0,44$ $p_1 < 0,05$	$3,12 \pm 0,18$ $p_1 < 0,05$	$17,13 \pm 0,97$ $p_1 < 0,01$
АФС + аміногуанідин	$2,91 \pm 0,13$ $p_1 < 0,05$	$14,89 \pm 0,64$ $p_1 < 0,05$	$2,54 \pm 0,11$ $p_1 > 0,05$	$13,90 \pm 0,64$ $p_1 > 0,05$
АФС + L-аргінін + аміногуанідин	$3,02 \pm 0,14$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 > 0,05$	$15,93 \pm 0,33$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,001$ $p_3 > 0,05$	$2,94 \pm 0,08$ $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,05$	$15,28 \pm 0,78$ $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$

В нирках тварин з АФС, яким вводили L-аргінін відбувалося зростання вмісту NO_2^- на 24 % та NO_3^- на 24 %, порівняно з показниками групи мишей з АФС. На 18-й день вагітності у нирках тварин з АФС, яким вводили L-аргінін, встановлено зростання вмісту NO_2^- на 14 %, а вміст NO_3^- достовірно не змінився, порівняно з показниками вагітних тварин з АФС (табл. 4.5).

Аміногуанідин – це нуклеофільна гідразинова сполука, який є конкурентним інгібітором ізоформи NOS – iNOS [238, 408]. Введення аміногуанідину не викликало достовірних змін показників кількості десквамованих ендотеліоцитів у вагітних та невагітних тварин з АФС (див. рис. 4.10). При введенні аміногуанідину вміст iNOS знижувався у крові тварин з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності (в 2,4 раза та 4,0 рази) та у печінці (в 2,1 раза та 3,2 раза), порівняно з показниками мишей з АФС у відповідні терміни дослідження (див. рис. 4.12). Введення аміногуанідину

не викликало достовірних змін вмісту eNOS у крові та печінці мишей лінії BALB/c з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності (див. рис. 4.11). У сироватці крові мишей з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності вміст NO_2^- достовірно не відрізнявся, а вміст NO_3^- знижувався на 56 % та 50 % (див. табл. 4.1). У мозочку невагітних та вагітних тварин з АФС, яким вводили аміногуанідин, знижувався вміст NO_2^- (на 34 % та 31 %) та NO_3^- (на 24 % та 30 %), порівняно з показниками тварин з АФС (див. табл. 4.2). При введенні аміногуанідину тваринам з АФС у півкулях великого мозку вміст NO_2^- знижувався на 18 %, а вміст NO_3^- – на 16 %, порівняно з показниками тварин з АФС (див. табл. 4.3). На 18-й день вагітності у півкулях великого мозку тварин з АФС, яким вводили аміногуанідин, вміст NO_2^- та NO_3^- достовірно не змінювався. У печінці вміст NO_2^- до вагітності достовірно не змінювався, а на 18-й день вагітності зростав на 21 % (табл. 4.4).

Таблиця 4.4

Вміст NO_2^- та NO_3^- у печінці мишей лінії BALB/c за умов антифосфоліпідного синдрому до вагітності та на 18-й день вагітності і при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину ($M \pm m$, $n=10$)

Група тварин	До вагітності		На 18-й день вагітності	
	NO_2^- , мкмоль/ кг	NO_3^- , мкмоль/ кг	NO_2^- , мкмоль/ кг	NO_3^- , мкмоль/ кг
АФС	1,35±0,05 $p < 0,05$	11,01±0,51 $p < 0,05$	0,68±0,04 $p < 0,001$	18,94±0,78 $p < 0,001$
АФС+ L-аргінін	1,88±0,05 $p_1 < 0,001$	15,96±0,83 $p_1 < 0,01$	1,30±0,09 $p_1 < 0,01$	22,44±0,97 $p_1 < 0,05$
АФС + аміногуанідин	1,42±0,03 $p_1 > 0,05$	9,46±0,28 $p_1 < 0,05$	0,82±0,03 $p_1 < 0,05$	10,55±0,22 $p_1 < 0,001$
АФС + L-аргінін + аміногуанідин	1,69±0,02 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,001$	10,20±0,36 $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,001$ $p_3 > 0,05$	1,94±0,11 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,01$ $p_3 < 0,001$	11,41±0,54 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 > 0,05$

Вміст NO_3^- у печінці невагітних та вагітних мишей з АФС знижувався на 14 % та 44 % відповідно. Отримані результати можуть бути обумовлені порушенням нітритредуктазного балансу при блокуванні ферментативного синтезу NO [92]. У нирках невагітних та вагітних тварин з АФС, яким вводили аміногуанідин, знижувався вміст NO_2^- (на 61 % та 44 %) та NO_3^- (на 48 % та 45 %), порівняно з показниками тварин з АФС (табл. 4.5).

Таблиця 4.5

Вміст NO_2^- та NO_3^- у нирках мишей лінії BALB/c за умов антифосфоліпідного синдрому до вагітності та на 18-й день вагітності та при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину ($M \pm m$, $n=10$)

Група тварин	До вагітності		На 18-й день вагітності	
	NO_2^- , мкмоль/ кг	NO_3^- , мкмоль/ кг	NO_2^- , мкмоль/ кг	NO_3^- , мкмоль/ кг
АФС	$1,19 \pm 0,07$ $p < 0,001$	$15,89 \pm 0,89$ $p < 0,001$	$1,41 \pm 0,04$ $p < 0,001$	$13,70 \pm 0,59$ $p < 0,001$
АФС+ L-аргінін	$1,47 \pm 0,06$ $p_1 < 0,05$	$19,75 \pm 0,71$ $p_1 < 0,05$	$1,60 \pm 0,04$ $p_1 < 0,05$	$13,00 \pm 0,32$ $p_1 > 0,05$
АФС + аміногуанідин	$0,46 \pm 0,03$ $p_1 < 0,001$	$8,21 \pm 0,25$ $p_1 < 0,001$	$0,78 \pm 0,04$ $p_1 < 0,001$	$7,59 \pm 0,40$ $p_1 < 0,001$
АФС + L-аргінін + аміногуанідин	$0,79 \pm 0,04$ $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,001$	$9,05 \pm 0,19$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,05$	$0,86 \pm 0,04$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 > 0,05$	$8,70 \pm 0,54$ $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,001$ $p_3 > 0,05$

Як показали результати досліджень, при комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину відбувається нормалізація кількості циркулюючих десквамованих ендотеліоцитів (див. рис. 4.10). Встановлено, що за комбінованого введення L-аргініну та аміногуанідину тваринам з АФС до вагітності спостерігається зниження кількості циркулюючих десквамованих ендотеліоцитів у крові в 1,5 раза, порівняно з показниками групи мишей з АФС.

При комбінованому введенні L-аргініну та аміногуанідину тваринам з АФС на 18-й день вагітності у крові встановлено зниження кількості циркулюючих десквамованих ендотеліоцитів в 2,1 раза, порівняно з показниками групи вагітних мишей з АФС. Отже, на фоні інгібування індукцйбельної NO-синтази аміногуанідином спостерігається збереження позитивного впливу L-аргініну на ендотелій судин при АФС.

При комбінованому застосуванні L-аргініну з аміногуанідином у невагітних та вагітних мишей з АФС встановлено зростання вмісту eNOS у сироватці крові (в 1,4 раза та в 2,2 раза) та печінці (в 2,4 раза та в 4,1 раза), порівняно з показниками груп мишей з АФС (див. рис. 4.11). Водночас встановлено достовірне зниження вмісту iNOS у сироватці крові (в 3,2 раза та в 3,8 раза) та печінці (в 2,3 раза та в 3,3 раза), що привело до нормалізації вмісту стабільних метаболітів нітроген оксиду NO_2^- та NO_3^- у крові і досліджуваних органах при експериментальному АФС до вагітності та на 18-й день вагітності (див. рис. 4.12). У сироватці крові тварин з АФС, яким вводили L-аргінін в комбінації з аміногуанідином, до вагітності та на 18-й день вагітності, вміст NO_2^- збільшувався на 25 % та 38 %, а вміст NO_3^- знижувався на 35 % та 29 %, порівняно з показниками мишей з АФС у відповідні терміни дослідження (див. табл. 4.1). За комбінованого застосування попередника NO L-аргініну та інгібітора iNOS аміногуанідину в мозочку мишей BALB/c з АФС встановлено зниження вмісту NO_2^- на 28 % та NO_3^- на 17 %, порівняно з показниками тварин з АФС (див. табл. 4.2). За комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину у мозочку мишей BALB/c з АФС на 18-й день вагітності встановлено зниження вмісту NO_2^- на 29 % та NO_3^- на 25 %, порівняно із показниками групи вагітних тварин з АФС. У півкулях великого мозку тварин з АФС вміст NO_2^- знижувався на 16 %, а вміст NO_3^- – на 10 %, порівняно з показниками групи мишей з АФС (див. табл. 4.3). На 18-й день вагітності при введенні L-аргініну в комбінації з аміногуанідином у півкулях великого мозку тварин з АФС вміст NO_2^- зростав на 21 %, а вміст NO_3^- – на 22 %, порівняно з показниками групи вагітних мишей лінії BALB/c з АФС. У печінці

тварин з АФС, яким вводили L-аргінін у комбінації з аміногуанідином, вміст NO_2^- збільшувався на 25 %, а вміст NO_3^- достовірно не змінювався, порівняно з показниками мишей з АФС (див. табл. 4.4). У печінці вагітних тварин з АФС, яким вводили L-аргінін в комбінації з аміногуанідином, вміст NO_2^- зростав на 186 %, а вміст NO_3^- знижувався на 40 %, порівняно з показниками вагітних мишей з АФС. У нирках тварин з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності, яким вводили L-аргінін в комбінації з аміногуанідином, знижувався вміст NO_2^- (на 33 % та 39 %) та NO_3^- (на 43 % та 36 %), порівняно з показниками тварин з АФС у відповідні терміни дослідження (див. табл. 4.5).

Результати проведених нами досліджень свідчать, що при введенні L-аргініну тваринам з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності відбувається зростання вмісту eNOS у сироватці крові та печінці, що супроводжується зростанням вмісту NO_2^- та NO_3^- у сироватці крові, мозочку, півкулях великого мозку, печінці та нирках. При введенні аміногуанідину тваринам з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності знижується вміст iNOS у сироватці крові та печінці та вміст стабільних метаболітів NO у досліджуваних органах. При комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину встановлено зростання вмісту eNOS та зниження вмісту iNOS у сироватці крові та печінці, що привело до нормалізації вмісту NO_2^- та NO_3^- при експериментальному АФС до вагітності та на 18-й день вагітності, порівняно з показниками мишей лінії BALB/c з АФС.

4.4. Вплив L-аргініну та аміногуанідину на цитокіновий профіль при антифосфоліпідному синдромі у невагітних та вагітних мишей

Одним із факторів патогенезу АФС є дисрегуляція цитокінового балансу із збільшенням вмісту прозапальних цитокінів. При взаємодії aPL з фосфоліпідами мембран розвивається дисбаланс компонентів цитокінових і кінінових каскадів [383]. Прозапальні Th1 цитокіни, TNF- α , IL-1 β , IFN- γ і IL-18, синтез який опосередковано β 2ГПЗ, компоненти комплементу (C3b, C3b і

C5a, C5b-9) і аутоантитіла активують ендотеліальні клітини і макрофаги, індукуючи експресію молекул адгезії (VCAM-1, ICAM-1, Р-селектин, Е-селектин), регулюють синтез NO ендотеліальними клітинами [2, 270]. На сьогодні недостатньо відомостей про роль змін активності системи NO у балансі про- і протизапальних цитокінів при АФС. Відповідно, пошук серед модуляторів синтезу NO ефективних засобів корекції порушень, що виникають при вагітності на фоні АФС, є актуальним завданням. Важливість його підтверджується відсутністю єдиного погляду на роль системи NO у розвитку АФС.

У результаті проведених експериментів нами встановлено, що за введення попередника NO L-аргініну тваринам з АФС відбувається зниження вмісту IL-1 β на 25 % та вмісту IL-6 на 20 %, порівняно з показниками тварин з АФС (табл. 4.6). За даними літератури [116], L-аргінін знижує рівень IL-6, що узгоджується з даними, отриманими у нашій роботі.

При введенні L-аргініну встановлено зниження TNF- α на 13 %, порівняно з показниками групи тварин з АФС (табл. 4.6). Отримані результати можна пояснити тим, що L-аргінін бере участь у синтезі глютаміну, який відіграє важливу роль у метаболізмі, а також може знижувати рівень розчинних рецепторів TNF- α [97]. Водночас зростала концентрація протизапального цитокіну IL-4 на 28 %, порівняно з показниками групи тварин з АФС.

За застосування інгібітора iNOS аміногуанідину відбувалося зниження концентрації TNF- α на 57 %, порівняно з показниками тварин з АФС (табл. 4.6). Введення аміногуанідину не викликало достовірних змін концентрації IL-1 β , IL-6, IL-4 та IL-10 у сироватці крові мишей лінії BALB/c з АФС, порівняно з групою мишей з АФС.

Наступним завданням нашого дослідження було вивчення впливу комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину на показники цитокінового профілю при АФС.

Таблиця 4.6

Вплив L-аргініну і аміногуанідину на показники цитокінового профілю мишей лінії BALB/с за умов антифосфоліпідного синдрому ($M \pm m$, $n=10$)

Показник	Група тварин			
	АФС	АФС+ L-аргінін	АФС+ аміногуанідин	АФС+ L-аргінін+ аміногуанідин
IL-1 β , пг/мл	46,11 \pm 2,86 $p < 0,001$	34,71 \pm 1,61 $p_1 < 0,05$	41,22 \pm 1,68 $p_1 > 0,05$	32,14 \pm 2,04 $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,05$
IL-6, пг/мл	19,01 \pm 0,80 $p < 0,001$	15,17 \pm 0,84 $p_1 < 0,05$	20,74 \pm 1,21 $p_1 > 0,05$	15,94 \pm 0,66 $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,05$
TNF- α , пг/мл	73,88 \pm 1,78 $p < 0,001$	64,21 \pm 2,43 $p_1 < 0,05$	32,04 \pm 2,45 $p_1 < 0,001$	30,15 \pm 1,93 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$ $p_3 > 0,05$
IL-4, пг/мл	15,81 \pm 0,88 $p < 0,001$	20,17 \pm 1,08 $p_1 < 0,05$	16,28 \pm 0,95 $p_1 > 0,05$	21,41 \pm 1,15 $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,05$
IL-10, пг/мл	30,59 \pm 1,57 $p < 0,001$	34,38 \pm 2,36 $p_1 > 0,05$	32,17 \pm 1,64 $p_1 > 0,05$	38,21 \pm 0,52 $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,05$

За застосування попередника NO L-аргініну в комбінації з аміногуанідином встановлено достовірне зниження концентрації IL-1 β на 30 %, IL-6 на 16 %, TNF- α на 59 %, порівняно з показниками групи тварин з АФС (див. табл. 4.6). Водночас зростала концентрація протизапальних цитокінів IL-4 на 35 % та IL-10 на 25 %, порівняно з показниками тварин з АФС. Результати дослідження показали, що за комбінованого введення L-аргініну та аміногуанідину спостерігалось зниження концентрації IL-1 β на 22 %, IL-6 на 23 % та зростання концентрації IL-4 на 32 % та IL-10 на 19 %, порівняно з показниками 4-ї групи тварин, яким вводили аміногуанідин. Встановлено

зниження концентрації TNF- α на 53 %, порівняно з показниками мишей лінії BALB/c, яким вводили L-аргінін (див. табл. 4.6). Отже, на фоні інгібування індукцйбельної NO-синтази аміногуанідином спостерігається збереження позитивного впливу L-аргініну на цитокіновий профіль, змінений при АФС.

При АФС наявні порушення як у ланці Th1, так і в ланці Th2 [8]. При фізіологічній вагітності переважає Th2-клітинна відповідь, тоді як підвищення продукції прозапальних цитокінів асоціюється з розвитком невиношування вагітності та гестозів [184], що є однією з типових ознак АФС.

На 18-й день вагітності при застосуванні попередника NO L-аргініну встановлено зниження концентрації прозапальних цитокінів IL-1 β на 13 %, IL-6 на 41 %, TNF- α на 15 %, порівняно з показниками групи вагітних тварин з АФС (табл. 4.7). Водночас концентрація протизапальних цитокінів IL-4 зростала на 29 %, IL-10 – на 18 %, порівняно з показниками групи вагітних тварин з АФС.

Введення інгібітора iNOS аміногуанідину не супроводжувалось достовірними змінами концентрації IL-1 β , IL-6 та IL-10 у сироватці крові на 18-й день вагітності. Водночас у цій групі встановлено зниження концентрації TNF- α на 43 % та зростання концентрації IL-4 на 21 %, порівняно з показниками вагітних тварин із АФС (табл. 4.7).

За комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину в сироватці крові мишей BALB/c із АФС на 18-й день вагітності встановлено зниження концентрації IL-1 β на 25 %, IL-6 на 35 %, TNF- α на 54 %, порівняно з показниками групи вагітних тварин з АФС. Водночас зростала концентрація протизапальних цитокінів: IL-4 на 65 % та IL-10 на 34 % (табл. 4.7).

Встановлено також, що при комбінованому введенні L-аргініну та аміногуанідину в сироватці крові мишей BALB/c із АФС на 18-й день вагітності відбувається зниження концентрації IL-1 β на 21 %, IL-6 на 29 %, TNF- α на 18 % та зростання концентрації IL-4 на 37 % та IL-10 на 21 %, порівняно з показниками мишей, яким вводили тільки аміногуанідин. Встановлено зниження концентрації IL-1 β на 14 %, TNF- α на 46 % та зростання

концентрації протизапальних цитокінів IL-4 на 28 % та IL-10 на 13 %, порівняно з показниками групи тварин, яким вводили лише L-аргінін (табл. 4.7).

Таблиця 4.7

Вплив L-аргініну і аміногуанідину на показники цитокінового профілю мишей за умов антифосфоліпідного синдрому на 18-й день вагітності ($M \pm m$, $n=10$)

Показник	Група тварин			
	АФС	АФС + L-аргінін	АФС + аміногуанідин	АФС + L-аргінін + аміногуанідин
IL-1 β , пг/мл	58,72 \pm 2,22 $p < 0,001$	51,05 \pm 1,34 $p_1 < 0,05$	56,36 \pm 3,00 $p_1 > 0,05$	44,18 \pm 1,60 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$
IL-6, пг/мл	34,97 \pm 1,63 $p < 0,001$	20,51 \pm 0,82 $p_1 < 0,001$	32,17 \pm 1,26 $p_1 > 0,05$	22,84 \pm 0,84 $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,001$
TNF- α , пг/мл	66,90 \pm 2,33 $p < 0,001$	57,07 \pm 2,09 $p_1 < 0,05$	37,91 \pm 2,33 $p_1 < 0,001$	31,11 \pm 1,27 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,05$
IL-4, пг/мл	36,33 \pm 1,61 $p < 0,001$	46,73 \pm 2,61 $p_1 < 0,05$	43,79 \pm 2,44 $p_1 < 0,05$	59,87 \pm 2,90 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,01$
IL-10, пг/мл	67,37 \pm 2,05 $p < 0,001$	79,46 \pm 2,93 $p_1 < 0,05$	74,44 \pm 2,70 $p_1 > 0,05$	90,05 \pm 1,87 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,01$

У вагітних тварин з АФС комбіноване введення попередника нітроген оксиду та блокатора iNOS також супроводжувалось збереженням позитивного впливу L-аргініну на цитокіновий профіль. Більше того, при застосуванні такої комбінації чинників корекції спостерігалось суттєве наростання рівня протизапальних цитокінів, порівняно з групою тварин, які отримували лише L-аргінін.

Результати дослідження показали, що при застосуванні L-аргініну у вагітних та невагітних мишей при АФС відбувалось зниження концентрації прозапальних цитокінів та зростання концентрації протизапальних цитокінів. Введення аміногуанідину супроводжувалося зниженням лише концентрації TNF- α у вагітних та невагітних тварин з АФС й зростанням концентрації IL-4 у вагітних самок з АФС. Найефективнішим із трьох досліджуваних способів корекції порушень балансу про- та протизапальних цитокінів, які виникають у вагітних та невагітних мишей при АФС, виявилось комбіноване застосування попередника NO L-аргініну та інгібітора індукцибельної NOS аміногуанідину.

4.5. Вплив L-аргініну та аміногуанідину на показники процесу апоптозу та продукції активних форм оксигену у лейкоцитах крові та вміст каспази-3 у печінці невагітних та вагітних мишей при антифосфоліпідному синдромі

Роль імуногенів для індукції аФЛ відіграють апоптотичні клітини, водночас фосфоліпіди та білково-фосфоліпідні комплекси, що утворюються під час апоптозу, є мішенню для аФЛ [155, 281, 290, 346]. NO індукує апоптоз за допомогою модуляції численних рецепторів сигнальних шляхів, включаючи рецептор смерті і мітохондріальні шляхи [279]. NO бере участь як у процесах апоптозу, так і в процесах некрозу, залежно від редокс-форми нітроген оксиду та його вмісту (високі рівні NO запускають некроз, тоді як тривалий вплив низьких концентрацій – апоптоз) [71].

У результаті проведених досліджень встановлено, що при застосуванні попередника NO L-аргініну в лейкоцитах крові мишей лінії BALB/c з АФС знижувався показник AV-GFP+, який відповідає за ранній апоптоз, на 46 %, та вміст PI+-клітин, які характеризують інтенсивність некротичних процесів, на 41 %, порівняно з показниками групи тварин з АФС (рис. 4.13).

При введенні інгібітора iNOS аміногуанідину мишам з АФС встановлено зниження вмісту AV-GFP+ на 38 %, та вмісту PI+ на 37 % у лейкоцитах крові, порівняно із показниками тварин з АФС. За комбінованого введення L-аргініну

та аміногуанідину мишам з АФС встановлено зниження вмісту AV-GFP+ на 55 %, та вмісту PI+ на 31 % у лейкоцитах крові, порівняно із показниками тварин з АФС. Встановлено, що у вагітних мишей за умов АФС застосування L-аргініну та аміногуанідину, окремо та при їх комбінованому введенні, приводить до нормалізації показників життєздатності лейкоцитів (рис. 4.14).

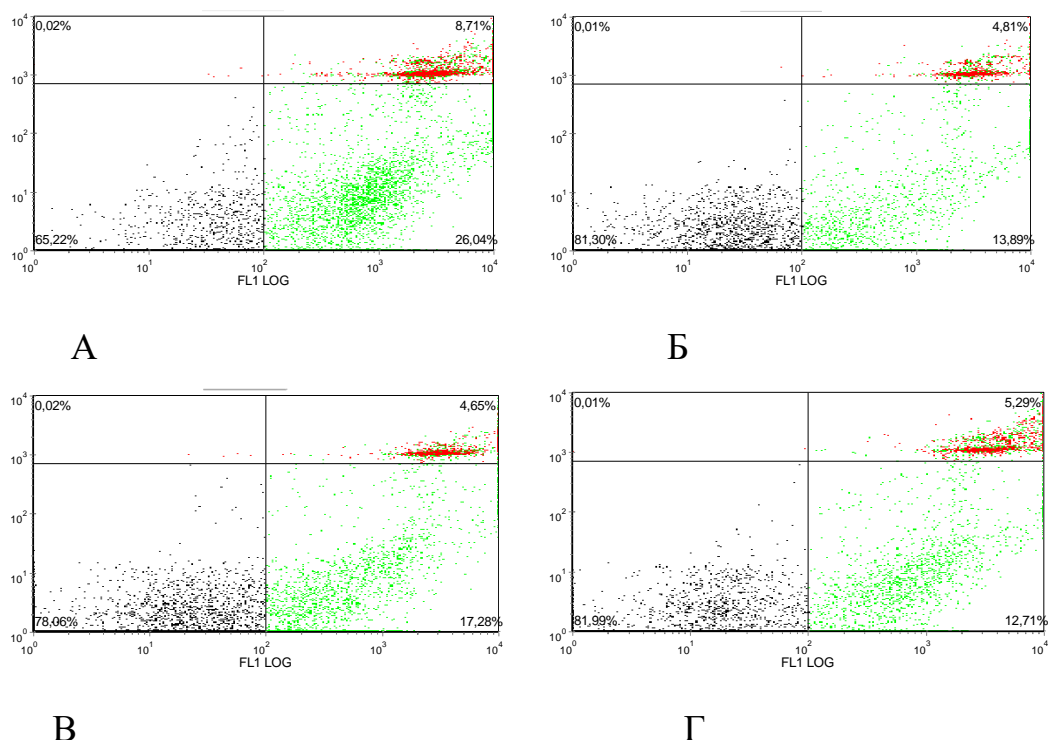


Рис. 4.13. Точкові діаграми розподілу апоптотичних і життєздатних клітин лейкоцитів мишей лінії BALB/c за умов АФС та при застосуванні L-аргініну і аміногуанідину в режимі DotPlot (інтенсивність флуоресценції за каналами FL1 (515–535 нм) і FL3 (620–630 нм))

Примітка. Тут і на рисунку 4.14. Чорним кольором позначено живі клітини, червоним кольором – клітини PI-позитивні і анексин V-GFP-позитивні (некротичні), а зеленим – тільки анексин V-GFP позитивні (апоптотичні). Позначення груп: А – Антифосфоліпідний синдром (АФС); Б – АФС + L-аргінін; В – АФС + аміногуанідин; Г – АФС + L-аргінін + аміногуанідин.

Антиапоптотична дія NO також включає як рецептор смерті, так і мітохондріальні шляхи апоптозу [360]. Медіатори запалення відіграють роль в індукції ендотеліальної дисфункції при АФС та активації лейкоцитів [207].

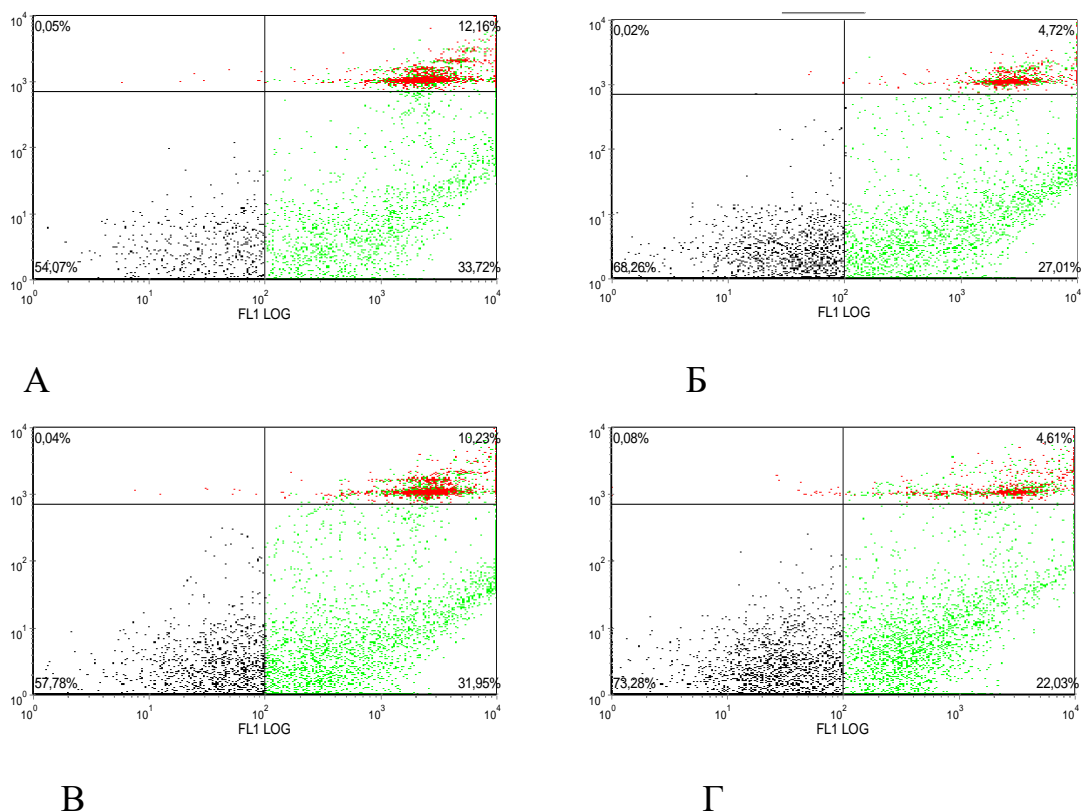


Рис. 4.14. Точкові діаграми розподілу апоптотичних і життєздатних клітин лейкоцитів мишей лінії BALB/c за умов АФС на 18-й день вагітності та при застосуванні L-аргініну і аміногуанідину в режимі DotPlot (інтенсивність флуоресценції за каналами FL1 (515–535 нм) і FL3 (620–630 нм))

Отримані нами результати свідчать про перерозподіл між двома основними типами лейкоцитів – гранулоцитами та агранулоцитами – у невагітних та вагітних мишей лінії BALB/c за умов АФС під впливом чинників корекції (рис. 4.15). Встановлено, що при введенні L-аргініну тваринам з АФС у крові відбувається подальше зростання кількості гранулоцитів, що на 19 % вище ($p < 0,05$), ніж у тварин з АФС. Кількість агранулоцитів знижувалася на 25 % ($p < 0,05$) відносно групи тварин з АФС. У вагітних мишей, яким вводили L-аргінін, встановлено зниження кількості гранулоцитів на 23 % ($p < 0,01$)

та зростання кількості агранулоцитів на 34 % ($p<0,01$), порівняно з групою тварин з АФС на 18-й день вагітності.

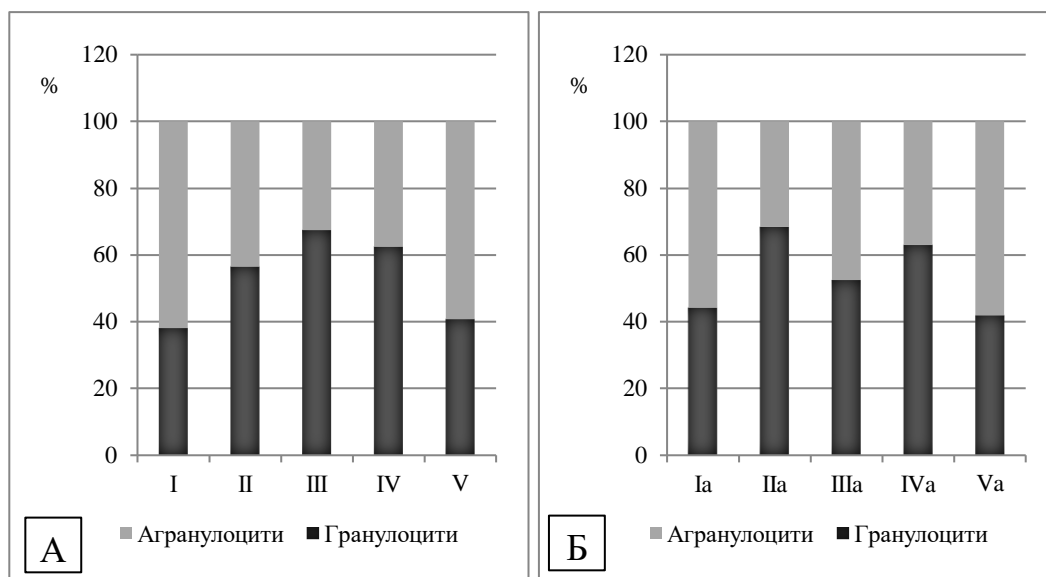


Рис. 4.15. Перерозподіл лейкоцитів крові у мишей лінії BALB/с за умов АФС до вагітності (А) та на 18-й день вагітності (Б) і при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину

При введенні аміногуанідину не виявлено достовірних змін кількості гранулоцитів у крові мишей з АФС, а кількість агранулоцитів знижувалася на 14 % ($p<0,05$), порівняно із показниками групи тварин з АФС. Введення аміногуанідину вагітним тваринам з АФС не впливало на кількість гранулоцитів та агранулоцитів у крові.

Відновлення рівноваги між кількістю гранулоцитів та агранулоцитів до рівня контролю під впливом комбінованого застосування L-аргініну і аміногуанідину відбувається у вагітних та невагітних мишей з АФС (рис. 4.15). При введенні L-аргініну в комбінації з аміногуанідином тваринам з АФС встановлено зниження кількості гранулоцитів на 28 % ($p<0,001$) та зростання кількості агранулоцитів на 36 % ($p<0,001$). При комбінованому застосуванні L-аргініну й аміногуанідину у мишей з АФС на 18-й день вагітності встановлено зниження кількості гранулоцитів на 39 % ($p<0,01$) та зростання кількості агранулоцитів на 77 % ($p<0,01$), порівняно із показниками вагітних тварин

з АФС. Зміни в перерозподілі лейкоцитів можуть бути обумовлені розвитком запальної реакції [25, 94].

Одним із важливих компонентів патогенезу АФС, що сприяє дисфункції імунокomпетентних клітин і синтезу аутоантитіл, є оксидативний стрес, розвиток якого безпосередньо пов'язаний з активацією програмованої клітинної загибелі – апоптозу [24]. Відомо, що у механізмах розвитку апоптозу клітин важливу роль відіграють мітохондрії, які продукують АФО, інтегрують внутрішньоклітинні сигнальні шляхи [63]. Порухення біодоступності NO при АФС може бути пов'язано зі зниженням концентрації субстрату – L-аргініну, а також зі зростанням утворення супероксид-аніона, який швидко зв'язує і інактивує NO з утворенням токсичного пероксинітриту [285].

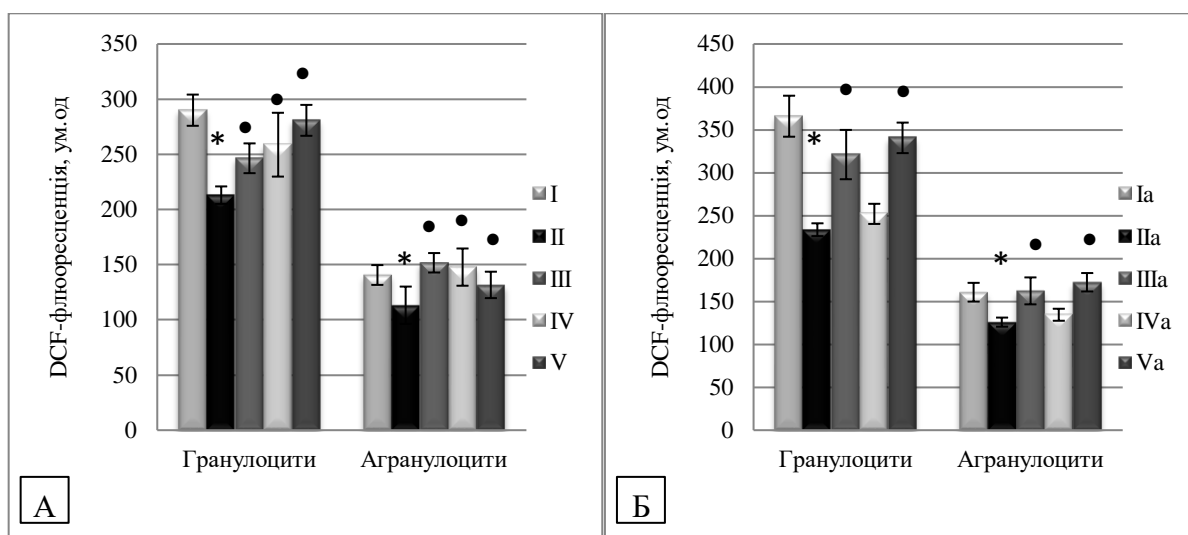


Рис. 4.16. Рівень АФО у лейкоцитах крові мишей лінії BALB/c за умов АФС до вагітності (А) та на 18-й день вагітності (Б) та при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину ($M \pm m$, $n=10$)

Під час оцінки ступеня утворення АФО в лейкоцитах мишей лінії BALB/c з АФС, яким вводили L-аргінін, встановлено зростання вмісту АФО у гранулоцитах на 16 % та в агранулоцитах на 34 %, порівняно з показниками групи мишей з АФС (рис. 4.16).

У групі вагітних тварин з АФС, яким вводили L-аргінін, виявлено зростання вмісту АФО в гранулоцитах на 37 % та в агранулоцитах на 29 %, порівняно з показниками мишей з АФС на 18-й день вагітності (див. рис. 4.16).

При введенні аміногуанідину вміст АФО збільшувався в гранулоцитах на 21 % та агранулоцитах на 31 %, порівняно із показниками тварин з АФС (див. рис. 4.16). У вагітних мишей з АФС не встановлено достовірних змін вмісту АФО в гранулоцитах та агранулоцитах. Комбіноване застосування L-аргініну та аміногуанідину в мишей з АФС призводило до зростання вмісту АФО в гранулоцитах на 32 % та в агранулоцитах на 16 %, порівняно з показниками тварин з АФС. Водночас відбувалася нормалізація показників вмісту АФО в гранулоцитах та агранулоцитах, порівняно з показниками контрольної групи тварин. У вагітних тварин з АФС, яким вводили L-аргінін у комбінації з аміногуанідином, встановлено зростання вмісту АФО в гранулоцитах на 46 % та в агранулоцитах на 37 %, порівняно з показниками мишей з АФС на 18-й день вагітності.

Дисбаланс між рівнями АФО та NO призводить до апоптозу та подальшої дисфункції ендотелію [366], що підтверджено в умовах *in vivo* та *in vitro* [362]. NO характеризується протективним ефектом на Fas-R-індукований апоптоз у гепатоцитах та в активованих Т-лімфоцитах. NO-індукований апоптоз може супроводжуватися акумуляцією гена-супресора пухлин p53, змінами в експресії антиапоптотичних Bcl-2, транслокацією цитохрому c, активацією каспаза-3-подібних протеаз [71].

Під впливом попередника NO L-аргініну у тканині печінки мишей з АФС встановлено зниження вмісту каспази-3 на 16 % та β -актину на 20 %, порівняно з показниками групи тварин з АФС (рис. 4.17, 4.18 А, 4.19 А). У групі вагітних мишей з АФС введення L-аргініну супроводжувалося зниженням вмісту каспази-3 на 44 % та β -актину на 10 % у тканині печінки, порівняно з показниками тварин з АФС на 18-й день вагітності (рис. 4.17, 4.18 Б, 4.19 Б).

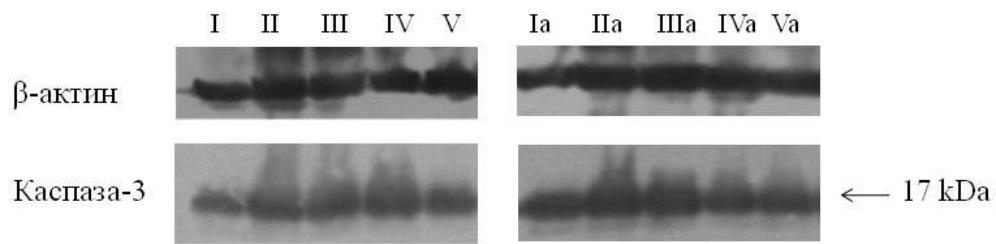


Рис. 4.17. Вестерн-блот аналіз вмісту активної форми каспази-3 та β -актину в печінці мишей лінії BALB/c за умов АФС до вагітності та на 18-й день вагітності і при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину

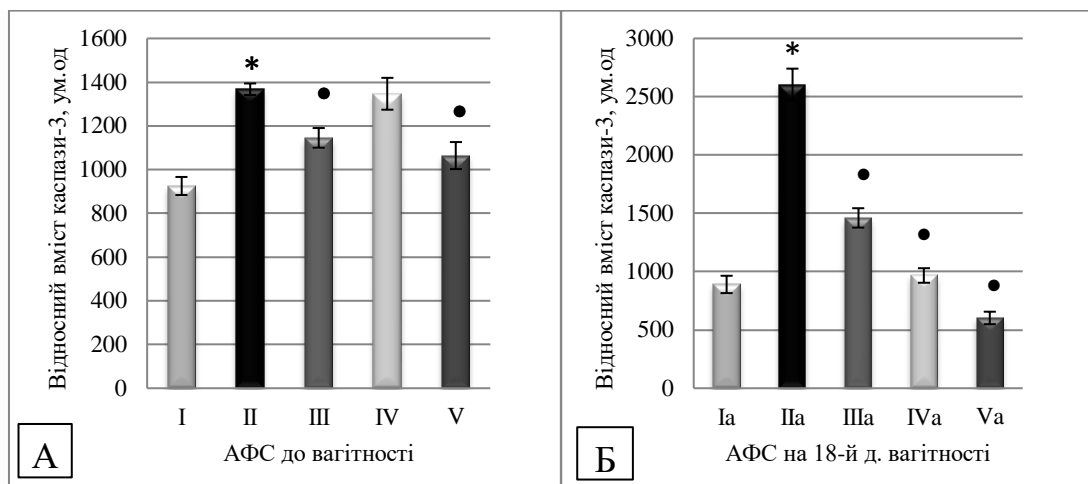


Рис. 4.18. Результати Вестерн-блот аналізу вмісту активної форми каспази-3 в печінці мишей лінії BALB/c за умов АФС до вагітності (А) та на 18-й день вагітності (Б) і при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину ($M \pm m$, $n=10$)

Ймовірно, що зниження вмісту каспази-3 у печінці тварин з АФС опосередковується цГМФ-залежною кіназою. Інші антиапоптотичні механізми дії NO пов'язані з індукцією синтезу білків теплового шоку, які пригнічують активність каспаз і стабілізують мембрани мітохондрій [227]. NO може інгібувати мітохондріальний шлях апоптозу через блокування вивільнення проапоптотичних білків: цитохрому c, AIF, Omi/HtrA2, Diablo/Smac [71].

Як показали результати досліджень, введення мишам лінії BALB/с з АФС інгібітора iNOS аміногуанідину не викликало достовірних змін вмісту каспази-3, а вміст β -актину знижувався на 24 % у тканині печінки, порівняно із показниками тварин з АФС (див. рис. 4.18 А, 4.19 А). Разом з тим, встановлено, що введення аміногуанідину вагітним мишам з АФС супроводжувалось зниженням вмісту каспази-3 на 63 % та не впливало на вміст β -актину, порівняно з показниками мишей з АФС на 18-й день вагітності (див. рис. 4.18 Б, 4.19 Б). За даними Dingman A. et al. [214], інгібування iNOS аміногуанідином пригнічує експресію каспази-3, що підтверджується результатами, отриманими у нашому дослідженні.

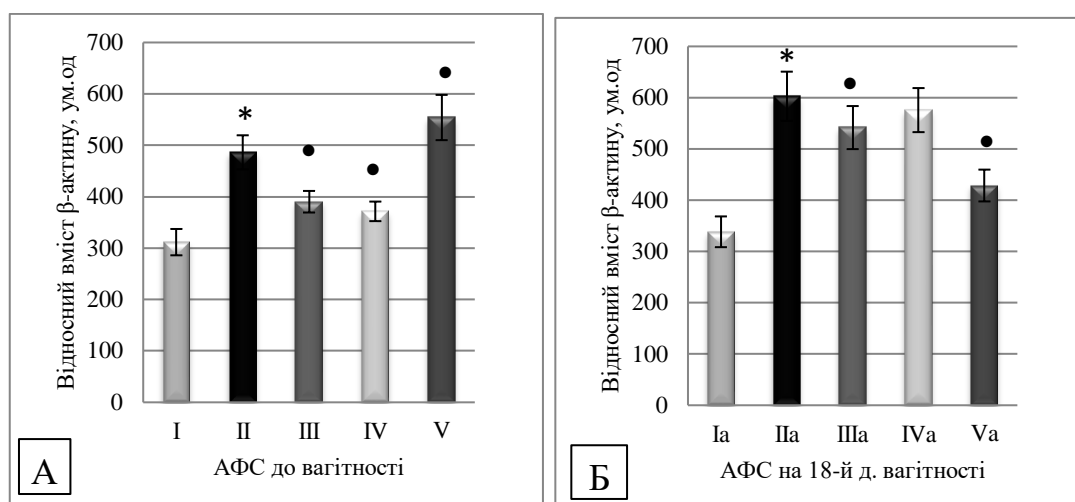


Рис. 4.19. Результати Вестерн-блот аналізу вмісту β -актину в печінці мишей лінії BALB/с за умов АФС до вагітності (А) та на 18-й день вагітності (Б) і при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину ($M \pm m$, $n=10$)

Установлено, що при комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину за умов АФС у тканині печінки відбувається зниження вмісту каспази-3 на 22 % та зростання вмісту β -актину на 14 %, порівняно з показниками групи тварин з АФС (див. рис. 4.18 А, 4.19 А). За комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину в печінці мишей лінії BALB/с з АФС на 18-й день вагітності встановлено зниження вмісту каспази-3 на 77 % та

β -актину на 29 %, порівняно із показниками групи вагітних мишей з АФС (див. рис. 4.18 Б, 4.19 Б).

Активність каспази-3 інгібується її посттрансляційним S-нітрозилюванням [360, 378].

При порівнянні отриманих результатів у групі тварин з АФС, яким вводили L-аргінін у комбінації з аміногуанідином, із групою тварин з АФС, яким вводили окремо L-аргінін, виявлено, що у печінці вміст каспази-3 достовірно не змінювався, а вміст β -актину зростав на 42 %. При комбінованому введенні L-аргініну та аміногуанідину у печінці мишей з АФС вміст каспази-3 знижувався на 21 %, а вміст β -актину зростав на 49 % відносно показників групи тварин з АФС, яким вводили аміногуанідин.

Результати дослідження показали, що за комбінованого введення L-аргініну та аміногуанідину вагітним мишам з АФС вміст каспази-3 був на 59 %, а β -актину – на 21 % нижчим, ніж у групі тварин з АФС на 18-й день вагітності, яким вводили L-аргінін. Встановлено також, що при комбінованому введенні L-аргініну та аміногуанідину вміст каспази-3 у печінці був на 38 %, а β -актину на 26 % нижчим, ніж у групі вагітних тварин з АФС, яким вводили аміногуанідин.

Таким чином, співвідношення між токсичними і захисними механізмами NO визначає його роль у пошкодженні клітин та механізмах розвитку апоптозу. Баланс між про- і антиапоптотичними сигнальними механізмами, їх активація або пригнічення в результаті синтезу NO супроводжується або збереженням структури тканини, або загибеллю клітин у результаті апоптозу [227].

Отже, у нашому дослідженні встановлено, що найефективнішим із досліджуваних трьох способів корекції порушень процесів реалізації апоптозу, які виникають у вагітних та невагітних мишей при АФС, є комбіноване застосування попередника NO L-аргініну та інгібітора індукцйбельної NOS аміногуанідину.

Встановлено, що застосування L-аргініну та аміногуанідину, окремо та при комбінованому введенні, вагітним та невагітним мишам з АФС приводить до нормалізації показників життєздатності гранулоцитів та агранулоцитів.

Комбіноване застосування L-аргініну та аміногуанідину вагітним та невагітним мишам лінії BALB/c з АФС більшою мірою, ніж їх окреме введення, супроводжується відновленням рівноваги між кількістю гранулоцитів та агранулоцитів до рівня контролю та нормалізацією показників вмісту АФО у гранулоцитах та агранулоцитах.

4.6. Вплив L-аргініну та аміногуанідину на показники системи прооксиданти – антиоксиданти у мозочку, півкулях великого мозку, печінці та нирках невагітних та вагітних мишей при антифосфоліпідному синдромі

Оксидативний стрес є одним із важливих компонентів патогенезу АФС [157, 325, 372, 375]. Пероксидне окиснення ліпідів є одним із факторів розвитку ендотеліальної дисфункції у пацієнтів з АФС [375, 400]. Порухення балансу між концентрацією АФО та компонентів АОС, рівноваги в системі прооксиданти/антиоксиданти призводить до оксидативного стресу, пошкодження структури ДНК, протеїнів та ліпідів [212, 285]. При АФС спостерігається порушення функції різних органів та систем: ЦНС, нирок, печінки, ендокринних залоз, серцево-судинної системи, шлунково-кишкового тракту [108, 351].

У багатьох хворих із АФС спостерігаються неврологічні порушення, зумовлені пошкодженням головного мозку [41, 230, 295]. Оксидативний стрес відіграє важливу роль у патобіохімічних механізмах ураження центральної нервової системи за умов АФС. Відомо, що важливу роль у функціонуванні нейронів, глії і кровоносних судин відіграє NO як інтегруючий фактор [84, 219]. При цьому NO залучений як до вторинного пошкодження, так і до неврологічного відновлення [168, 259]. При порушенні балансу активних форм нітрогену і кисню NO і $O_2^{\cdot-}$ взаємодіють між собою, утворюється

пероксинітрит, що призводить до пошкодження судин мозку [84]. Підтримка окисно-відновного гомеостазу має важливе значення для виживання клітин мозку через їх високу потребу в метаболічній енергії для підтримки електрохімічних градієнтів, вивільнення нейромедіаторів та стабільності ліпідів мембран [198, 369].

Встановлено, що у мозочку мишей з АФС, яким вводили L-аргінін, відбувається збільшення вмісту ГПЛ на 22 % та ТБК-АП на 11 %, порівняно із показниками групи тварин з АФС (табл. 4.8).

Таблиця 4.8

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

Показник	Група тварин			
	АФС	АФС+ L-аргінін	АФС + аміногуанідин	АФС + L-аргінін + аміногуанідин
ГПЛ, у.о./г тканини	15,76 \pm 0,54 $p < 0,001$	19,21 \pm 0,58 $p_1 < 0,005$	10,01 \pm 0,57 $p_1 < 0,001$	12,48 \pm 0,61 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,05$
ТБК-АП, нмоль/г тканини	6,78 \pm 0,22 $p < 0,001$	7,56 \pm 0,19 $p_1 < 0,05$	5,87 \pm 0,22 $p_1 < 0,05$	4,56 \pm 0,16 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,01$
СОД, у.о./мг протеїну	1,09 \pm 0,08 $p < 0,001$	0,65 \pm 0,03 $p_1 < 0,005$	1,90 \pm 0,07 $p_1 < 0,001$	2,09 \pm 0,05 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 > 0,05$
КАТ, нмоль/хв· протеїну	1,79 \pm 0,09 $p < 0,001$	1,26 \pm 0,07 $p_1 < 0,005$	3,44 \pm 0,19 $p_1 < 0,001$	2,82 \pm 0,11 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,05$
G-SH, мкмоль/г тканини	5,65 \pm 0,06 $p < 0,001$	4,42 \pm 0,13 $p_1 < 0,001$	6,27 \pm 0,10 $p_1 < 0,005$	6,90 \pm 0,09 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,01$

Водночас встановлено зниження активності СОД на 41 % та КАТ на 30 %, вмісту G-SH на 22 % (див. табл. 4.8) та активності ензимів електронотransпортного ланцюга мітохондрій СДГ на 12 % та ЦХО на 18 %, порівняно із показниками групи тварин з АФС (табл. 4.9).

Оскільки введення субстрату для синтезу NO L-аргініну тваринам з АФС призводить до подальшого порушення рівноваги у системі прооксиданти – антиоксиданти у мозочку мишей лінії BALB/c за умов АФС, отримані результати опосередковано підтверджують пошкоджувальну роль надлишкового утворення NO у розвитку оксидативного стресу в структурах ЦНС.

Таблиця 4.9

Вплив L-аргініну та аміногуанідину на показники активності ензимів тканинного дихання у мозочку невагітних та вагітних мишей лінії BALB/c за умов антифосфоліпідного синдрому ($M \pm m$, $n=10$)

Група тварин	АФС до вагітності		АФС на 18-й день вагітності	
	СДГ, нмоль/хв·мг протеїну	ЦХО, мкмоль/хв·мг протеїну	СДГ, нмоль/хв·мг протеїну	ЦХО, мкмоль/хв·мг протеїну
АФС	4,36±0,07 $p < 0,001$	3,16±0,07 $p < 0,001$	3,48±0,09 $p < 0,001$	2,20±0,07 $p < 0,001$
АФС + L-аргінін	3,82±0,08 $p_1 < 0,005$	2,58±0,07 $p_1 < 0,001$	3,88±0,05 $p_1 < 0,01$	2,49±0,09 $p_1 < 0,05$
АФС + аміногуанідин	5,39±0,07 $p_1 < 0,001$	4,55±0,06 $p_1 < 0,001$	4,29±0,13 $p_1 < 0,01$	3,90±0,12 $p_1 < 0,001$
АФС + L-аргінін + аміногуанідин	5,56±0,16 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 > 0,05$	5,81±0,07 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,001$	4,91±0,11 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,05$	4,34±0,09 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,05$

Однак, незважаючи на те, що рівень стабільних метаболітів NO у мозочку вагітних мишей з АФС зростає (див. підрозділ 3.3), введення L-аргініну цим тваринам сприяло пригніченню активності процесів переокиснення мембранних ліпідів. Установлено зниження вмісту ГПЛ на 26 % та ТБК-АП

на 12 %, порівняно з групою вагітних тварин з АФС, які не отримували L-аргініну (табл. 4.10). Про активацію системи антиоксидантного захисту в мозочку тварин у цій групі свідчило підвищення активності СОД на 33 %, КАТ на 26 %. Також встановлено зростання активності мітохондріальних СДГ на 12 % та ЦХО на 13 %, порівняно із показниками групи вагітних мишей з АФС (див. табл. 4.9).

Таблиця 4.10

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

Показник	Група тварин			
	АФС	АФС+ L-аргінін	АФС + аміногуанідин	АФС + L-аргінін + аміногуанідин
ГПЛ, ум.од./г тканини	19,75±0,60 $p < 0,001$	14,56±0,61 $p_1 < 0,01$	15,50±0,90 $p_1 < 0,01$	12,59±0,51 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$
ТБК-АП, нмоль/г тканини	14,17±0,45 $p < 0,001$	12,41±0,39 $p_1 < 0,05$	10,56±0,85 $p_1 < 0,01$	8,27±0,38 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,05$
СОД, ум.од./мг протеїну	1,44±0,13 $p < 0,001$	1,91±0,10 $p_1 < 0,05$	2,07±0,16 $p_1 < 0,05$	3,00±0,24 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,01$ $p_3 < 0,05$
КАТ, нмоль/хв·мг протеїну	2,07±0,15 $p < 0,001$	2,60±0,13 $p_1 < 0,05$	3,32±0,24 $p_1 < 0,01$	4,05±0,13 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,05$
G-SH, мкмоль/г тканини	3,92±0,14 $p < 0,001$	4,05±0,19 $p_1 > 0,05$	4,56±0,14 $p_1 < 0,05$	5,38±0,16 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,01$ $p_3 < 0,01$

Позитивний вплив попередника NO L-аргініну на показники оксидативного стресу в мозочку вагітних мишей з АФС, ймовірно, відбувається

через його антиоксидантні властивості. Можна також припустити, що під час вагітності L-аргінін використовується більшою мірою для забезпечення функціонування плода, матки, плаценти, оскільки у мозочку при введенні L-аргініну вміст NO_2^- достовірно не змінювався, а вміст NO_3^- зростав незначно. Вплив NO може регулюватися його клітинною локалізацією та рівнем оксидативного стресу в тканині [168].

При введенні аміногуанідину встановлено послаблення активності процесів пероксидного окиснення мембранних ліпідів у мозочку мишей з АФС: знижувався вміст ГПЛ на 37 % і ТБК-АП на 14 %, порівняно з показниками групи тварин з АФС (див. табл. 4.8). Про активацію системи антиоксидантного захисту при застосуванні аміногуанідину свідчило підвищення активності СОД на 74 % і КАТ на 92 %, вміст G-SH зростав на 11 %, порівняно з показниками мишей з АФС. Встановлено підвищення активності СДГ на 23 % та ЦХО на 44 % (див. табл. 4.9).

При введенні аміногуанідину в мозочку вагітних мишей з АФС відбувається пригнічення активності процесів переокиснення мембранних ліпідів: зниження вмісту ГПЛ на 22 % та ТБК-АП на 25 %, порівняно із показниками групи вагітних тварин з АФС (див. табл. 4.10). Встановлено зростання активності СОД на 44 % та КАТ на 60 % (див. табл. 4.10), СДГ на 23 %, ЦХО на 77 % (див. табл. 4.9) та вмісту G-SH на 16 % (див. табл. 4.10), порівняно з показниками групи вагітних тварин з АФС. Оскільки аміногуанідин є інгібітором iNOS, ймовірно, що його нейропротекторний ефект відбувається завдяки інгібувальній дії щодо цієї ізоформи NOS [203].

Враховуючи те, що при АФС виникає відносна недостатність NO, який синтезується eNOS, на фоні загальної гіперпродукції NO, що синтезується під впливом iNOS, наступним завданням нашого дослідження було встановлення можливості підвищення нейропротекторного впливу при комбінованому застосуванні аміногуанідину з L-аргініном.

Встановлено, що за комбінованого введення L-аргініну та аміногуанідину тваринам з АФС у мозочку відбувається зниження вмісту ГПЛ на 21 %

та ТБК-АП на 33 %, порівняно із показниками групи тварин з АФС (див. табл. 4.8). Виявлено зростання активності СОД на 92 % та КАТ на 57 %, вмісту G-SH на 22 %, порівняно із показниками групи тварин з АФС. Встановлено також достовірне зростання активності мітохондріальних ензимів СДГ на 27 % та ЦХО на 84 %, порівняно з групою тварин з експериментальним АФС (див. табл. 4.9). Результати дослідження показали, що за комбінованого введення L-аргініну та аміногуанідину в мозочку тварин з АФС відбувається гальмування процесів пероксидного окиснення ліпідів, про що свідчило достовірне зниження вмісту ГПЛ на 35 % та ТБК-АП на 40 %, порівняно з показниками мишей з АФС, яким вводили L-аргінін. Про активацію системи антиоксидантного захисту за комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину свідчило підвищення активності СОД на 223 %, КАТ на 123 % та вмісту G-SH на 56 %. Встановлено зростання активності СДГ на 46 % та ЦХО на 125 %, відносно групи мишей лінії BALB/c, яким вводили L-аргінін. Встановлено, що за комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину в мозочку мишей з АФС відбувається збільшення вмісту ГПЛ на 25 %, зниження вмісту ТБК-АП на 22 %, зниження активності КАТ на 18 %, зростання вмісту G-SH на 10 % та активності ЦХО на 28 %, порівняно із показниками групи тварин з АФС, яким вводили аміногуанідин.

За комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину вагітним мишам з АФС у їх мозочку встановлено достовірне зниження вмісту ГПЛ на 36 % та ТБК-АП на 42 %, підвищення активності СОД на 108 % та КАТ на 96 % та вмісту G-SH на 37 %, порівняно з показниками вагітних тварин із АФС (див. табл. 4.10). Спостерігали зростання активності СДГ на 41 % та ЦХО на 97 %, порівняно з показниками вагітних мишей з АФС (див. табл. 4.9). При комбінованому введенні L-аргініну та аміногуанідину в мозочку тварин з АФС на 18-й день вагітності виявлено зниження вмісту ГПЛ на 14 % та ТБК-АП на 33 %, зростання активності СОД на 57 %, КАТ на 56 %, СДГ на 27 % та ЦХО на 75 %, а також вмісту G-SH на 33 %, порівняно з показниками вагітних мишей з АФС, яким вводили L-аргінін. Встановлено, що за комбінованого

застосування L-аргініну та аміногуанідину у мозочку вагітних мишей з АФС відбувається зниження вмісту ГПЛ на 19 %, ТБК-АП на 22 %, зростання активності СОД на 45 %, КАТ на 23 %, СДГ на 15 % та ЦХО на 11 %, а також вмісту G-SH на 18 %, порівняно із показниками групи вагітних тварин з АФС, яким вводили аміногуанідин.

На основі вищенаведених результатів можна зробити висновок, що при комбінованому використанні аміногуанідину з L-аргініном відбувається підвищення нейропротекторної активності у мозочку вагітних та невагітних мишей за умов АФС.

Як свідчать результати виконаних нами досліджень, при введенні L-аргініну у півкулях великого мозку тварин з АФС відбувається пригнічення активності процесів переокиснення мембранних ліпідів. Встановлено зниження вмісту ГПЛ на 29 % та ТБК-АП на 12 %, порівняно із показниками групи тварин з АФС (табл. 4.11). Водночас відмічено підвищення активності СОД на 31 % та КАТ на 63 %, СДГ на 17 %, порівняно із показниками групи тварин з АФС (табл. 4.12).

У півкулях великого мозку вагітних мишей з АФС, яким вводили L-аргінін, виявлено зниження вмісту ГПЛ на 21 % та ТБК-АП на 24 %, порівняно із показниками групи тварин з АФС на 18-й день вагітності (табл. 4.13). Про активацію системи антиоксидантного захисту при застосуванні аміногуанідину свідчило підвищення активності СОД на 38 % та КАТ на 40 %, а також вмісту G-SH на 39 %.

При введенні аміногуанідину у півкулях великого мозку виявлено зниження вмісту ГПЛ на 30 % і ТБК-АП на 18 % (табл. 4.11). Про активацію системи антиоксидантного захисту у цій серії дослідів свідчило підвищення активності СОД на 41 % і КАТ на 83 %, порівняно з показниками групи тварин з АФС. Водночас зростав вміст G-SH на 15 %. Введення аміногуанідину супроводжувалося підвищенням активності ЦХО на 33 %, порівняно із показниками групи тварин з АФС (табл. 4.12).

Таблиця 4.11

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

Показник	Група тварин			
	АФС	АФС + L-аргінін	АФС + аміногуанідин	АФС + L-аргінін + аміногуанідин
ГПЛ, у.о./г тканини	13,27 \pm 0,28 $p < 0,001$	9,37 \pm 0,44 $p_1 < 0,001$	9,28 \pm 0,62 $p_1 < 0,01$	8,7 \pm 0,35 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$
ТБК-АП, нмоль/г тканини	5,59 \pm 0,23 $p < 0,001$	4,92 \pm 0,13 $p_1 < 0,05$	4,58 \pm 0,15 $p_1 < 0,05$	3,94 \pm 0,14 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,01$ $p_3 < 0,05$
СОД, у.о./мг протеїну	2,11 \pm 0,14 $p < 0,001$	2,77 \pm 0,17 $p_1 < 0,05$	2,98 \pm 0,07 $p_1 < 0,005$	3,52 \pm 0,19 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$
КАТ, нмоль/хв·мг протеїну	2,67 \pm 0,21 $p < 0,001$	4,35 \pm 0,28 $p_1 < 0,005$	4,89 \pm 0,26 $p_1 < 0,001$	4,59 \pm 0,30 $p_1 < 0,005$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$
G-SH, мкмоль/г тканини	4,19 \pm 0,10 $p < 0,001$	4,42 \pm 0,12 $p_1 > 0,05$	4,81 \pm 0,17 $p_1 < 0,05$	5,41 \pm 0,14 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,01$ $p_3 < 0,05$

Нейропротекторна роль аміногуанідину може реалізуватися через пригнічення утворення АФО, інгібування пероксидації ліпідів у клітинах і тканинах та запобігання апоптозу завдяки його антиоксидантним властивостям [146, 238].

При введенні аміногуанідину встановлено послаблення активності процесів пероксидного окиснення мембранних ліпідів у півкулях великого мозку вагітних мишей з АФС: знижувався вміст ГПЛ на 17 % і ТБК-АП на 13 % (табл. 4.13). Встановлено підвищення активності СОД на 17 % і КАТ на 19 %, порівняно з показниками групи тварин з АФС. Одночасно зростав вміст G-SH

на 24 %, порівняно показниками групи вагітних тварин з АФС. Отримані результати можна пояснити тим, що аміногуанідин впливає на пероксидацію ліпідів, зменшуючи розвиток оксидативного стресу [203].

Таблиця 4.12

Вплив L-аргініну та аміногуанідину на показники активності ензимів тканинного дихання у півкулях великого мозку вагітних та невагітних мишей лінії BALB/c за умов антифосфоліпідного синдрому ($M \pm m$, $n=10$)

Група тварин	АФС до вагітності		АФС на 18-й день вагітності	
	СДГ, нмоль/хв·мг протеїну	ЦХО, мкмоль/хв·мг протеїну	СДГ, нмоль/хв·мг протеїну	ЦХО, мкмоль/хв·мг протеїну
АФС	4,64±0,08 $p < 0,001$	3,60±0,11 $p < 0,001$	4,78±0,20 $p > 0,05$	6,93±0,23 $p > 0,05$
АФС+ L-аргінін	5,41±0,17 $p_1 < 0,01$	3,88±0,16 $p_1 > 0,05$	5,23±0,12 $p_1 > 0,05$	6,84±0,22 $p_1 > 0,05$
АФС + аміногуанідин	4,96±0,14 $p_1 > 0,05$	4,79±0,10 $p_1 < 0,001$	5,39±0,19 $p_1 > 0,05$	7,34±0,30 $p_1 > 0,05$
АФС + L-аргінін + аміногуанідин	5,50±0,16 $p_1 < 0,005$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,05$	5,60±0,15 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,01$	5,22±0,12 $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$	7,87±0,42 $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$

Отже, аміногуанідин за умов експериментального АФС проявляє антиоксидантні властивості, його дія спрямована на відновлення активності та вмісту компонентів АОС, ензимів електронотransпортного ланцюга мітохондрій, зниження рівня ПОЛ у півкулях великого мозку вагітних та невагітних мишей при АФС.

При введенні L-аргініну в комбінації з аміногуанідином встановлено пригнічення активності процесів переокиснення мембранних ліпідів у півкулях великого мозку: зниження вмісту ГПЛ на 35 % та ТБК-АП на 29 %, порівняно із показниками групи тварин з АФС (див. табл. 4.11). Про активацію системи

антиоксидантного захисту у півкулях великого мозку при комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину свідчить підвищення активності СОД на 66 % і КАТ на 72 % та підвищення вмісту G-SH на 29 %.

Таблиця 4.13

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

Показник	Група тварин			
	АФС	АФС + L-аргінін	АФС + аміногуанідин	АФС + L-аргінін + аміногуанідин
ГПЛ, у.о./г тканини	12,44±0,67 $p < 0,01$	9,82±0,35 $p_1 < 0,05$	10,32±0,25 $p_1 < 0,05$	8,98±0,42 $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,05$
ТБК-АП, нмоль/г тканини	9,24±0,20 $p < 0,001$	7,06±0,24 $p_1 < 0,001$	8,01±0,33 $p_1 < 0,05$	5,76±0,23 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,01$ $p_3 < 0,01$
СОД, у.о./мг протеїну	1,88±0,10 $p < 0,001$	2,58±0,18 $p_1 < 0,05$	2,19±0,06 $p_1 < 0,05$	3,55±0,21 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,001$
КАТ, нмоль/хв·мг протеїну	3,33±0,11 $p < 0,001$	4,67±0,20 $p_1 < 0,01$	3,97±0,11 $p_1 < 0,01$	5,77±0,20 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,01$ $p_3 < 0,001$
G-SH, мкмоль/г тканини	2,92±0,11 $p < 0,001$	4,05±0,04 $p_1 < 0,001$	3,61±0,15 $p_1 < 0,05$	4,45±0,14 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,01$

Встановлено зростання активності ензимів дихального ланцюга мітохондрій СДГ на 19 % та ЦХО на 56 %, порівняно з показниками тварин із АФС (див. табл. 4.12). Результати дослідження показали, що за комбінованого введення L-аргініну та аміногуанідину у півкулях великого мозку тварин з АФС

відбувається гальмування процесів вільнорадикального окиснення, про що свідчило зниження вмісту ТБК-АП (на 20 % та 14 %), порівняно з показниками мишей з АФС, яким вводили окремо L-аргінін та аміногуанідин. Встановлено підвищення активності СОД (на 27 % та 18 %), ЦХО (на 44 % та 17 %) та вмісту G-SH (на 22 % та 13 %), порівняно з показниками мишей з АФС, яким вводили окремо L-аргінін та аміногуанідин.

При введенні L-аргініну в комбінації з аміногуанідином встановлено пригнічення активності процесів вільнорадикального окиснення у півкулях великого мозку мишей з АФС на 18-й день вагітності: спостерігалось зниження вмісту ГПЛ на 28 % та ТБК-АП на 38 %, порівняно із показниками групи вагітних тварин з АФС (див. табл. 4.13). Встановлено зростання активності СОД на 89 % і КАТ на 73 % та підвищення вмісту G-SH на 52 %, порівняно з показниками вагітних тварин з АФС. У півкулях великого мозку вагітних мишей з АФС, яким вводили L-аргінін в комбінації з аміногуанідином спостерігалось зниження вмісту ТБК-АП (на 19 % та 28 %), підвищення активності СОД (на 37 % та 62 %), КАТ (на 24 % та 45 %) та вмісту G-SH (на 10 % та 23 %), порівняно з показниками мишей з АФС на 18-й день вагітності, яким вводили окремо L-аргінін та аміногуанідин.

Отримані результати свідчать про підвищення нейропротекторної активності L-аргініну та аміногуанідину при їх комбінованому застосуванні у півкулях великого мозку вагітних та невагітних мишей за умов АФС.

Характерною особливістю розвитку АФС є ураження печінки. Встановлено, що у сироватці крові невагітних та вагітних мишей з АФС, яким вводили L-аргінін, відбувається зниження активності АлАТ (на 29 та 39%) та АсАТ (на 38 та 19 %), порівняно із показниками тварин з АФС (табл. 4.14).

За результатами проведених нами експериментів встановлено, що у печінці мишей з АФС, яким вводили L-аргінін відбувається пригнічення активності процесів пероксидації мембранних ліпідів: зниження вмісту ГПЛ на 21 % відносно тварин з АФС (табл. 4.15).

Таблиця 4.14

Вплив L-аргініну та аміногуанідину на показники активності аміотрансфераз у сироватці крові вагітних та невагітних мишей лінії BALB/c за умов антифосфоліпідного синдрому ($M \pm m$, $n=10$)

Група тварин	АФС до вагітності		АФС на 18-й день вагітності	
	АлАТ, Од/л	АсАТ, Од/л	АлАТ, Од/л	АсАТ, Од/л
АФС	105,86 \pm 5,63 $p < 0,001$	306,59 \pm 13,53 $p < 0,001$	140,87 \pm 7,94 $p < 0,001$	236,96 \pm 13,16 $p < 0,001$
АФС + L-аргінін	75,68 \pm 4,31 $p_1 < 0,01$	191,20 \pm 11,87 $p_1 < 0,01$	85,53 \pm 5,89 $p_1 < 0,01$	190,89 \pm 9,88 $p_1 < 0,05$
АФС + аміногуанідин	86,60 \pm 3,53 $p_1 < 0,05$	254,25 \pm 11,20 $p_1 < 0,05$	109,62 \pm 7,82 $p_1 < 0,05$	210,53 \pm 10,51 $p_1 > 0,05$
АФС + L-аргінін + аміногуанідин	59,43 \pm 4,45 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,01$	126,97 \pm 6,67 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,01$ $p_3 < 0,001$	73,65 \pm 5,85 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,05$	155,33 \pm 14,04 $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,05$

Водночас встановлено зниження активності СОД на 16 % та КАТ на 14 % у печінці. У печінці тварин з АФС, яким вводили L-аргінін, встановлено зростання вмісту G-SH на 19 %, порівняно із показниками групи тварин з АФС. Під впливом L-аргініну встановлено також зростання активності мітохондріальних ензимів у печінці: СДГ на 21 % та ЦХО на 19 %, порівняно з групою тварин із експериментальним АФС (табл. 4.16).

Встановлено, що при введенні попередника NO L-аргініну тваринам з АФС на 18-й день вагітності відбувається зниження вмісту ГПЛ на 14 % та ТБК-АП на 24 %, порівняно із показниками групи вагітних тварин з АФС (табл. 4.17). Встановлено зростання активності СОД в 2,2 раза, КАТ на 66 % та вмісту G-SH на 19 %. Під впливом L-аргініну у печінці виявлено також зростання активності мітохондріальних ензимів СДГ на 24 % та ЦХО на 42 %, порівняно із показниками групи мишей з АФС на 18-й день вагітності (табл. 4.16).

Таблиця 4.15

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

Показник	Група тварин			
	АФС	АФС + L-аргінін	АФС + аміногуанідин	АФС + L-аргінін + аміногуанідин
ГПЛ, ум.од./г тканини	10,86 \pm 0,27 $p < 0,001$	8,57 \pm 0,27 $p_1 < 0,01$	9,30 \pm 0,48 $p_1 < 0,05$	7,93 \pm 0,38 $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$
ТБК-АП, нмоль/г тканини	5,60 \pm 0,22 $p < 0,05$	4,97 \pm 0,21 $p_1 > 0,05$	4,18 \pm 0,15 $p_1 < 0,01$	3,93 \pm 0,14 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,01$ $p_3 > 0,05$
СОД, ум.од./мг протеїну	4,36 \pm 0,23 $p < 0,01$	3,64 \pm 0,18 $p_1 < 0,05$	4,06 \pm 0,49 $p_1 > 0,05$	3,54 \pm 0,17 $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$
КАТ, нмоль/хв·мг протеїну	17,13 \pm 0,79 $p < 0,05$	14,67 \pm 0,56 $p_1 < 0,05$	15,59 \pm 0,68 $p_1 > 0,05$	13,86 \pm 0,82 $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$
G-SH, мкмоль/г тканини	3,24 \pm 0,17 $p < 0,05$	3,86 \pm 0,07 $p_1 < 0,05$	3,10 \pm 0,13 $p_1 > 0,05$	3,68 \pm 0,06 $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,01$

NO внаслідок своєї високої реакційної здатності з іншими вільними радикалами також діє як потужний антиоксидант. Взаємодія NO з ліпідними пероксильними радикалами приводить до ефективного пригнічення пероксидного окиснення ліпідів [51, 168].

Отже, L-аргінін за умов експериментального АФС проявляє гепатопротекторні властивості, його дія спрямована на відновлення активності та вмісту компонентів АОС, ензимів електронотransпортного ланцюга мітохондрій, зниження рівня ПОЛ у печінці при експериментальному антифосфоліпідному синдромі.

Таблиця 4.16

Вплив L-аргініну та аміногуанідину на показники активності ензимів
тканинного дихання у печінці вагітних та невагітних мишей лінії BALB/c за
умов антифосфоліпідного синдрому ($M \pm m$, $n=10$)

Група тварин	АФС до вагітності		АФС на 18-й день вагітності	
	СДГ, нмоль/хв·мг протеїну	ЦХО, мкмоль/хв·мг протеїну	СДГ, нмоль/хв·мг протеїну	ЦХО, мкмоль/хв·мг протеїну
АФС	$5,92 \pm 0,30$ $p < 0,01$	$4,29 \pm 0,14$ $p < 0,01$	$5,21 \pm 0,29$ $p < 0,001$	$4,04 \pm 0,23$ $p < 0,001$
АФС + L-аргінін	$7,18 \pm 0,36$ $p_1 < 0,05$	$5,10 \pm 0,26$ $p_1 < 0,05$	$6,45 \pm 0,16$ $p_1 < 0,05$	$5,75 \pm 0,30$ $p_1 < 0,01$
АФС + аміногуанідин	$5,62 \pm 0,17$ $p_1 > 0,05$	$5,05 \pm 0,23$ $p_1 < 0,05$	$5,43 \pm 0,41$ $p_1 > 0,05$	$4,88 \pm 0,11$ $p_1 < 0,05$
АФС + L-аргінін + аміногуанідин	$7,36 \pm 0,46$ $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,05$	$6,11 \pm 0,32$ $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	$7,39 \pm 0,34$ $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	$6,77 \pm 0,22$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,001$

Встановлено, що у сироватці крові невагітних та вагітних мишей з АФС, яким вводили аміногуанідин, відбувається зниження активності АЛАТ (на 18 та 22 %), водночас активність АсАТ знижувалася лише на 17 % у групі невагітних тварин з АФС, порівняно із показниками мишей з АФС (див. табл. 4.14).

При застосуванні аміногуанідину в печінці мишей з АФС встановлено зниження вмісту ГПЛ на 14 % і ТБК-АП на 25 %, порівняно з показниками групи тварин з АФС (див. табл. 4.15). Введення аміногуанідину не викликало достовірних змін показників системи антиоксидантного захисту у тварин з АФС. Водночас встановлено підвищення активності ЦХО на 18 %, порівняно з показниками групи мишей з АФС (див. табл. 4.16).

При застосуванні аміногуанідину в печінці мишей BALB/c із АФС на 18-й день вагітності не відбувається достовірних змін рівня продуктів вільнорадикального окиснення ліпідів (ГПЛ, ТБК-АП), активності ензимів

системи антиоксидантного захисту (СОД, КАТ), тканинного дихання (СДГ, ЦХО) та вмісту G-SH, порівняно із показниками групи вагітних мишей з АФС (табл. 4.17).

Таблиця 4.17

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

Наступним завданням нашого дослідження було встановлення можливості підвищення гепатопротекторної активності L-аргініну та аміногуанідину при їх комбінованому застосуванні за умов АФС.

Встановлено, що за комбінованого введення L-аргініну та аміногуанідину у сироватці крові невагітних та вагітних мишей з АФС відбувається зниження

активності АЛАТ (на 44 та 48%) та АсАТ (на 59 та 34 %), порівняно із показниками тварин з АФС (див. табл. 4.14).

Встановлено, що при комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину в печінці тварин з АФС відбувається послаблення активності процесів пероксидного окиснення мембранних ліпідів, про що свідчить зниження вмісту ГПЛ на 27 % та ТБК-АП на 30 %, порівняно з показниками групи мишей лінії BALB/c із АФС (див. табл. 4.15). За комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину в печінці тварин з АФС виявлено нормалізацію активності СОД і КАТ та зростання вмісту G-SH на 14 %. Водночас встановлено достовірне зростання активності ензимів дихального ланцюга мітохондрій СДГ на 24 % та ЦХО на 42 %, порівняно з показниками тварин з АФС (див. табл. 4.16). Результати досліджень показали, що за комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину в печінці мишей з АФС відбувається зниження вмісту ГПЛ на 14 % та активності СОД на 12 %, КАТ на 11 %, а також зростання вмісту G-SH на 19 % та активності СДГ на 31 % і ЦХО на 21 %, порівняно з показниками групи тварин з АФС, яким вводили аміногуанідин.

При комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину в печінці тварин з АФС на 18-й день вагітності встановлено достовірне зниження вмісту ГПЛ на 26 % та ТБК-АП на 37 %, порівняно із показниками групи вагітних самок лінії BALB/c з АФС (див. табл. 4.17). Про активацію системи антиоксидантного захисту в печінці при комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину в тварин цієї групи свідчило підвищення активності СОД у 2,5 раза і КАТ у 2,2 раза та зростання вмісту G-SH на 83 %, порівняно з показниками вагітних тварин з АФС. Водночас спостерігалось достовірне зростання активності ензимів дихального ланцюга мітохондрій СДГ на 42 % та ЦХО на 68 % (див. табл. 4.16). Результати дослідження показали, що за комбінованого введення L-аргініну та аміногуанідину в печінці тварин з АФС на 18-й день вагітності спостерігалось гальмування процесів пероксидного окиснення ліпідів, про що свідчило достовірне зниження вмісту ГПЛ (на 14 % та 20 %) та ТБК-АП (на 17 % та 27 %) відповідно, порівняно з показниками вагітних тварин з АФС, яким вводили

окремо L-аргінін та аміногуанідин. Про активацію системи антиоксидантного захисту при комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину свідчило підвищення активності СОД (на 14 % та 117 %), КАТ (на 34 % та 90 %) та вмісту G-SH (на 16 % та 60 %), та ензимів тканинного дихання СДГ (на 15 % та 36 %) та ЦХО (на 18 % та 39 %), порівняно з показниками вагітних мишей з АФС, яким вводили окремо L-аргінін та аміногуанідин.

Отже, за комбінованого введення L-аргініну та аміногуанідину при АФС до вагітності та на 18-й день вагітності встановлено підвищення гепатопротекторної активності L-аргініну, що проявляється зменшенням проявів оксидативного стресу в печінці, зниженням активності процесів пероксидного окиснення ліпідів, підвищенням активності та вмісту компонентів антиоксидантної системи та активності ензимів електронотransпортного ланцюга мітохондрій.

Нирки є одним з основних органів-мішеней при всіх клінічних формах АФС. Одним із проявів ураження нирок при АФС є пошкодження мікроциркуляторного русла [18].

Встановлено, що у сироватці крові невагітних та вагітних мишей з АФС, яким вводили L-аргінін, відбувається зниження вмісту креатиніну (на 31 та 37 %), проте вміст сечовини достовірно не змінювався відносно показників тварин з АФС (табл. 4.18).

При введенні L-аргініну мишам з АФС встановлено пригнічення активності процесів переокиснення мембранних ліпідів у нирках: зниження вмісту ГПЛ на 20 % і ТБК-АП на 34 %, порівняно з показниками тварин з АФС (табл. 4.19). Встановлено зниження активності СОД на 15 % тенденцію до зростання активності КАТ, вміст G-SH підвищувався на 17 %, порівняно з показниками тварин з АФС. Встановлено зростання активності мітохондріальних ензимів СДГ на 14 % і ЦХО на 16 % відповідно, порівняно із показниками групи мишей з АФС (табл. 4.20).

При введенні L-аргініну вагітним мишам з АФС у нирках відмічено послаблення активності процесів переокиснення мембранних ліпідів: кількість

ГПЛ та ТБП зменшувалась відповідно на 24 % і 32 % (табл. 4.21). Про активацію системи антиоксидантного захисту в нирках при застосуванні L-аргініну у тварин цієї групи свідчило підвищення активності СОД та КАТ відповідно на 42 % та 43 %, вміст G-SH зростав на 23 %, порівняно з аналогічними показниками у тварин з АФС на 18-й день вагітності.

Таблиця 4.18

Вплив L-аргініну та аміногуанідину на показники вмісту сечовини та креатиніну у сироватці крові вагітних та невагітних мишей лінії BALB/c за умов антифосфоліпідного синдрому ($M \pm m$, $n=10$)

Група тварин	АФС до вагітності		АФС на 18-й день вагітності	
	Креатинін, мкмоль/л	Сечовина, ммоль/л	Креатинін, мкмоль/л	Сечовина, ммоль/л
АФС	44,40 \pm 1,60 $p < 0,001$	11,27 \pm 0,51 $p < 0,001$	54,82 \pm 2,67 $p < 0,001$	11,96 \pm 0,77 $p < 0,01$
АФС + L-аргінін	30,82 \pm 1,22 $p_1 < 0,01$	12,76 \pm 1,02 $p_1 > 0,05$	34,36 \pm 2,99 $p_1 < 0,01$	10,35 \pm 0,93 $p_1 > 0,05$
АФС + аміногуанідин	38,87 \pm 1,48 $p_1 < 0,05$	9,57 \pm 0,36 $p_1 < 0,05$	45,47 \pm 2,08 $p_1 < 0,05$	10,79 \pm 0,95 $p_1 > 0,05$
АФС + L-аргінін + аміногуанідин	26,77 \pm 0,71 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,001$	7,79 \pm 0,34 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,01$ $p_3 < 0,05$	28,67 \pm 1,83 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,001$	7,02 \pm 0,43 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$

Відновлення балансу в системі прооксиданти – антиоксиданти у нирках супроводжувалось зростанням активності ензимів СДГ на 21 % та ЦХО на 42 % (табл. 4.20).

Отже, введення L-аргініну вагітним та невагітним тваринам з АФС супроводжується зменшенням проявів оксидативного стресу у нирковій тканині, що проявляється зниженням активності процесів пероксидного окиснення ліпідів, підвищенням активності та вмісту компонентів антиоксидантної системи та ензимів електронотранспортного ланцюга мітохондрій.

Таблиця 4.19

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

Показник	Група тварин			
	АФС	АФС+ L-аргінін	АФС + аміногуанідин	АФС + L-аргінін + аміногуанідин
ГПЛ, ум.од./г тканини	13,69±0,60 $p < 0,01$	10,96±0,52 $p_1 < 0,05$	15,73±0,48 $p_1 < 0,05$	14,24±0,30 $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,01$ $p_3 < 0,05$
ТБК-АП, нмоль/г тканини	7,79±0,53 $p < 0,01$	5,17±0,26 $p_1 < 0,01$	7,40±0,43 $p_1 > 0,05$	5,26±0,31 $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,01$
СОД, ум.од./мг протеїну	9,02±0,34 $p < 0,05$	7,63±0,41 $p_1 < 0,05$	10,07±0,17 $p_1 < 0,05$	7,71±0,40 $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,01$
КАТ, нмоль/хв·мг протеїну	6,16±0,13 $p < 0,05$	6,73±0,45 $p_1 > 0,05$	5,57±0,14 $p_1 < 0,05$	6,89±0,20 $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,01$
G-SH, мкмоль/г тканини	2,43±0,07 $p < 0,05$	2,84±0,10 $p_1 < 0,05$	2,72±0,05 $p_1 < 0,05$	3,00±0,13 $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$

Встановлено, що у сироватці крові невагітних та вагітних мишей з АФС, яким вводили аміногуанідин, відбувається зниження вмісту креатиніну (на 12 та 17 %), а вміст сечовини достовірно знижувався на 15 % лише у групі невагітних мишей з АФС (табл. 4.18).

При застосуванні аміногуанідину встановлено зростання вмісту ГПЛ на 15 %, порівняно з показниками тварин з АФС (див. табл. 4.19). Активність КАТ знижувалась на 10 %, в той же час зростали активність СОД на 12 % та вміст G-SH на 12 %. При введенні аміногуанідину активність СДГ та ЦХО достовірно не змінювалась, порівняно із показниками тварин з АФС (табл. 4.20).

Таблиця 4.20

Вплив L-аргініну та аміногуанідину на показники активності ензимів тканинного дихання у нирках вагітних та невагітних мишей лінії BALB/c за умов антифосфоліпідного синдрому ($M \pm m$, $n=10$)

Група тварин	АФС до вагітності		АФС на 18-й день вагітності	
	СДГ, нмоль/хв·мг протеїну	ЦХО, мкмоль/хв·мг протеїну	СДГ, нмоль/хв·мг протеїну	ЦХО, мкмоль/хв·мг протеїну
АФС	$5,25 \pm 0,02$ $p < 0,05$	$3,67 \pm 0,14$ $p < 0,01$	$4,51 \pm 0,06$ $p < 0,001$	$3,72 \pm 0,31$ $p < 0,001$
АФС + L-аргінін	$5,99 \pm 0,24$ $p_1 < 0,05$	$4,27 \pm 0,09$ $p_1 < 0,01$	$5,47 \pm 0,06$ $p_1 < 0,001$	$5,28 \pm 0,36$ $p_1 < 0,05$
АФС + аміногуанідин	$5,53 \pm 0,15$ $p_1 > 0,05$	$3,93 \pm 0,24$ $p_1 > 0,05$	$4,72 \pm 0,08$ $p_1 > 0,05$	$4,70 \pm 0,14$ $p_1 < 0,05$
АФС + L-аргінін + аміногуанідин	$6,11 \pm 0,16$ $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,05$	$4,13 \pm 0,08$ $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$	$5,30 \pm 0,07$ $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,01$	$6,50 \pm 0,36$ $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,01$

При введенні аміногуанідину вагітним мишам з АФС у нирках відбувалося зростання вмісту ТБК-АП на 18 % з одночасним підвищенням активності КАТ на 21 % та вмісту G-SH на 30 %, порівняно із аналогічними показниками вагітних мишей з АФС (табл. 4.21). Водночас встановлено зростання активності ЦХО на 26 % (див. табл. 4.20).

Таким чином, при застосуванні аміногуанідину у вагітних мишей з АФС спостерігається подальша інтенсифікація вільнорадикального окиснення, що водночас поєднується із активацією антирадикального та антиоксидантного захисту.

При комбінованому введенні L-аргініну та аміногуанідину мишам з АФС у нирках вміст ГПЛ достовірно не змінювався (див. табл. 4.19). Водночас встановлено зниження вмісту ТБК-АП на 33 %, порівняно з показниками тварин з АФС. Спостерігалось зниження активності СОД на 14 %, порівняно з показниками тварин з АФС. Встановлено зростання активності КАТ на 12 % та вмісту G-SH на 23 %. Виявлено зростання активності мітохондріальних СДГ

на 16 % і ЦХО на 13 % відповідно, порівняно з показниками тварин з АФС (див. табл. 4.20). Результати дослідження показали, що за комбінованого введення L-аргініну та аміногуанідину відбувалося зниження вмісту ТБК-АП на 29 %, активності СОД на 23 %, зростання активності КАТ на 24 %, СДГ на 11 %, порівняно з аналогічними показниками тварин з АФС, яким вводили окремо аміногуанідин.

Таблиця 4.21

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

Показник	Група тварин			
	АФС	АФС+ L-аргінін	АФС + аміногуанідин	АФС + L-аргінін + аміногуанідин
ГПЛ, ум.од./г тканини	17,17 \pm 0,58 $p < 0,001$	12,97 \pm 0,45 $p_1 < 0,01$	18,45 \pm 0,47 $p_1 > 0,05$	14,71 \pm 0,40 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,001$
ТБК-АП, нмоль/г тканини	12,13 \pm 0,26 $p < 0,001$	8,27 \pm 0,23 $p_1 < 0,001$	14,35 \pm 0,71 $p_1 < 0,05$	7,51 \pm 0,39 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,001$
СОД, ум.од./мг протеїну	5,12 \pm 0,19 $p < 0,001$	7,29 \pm 0,41 $p_1 < 0,01$	5,38 \pm 0,40 $p_1 > 0,05$	7,95 \pm 0,67 $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,05$
КАТ, нмоль/хв·мг протеїну	3,40 \pm 0,21 $p < 0,01$	4,85 \pm 0,15 $p_1 < 0,01$	4,11 \pm 0,20 $p_1 < 0,05$	5,66 \pm 0,24 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,01$
G-SH, мкмоль/г тканини	1,58 \pm 0,11 $p < 0,01$	1,94 \pm 0,09 $p_1 < 0,05$	2,05 \pm 0,11 $p_1 < 0,05$	2,39 \pm 0,07 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,01$ $p_3 < 0,05$

Встановлено, що у сироватці крові невагітних та вагітних мишей з АФС, яким вводили L-аргінін та аміногуанідин, відбувається зниження вмісту

креатиніну (на 40 та 48 %) та сечовини (на 31 та 41 %) порівняно із показниками тварин з АФС (табл. 4.18).

За комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину вагітним мишам з АФС у тканині нирок відмічено послаблення активності процесів переокиснення мембранних ліпідів. Установлено достовірне зниження вмісту ГПЛ на 14 % та ТБК-АП на 38 % у нирках, порівняно з показниками тварин з АФС на 18-й день вагітності (див. табл. 4.21). Про активацію системи антиоксидантного захисту у нирках при застосуванні L-аргініну та аміногуанідину в тварин цієї групи свідчило підвищення активності СОД на 55 % та КАТ на 66 %, а також вмісту G-SH на 51 %, порівняно з аналогічними показниками у вагітних тварин з АФС. Виявлено зростання активності ензимів СДГ на 18 % та ЦХО на 75 % відповідно, порівняно з показниками вагітних мишей з АФС (див. табл. 4.20). Встановлено, що за комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину в нирках вагітних мишей з АФС відбувається зниження вмісту ГПЛ на 20 %, ТБК-АП на 48 %, зростання активності СОД на 48 %, КАТ на 38 %, СДГ на 12 % та ЦХО на 38 % та вмісту G-SH на 17 %, порівняно з показниками групи вагітних тварин з АФС, яким вводили аміногуанідин.

Отже, комбіноване введення L-аргініну та аміногуанідину при АФС та на 18-й день вагітності у тварин з АФС супроводжується зменшенням проявів вільнорадикального окиснення у нирковій тканині, що проявляється зниженням активності процесів пероксидного окиснення ліпідів, підвищенням активності та вмісту компонентів антиоксидантної системи та ензимів електронотransпортного ланцюга мітохондрій.

Таким чином, встановлено, що попередник нітроген оксиду L-аргінін у вагітних та невагітних мишей за умов АФС проявляє антиоксидантні, гепатопротекторні та нефропротекторні властивості, його дія спрямована на відновлення активності та вмісту компонентів АОС, ензимів електронотransпортного ланцюга мітохондрій, зниження рівня пероксидного окиснення ліпідів у півкулях великого мозку, печінці та нирках. Встановлено, що

введення L-аргініну невагітним мишам з АФС супроводжувалося поглибленням оксидативного стресу в мозочку, проте на 18-й день вагітності відбувалося пригнічення активності процесів переокиснення мембранних ліпідів.

Нейропротекторний вплив аміногуанідину при АФС проявлявся зменшенням оксидативного стресу в мозочку та півкулях великого мозку. У печінці та нирках мишей з АФС, яким вводили аміногуанідин відбувається подальша інтенсифікація вільнорадикального окиснення, що поєднується з активацією антирадикального та антиоксидантного захисту.

Комбіноване введення L-аргініну та аміногуанідину при АФС та на 18-й день вагітності у тварин з АФС супроводжується нейропротекторним, гепатопротекторним та нефропротекторним впливом, що проявляється зниженням активності процесів пероксидного окиснення ліпідів, підвищенням активності та вмісту компонентів антиоксидантної системи та ензимів електронотransпортного ланцюга мітохондрій у мозочку, півкулях великого мозку, печінці та нирках.

4.7. Вплив L-аргініну та аміногуанідину на вміст деяких гліальних протеїнів у мозочку та півкулях великого мозку невагітних та вагітних мишей при антифосфоліпідному синдромі

При АФС спостерігаються порушення функцій ЦНС, зумовлені пошкодженням головного мозку [40, 230, 244, 351]. Нейрозапалення – це складний багатofакторний процес, в якому беруть участь клітини мозку та активовані імунні клітини системного кровообігу. У відповідь на пошкодження клітини мікроглії зазнають ступінчастого процесу активації, регулюють синтез прозапальних цитокінів та цитотоксичних медіаторів, проліферацію та фагоцитоз [214]. GFAP вивільняється в кров після пошкодження мозку та є інформативним показником перебігу широкого кола нейродегенеративних розладів, спричинених різними несприятливими факторами [102, 301].

Як показали результати досліджень, при введенні L-аргініну мишам з АФС у мозочку відбувається зростання загального вмісту GFAP на 17 % та ізоформи GFAP (37 kDa) на 42 %, порівняно з показниками групи тварин із АФС (рис. 4.20, 4.21).

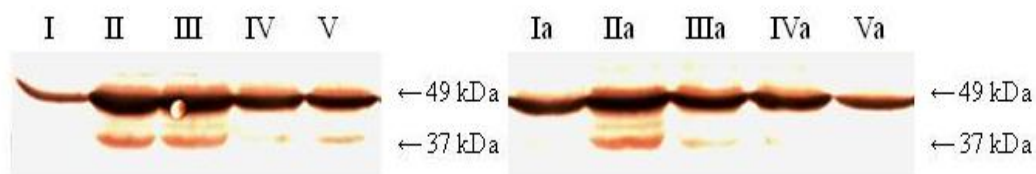


Рис. 4.20. Вестерн-блот аналіз зразків мозочка мишей лінії BALB/c з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності і при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину (антитіла проти GFAP)

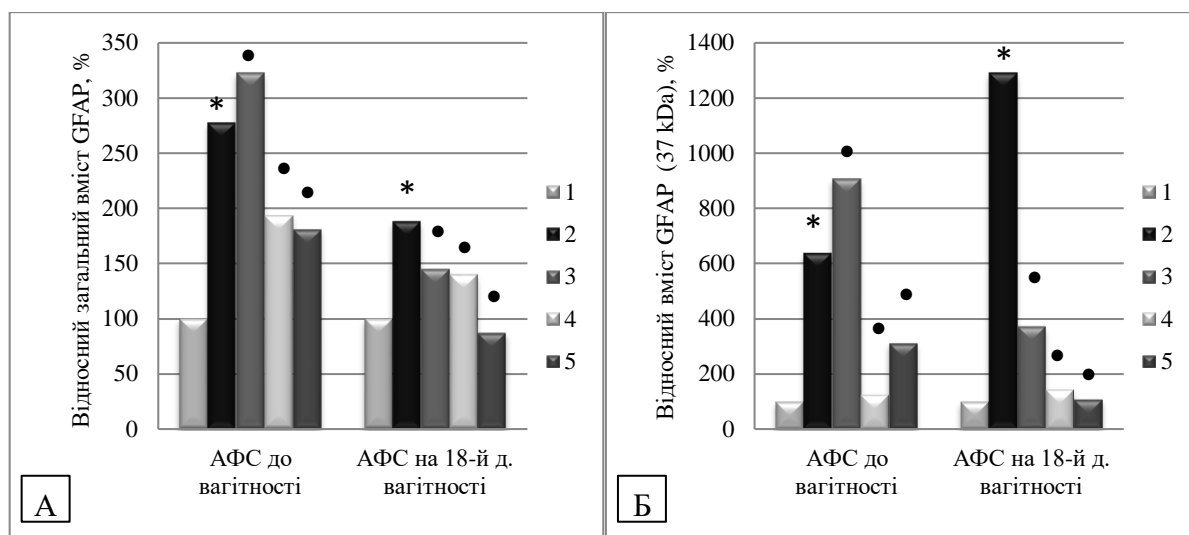


Рис. 4.21. Результати Вестерн-блот аналізу гліального фібрилярного кислого протеїну (загальний вміст GFAP (А) та вміст ізоформи GFAP (37 kDa) (Б)) у мозочку мишей лінії BALB/c з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності і при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину. Дані наведено у відсотках від контролю (n=10)

Примітка. Тут і на рисунку 4.23. Умовні позначення груп тварин: 1 – контроль; 2 – антифосфоліпідний синдром (АФС); 3 – АФС + L-аргінін; 4 – АФС + аміногуанідин; 5 – АФС + L-аргінін + аміногуанідин. * – достовірно відмінне від відповідних значень у контрольній групі ($p < 0,05$); • – достовірно відмінне від відповідних значень у групі тварин з АФС ($p < 0,05$).

При введенні L-аргініну мишам з АФС на 18-й день вагітності у мозочку встановлено зниження загального вмісту GFAP на 23 % та ізоформи GFAP (37 kDa) на 71 %, порівняно із показниками групи вагітних мишей з АФС. Ймовірно, зниження вмісту ізоформи GFAP (37 kDa) відбувається завдяки відомим антиоксидантним властивостям L-аргініну [62, 331].

Півкулі великого мозку виявилися менш чутливими, ніж мозочок, до дії попередника NO L-аргініну, оскільки загальний вміст GFAP під впливом L-аргініну у зразках півкуль великого мозку мишей лінії BALB/c з АФС статистично не відрізнявся від значення групи тварин з АФС (рис. 4.22, 4.23).

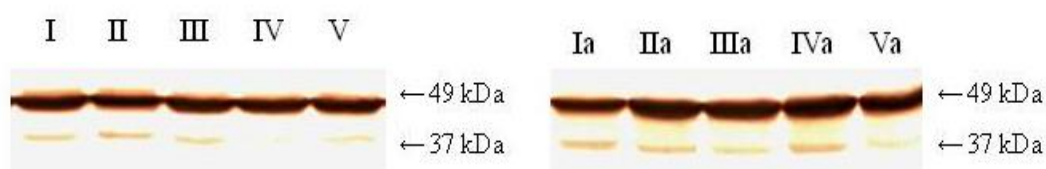


Рис. 4.22. Вестерн-блот аналіз зразків півкуль великого мозку мишей лінії BALB/c з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності і при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину (антитіла проти GFAP)

Під впливом L-аргініну в тканині півкуль великого мозку встановлено зниження вмісту ізоформи GFAP (37 kDa) на 28 %, порівняно з групою тварин з АФС (рис. 4.23). У півкулях великого мозку вагітних мишей з АФС, яким вводили L-аргінін, встановлено зниження загального вмісту GFAP на 14 % та ізоформи GFAP (37 kDa) на 19 %, порівняно із показниками тварин з АФС на 18-й день вагітності.

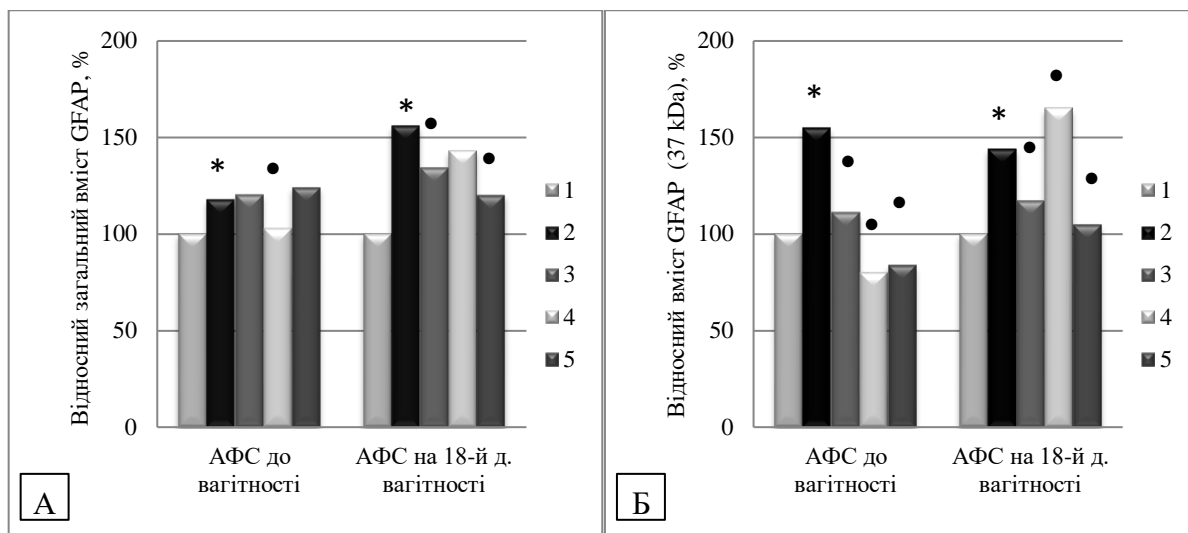


Рис. 4.23. Результати Вестерн-блот аналізу гліального фібрилярного кислого протеїну (загальний вміст GFAP (А) та вміст ізоформи GFAP (37 kDa) (Б)) у півкулях великого мозку мишей лінії BALB/c з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності і при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину. Дані наведено у відсотках від контролю (n=10)

При цереброваскулярних порушеннях спостерігається активація генерації NO в різних тканинах [62, 382]. При АФС підвищується вміст індукцйбельної ізоформи NOS, що може бути спричинено зростанням продукції прозапальних цитокінів IL-1 β , IL-6 та TNF- α [380]. iNOS є продуктом активованої мікроглії [214]. Збільшення активності iNOS у мозку активує численні сигнальні шляхи і призводить до нейрозапалення [374].

При введенні інгібітора індукцйбельної ізоформи ензиму NOS аміногуанідину мишам лінії BALB/c з АФС у мозочку встановлено зниження загального вмісту GFAP на 30 % та ізоформи GFAP (37 kDa) на 81 %, порівняно із показниками групи тварин з АФС (див. рис. 4.21). При введенні аміногуанідину в мозочку вагітних мишей з АФС встановлено зниження загального вмісту GFAP на 26 % та ізоформи GFAP (37 kDa) на 89 %, порівняно з показниками групи вагітних тварин з АФС.

Встановлено, що при введенні тваринам з АФС аміногуанідину в зразках півкуль великого мозку відбувається зниження загального вмісту GFAP на 13 % та ізоформи GFAP (37 kDa) на 48 %, порівняно із показниками групи тварин з АФС (див. рис. 4.23). Отримані результати узгоджуються з даними про те, що аміногуанідин, як специфічний інгібітор iNOS, може мати профілактичний вплив щодо нейротоксичності [238]. Разом з тим, у півкулях великого мозку вагітних мишей з АФС, яким вводили аміногуанідин, не відбувалось достовірних змін загального вмісту GFAP, водночас встановлено зростання вмісту ізоформи GFAP (37 kDa) на 15 %, порівняно із показниками групи вагітних мишей з АФС.

Наступним завданням нашого дослідження було встановлення впливу L-аргініну та аміногуанідину при їх комбінованому застосуванні на вміст GFAP у мозочку та півкулях великого мозку мишей лінії BALB/c за умов АФС.

За комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину в мозочку тварин з АФС встановлено зниження загального вмісту GFAP на 35 % та ізоформи GFAP (37 kDa) на 51 %, порівняно з аналогічними показниками групи мишей з АФС (див. рис. 4.21). При комбінованому введенні L-аргініну та аміногуанідину в мозочку тварин з АФС на 18-й день вагітності встановлено зниження загального вмісту GFAP на 54 %. Водночас у мозочку встановлено зниження вмісту ізоформи GFAP (37 kDa) на 92 %, порівняно з показниками групи вагітних мишей з АФС. При порівнянні отриманих результатів у групі тварин з АФС, яким вводили L-аргінін у комбінації з аміногуанідином, із групою тварин з АФС, яким вводили окремо L-аргінін, у мозочку встановлено зниження загального вмісту GFAP на 44 % та ізоформи GFAP (37 kDa) на 66 %. При комбінованому введенні L-аргініну та аміногуанідину в мозочку мишей з АФС загальний вміст GFAP достовірно не відрізнявся від показників групи тварин з АФС, яким вводили аміногуанідин. Водночас встановлено зростання вмісту ізоформи GFAP (37 kDa) на 151 %, порівняно з показниками у групі тварин, яким вводили окремо аміногуанідин. Результати дослідження показали, що за комбінованого введення L-аргініну та аміногуанідину в мозочку мишей з АФС на 18-й день вагітності відбувається зниження загального вмісту GFAP

(на 40 % та 38 %) та ізоформи GFAP (37 kDa) (на 71 % та 26 %), порівняно з показниками вагітних тварин з АФС, яким вводили окремо L-аргінін та аміногуанідин.

За комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину в тканині півкуль великого мозку тварин з АФС не спостерігалось достовірних змін загального вмісту GFAP, порівняно із показниками групи мишей-самок лінії BALB/c з АФС (див. рис. 4.23). Встановлено, що при комбінованому введенні L-аргініну з аміногуанідином у тканині півкуль великого мозку тварин з АФС відбувається зниження ізоформи GFAP (37 kDa) на 46 %, порівняно з показниками групи тварин з АФС. У півкулях великого мозку вагітних мишей з АФС, яким вводили L-аргінін у комбінації з аміногуанідином, встановлено зниження загального вмісту GFAP на 23 % та ізоформи GFAP (37 kDa) на 30 %, порівняно з показниками групи вагітних тварин з АФС. За комбінованого введення L-аргініну та аміногуанідину у півкулях великого мозку мишей з АФС відбувалося зростання загального вмісту GFAP на 20 %, порівняно з показниками групи тварин з АФС, яким вводили окремо аміногуанідин. Водночас встановлено зниження вмісту ізоформи GFAP (37 kDa) на 25 %, порівняно із показниками мишей з АФС, яким вводили окремо L-аргінін. При комбінованому введенні L-аргініну та аміногуанідину у півкулях великого мозку вагітних мишей з АФС відбувалося зниження загального вмісту GFAP (на 10 % та 16 %) та ізоформи GFAP (37 kDa) (на 14 % та 39 %), порівняно з показниками вагітних тварин з АФС, яким вводили окремо L-аргінін та аміногуанідин.

Механізми ураження ЦНС при АФС можна пояснити «тромбогенною» дією аФЛ, які здатні впливати на проліферацію астроцитів [67]. Підвищена експресія GFAP характеризує астрогліальну активацію та гліоз під час нейродегенерації. [182, 301].

В останні роки перспективним напрямком стало дослідження нейроспецифічних протеїнів, у тому числі основного протеїну мієліну, з метою діагностики різних захворювань, що супроводжуються нейродеструктивними

процесами. Доведено важливу діагностичну роль МВР при цілому ряді захворювань ЦНС. Руйнування мієліну є універсальним механізмом реакції нервової тканини на пошкодження. МВР становить основну частину білкового складу мієліну [5, 202].

У результаті проведеного Вестерн-блот аналізу встановлено, що у мозочку невагітних та вагітних мишей за умов АФС рівень олігомерних форм МВР (95–110 kDa) був збільшений, натомість субодиницю МВР (18,4 kDa) виявлено у дуже незначній кількості (рис. 4.24).

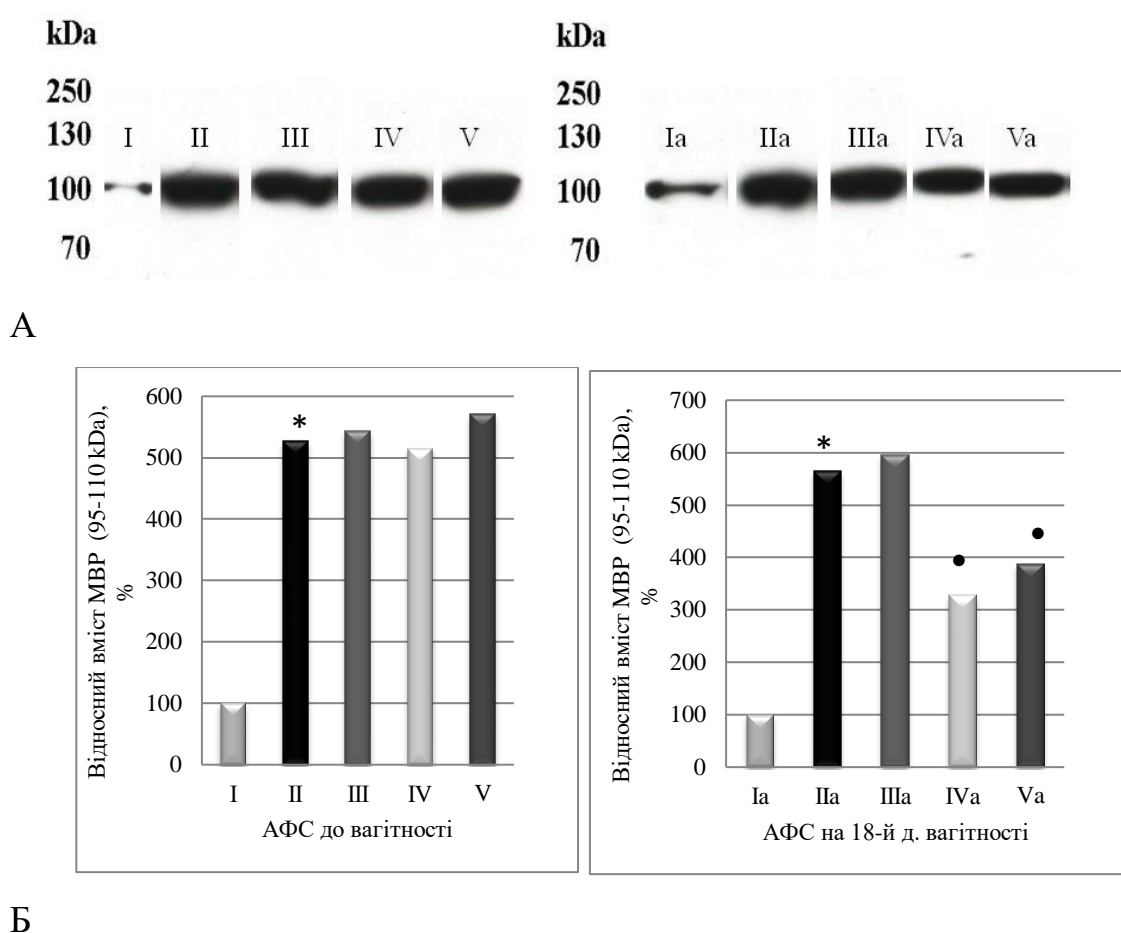


Рис. 4.24. Вестерн-блот аналіз основного протеїну мієліну (95–110 kDa) у зразках мозочка мишей лінії BALB/c з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності і при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину: блотограма (А) та результати денситометрії (Б). Дані наведено у відсотках від контролю (n=10)

Як показали результати досліджень, при застосуванні попередника NO L-аргініну, інгібітора iNOS аміногуанідину та комбінації L-аргініну й аміногуанідину в мозочку мишей лінії BALB/c з АФС до вагітності не відбувається достовірних змін вмісту МВР у діапазоні молекулярних мас 95–110 kDa, порівняно із показниками групи тварин з АФС.

Проте на 18-й день вагітності у мозочку тварин з АФС за окремого введення аміногуанідину виявлено зниження вмісту МВР (95–110 kDa) на 43 %, порівняно з показниками вагітних тварин з АФС (див. рис. 4.24). За комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину в мозочку вагітних мишей з АФС встановлено зниження вмісту МВР (95–110 kDa) на 31 %, порівняно з показниками вагітних тварин з АФС.

При комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину вагітним мишам з АФС у мозочку вміст олігомерних форм МВР (95–110 kDa) знижувався на 34 %, порівняно з показниками тварин з АФС на 18-й день вагітності, яким вводили L-аргінін.

За комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину в мозочку вагітних мишей з АФС відбувається зростання вмісту олігомерних форм МВР (95–110 kDa) на 22 %, порівняно з показниками тварин з АФС, яким вводили аміногуанідин.

У півкулях великого мозку за умов експериментального АФС спостерігалась принципово інша картина (рис. 4.25).

Встановлено, що окреме та комбіноване введення модуляторів синтезу NO (L-аргініну та аміногуанідину) не впливало вміст олігомерних форм МВР (95–110 kDa) у півкулях великого мозку невагітних мишей з АФС (рис. 4.25, 4.26).

При введенні L-аргініну тваринам з АФС у півкулях великого мозку мишей відбувалося подальше зростання вмісту субодиниці МВР (18,4 kDa) в 4,8 рази, порівняно із показниками групи тварин з АФС (рис. 4.26). При введенні L-аргініну тваринам з АФС на 18-й день вагітності у півкулях великого мозку відбувалося зниження олігомерних форм МВР (95–110 kDa) на 14 %

та субодиниці МВР (18,4 kDa) на 20 %, порівняно із показниками групи вагітних мишей з АФС.

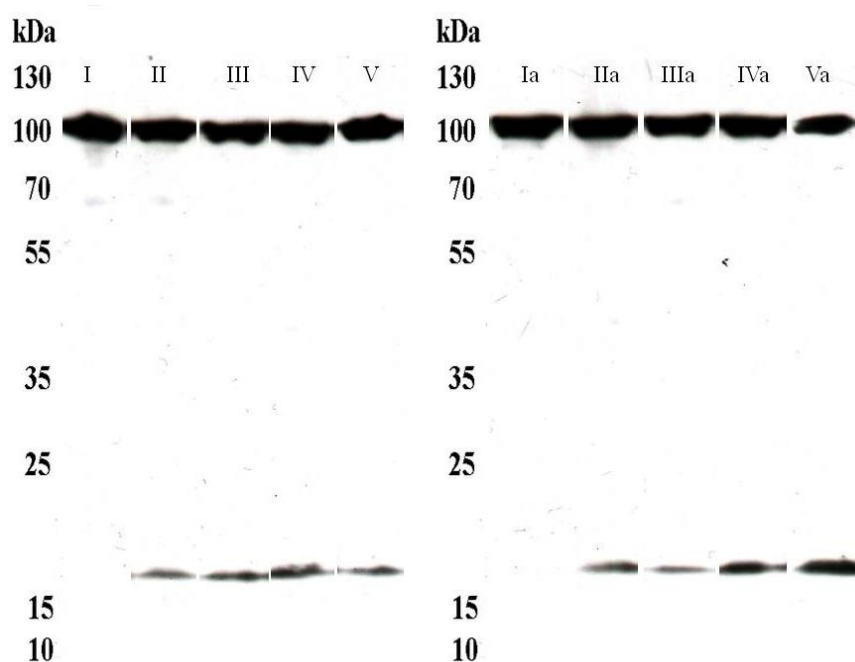


Рис. 4.25. Вестерн-блот аналіз основного протеїну мієліну (95–110 kDa та 18,4 kDa) у зразках півкуль великого мозку мишей лінії BALB/c з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності і при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину

При застосуванні інгібітора iNOS аміногуанідину у тканині півкуль великого мозку мишей лінії BALB/c з АФС встановлено зростання вмісту МВР (18,4 kDa) у 10 разів, порівняно із показниками тварин з АФС (див. рис. 4.25, 4.26). Введення аміногуанідину тваринам з АФС на 18-й день вагітності не супроводжувалося змінами вмісту МВР (95–110 kDa) у півкулях великого мозку. Водночас встановлено подальше зростання вмісту МВР (18,4 kDa) на 64 %, порівняно із показниками групи вагітних мишей з АФС.

При комбінованому застосуванні L-аргініну з аміногуанідином у півкулях великого мозку вміст МВР (18,4 kDa) зростав у 13 разів, порівняно

з показниками групи мишей з АФС (див. рис. 4.25, 4.26). Причому, при комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину у півкулях великого мозку вміст МВР (18,4 kDa) зростав в 2,7 раза, порівняно з показниками групи тварин з АФС, яким вводили тільки L-аргінін. Водночас за комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину в зразках півкуль великого мозку мишей не відбувалося достовірних змін вмісту МВР (18,4 kDa), порівняно з показниками тварин з АФС, яким вводили аміногуанідин.

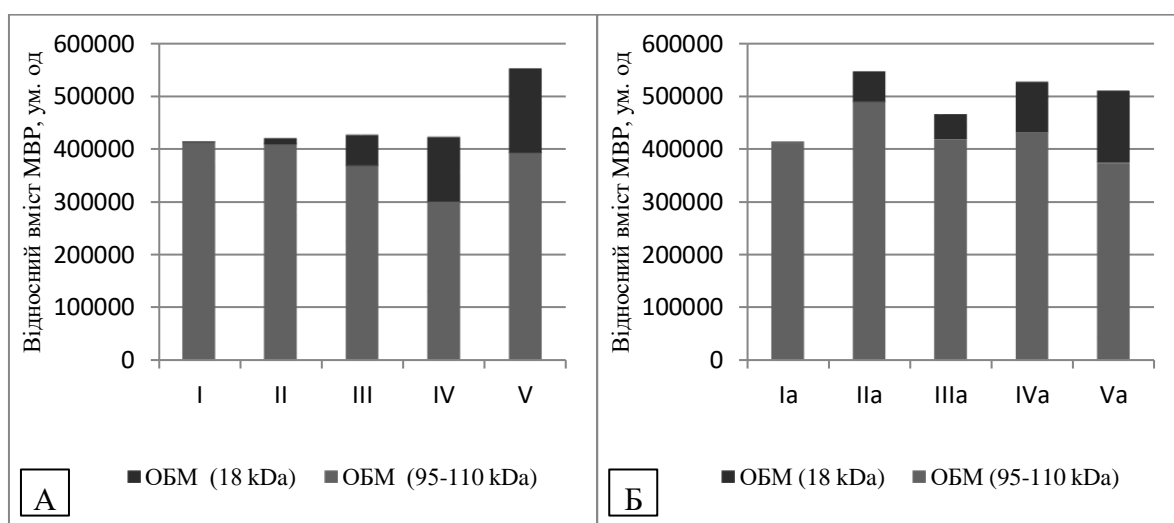


Рис. 4.26. Результати Вестерн-блот аналізу основного протеїну мієліну (95–110 kDa та 18,4 kDa) у зразках півкуль великого мозку мишей лінії BALB/c з АФС до вагітності (А) та на 18-й день вагітності (Б) і при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину (n=10)

Введення L-аргініну в комбінації з аміногуанідином мишам з АФС на 18-й день вагітності супроводжувалося зниженням у півкулях великого мозку вмісту МВР (95–110 kDa) на 24 % та зростанням вмісту МВР (18,4 kDa) на 133 %, порівняно з показниками вагітних тварин з АФС (див. рис. 4.25, 4.26). При комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину вагітним мишам з АФС у півкулях великого мозку вміст МВР (18,4 kDa) зростав на 192 %, порівняно з показниками тварин з АФС на 18-й день вагітності, яким вводили

L-аргінін. Водночас за комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину в зразках півкуль великого мозку вагітних мишей з АФС вміст MBP (18,4 kDa) зростав на 42 %, порівняно з показниками тварин з АФС, яким вводили аміногуанідин.

Отже, введення модуляторів синтезу NO впливає на вміст GFAP у мозочку та півкулях великого мозку мишей BALB/c за умов АФС, що опосередковано може підтверджувати роль NO у регулюванні експресії GFAP в астроцитах при АФС. Наявність більш низькомолекулярного поліпептиду GFAP 37 kDa переважно у мозочку мишей BALB/c з експериментальним АФС свідчить про перебудову проміжних філаментів цитоскелета астроцитів. Установлено, що при окремому та комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину вміст субдиниці MBP (18,4 kDa) зростав у зразках півкуль великого мозку. Підсилення деградації MBP у тварин з АФС на фоні розвитку реактивного астрогліозу може бути одним із шляхів активної перебудови компонентів пошкоджених мієлінових оболонок.

У результаті всебічного аналізу результатів досліджень, представлених у даному розділі, можна зробити такі висновки:

1. Введення L-аргініну мишам лінії BALB/c з АФС до вагітності супроводжувалося зростанням вмісту аутоантитіл до протеїнів головного мозку у трьох поліпептидних зонах (120 kDa, 150 kDa та >170 kDa), проте на 18-й день вагітності встановлено зниження вмісту аутоантитіл 120 kDa та 150 kDa та зростання вмісту аутоантитіл >170 kDa. При введенні аміногуанідину, окремо та у комбінації з L-аргініном, встановлено зниження вмісту антитіл до власних протеїнів головного мозку в невагітних та вагітних тварин з АФС.

2. Встановлено позитивний вплив L-аргініну за умов АФС на систему гемостазу. Введення аміногуанідину мишам з АФС та вагітним мишам з АФС призводить до подальшого прогресування патологічних змін коагулограми. Встановлено позитивний вплив комбінованого застосування L-аргініну

та аміногуанідину у вагітних та невагітних мишей за умов АФС на систему гемостазу. При порівнянні результатів у тварин з АФС, яким вводили L-аргінін у комбінації з аміногуанідином, із показниками тварин з АФС, яким вводили окремо L-аргінін, у вагітних мишей встановлено зростання кількості тромбоцитів на 24 % та вкорочення АЧТЧ на 25 %, а у групі невагітних тварин з АФС достовірних змін досліджуваних показників системи зсідання крові не виявлено.

3. При введенні L-аргініну тваринам з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності відбувається зростання вмісту eNOS у сироватці крові та печінці, що супроводжується зростанням вмісту NO_2^- та NO_3^- у сироватці крові, мозочку, півкулях великого мозку, печінці та нирках. Водночас вміст iNOS у крові достовірно не змінюється. У печінці відбувається зменшення вмісту iNOS у тварин з АФС до вагітності на 21 % та у вагітних мишей з АФС на 26 %. При введенні аміногуанідину тваринам з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності знижується вміст iNOS у сироватці крові та печінці і вміст стабільних метаболітів NO у досліджуваних органах. Введення аміногуанідину не впливає на вміст eNOS у сироватці крові та печінці. При комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину встановлено зростання вмісту eNOS та зниження вмісту iNOS у сироватці крові та печінці, що привело до нормалізації вмісту NO_2^- та NO_3^- у вагітних та невагітних мишей при АФС.

4. Встановлено, що при введенні попередника NO L-аргініну тваринам з АФС до вагітності спостерігається зниження кількості циркулюючих десквамованих ендотеліоцитів у крові. Введення аміногуанідину не викликало достовірних змін показників кількості десквамованих ендотеліоцитів у вагітних та невагітних тварин з АФС. При комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину відбувається нормалізація кількості циркулюючих десквамованих ендотеліоцитів.

5. При застосуванні L-аргініну у вагітних та невагітних мишей за умов АФС встановлено зниження концентрації прозапальних цитокінів (IL-1 β , IL-6, TNF- α) та зростання концентрації протизапальних цитокінів (IL-4, IL-

10). Введення аміногуанідину супроводжувалося зниженням лише концентрації TNF- α у вагітних та невагітних тварин з АФС й зростанням концентрації IL-4 у вагітних самок з АФС. Комбіноване введення попередника NO та інгібітора iNOS супроводжувалося збереженням позитивного впливу L-аргініну на цитокіновий профіль. Встановлено зниження концентрації IL-1 β на 14 %, TNF- α на 46 % і зростання концентрації IL-4 на 28 % та IL-10 на 13 %, порівняно з показниками групи тварин, яким вводили лише L-аргінін.

6. Встановлено, що застосування L-аргініну та аміногуанідину, окремо та при комбінованому введенні, вагітним та невагітним мишам з АФС приводить до нормалізації показників життєздатності лейкоцитів. Комбіноване застосування попередника NO та інгібітора iNOS тваринам з АФС більшою мірою, ніж їх окреме введення, супроводжується відновленням рівноваги між кількістю гранулоцитів та агранулоцитів до рівня контролю та нормалізацією показників вмісту АФО у гранулоцитах та агранулоцитах вагітних та невагітних мишей за умов АФС.

7. Під впливом L-аргініну в печінці вагітних та невагітних мишей з АФС встановлено зниження вмісту каспази-3 та β -актину. Введення аміногуанідину тваринам з АФС до вагітності не викликало достовірних змін вмісту каспази-3, а вміст β -актину знижувався. Введення аміногуанідину вагітним мишам з АФС супроводжувалося зниженням вмісту каспази-3 на 63 % і не впливало на вміст β -актину. У групі тварин з АФС до вагітності, яким вводили L-аргінін у комбінації з аміногуанідином, вміст β -актину в печінці був більший, порівняно з аналогічними показниками при окремому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину. За комбінованого введення цих сполук вагітним мишам з АФС відбувалась нормалізація вмісту каспази-3 та β -актину в печінці.

8. L-аргінін за умов АФС проявляє гепатопротекторні та нефропротекторні властивості. При введенні L-аргініну невагітним мишам з АФС у мозочку відбувалось поглиблення оксидативного стресу, проте при вагітності відбувалось пригнічення активності процесів переокиснення мембранних ліпідів. У печінці та нирках мишей з АФС за застосування аміногуанідину

спостерігалася подальша інтенсифікація вільнорадикального окиснення, що водночас поєднувалось із активацією антирадикального та антиоксидантного захисту. Нейропротекторний вплив аміногуанідину при АФС проявлявся зменшенням оксидативного стресу в мозочку та півкулях великого мозку. Комбіноване введення L-аргініну та аміногуанідину вагітним та невагітним мишам з АФС супроводжувалось нейропротекторним, гепатопротекторним та нефропротекторним впливами.

9. У мозочку мишей з АФС до вагітності, яким вводили L-аргінін відбувалось зростання загального вмісту гліального фібрилярного кислого протеїну та його ізоформи (37 kDa), проте на 18-й день вагітності виявлено зниження загального вмісту гліального фібрилярного кислого протеїну та його ізоформи (37 kDa). Півкулі великого мозку виявилися менш чутливими, ніж мозочок, до дії попередника NO: загальний вміст гліального фібрилярного кислого протеїну в зразках півкуль великого мозку мишей лінії BALB/c з АФС, яким вводили L-аргінін, статистично не відрізнявся від значення групи тварин з АФС. При введенні аміногуанідину вагітним та невагітним мишам з АФС у мозочку та півкулях великого мозку встановлено зниження загального вмісту гліального фібрилярного кислого протеїну та ізоформи гліального фібрилярного кислого протеїну (37 kDa). При комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину у мозочку вагітних та невагітних тварин з АФС встановлено зниження загального вмісту гліального фібрилярного кислого протеїну та його ізоформи (37 kDa). У півкулях великого мозку вагітних мишей з АФС, яким вводили L-аргінін у комбінації з аміногуанідіном, встановлено зниження загального вмісту гліального фібрилярного кислого протеїну та його ізоформи (37 kDa) відносно показників групи вагітних тварин з АФС.

10. Встановлено, що окреме та комбіноване введення модуляторів синтезу NO (L-аргініну та аміногуанідину) не впливало на вміст олігомерних форм основного протеїну мієліну (95–110 kDa) у мозочку та півкулях великого мозку невагітних мишей з АФС. Проте на 18-й день вагітності у мозочку тварин з АФС 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 АФС. Причому, при комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину у півкулях великого мозку вагітних мишей з АФС вміст основного протеїну мієліну (95–110 kDa) знижувався, а вміст субодиниці основного протеїну мієліну (18,4 kDa) зростав, порівняно з показниками тварин, яким вводили L-аргінін. За комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину в зразках півкуль великого мозку вагітних мишей з АФС відбувається зростання вмісту олігомерних форм основного протеїну мієліну (95–110 kDa) та субодиниці основного протеїну мієліну (18,4 kDa), порівняно з показниками тварин з АФС, яким вводили аміногуанідин. Підсилення деградації основного протеїну мієліну в тварин з АФС на фоні розвитку реактивного астрогліозу може бути одним із шляхів активної перебудови компонентів пошкоджених мієлінових оболонок.

Результати досліджень, наведені в цьому підрозділі, опубліковано в таких наукових працях [10, 11, 30, 77–81, 109, 121, 122, 124–145, 333, 413–417].

РОЗДІЛ 5

МОРФОЛОГІЧНІ ТА СУБМІКРОСКОПІЧНІ ЗМІНИ У ПЕЧІНЦІ ТА НИРКАХ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ АНТИФОСФОЛІПІДНОМУ СИНДРОМІ ТА ЗАСТОСУВАННІ МОДУЛЯТОРІВ СИНТЕЗУ НІТРОГЕН ОКСИДУ

5.1. Гістологічні зміни печінки мишей за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому та при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину

Мікроскопічні дослідження печінки експериментальних тварин, яким моделювали антифосфоліпідний синдром, виявили значні розлади судинного русла та деструктивно-дегенеративні зміни строми і паренхіми. Більшість судин повнокровні, особливо центральні та міжчасточкові вени, стінка їх стоншена й нечітко контурована (рис. 5.1).

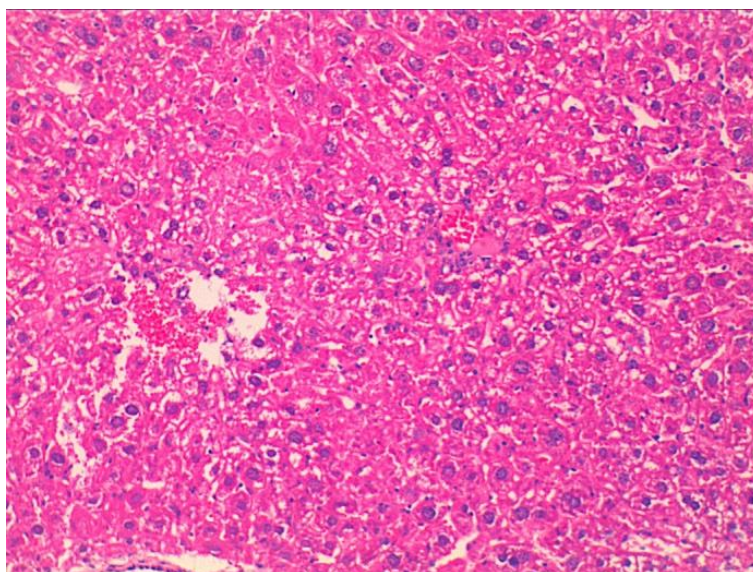


Рис. 5.1. Гістологічні зміни печінки тварини за умов АФС. Дискомплексация печінкових балок, деструктивно-дистрофічні зміни гепатоцитів, зони лізису та деструкції гепатоцитів, пошкодження стінки судини з формуванням крововиливу. Забарвлення гематоксилином та еозином. $\times 200$

Для стінки артерій характерні деструкція, потовщення. В більшості полів зору наявне порушення часточково-балкової структури органа. В центролобулярних ділянках виявлялися дистрофічно змінені гепатоцити з утворенням локусів некрозу та лізису, визначалися точкові крововиливи. Для гепатоцитів були характерні зменшення оксифілії, набряк, ознаки гідропічної дистрофії цитоплазми. Ядра клітин гіперхромні, пікнотично змінені, виявляються темні гепатоцити. Синусоїди візуалізувалися переважно на периферії часточок, для них характерне кровонаповнення. В перипортальних зонах виявлялася лейкоцитарна інфільтрація (див. рис. 5.1).

Гістологічні дослідження печінки тварин з АФС, яким вводили аміногуанідин, виявили порушення часточково-балкової організації органа та розлади кровообігу, однак ступінь вираження був не таким значним, як у групі тварин з АФС (рис. 5.2).

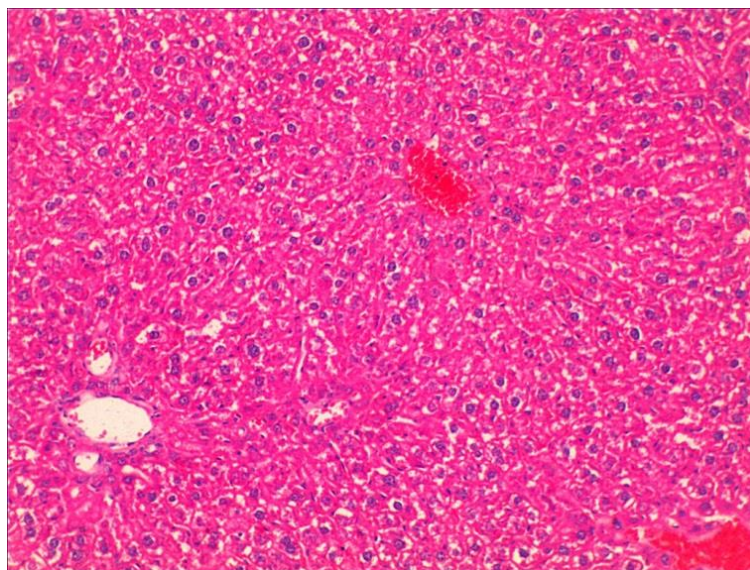


Рис. 5.2. Мікроскопічний стан печінки тварини за умов АФС та застосування аміногуанідину. Помірно порушена часточково-балкова організація органа, деструкція гепатоцитів, помірно кровонаповнені центральні вени. Забарвлення гематоксиліном і еозином. $\times 200$

Визначаються різко кровонаповнені центральні вени, та спустошені судини триад. Гепатоцити набряклі, із ознаками гідропічної дистрофії, однак не так значно, як у групі тварин зі змодельованим АФС. Ядра клітин переважно гіперхромні, пікнотичні, проте рідко виявляються двоядерні гепатоцити. Кровонаповнення синусоїдів значне, проте виявляється не по всій площі часточок, цетролобулярно наявні помірно кровонаповнені капіляри, або звужені та мають нечіткий просвіт. цетролобулярно наявні помірно кровонаповнені або звужені з нечітким просвітом капіляри (див. рис. 5.2).

Вивчення гістологічної перебудови печінки мишей при застосуванні L-аргініну за умов АФС виявило порушення кровообігу органа, що проявлялися кровонаповненням міжчасточкових, центральних та, особливо, підчасточкових вен (рис. 5.3).

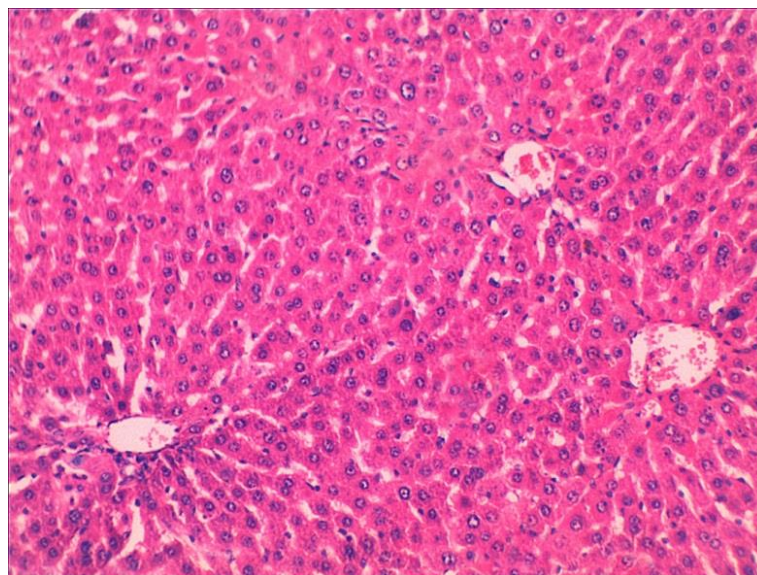


Рис. 5.3. Мікроскопічний стан печінки миші за умов АФС та застосування L-аргініну. Помірно змінена часточково-балкова організація органа. Деструктивно змінені окремі ділянки печінкової часточки з гепатоцитами, помірно розширені просвіти синусоїдів. Забарвлення гематоксиліном і еозином. $\times 200$

Для синусоїдних капілярів характерне кровонаповнення переважно в периферійних ділянках часточки, їх стінки чітко контуровані. Паравазальні лейкогістіоцитарні інфільтрати невеликі. Впорядковане, балкове розташування гепатоцитів визначається переважно на периферії часточки, дезорієнтоване – центролобулярно. Цитоплазма гепатоцитів набрякла, помірно оксифільна, більшість ядер нормохромні, темні клітини не виявляються (див. рис. 5.3).

Проведене гістологічне дослідження печінки мишей з АФС, яким вводили L-аргінін у комбінації з аміногуанідином, виявило, що в органі відбувається реорганізація судинного русла, що має адаптивний характер (рис. 5.4).

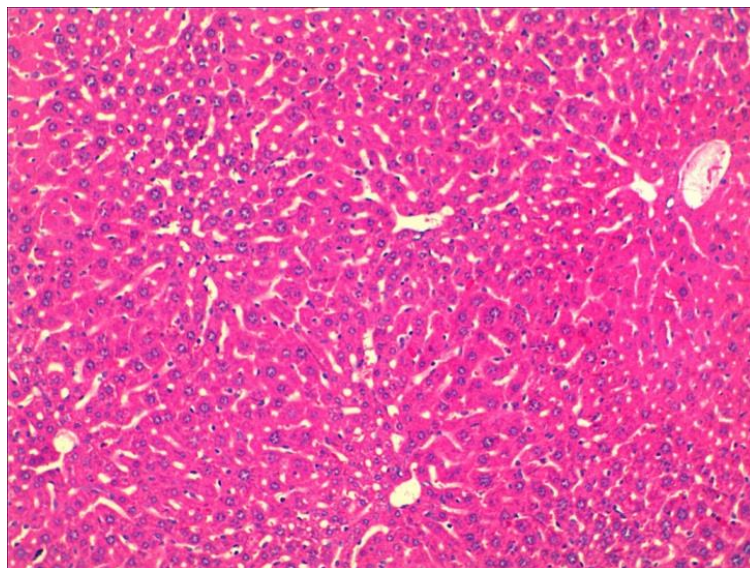


Рис. 5.4. Мікроскопічні зміни печінки тварини за умов комбінованого введення L-аргініну та аміногуанідину на тлі АФС. Печінкові часточки з центральними венами, синусоїдні гемокапіляри незначно розширені. Забарвлення гематоксилином та еозином. $\times 200$

Визначається помірне кровонаповнення як венозних, так і артеріальних судин, однак деякі міжчасточкові вени були повнокровними. Відновлюється впорядковане розташування гепатоцитів у складі часточок органа. Цитоплазма гепатоцитів однорідна, незначно набрякла, помірно оксифільна. Ядра клітин збільшені, нормохромні, виявлялися ядерця. Зростала частка двоядерних

гепатоцитів, що можна розцінити як прояв регенераторних процесів у печінці тварин цієї групи спостереження. Синусоїди помірно розширені, стінка чітко контурована, в їх просвітах виявляються поодинокі еритроцити (див. рис. 5.4).

У результаті проведених мікроскопічних досліджень печінки встановлено, що за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому в печінці наявні значні гемодинамічні розлади, що призводять до деструктивно-дегенеративних змін паренхіми органа. За використання L-аргініну та аміногуанідину при АФС, особливо за умов їх комбінованого введення, часточково-балкова організація печінки відновлюється. Встановлено протекторний ефект досліджуваних модуляторів системи NO на мікроциркуляцію, що свідчить про відновлення функціонування печінки мишей з АФС.

5.2. Гістологічні зміни нирки мишей за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому та при застосуванні L-аргініну та аміногуанідину

Проведені гістологічні дослідження нирок тварин інтактної групи встановили загальні закономірності структурної організації органа.

Мікроскопічні дослідження нирок експериментальних тварин, яким моделювали АФС, виявили деструктивні зміни всіх компонентів та порушення мозкового і кіркового кровообігу органа. Визначається розширення просвітів і збільшення кровонаповнення вен та артерій, особливо дрібного калібру, в артеріолах та перитубулярних гемокапілярах і клубочках ниркових тілець виявлено застійні явища, складжування еритроцитів, стази. Стінки судин стоншені, деструктивно змінені, наявні кровивиливи. Набряк строми помірний, наявна лейкоцитарна інфільтрація (рис. 5.5).

Більшість ниркових тілець гіпертрофовані, в них виявляється кровонаповнення судинних клубочків, за рахунок чого значно звужуються просвіти двостінної капсули Шумлянського – Боумена. Також спостерігаються ниркові тільця зміненої форми або зменшені в розмірах, що свідчить про їх деструкцію та гіпотрофію.

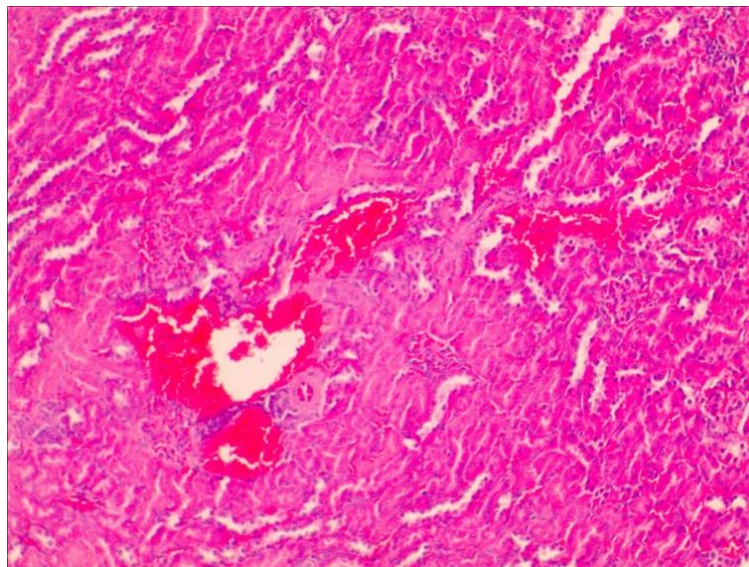


Рис. 5.5. Мікроскопічні зміни нирки миші лінії BALB/c за умов АФС. Розширені, кровонаповнені просвіти судин, звуження просвіту окремих каналців та дистрофічні зміни епітелію звивистих каналців. Забарвлення гематоксиліном та еозином. x 100

Зміни визначаються також в епітеліоцитах каналців нефрона. Для проксимальних – характерне звуження або нечіткість просвіту, погано контуруються мембрани плазмолем, наявний набряк, просвітлення цитоплазми клітин, були наявні оптично порожні вакуолі, що свідчить про вогнищевий розвиток гідропічної дистрофії. Подекуди визначалася десквамація нефроцитів у просвіт каналця. В частини епітеліоцитів цитоплазма зерниста або вакуолізована, дистрофічно змінена, їх ядра гіперхромні, пікнотично змінені. Дистальні каналці помірно розширені, епітелій набряклий (рис. 5.6).

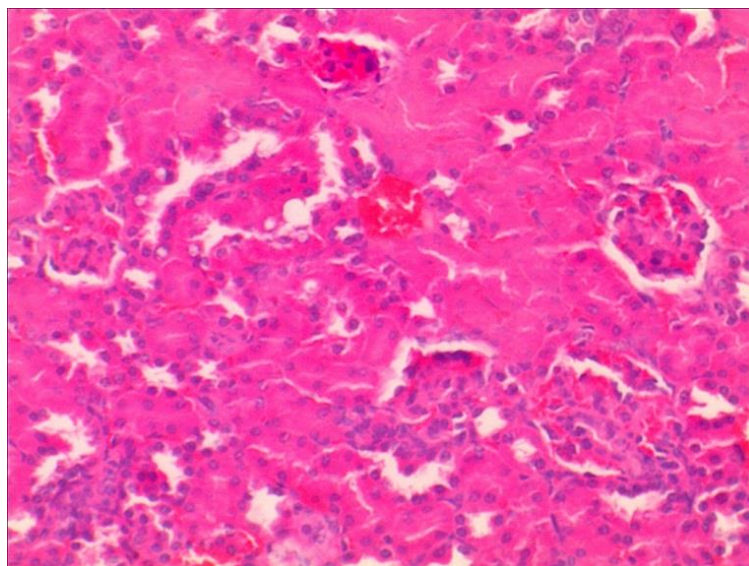


Рис. 5.6. Мікроскопічні зміни нирки миші лінії BALB/c за умов АФС. Дистрофічно змінений нефротелій канальців нефрона, деформовані гіпер- та атрофічно змінені ниркові тільця, кровонаповнені судини. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 200$

Гістологічні зміни нирок тварин із експериментальним АФС, яким вводили L-аргінін, проявлялися зменшенням кровонаповнення судин органа із збереженням цілісності судинної стінки. Формені елементи крові виявляються переважно у венозному руслі строми та помірно подекуди в артеріолах і гемокапілярах судинних клубочків. За умов застосування L-аргініну зменшується кількість гіпер- і гіпотрофованих ниркових тілець, вони переважно звичайних розмірів без проявів посиленого кровонаповнення, зі збереженим епітелієм внутрішнього і зовнішнього листків капсули Шумлянського – Боумена (рис. 5.7). Спостерігаються незначні зміни проксимальних канальців, нефроцити, що їх вистеляють, помірно набряклі, цитоплазма частини епітеліоцитів зерниста. Ядра без явищ гіперхромії, помірно базофільні, рідко виявляється десквамація клітин у просвіт канальця. Епітеліоцити дистального відділу нефрона без виразних деструктивних змін.

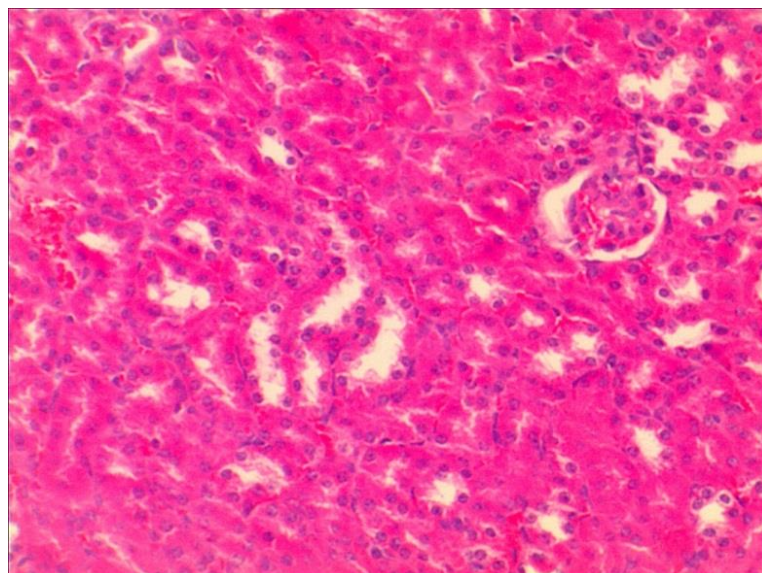


Рис. 5.7. Мікроскопічний стан кіркової речовини нирки миші лінії BALB/c за умов АФС та корекції L-аргініном. Ниркові тільця з помірно кровонаповненими судинними клубочками, малозмінені каналці нефрона. Забарвлення гематоксилином та еозином. $\times 200$

Мікроскопічні зміни нирок тварин із модельованим АФС, яким вводили аміногуанідин, проявляються розширенням і кровонаповненням багатьох судин, переважно дрібних артерій кіркової речовини органа. Визначаються помірно і подекуди значно кровонаповнені капіляри перитубулярної сітки та деяких кровоносних капілярів судинних клубочків. Наявні деформовані, зміненої форми ниркові тільця, однак меншою мірою, порівняно із нирками групи тварин з АФС. Відмічаються також нечисленні збільшені в розмірах гіпертрофовані та атрофовані ниркові тільця. Реорганізація проксимальних та дистальних каналців проявляється помірним розширенням просвітів, незначним набряком цитоплазми епітеліоцитів, подекуди із її вакуолізацією. Більшість ядер клітин помірно базofilні, еухроматинові (рис. 5.8).

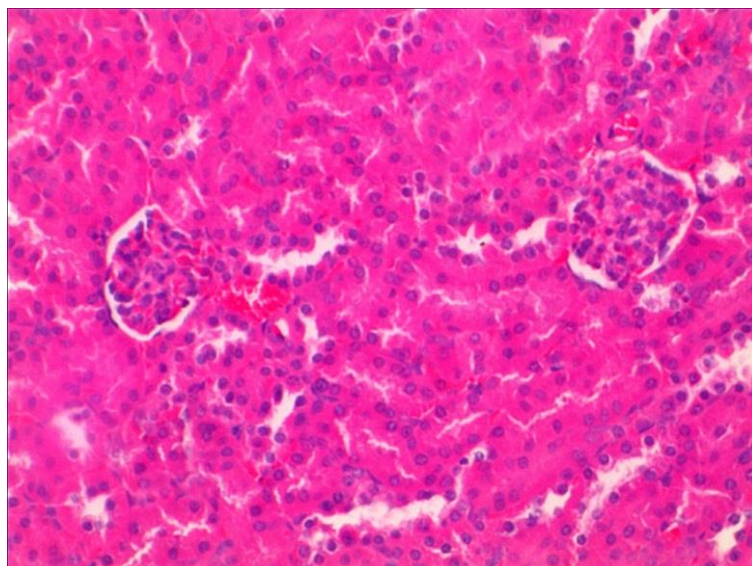


Рис. 5.8. Гістологічні зміни нирки миші лінії BALB/c за умов АФС та корекції аміногуанідином. Помірно кровонаповнені дрібні судини, змінені ниркові тільця і канальці нефронів. Забарвлення гематоксилином та еозином. $\times 200$

За умов комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину в нирках мишей з АФС виявляються найменші зміни деструктивного характеру, наявна відносна нормалізація судинного компонента органа, залишаються кровонаповненими тільки міжчасткові та міжчасточкові вени. Судинні клубочки помірно кровонаповнені, просвіти капсул незначно розширені. Цитоплазма епітеліоцитів канальців нефрона без ознак набряку, з чітко контурованими мембранами плазмолемми, містить округлі слабо базofilні еухроматинові ядра. Просвіти канальців, особливо дистальних, чіткі, не розширені. Структурна організація збірних канальців і трубочок також без видимих змін (рис. 5.9).

За умов АФС у нирці відбуваються істотні судинні порушення, які призводять до значних деструктивних змін нефронів. Порушуються загальна гемодинаміка органа та мікроциркуляція у ниркових тільцях і перитубулярній кровоносній сітці, розвиваються деструктивні й дистрофічні зміни епітеліоцитів проксимальних і дистальних канальців.

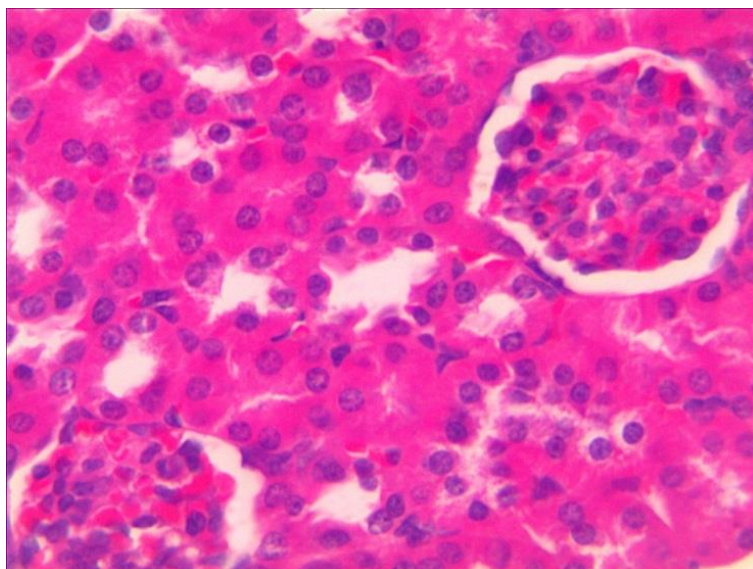


Рис. 5.9. Мікроскопічний стан кіркової речовини нирки миші лінії BALB/c за умов АФС та корекції L-аргініном і аміногуанідином. Ниркові тільця та звивисті каналці нефронів без ознак пошкодження. Забарвлення гематоксиліном та еозином. $\times 400$

L-аргінін та аміногуанідин, особливо за умов їх комбінованого введення, зменшують патологічні зміни компонентів нефрона, порівняно з групою тварин із АФС, що проявляється відновленням мікроциркуляції в органі, покращенням структури ниркових тілець та епітеліоцитів каналців нефрона, що свідчить про відносну нормалізацію фаз процесу сечоутворення у нирках експериментальних тварин.

5.3. Субмікроскопічні дослідження печінки за умов антифосфоліпідного синдрому та при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину

Проведені електронномікроскопічні дослідження печінки мишей лінії BALB/c інтактної групи показали, що гепатоцити містять округлі ядра, які мають центральне розташування. Каріолема чітко структурована, виявляються численні ядерні пори. Каріоплазма містить переважно еухроматин, наявні ядерця. Для інтактних тварин характерна наявність великих двоядерних

гепатоцитів. У цитоплазмі клітин наявне впорядковане розташування органел. Біліарні полюси гепатоцитів містять, як правило, каналці гранулярної ендоплазматичної сітки, цистерни та мікропухирці комплексу Гольджі, також наявні лізосоми та пероксисоми. Васкулярна поверхня клітин містить каналці агранулярної ендоплазматичної сітки, численні грудки. По всій площі цитоплазми клітин визначаються численні округлі мітохондрії із електронноосвітлим матриксом та кристами. Плазмолеми клітин чітко виражені, обмежують у відповідних ділянках жовчні капіляри, в місцях з'єднання наявні прості десмосомальні та щільні замикальні міжклітинні контакти (рис. 5.10).

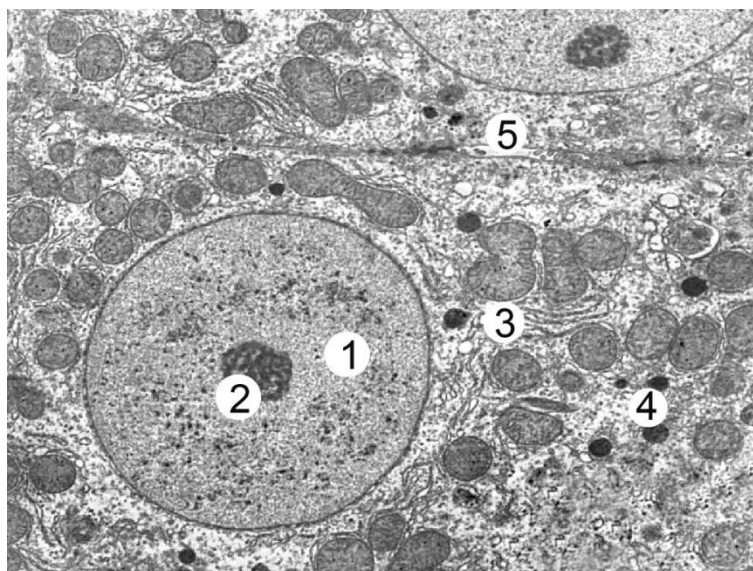


Рис. 5.10. Субмікроскопічна організація гепатоцита печінки миші лінії BALB/c інтактної групи. Кругле ядро (1), ядро (2), мітохондрії (3), гранулярна ендоплазматична сітка (4), лізосоми (5). $\times 12\,000$

Васкулярні поверхні клітин утворюють численні мікроборсинки, які виступають у параваскулярний простір Діссе. Синусоїдні гемокапіляри утворені ендотеліоцитами з фенестрами у цитоплазматичних ділянках та пористою несучільною нечіткою базальною мембраною. Переважно між ендотеліоцитами та у просторах Діссе виявляються печінкові макрофаги –

клітини Купфера, які мають добре розвинені органели загального призначення, і основною особливістю їх є наявність у цитоплазмі лізосом. Ендотеліальні клітини містять об'ємну ядерну ділянку та зону органел, найбільшу площу має периферійна стоншена цитоплазматична з вакуолями та мікропухирцями (рис. 5.11).

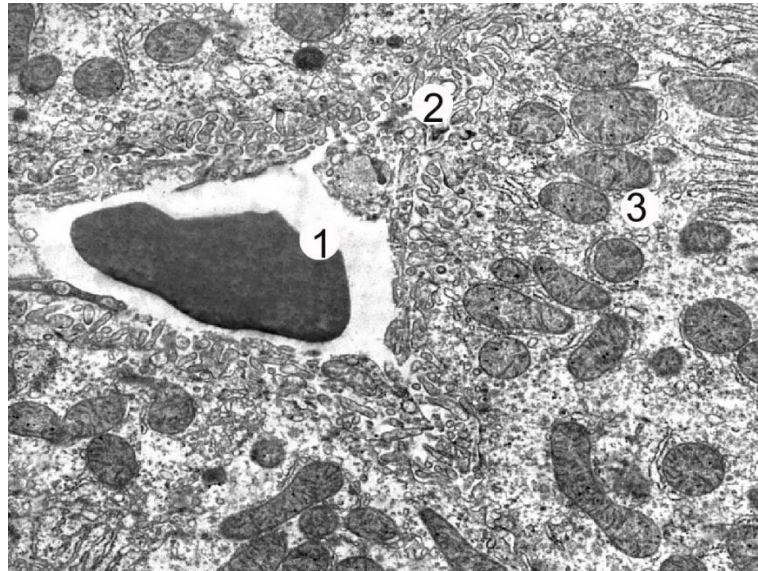


Рис. 5.11. Ультраструктура гемокапіляра печінки миші лінії BALB/c інтактної групи. Просвіт із еритроцитом (1), простір Діссе з мікроворсинками (2), гепатоцит (3). $\times 13\,000$

Отримані дані щодо субмікроскопічної організації компонентів часточки печінки миші лінії BALB/c є контролем і необхідні для встановлення змін у наступних дослідних групах.

Ультраструктурні дослідження печінки тварин, проведені за умов модельованого АФС, виявили значні деструктивні зміни складових компонентів органа. Визначаються синусоїдні гемокапіляри з розширеними кровонаповненими просвітами та деструктуризованою стінкою. В просвітах виявляються еритроцити, нейтрофіли, тромбоцити, фібринові маси. Наявні також залишки клітин, вакуолі, білки плазми крові, за рахунок чого в полях спостереження частіше виявляються клітини Купфера, основною ознакою

яких є наявність первинних і вторинних лізосом. Спостерігається десквамація 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. Периферійні 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. 5.12).

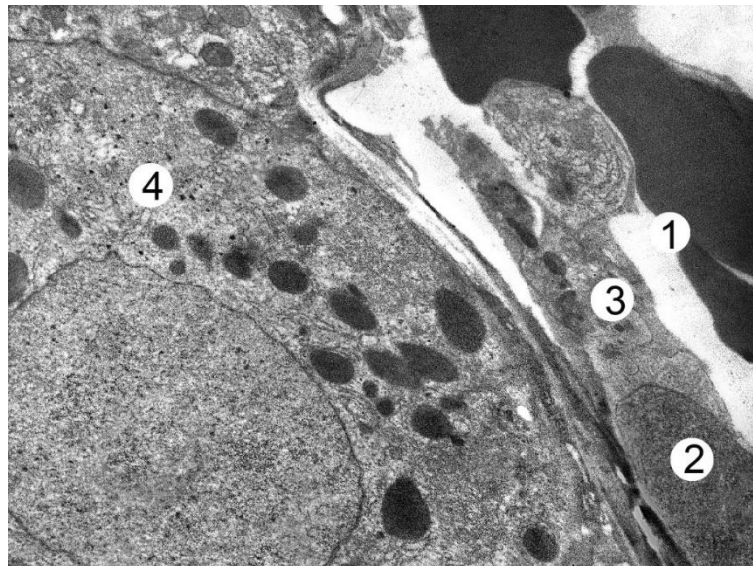


Рис. 5.12. Фрагмент гемокапіляра печінки миші лінії BALB/c за умов АФС. Просвіт з форменими елементами крові (1), ядро (2) і цитоплазма (3) ендотеліоцита, гепатоцит (4). $\times 18\,000$

У різних ділянках часточок печінки експериментальних тварин за умов АФС ультраструктурно виявляються поліморфні зміни гепатоцитів. Спостерігаються «темні», пошкоджені клітини, з інтенсивно осміюфільною гіало- та каріоплазмою. Їх цитоплазма ущільнена, електроннощільна, із значно деструктивно зміненими органелами. Цистерни комплексу Гольджі та каналці

ендоплазматичної сітки вкорочені, фрагментовані. Мембрани гранулярної ендоплазматичної сітки містять небагато рибосом. Різноманітні зміни визначаються у мітохондріях: для частини з них характерні зростання розмірів, гіпертрофія, фрагментація крист. В інших, зменшених за розмірами органелах, в осміофільному матриксі наявні погано структуровані кристи. Характерною особливістю ультраструктурних змін гепатоцитів є збільшення в цитоплазмі числа лізосом та фагосом. Гетерогенні зміни жовчних капілярів проявлялися звуженням або розширенням просвітів, в яких виявлялося мало мікроворсинок (рис. 5.13).

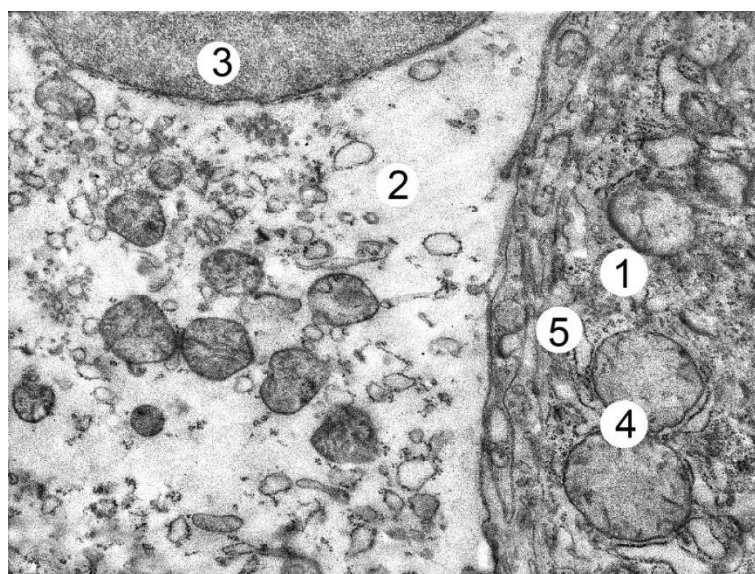


Рис. 5.13. Ультраструктурні зміни гепатоцитів печінки миші лінії BALB/c за умов АФС. Осміофільна гіалоплазма «темного» гепатоцита (1), електроннопрозора гіалоплазма «світлого» гепатоцита (2), ядро (3), мітохондрії (4), гранулярна ендоплазматична сітка (5). $\times 22\,000$

Проведені електронномікроскопічні дослідження часточок печінки тварин при АФС за умов застосування аміногуанідину встановили реактивні зміни ультраструктури гепатоцитів та гемокапілярів. Субмікроскопічні зміни при застосуванні аміногуанідину за умов АФС подібні, до тих, які виявляються у групі тварин з АФС, однак відрізняються не таким значним ступенем ультраструктурної деструкції. Печінкові балки оточують синусоїдні

гемокапіляри, що мають широкі і вузькі просвіти, в яких наявні формені елементи крові: еритроцити, нейтрофіли, лімфоцити (рис. 5.14).

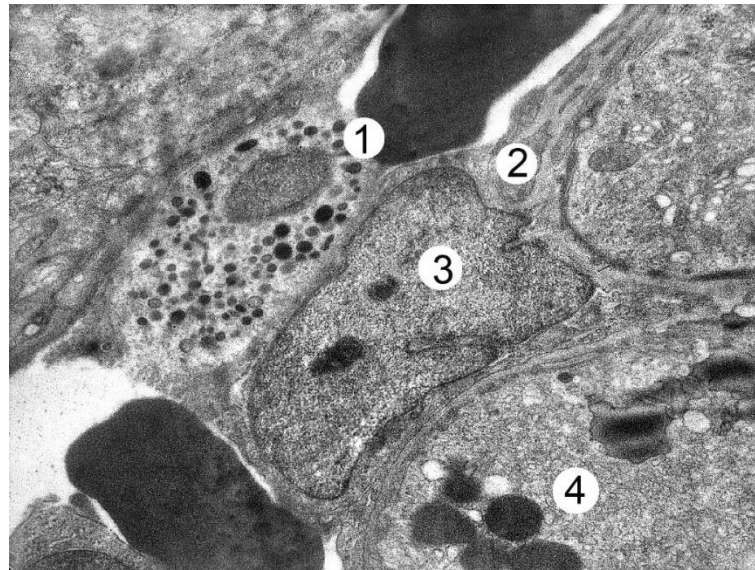


Рис. 5.14. Ультраструктурні зміни гемокапіляра печінки миші лінії BALB/c за умов АФС та при застосуванні аміногуанідину. Просвіт з форменими елементами крові (1), цитоплазма (2) і ядро ендотеліоцита (3), фрагмент гепатоцита (4). $\times 19\,000$

У потовщених набряклих ділянках цитоплазми ендотеліоцитів розташовано небагато органел. Непротяжні каналці ендоплазматичної сітки потовщені. Невеликих розмірів округлі мітохондрії включають електронносвітлий матрикс, у якому мало крист. Цитоплазматичні ділянки ендотеліоцитів мають небагато піноцитозних пухирців і кавеол. Простори Діссе нерівномірні, включають розширені і вузькі ділянки, а кількість мікроворсинок у них невелика. Виявляються також тонкі осміюфільні ділянки цитоплазми ендотеліальних клітин. У складі стінки наявні клітини Купфера, в цитоплазмі яких є лізосоми та фагосоми.

У різних ділянках часточок органа наявні гепатоцити з округлої форми ядрами, які мають однорідну зернисту каріоплазму та невеликі ядерця. Між ядерними мембранами перинуклеарний простір не так значно розширений,

окремі ділянки його потовщені. У цитоплазмі наявні електронносвітлі ділянки гіалоплазми, в них мало рибосом и полірибосом. Привертає увагу гіпертрофія частини мітохондрій, вони мають подовгасту округло-овальну форму, гомогений, помірної електронної щільності матрикс. Кристи розташовані переважно по периферії органел, унаслідок редукції їх у центральних ділянках. При застосуванні аміногуанідину відмічається не таке значне, як при АФС, потовщення каналців гранулярної та агранулярної ендоплазматичної сітки, розширені та вакуолеподібні лише окремі їх ділянки. Подібно змінені цистерни комплексу Гольджі. У біліарних ділянках цитоплазми зростає вміст первинних та вторинних лізосом. Плазмолемі гепатоцитів місцями погано структуровані, нечіткі, проте збережені міжклітинні контакти, що обмежують жовчні капіляри. У їх помірних просвітах краще, ніж у печінці тварин без корекції, збережені мікроворсинки (рис. 5.15).

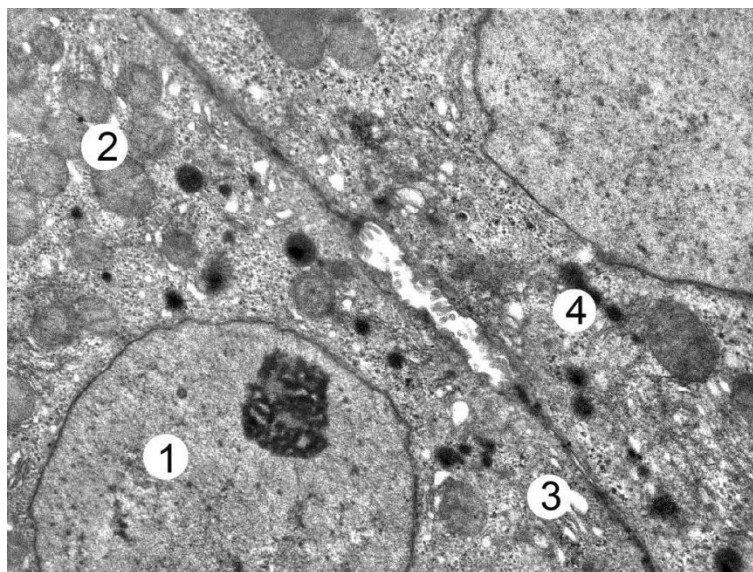


Рис. 5.15. Субмікроскопічні зміни гепатоцита печінки миші лінії BALB/c за умов АФС та введення аміногуанідину. Кругле ядро (1), мітохондрії (2), гранулярна ендоплазматична сітка (3), лізосоми (4), жовчний капіляр (5).
× 15 000

В умовах застосування L-аргініну при АФС виявлено ознаки відновлення субмікроскопічної організації синусоїдів і гепатоцитів у часточках печінки. Більшість гемокапілярів органа в тварин цієї групи мають краще збережену ультраструктуру, порівняно з печінкою тварин при АФС. У помірно розширених просвітах судин наявні здебільшого еритроцити, небагато лейкоцитів та тромбоцитів.

Ядра ендотеліальних клітин округлі, сплющені, каріоплазма відносно електроннопрозорова, в ній переважає еухроматин, мембрани каріолеми чітко виражені, рідко виявляється 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 прозвітлений. У периферійних цитоплазматичних ділянках клітин зростає кількість мікропіноцитозних міхурців, наявні наскрізні перфорації. Добре визначаються мікроворсинки у просторі Діссе (рис. 5.16).

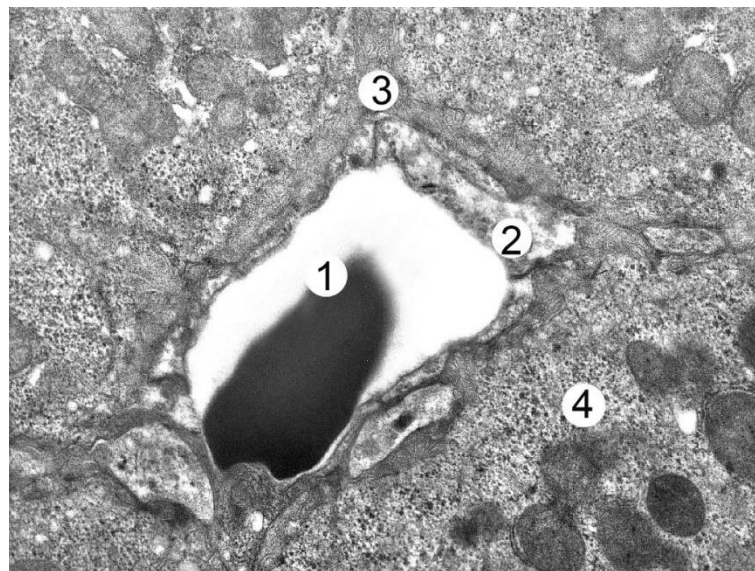


Рис. 5.16. Ультраструктурна гемокапіляра печінки миші лінії BALB/c за умов АФС при застосуванні L-аргініну. Еритроцит у просвіті гемокапіляра (1), цитоплазма ендотеліоцита (2), простір Діссе (3), гепатоцит (4). $\times 15\,000$

У просторах Діссе та просвітах капілярів рідко виявляються клітини Купфера, в цитоплазмі яких наявні лізосоми. В часточках визначаються «світлі» та «темні» гепатоцити, для яких характерна неоднорідна щільність цитоплазми, однак ступінь їх ушкодження був меншим, ніж у печінці білих мишей з АФС. «Світлі» клітини містили округло-овальні ядра з чіткими мембранами, добре виявлялися ядерні пори. Каріоплазма включала переважно еухроматин, зрідка виявлялися грудки маргінально розміщеного гетерохроматину, визначалися одне або декілька ядерців. Ультраструктура органели клітин відносно збережена. Для «темних» клітин характерна більша електроннооптична щільність цитоплазми. Мітохондрії незначно збільшені в розмірах, кристи збережені, матрикс помірно осміофільний. «Світлі» клітини містили порівняно менше мітохондрій, які переважно були збільшені в розмірах.

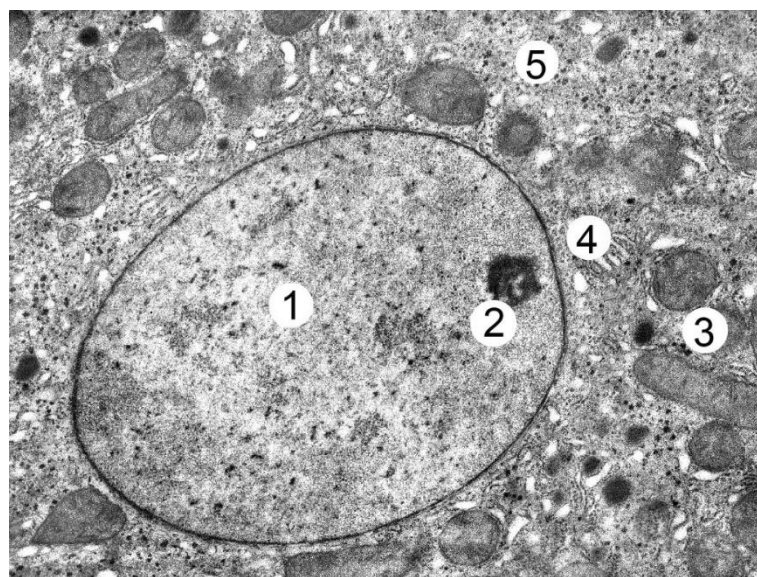


Рис. 5.17. Субмікроскопічні зміни гепатоцитів печінки миші лінії BALB/c за умов АФС та застосуванні L-аргініну. Кругле ядро (1), ядерце «світлого» гепатоцита (2), мітохондрії (3), гранулярна ендоплазматична сітка (4), грудки глікогену (5). $\times 17\,000$

Ультраструктурно гепатоцити містили відносно розширені каналці гранулярної ендоплазматичної сітки, проте на їх мембранах виявлялися

численні рибосоми. Цистерни та вакуолі комплексу Гольджі незначно збільшені, чітко контуруються їх мембрани. Виявлено небагато грудок глікогену, що розміщуються в певних зонах клітини. По всій площі визначалися поодинокі первинні лізосоми та фагосоми. Просвіти жовчних капілярів були все ж розширеними, проте чітко визначалися мікроворсинки. Щільні замикаючі контакти та десмосоми, що їх з'єднують, збережені (див. рис. 5.17).

За умов комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину при АФС субмікроскопічно виявлений найзначніший позитивний вплив на компоненти печінки дослідних тварин. Ультраструктура гепатоцитів та кровоносних капілярів подібна до компонентів печінки тварин інтактної групи. Ядра клітин округлі, мембрани каріолеми добре контуровані, перинуклеарний простір різномірний, не розширений (рис. 5.18).

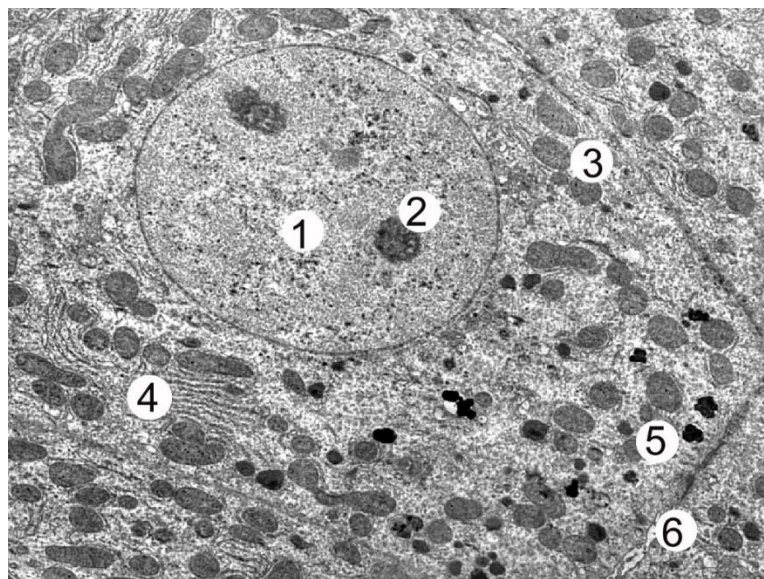


Рис. 5.18. Ультраструктура гепатоцита в складі часточки печінки миші лінії BALB/с за умов АФС при комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину. Ядро (1) з ядерцями (2), мітохондрії (3), каналці гранулярної ендоплазматичної сітки (4), лізосоми (5), жовчний капіляр (6). $\times 12\,000$.

Мітохондрії збережені, без ознак порушення їх ультраструктури, матрикс помірно осміофільний, кристи добре структуровані. Канальці та цистерни комплексу Гольджі не розширені, виявляються вільні рибосоми в складі полісом та фіксовані до мембран ендоплазматичної сітки, поодинокі по всій площі клітин виявляються первинні лізосоми. Жовчні капіляри не розширені, мають чітко виражені мембрани, збережені мікроворсинки та міжклітинні контакти, що їх обмежують (див. рис. 5.18).

Ультраструктура синусоїдів печінки ограна за умов АФС при комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину відновлюється, їх просвіти незначно розширені або звужені, з формених елементів крові виявляються переважно еритроцити. Наявні неактивні клітини Купфера, що містять у цитоплазмі лізосоми.

Ультраструктура ендотеліальних клітин відновлена, видовжені електроннопрозорі ядра містять у каріоплазмі еухроматин (рис. 5.19).

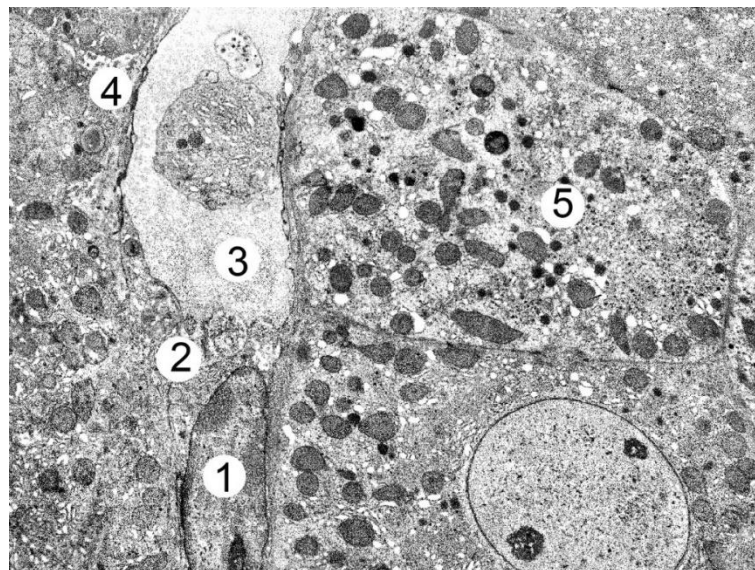


Рис. 5.19. Субмікроскопічний стан гемокапіляра в складі часточки печінки миші лінії BALB/с за умов АФС при комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину. Ядро (1) і цитоплазма (2) ендотеліоцита, просвіт капіляра (3), простір Діссе (4), гепатоцит (5). $\times 9\,000$

Каріолема чітка, мембрани не ушкоджені, суцільні, наявні численні ядерні пори. Перинуклеарно наявні структурно незмінені органели загального призначення. Тільки деякі каналці ендоплазматичної сітки розширені, а в деяких мітохондріях ущільнений матрикс. Відновлена ультраструктура периферійних цитоплазматичних ділянок ендотеліоцитів, у них наявні численні мікропіноцитозні міхурці. Простори Діссе добре структуровані, містять мікроворсинки (див. рис. 5.19).

У результаті проведеного ультраструктурного дослідження встановлено, що за умов експериментального АФС у печінці тварин розвиваються суттєві розлади судин мікроциркуляторного русла. Виявлені глибокі зміни всіх структурних компонентів часточок печінки. У часточках порушується ультраструктура гепатоцитів, пошкоджуються їх плазматичні та органоїдні мембрани. На фоні значних розладів мікроциркуляції і порушення транскапілярного обміну відбуваються значні деструктивні пошкодження гепатоцитів, що значно погіршує стан метаболічних процесів у печінці та її детоксикаційні можливості.

За умов корекції АФС окремо та при комбінованому застосуванні L-аргініну й аміногуанідину встановлено менше пошкодження структурних компонентів часточок органа. Покращення ультраструктури і нормалізація синусоїдних гемокапілярів печінки та гепатоцитів особливо яскраво проявляється за умов комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину. Використання препаратів запобігає і зменшує пошкодження мембранних органел, ядерних і плазматичних мембран ендотеліоцитів та гепатоцитів.

5.4. Електронномікроскопічні дослідження нирки за умов антифосфоліпідного синдрому та при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину

Субмікроскопічне вивчення нирок тварин інтактною групи виявило, що в кірковій речовині ниркові тільця мають типову організацію, утворені двостінною капсулою Шумлянського – Боумена та судинним клубочком.

Клітини внутрішнього шару капсули – подоцити, які з'єднуються з гломерулярною базальною мембраною капілярів судинного клубочка. Подоцити мають химерну неправильну форму, утворюють багато відростків, відгалужень, цитотрабекул. Від цитотрабекул, у свою чергу, відгалужуються малі пальцеподібні утвори – цитоподії, які прикріплюються до тришарової базальної мембрани, яка є спільною з клубочковими гемокапілярами. Кровоносні капіляри судинного клубочка, вистелені ендотеліальними клітинами, які мають тонкі, периферичні, цитоплазматичні частини клітин, що має отвори – фенестри (рис. 5.20). Базальна мембрана особливої будови, вона тришарова, середній шар – електроннощільний, зовнішні – електроннопрозорі, вона є спільною для подоцитів внутрішнього шару капсули Шумляньського – Боумена та ендотеліоцитів капілярів судинного клубочка, всі разом структури формують фільтраційний бар'єр.

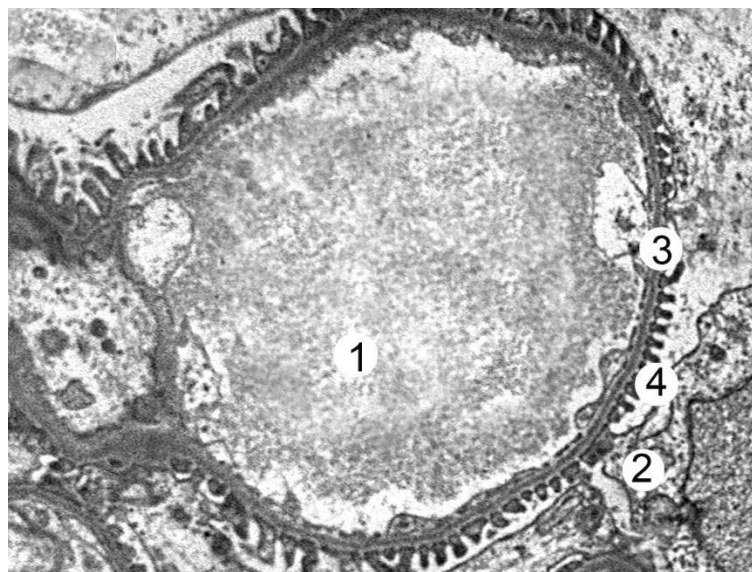


Рис. 5.20. Ультраструктурна організація компонентів судинного клубочка нирки миші лінії BALB/c інтактної групи. Просвіт гемокапіляра з еритроцитом (1), цитотрабекула (2), базальна мембрана (3), цитоподії (4). $\times 12\,000$

Епітеліоцити проксимальних каналців нефрона також розташовані на базальній мембрані, містять округло-овальні ядра, а на апікальній частині

клітин – значну кількість мікроборсинок, що утворюють щіточкову облямівку. Цитоплазма клітин містить канальці ендоплазматичної сітки, рибосоми, в апікальній частині – лізосоми. Базальна частина клітин містить складки плазмолем, між якими розміщуються видовжені паличкоподібні мітохондрії, вони мають відносно електроннощільний матрикс, чіткі кристи.

Між канальцями нефрона розміщені гемокапіляри перитубулярної кровоносної сітки. Ендотеліоцити в їх складі видовжені, ядра їх округлі, або витягнуті, мають чітко виражені мембрани каріолем, каріоплазма насичена переважно еухроматином, наявні ядерця. Цитоплазма містить помірно розвинені органи за загального призначення, а в периферійних зонах, так званих вуалях, мікропіноцитозні міхурці та кавеоли, наявні отвори – фенестри.

В епітеліоцитах дистального відділу нефрона наявні центрально розміщені овальні ядра, електронносвітла цитоплазма. В базальній частині клітин визначається базальна посмугованість, що утворена протяжними складками плазмолем та розміщеними між ними великими видовженими мітохондріями (рис. 5.21).

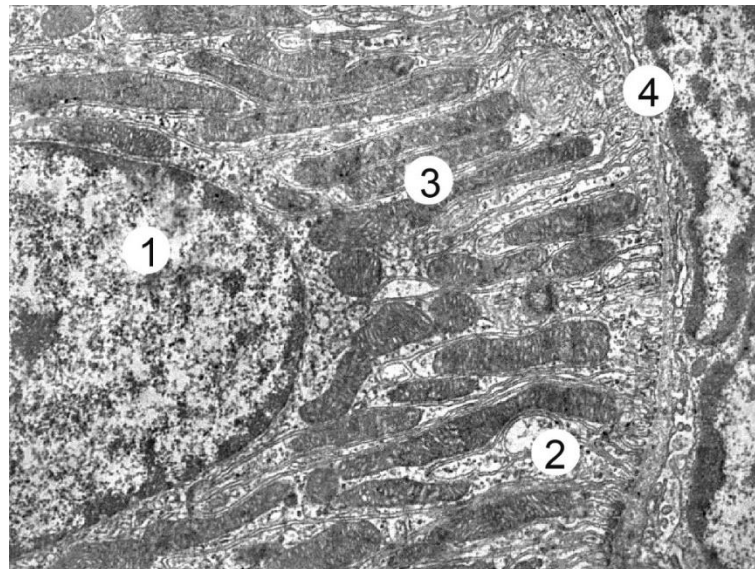


Рис. 5.21. Ультраструктурна організація епітеліоцита дистального відділу нефрона нирки миші лінії BALB/c інтактної групи. Ядро (1), цитоплазма (2), мітохондрії між складками плазмолем (3), базальна мембрана (4). $\times 15\,000$

Ультраструктурні дослідження нирок тварин при експериментальному АФС встановили значні порушення структурної організації компонентів органа. Гемокапіляри судинних клубочків розширені, кровонаповнені, в них виявляються стази, складжі еритроцитів. В ендотеліюцитах цитоплазма набрякла, просвітлена, проте наявні зони ущільнення, фенестри нечіткі, погано виражені. Більшість мембранних органел пошкоджені, в цитоплазмі виявляються просвітлені зони, позбавлені органел або з їх залишками, фрагментами.

Гломерулярна базальна мембрана зонально потовщена або стоншена, втрачає тришарову будову, має вигляд гомогенної смужки. Подоцити містять деструктивно змінені органели, набряклі просвітлені ділянки цитоплазми (рис. 5.22).

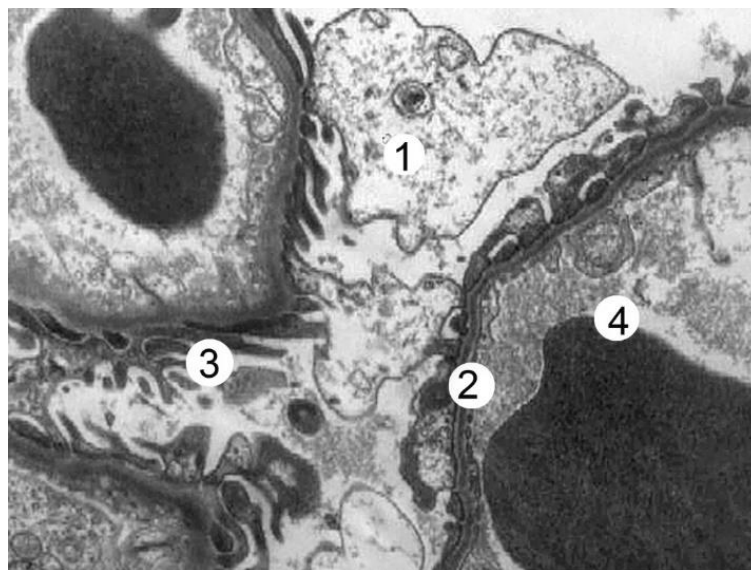


Рис. 5.22. Субмікроскопічні зміни компонентів судинного клубочка ниркового тільця. Нирка миші лінії BALB/с при експериментальному АФС. Змінена цитоплазма подоцита (1), базальна мембрана (2), цитоподії (3), просвіт гемокапіляра (4). $\times 11\ 000$.

Канальці ендоплазматичної сітки вкорочені, мітохондрій небагато, з електроннощільним матриксом, пошкодженими кристами. Цитотрабекули на деяких ділянках стоншені, згладжені, в інших зонах набряклі, потовщені. Цитоподії різноспрямовані, деформовані, між ними наявні розширені проміжки. В ядрах подоцитів виявляються деформовані ядра, з вгинами вп'ячуваннями каріолеми (див. рис. 5.22).

Для гемокапілярів перитубулярної кровоносної сітки також характерне розширення і надмірне кровонаповнення. Базальна мембрана гомогенна, набрякла, розмита. Для цитоплазми ендотеліальних клітин характерний зональний набряк або надмірне стоншення, слабо виражені виявляються фенестри (рис. 5.23).

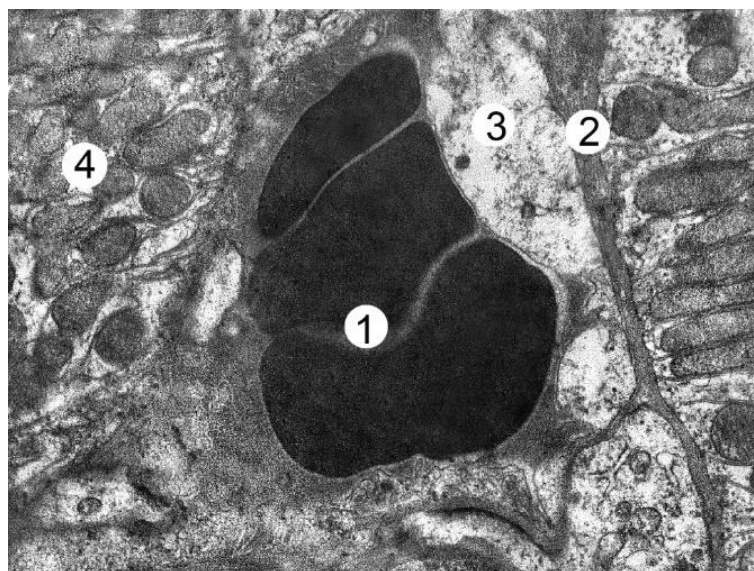


Рис. 5.23. Субмікроскопічні зміни епітеліоцита і гемокапіляра кіркової речовини нирки миші лінії BALB/c при експериментальному АФС. Кровонаповнений просвіт капіляра (1), базальна мембрана (2), набрякла цитоплазма ендотеліоцита (3), цитоплазма базальної частини епітеліоцита каналця (4). $\times 12\,000$

За умов АФС суттєві деструктивно-дегенеративні зміни виявляються у нефроцитах каналців нефронів, у клітинах проксимального відділу нефрона

визначалися електронносвітлі ділянки, позбавлені органел, або їх фрагменти. Порушується впорядковане паралельне розташування мітохондрій, вони мають гомогенний електроннощільний матрикс та редуковані кристи. Мікроворсинки апікальної поверхні клітин змінені, деформовані, частково фрагментовані та лізовані. Ядра мають переважно базальне розміщення, в них переважає гетерохроматин, що утворює грудки під каріолемою, рідко визначаються ядерця. Виявляються вкорочені і дезорієнтовані мембрани базальної частини клітин та змінене розміщення між ними мітохондрій (див. рис. 5.23).

Для нефроцитів дистальних відділів нефрона характерні значний набряк та просвітлення апікальних відділів клітин, ці зони позбавлені органел або містять їх окремі фрагменти (рис. 5.24).

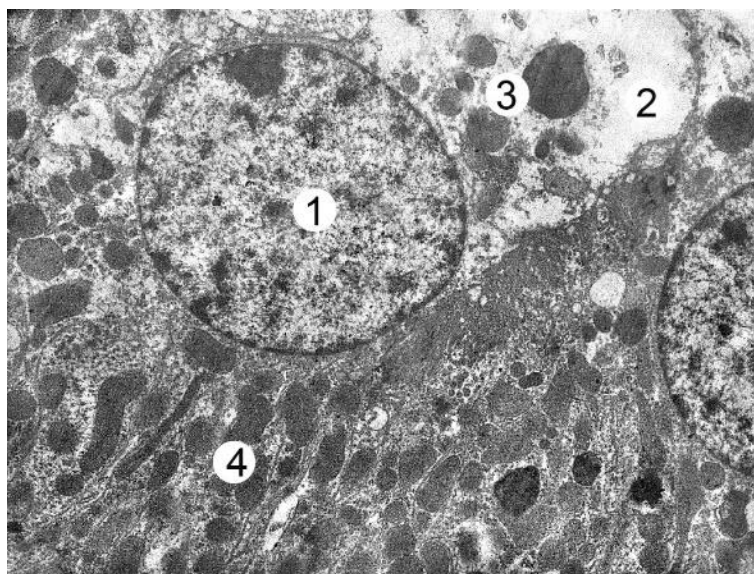


Рис. 5.24. Ультраструктурний стан епітеліоцита дистального відділу нефрона. Нирка миші лінії BALB/с за умов АФС. Ядро (1), просвітлена набрякла цитоплазма (2), осміюфільна вакуолеподібна структура (3), осміюфільні мітохондрії (4). $\times 11\,000$

Округлі ядра осміюфільні, в них переважає маргінально розміщений гетерохроматин. У базальній частині клітин порушене впорядковане розташування складок мембран базальної частини клітин та мітохондрій, деякі з

них гіпертрофовані, з просвітленим матриксом. Цитоплазма клітин містить великі осміюфільні вакуолоподібні структури. Базальна мембрана вузька, на окремих ділянках нечітко контурована (див. рис. 5.24).

Ультраструктурне вивчення кіркової речовини нирок за умов АФС при введенні аміногуанідину виявило менший ступінь деструктивних змін усіх складових нефрона, порівняно із печінкою тварин із модельованим АФС. Кровонаповнення гемокапілярів судинного клубочка ще наявне, проте не таке значне, як у попередній групі спостереження. Цитоплазма ендотеліальних клітин набрякла, однак чітко визначаються фенестри в цитоплазматичних ділянках. Відновлюється ультраструктурна організація тришарової базальної мембрани, проте на деяких ділянках вона потовщена, нечітка. Цитотрабекули набрякли, органели нечисленні. Мітохондрії містять матрикс помірної електронної щільності. Цитоподії мають неоднорідну структурну організацію, наявні як стоншені так і потовщені (рис. 5.25).



Рис. 5.25. Фрагмент гемокапіляра судинного клубочка ниркового тільця. Нирка миші лінії BALB/с за умов АФС та при застосуванні аміногуанідину. Ядро (1) і цитоплазма подоцита (2), базальна мембрана (3), ядро ендотеліоцита (4), просвіт капіляра (5), цитоподії (6). $\times 13\,000$

Субмікроскопічно в каналцях нирки за умов АФС та при застосуванні аміногуанідину спостерігається часткове відновлення структури епітеліоцитів, порівняно з групою тварин з АФС. У нефроцитах проксимальних і дистальних каналців визначаються округло-овальні ядра, в яких каріолема рівна, не утворює глибоких інвагінацій, мембрани чіткі, визначаються ядерні пори. В деяких ядрах спостерігаються великі ядерця як прояв відновних процесів та інтенсифікації обмінних процесів у органі.

У помірно набряклій цитоплазмі визначаються збільшені за розмірами мітохондрії, в яких кристи збережені, частково фрагментовані, каналці ендоплазматичної сітки незначно розширені, наявні численні рибосоми. Складки плазмолеми виявляються, проте розташовані вони невпорядковано. Базальна мембрана на основному протязі чітка, незначно потовщена.

Мікроворсинки апікальної поверхні епітеліоцитів каналців нефрона частково фрагментовані, однак не так значно, як у групі тварин з АФС (рис. 5.26).

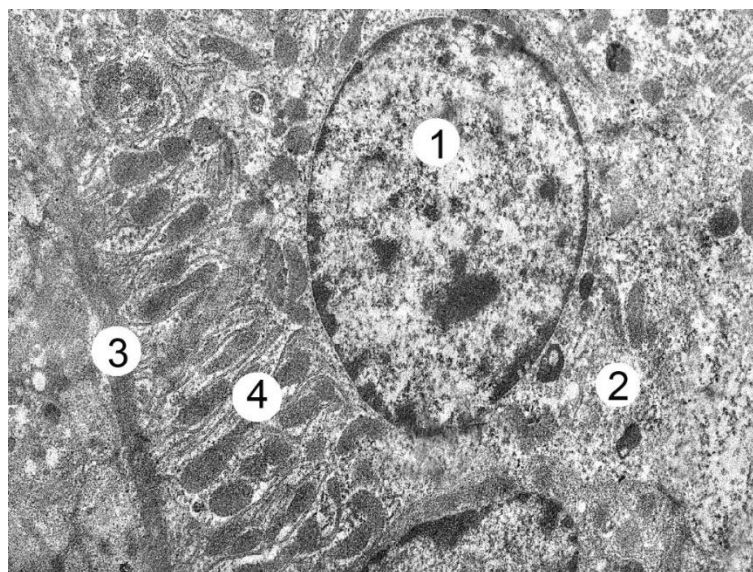


Рис. 5.26. Субмікроскопічні зміни епітеліоцита проксимального віділу нефрона. Нирка миші лінії BALB/с при АФС та застосуванні аміногуанідину. Базальна частина клітини. Ядро (1), цитоплазма епітеліоцита (2), базальна мембрана (3), базальна посмугованість (4). $\times 12\,000$

Базальна поверхня цитоплазми епітеліоцитів у дистальних відділах нефрона містить непротяжні мембранні складки, проте вони чітко контуровані. У базальних частинах цитоплазми епітеліоцитів дистальних звивистих каналців мембранні складки також непротяжні, а ті, що є, добре контуровані. Мітохондрії помірно набряклі, з просвітленим матриксом, розміщені впорядковано між складками плазмолеми, епітеліоцитів. Базальна мембрана потовщена, рівномірна (див. рис. 5.26).

Ультраструктурно в нирці за умов АФС при застосуванні L-аргініну спостерігається активна регенерація структурних компонентів органа. Кровоносні капіляри судинних клубочків ниркових тілець мають помірно розширені і кровонаповнені просвіти. Цитоплазма ендотеліальних клітин незначно набрякла, ядра видовженої форми, з чіткими контурами ядерних мембран (рис. 5.27).



Рис. 5.27. Ультраструктура судинного клубочка ниркового тільца. Нирка миші лінії BALB/с за умов АФС та при застосуванні L-аргініну. Просвіт капіляра (1), базальна мембрана (2), цитотрабекула (3), цитоподії (5). $\times 11\,000$

Також виявляються збільшені за розмірами ядра з незначними інвагінаціями каріолеми, в каріоплазмі яких переважає еухроматин, наявні

ядерця. Відновлюється ультраструктура тришарової базальної мембрани. В периферійних цитоплазматичних ділянках виявляються чітко структуровані фенестри. Подоцити внутрішнього шару капсули Шумлянського – Боумена без виражених змін деструкції, цитотрабекули формують невисокі цитоподії, які щільно прилягають до базальної мембрани (див. рис. 5.27).

Вивчення ультраструктурних змін каналців нефрона виявили відновлення структури епітеліоцитів, які вистеляють стінку каналців. Ядра клітин чітко контуровані, наявні численні ядерні пори. Каріоплазма клітин містить переважно еухроматин, виявляються великі ядерця, багато гранул рибосомального типу. Базальна мембрана чітка, не потовщена. Цитоплазма містить мітохондрії, кристи в яких добре контуровані. Відновлюються інші органели загального призначення (рис. 5.28).

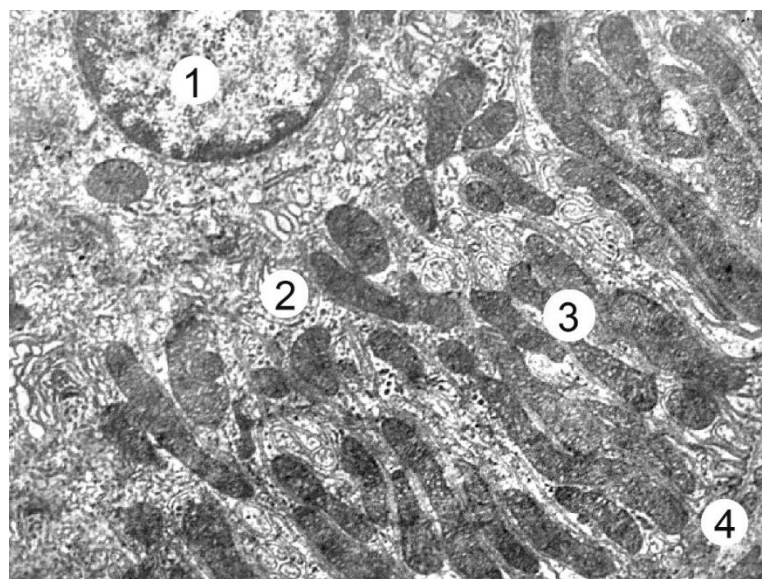


Рис. 5.28. Ультраструктура епітеліоцита дистального відділу нефрона. Нирка миші лінії BALB/с за умов АФС та при застосуванні L-аргініну. Ядро епітеліоцита (1), цитоплазма (2), мітохондрії (3), базальна мембрана (4). $\times 13\,000$

При вивченні субмікроскопічної організації складових структур нефрона при комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину встановлено найсуттєвіше покращення структурної організації компонентів клітин органа, порівняно з нирками тварин з АФС.

Кровоносні капіляри судинних клубочків з неширокими просвітами, в яких наявні поодинокі еритроцити, лейкоцити. Цитоплазма ендотеліальних клітин помірно осміофільна, ядра округло-овальні або видовжені, мембрани каріолеми чітко виражені, добре структуровані. Периферійні 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 (рис. 5.29).

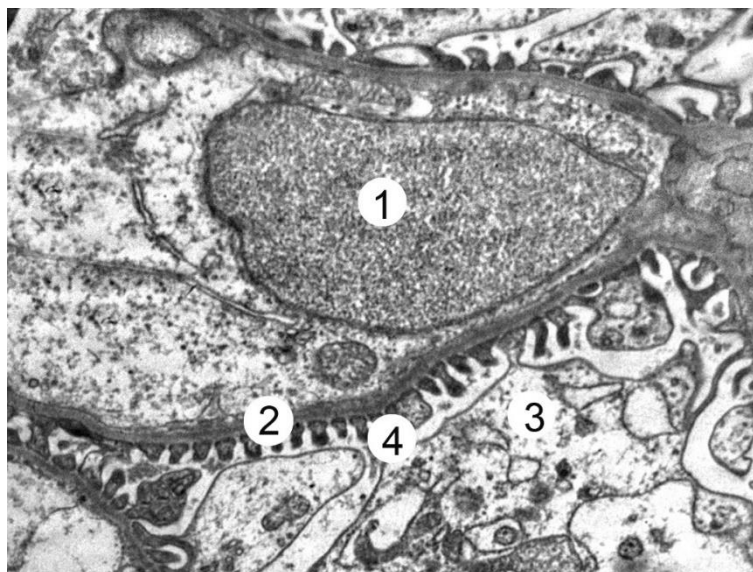


Рис. 5.29. Ультраструктура судинного клубочка ниркового тільця. Нирка миші лінії BALB/с за умов АФС та при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину. Ядро ендотеліоцита (1), базальна мембрана (2), цитотрабекула (3), цитоподії (4). $\times 13\,000$

Дослідження каналців нефрона у тварин з АФС, яким вводили L-аргінін у комбінації з аміногуанідином, виявили відновлення ультраструктурної

організації епітеліальних клітин. Епітеліоцити каналців мають округлі ядра, з чітко контурованими мембранами каріолеми, містять численні ядерні пори, в каріоплазмі рівномірно розміщений еухроматин, виявляються численні рибосомальні гранули та наявні ядерця. Апікальна частина клітин містить довгі мікроворсинки, структура яких збережена.

Складки мембран плазмолемі базальної частини клітин чітко виражені та формують базальну посмугованість, між ними впорядковано розміщені мітохондрії. Базальна мембрана збережена, чітка, не потовщена (рис. 5.30).

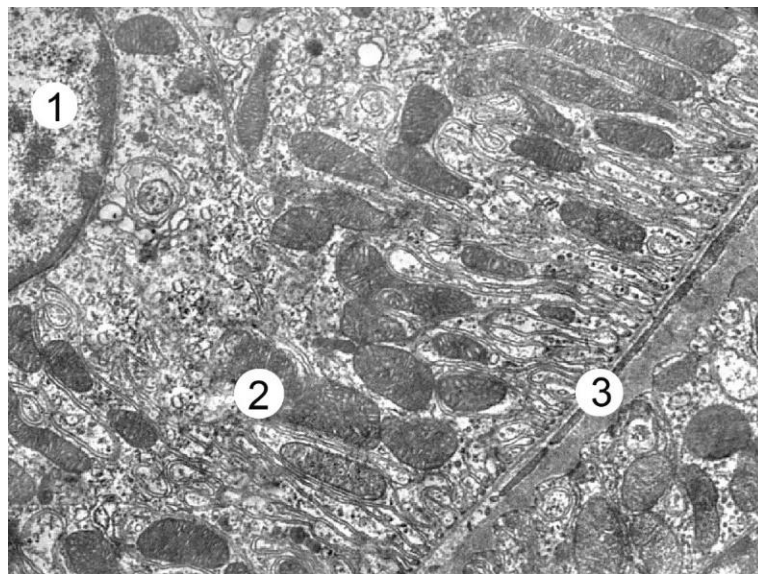


Рис. 5.30. Ультраструктура епітеліоцита нефрона. Нирка миші лінії BALB/с за умов АФС та при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину. Ядро епітеліоцита (1), гіпертрофовані мітохондрії (2), базальна мембрана (3). $\times 12\,000$

Проведенні дослідження показали, що при експериментальному АФС у нирці на фоні порушення мікроциркуляції у нирковому тільці та перитубулярній сітці розвиваються пошкодження структури епітеліоцитів проксимальних і дистальних каналців. Дестабілізація і деструкція плазматичних і органоїдних мембран негативно впливає на перебіг фаз сечоутворення, функціональні можливості органа.

Дослідження ультраструктурного стану компонентів нефронів тварин при застосуванні L-аргініну і аміногуанідину за умов АФС виявили менший ступінь їх пошкодження, ніж у нирках тварин без корекції. Краще збереження компонентів фільтраційного бар'єру, епітеліоцитів каналців нефрона забезпечує відносну нормалізацію фаз сечоутворення у нирках піддослідних тварин.

На основі аналізу результатів досліджень, представлених у цьому розділі, можна зробити такі висновки:

1. За умов експериментального антифосфоліпідного синдрому в печінці виявляються значні гемодинамічні розлади, що призводять до деструктивно-дегенеративних змін паренхіми органа. Встановлено протекторний вплив L-аргініну та аміногуанідину, особливо за умов їх комбінованого введення, на мікроциркуляцію, що супроводжується покращенням часточково-балкової організації печінки та свідчить про відновлення функціонування печінки мишей з АФС.

2. За умов експериментального АФС в печінці тварин розвиваються суттєві розлади судин мікроциркуляторного русла. Виявлені глибокі зміни всіх структурних компонентів часточок печінки. При окремому введенні L-аргініну та аміногуанідину за умов АФС встановлено менше пошкодження структурних компонентів часточок органа. За умов комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину при АФС відбувається покращення і нормалізація синусоїдних гемокапілярів та гепатоцитів печінки, зменшується пошкодження мембранних органел, ядерних і плазматичних мембран ендотеліоцитів та гепатоцитів.

3. За умов експериментального антифосфоліпідного синдрому в нирці порушується загальна гемодинаміка органа та мікроциркуляція у ниркових тільцях і перитубулярній кровоносній сітці, розвиваються деструктивні та дистрофічні зміни епітеліоцитів проксимальних і дистальних каналців. L-аргінін та аміногуанідин, особливо за умов їх комбінованого введення,

зменшують патологічні зміни компонентів нефрона, порівняно з групою тварин із АФС.

4. Дослідження ультраструктурного стану компонентів нефронів тварин за умов АФС показали порушення мікроциркуляції у нирковому тільці та перитубулярній сітці, пошкодження структури епітеліоцитів проксимальних і дистальних канальців. При введенні аміногуанідину і L-аргініну виявлено менший ступінь їх пошкодження, ніж у нирках тварин з АФС. За комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину відмічено найкраще збереження компонентів фільтраційного бар'єру, епітеліоцитів канальців нефрона тварин з АФС.

Наведені в цьому підрозділі результати досліджень опубліковано в таких наукових працях [123].

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

АФС – аутоімунне захворювання, що характеризується наявністю в крові антитіл до негативно заряджених фосфоліпідів мембран [22, 199, 239]. При взаємодії аФЛ із фосфоліпідами клітинних мембран важливу роль відіграють кофактори, які входять до складу білково-фосфоліпідних комплексів. Такими кофакторами можуть бути β 2ГПІ й інші білки, які беруть участь у регуляції згортання крові: протромбін (фактор II – фІІ), протеїн С, протеїн S, анексин I, II і V, тромбомодулін, фV, фVII/VIIa і фXII, високомолекулярний і низькомолекулярний кініноген, гепарин тощо. аФЛ, взаємодіючи з відповідними мембранозв'язаними білками, можуть змінювати кінетику прокоагулянтних і антикоагулянтних реакцій [18, 72]. Взаємодія антитіл із фосфоліпідами клітинних мембран призводить до порушення функцій клітин, процесів згортання крові [157]. При АФС аФЛ порушують баланс системи гемостазу, активуючи коагуляцію і тромбоцитарну ланку, блокуючи фібриноліз і антикоагулянтну систему, викликаючи ендотеліальну дисфункцію, активуючи процеси запалення, викликаючи імуноопосередковані порушення згортання крові [59, 72]. Зв'язування аФЛ з β 2ГПІ в ендотеліальних клітинах, моноцитах і тромбоцитах індукує передачу сигналів, здатних стимулювати прокоагулянтні та прозапальні зміни, експресію молекул адгезії і вивільнення тканинних факторів та інгібіторів фібринолізу [296].

АФС характеризується рецидивними венозними і артеріальними тромбозами, різними формами акушерської патології, тромбоцитопенією, різноманітними неврологічними, серцево-судинними, гематологічними та іншими порушеннями [19, 32, 41, 47, 86, 187, 231, 316, 370, 410].

АФС розвивається в 4–7 разів частіше у жінок, ніж у чоловіків, що, ймовірно, пов'язано з більшою схильністю жінок до системних захворювань сполучної тканини [100]. 22 % жінок з АФС мають в анамнезі тромбоз, 7 % – тромбоз судин мозку. Крім того, 24 % всіх тромботичних ускладнень

припадають на період вагітності і післяпологовий період. Високий ризик інвалідизації, порушення репродуктивної функції у жінок надає цій проблемі соціального значення [76, 100, 239].

Профілактика і лікування АФС є складною проблемою. Це обумовлено неоднорідністю патогенетичних механізмів, поліморфізмом клінічних проявів, а також відсутністю достовірних клінічних та лабораторних показників, що дозволяють прогнозувати рецидив тромботичних порушень [90].

Одним із основних та найнебезпечніших проявів АФС є ендотеліальна дисфункція, опосередкована аФЛ, що поєднується з рецидивним тромбозом [395, 404]. Відомо, що при АФС в ендотелії порушуються синтез та біодоступність нітроген оксиду (NO), який бере участь у регуляції судинного тонуусу і коагуляційних властивостей крові [188, 309]. Разом з тим, на моделі АФС, викликаного ліпополісахаридами, продемонстровано неоднозначну дію NO на скоротливу функцію міометрія під час вагітності. NO може бути релаксантом матки, якщо його концентрація невелика. Проте суттєве зниження його утворення призводить до спонтанних абортів та передчасних пологів. З іншого боку, гіперпродукція NO, опосередкована індукцибельною NO-синтазою, збільшує маткові скорочення і ризик невиношування вагітності [188, 257].

При АФС описано ураження різних органів та систем (нирок, серця, печінки, центральної нервової системи тощо), у виникненні якого також відіграє роль судинний компонент, зокрема ендотеліальна дисфункція [396, 404].

Незважаючи на те, що загалом патогенетичні аспекти АФС достатньо висвітлені, є лише поодинокі дослідження щодо участі NO у механізмах судинних ускладнень при АФС. Отже, встановлення патобіохімічних механізмів, зокрема ролі системи NO, у розвитку АФС та пошук ефективних методів корекції патологічних змін, які виникають при цьому, є актуальною проблемою.

Недостатність та суперечливість існуючих літературних даних щодо ролі системи NO у розвитку АФС спонукала нас до проведення досліджень з метою з'ясування ступеня залученості цієї системи до патобіохімічних механізмів

розвитку експериментального АФС, також до механізмів ураження структур центральної нервової системи, печінки та нирок при АФС. Крім безпосереднього вивчення компонентів системи NO при АФС, для з'ясування ролі змін її активності у розвитку патологічних змін застосовано попередник NO L-аргінін та інгібітор індукцйбельної NOS аміногуанідин.

L-аргінін – попередник NO – належить до групи умовно незамінних амінокислот і відіграє важливу роль у життєдіяльності організму. L-аргінін бере участь в окисному перетворенні за допомогою ензиму NOS до NO і цитруліну та в неокисному – за допомогою аргінази – до сечовини та орнітину [97, 148, 178, 197, 227]. Синтез NO є регульованим процесом і може гальмуватись інгібіторами NOS, зокрема аміногуанідином, який пригнічує індукцйбельну ізоформу ензиму [227].

АФС відтворювали за допомогою кардіоліпіну [35] на мишах-самках лінії BALB/c. Для підвищення імунної відповіді використовували повний та неповний ад'юванти Фрейнда. Для підтвердження валідності використаної експериментальної моделі АФС визначали наявність антикардіоліпінових антитіл за допомогою реакції мікропреципітації з кардіоліпіновим антигеном, що підтверджувало розвиток АФС [35].

Про стан системи гемостазу піддослідних тварин робили висновки за такими показниками: активований частковий тромбопластиновий час, протромбіновий час, протромбіновий індекс, міжнародне нормалізоване відношення, концентрація фібриногену, кількість тромбоцитів; про стан судинного ендотелію – за кількістю циркулюючих ендотеліальних клітин, електронномікроскопічними змінами; про стан системи NO – за вмістом eNOS та iNOS у сироватці крові та печінці, за вмістом стабільних метаболітів NO нітрит-аніона (NO_2^-) та нітрат-аніона (NO_3^-) у сироватці крові, тканинах мозку (мозочка та півкуль великого мозку), печінки та нирок; про процеси реалізації апоптозу – за визначенням кількості апоптотичних і некротичних клітин, рівнем АФО в лейкоцитах крові та вмістом каспази-3 і β -актину в печінці; про показники цитокінового профілю – за концентрацією IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-4 та IL-10;

про наявність оксидативного стресу в тканинах мозочка та півкуль великого мозку, печінки та нирок – за показниками вільнорадикального окиснення, активності та вмісту компонентів системи антиоксидантного захисту; про енергозабезпечувальні процеси у мітохондріях – за активністю сукцинатдегідрогенази та цитохромоксидази; про стан структур центральної нервової системи (мозочку та півкуль великого мозку) – за вмістом гліальних протеїнів (гліального фібрилярного кислого протеїну та основного протеїну мієліну), вмістом аутоантитіл до протеїнів головного мозку.

Результати проведених нами досліджень показали, що за умов експериментального АФС у мозочку, півкулях великого мозку, печінці та нирках відбувались порушення метаболічних процесів.

Аналіз одержаних даних свідчить про те, що у мишей з АФС знижувався вміст eNOS у крові в 1,2 раза та у печінці в 1,7 раза та зростав вміст iNOS у крові в 4,1 раза та у печінці у 2,2 раза, порівняно із показниками тварин контрольної групи. Аналогічна тенденція зберігалась у вагітних мишей з АФС. Встановлено, що на 18-й день вагітності у них знижувався вміст eNOS у крові в 1,7 раза та у печінці в 1,8 раза, порівняно із показниками тварин контрольної групи. Отримані результати узгоджуються з даними інших авторів, які підтверджують важливу роль ендотеліальної дисфункції у патобіохімічних механізмах розвитку АФС [200, 344, 396, 404] та порушення синтезу і біодоступності NO в ендотелії [153, 188, 257, 358]. Одним із механізмів виникнення патологічних змін є інгібування eNOS під впливом аФЛ [343, 358]. Водночас у вагітних мишей з АФС встановлено зростання вмісту iNOS у крові в 4,5 раза та у печінці в 3,5 раза, що, ймовірно, може бути спричинено зростанням продукції прозапальних цитокінів IL-1 β , IL-6 та TNF- α [380].

Отримані результати щодо зниження вмісту NO $_2^-$ та збільшення вмісту NO $_3^-$ у сироватці крові та печінці за умов АФС до вагітності та під час вагітності свідчать про дисрегуляцію синтезу NO та порушення функції ендотелію [67, 153]. J. Delgado Alves et al. на мишачій моделі АФС показали, що утворення аФЛ супроводжується зниженням рівня NO у плазмі крові [212].

За даними [153], при АФС середній рівень NO_2^- у плазмі крові знижується, тоді як середній вміст нітротирозину підвищується. Встановлено, що рівень нітратів плазми крові обернено пропорційний титрам аФЛ [153]. З іншого боку, за даними Д. В. Решетняк і співавт. [85], рівень нітратів сироватки крові підвищується у хворих на АФС з тяжкими тромботичними ускладненнями та у пацієнтів із системним червоним вовчаком.

Встановлено, що у групі вагітних та невагітних мишей з АФС відбувається зростання вмісту стабільних метаболітів NO у мозочку. У півкулях великого мозку мишей BALB/c з АФС виявлено зростання NO_2^- на 28 % та NO_3^- на 20 %, порівняно з контролем. Проте у досліджуваних зразках півкуль великого мозку вагітних мишей BALB/c за умов АФС відбувається достовірне зниження вмісту NO_2^- на 15 % та NO_3^- на 19 %, порівняно з контролем. Отримані нами результати досліджень узгоджуються з даними літератури про те, що синтез і біодоступність NO порушуються при акушерському АФС [76]. Це може бути пов'язано як із недостатністю субстрату для синтезу NO L-аргініну, так і з підвищенням рівня супероксиданіона, який швидко зв'язує й інактивує NO [67, 285].

Установлено, що за умов АФС у нирках вміст NO_2^- зростав в 1,9 раза, а NO_3^- – у 2,2 раза, порівняно з контролем. У мишей з АФС на 18-й день вагітності у нирках відбувалося збільшення вмісту NO_2^- у 1,9 раза та NO_3^- у 1,9 раза, порівняно із показниками вагітних тварин з АФС.

Отже, результати проведених нами досліджень свідчать, що за умов експериментального АФС у мишей лінії BALB/c виникає відносна недостатність NO, який синтезується під впливом eNOS, на фоні загальної гіперпродукції NO, який синтезується під впливом iNOS. Ймовірно, відбуваються зміни в клітинному розподілі eNOS, що спричиняє транслокацію eNOS в ядра гепатоцитів. Унаслідок цього у внутрішньопечінковій мікроциркуляції виникає парадоксальна ситуація: у крові, що притікає, міститься збільшений рівень NO, що створює додатковий тиск на стінку синусоїдів та вимагає подальшої активації eNOS і вироблення нітроген оксиду в ендотелії синусоїдів. Проте, цього не відбувається. Не виключено, що підвищений вміст

NO в крові, який притікає, за механізмом зворотного зв'язку інгібує експресію eNOS в печінці. Розвивається дефіцит вазодилатації, що сприяє зменшенню діаметра синусоїдів і збільшенню загальної портальної судинної резистентності. Таким чином, незважаючи на гіперпродукцію NO, виникає відносна його недостатність на рівні внутрішньопечінкової мікроциркуляції [69, 403], що підтверджується зниженням вмісту NO_2^- у печінці. Зростання рівня NO_3^- у сироватці крові, зумовлене, на нашу думку, активацією iNOS, вміст якої у печінці зростає.

Зниження активності eNOS лежить в основі підвищеної адгезії тромбоцитів до судинного ендотелію та виникнення тромбозів [343]. Індуковані аФЛ зміни ендотеліоцитів відіграють важливу роль в адгезії клітин до ендотелію [171, 212, 358]. Встановлено, що у тварин з АФС кількість десквамованих ендотеліоцитів зростає в 1,6 раза відносно контролю, а у вагітних мишей з АФС – в 2,4 раза.

При фізіологічній вагітності адаптаційною реакцією системи гемостазу є збільшення концентрації факторів згортання крові та функціональної активності тромбоцитів. При вагітності на фоні захворювань, що перебігають з порушенням системи гемостазу, ризик тромбоутворення в судинах організму вагітної та фетоплацентарного комплексу зростає [58].

Нами встановлено зниження кількості тромбоцитів у групі тварин з АФС та подальше їх зниження у вагітних мишей з АФС. Тромбоцитопенія трапляється у 28 % випадків первинного АФС і у 22 % випадків вторинного АФС [273]. Антитіла до фосфатидилсерину, взаємодіючи з фосфоліпідами мембран тромбоцитів і ендотеліальних клітин, викликають порушення, які провокують розвиток тромбозів та тромбоемболій [22]. У вагітних та невагітних тварин з АФС спостерігається підвищення концентрації фібриногену, що свідчить про схильність до гіперкоагуляції [28]. Підвищення концентрації фібриногену є одним із основних факторів ризику виникнення серцево-судинних захворювань, зокрема, призводить до розвитку тромботичних ускладнень та інфаркту міокарда [46]. На думку ряду авторів, розвиток гіперкоагуляції

й уповільнення фібринолізу обумовлені, в основному, впливом тромбоцитарних і тканинних факторів згортання крові, в тому числі тих, які надходять з плаценти [28]. Є дані про зростання рівня фібриногену в крові хворих на СЧВ. Встановлено, що при СЧВ зростає позаклітинне фосфорилювання фібриногену, що корелює із активацією тромбоцитів. Дослідження демонструють участь аФЛ у розвитку тромбозів при СЧВ, але досі залишається незрозумілим механізм дії цих антитіл [14].

Встановлено, що у невагітних та вагітних мишей з АФС відбувається вкорочення АЧТЧ на 19 % та на 46 %, що свідчить про підвищену здатність до тромбоутворення [88]. За іншими даними [14], аФЛ можуть викликати збільшення активованого часткового тромбопластинового часу і протромбінового часу. Процеси гіперкоагуляції у вагітних з АФС у клініці, ймовірно, пов'язані з тим, що з 24 тижня гестації починає своє формування третє коло кровообігу [28].

Установлені вкорочення протромбінового часу, підвищення протромбінового індексу та зниження міжнародного нормалізованого відношення свідчать про гіперкоагуляцію та ризик тромбоутворення у самок з АФС до вагітності та при вагітності, що є одним із провідних патогенетичних моментів невиношування вагітності при цій патології [76].

Система цитокінів представлена рядом протеїнів або глікопротеїнів, які виробляються переважно активованими лімфоцитами і моноцитарно-макрофагальною системою, а також, меншою мірою, фібробластами, ендотеліальними, соматичними клітинами, клітинами ендометрія і трофобласта [57, 99, 118]. Одним із центральних прозапальних цитокінів при АФС є TNF- α , рівень якого відображає патологічні процеси в ендотеліальних клітинах. аФЛ і TNF- α можуть активувати ендотелій та індукувати протромботичний фенотип ендотеліальних клітин, що призводить до збільшення вироблення тромбіну. Активація ендотеліальних клітин викликає підвищення регуляції TF, що було запропоновано як основний потенційний механізм тромбозу, пов'язаного з АФС [381]. Отримані нами результати

про підвищення концентрації прозапальних цитокінів IL-1 β у 3,2 раза, IL-6 у 2,3 раза, TNF- α в 4,5 раза у сироватці крові експериментальних тварин з АФС узгоджуються з даними інших авторів [170, 232, 225]. За даними Н. В. Середавкиной [91], рівень IL-6 у пацієнтів з АФС був достовірно вищим, ніж у контрольній групі. Причому в пацієнтів із позитивними аФЛ (з АФС і без нього) була виявлена пряма кореляція між величинами IL-6 і TNF- α [91]. У дослідженнях на експериментальній моделі мишей з АФС продемонстровано важливу роль TNF- α у патогенезі індукованих аФЛ втрат плода [2]. Не з'ясовано до кінця, чи аФЛ діють на ендотеліальні клітини безпосередньо, чи через посередництво TNF- α . Незалежно від механізму, протромботичний стан, типовий для АФС, пов'язаний як із значно підвищеними рівнями аФЛ, так і з підвищеними концентраціями TNF- α [297]. Як свідчать результати дослідження R. R. Forastiero і співавт. [232], рівень IL-6 у пацієнтів з АФС та носіїв аФЛ був вищий, ніж у контрольній групі. Концентрація TNF- α була однаковою у хворих з АФС та носіїв аФЛ, але вищою, ніж у групі контролю.

Крім загальноприйнятого шляху Th1, цитокіни Th2 відіграють ключову роль у механізмах розвитку АФС, а саме IL-4 та IL-10 [8, 373]. Приєднання аФЛ до поверхні ендотеліальних клітин, крім активації факторів тромбоутворення, пригнічує синтез ендотелієм протизапальних цитокінів [13, 242]. Встановлено зниження концентрації IL-4 в 1,9 раза та IL-10 у 2,2 раза у сироватці крові мишей лінії BALB/c з АФС, порівняно із показниками контролю. За даними [373], маркери ендотеліальної дисфункції позитивно корелювали з рівнем IL-4 при АФС, що дозволяє припустити, що завдяки активації гуморальної та клітинної імунної відповіді зниження рівня IL-4 відіграє ключову роль у розвитку ендотеліальної дисфункції, атеросклерозу, артеріальних та венозних тромбозів. За результатами дослідження [297], рівні цитозольних IL-10 і гамма-інтерферону (IFN- γ) у мишей з АФС були нижчими на 6 та 15 тижні, але зростали на 24-й тиждень після імунізації. Рівень IL-10, який відіграє важливу роль

в аутоімунних захворюваннях, у сироватці крові пацієнтів з АФС також знижувався [373].

Порушення цитокинового балансу з переважанням прозапальних цитокінів може обумовлювати порушення нормального розвитку трофобласта, що зумовлює ризики переривання вагітності [118]. Антитіла проти β 2ГПІ активують продукцію цієї групи цитокінів під час вагітності, що може провокувати запалення і загибель клітин трофобласта [57, 104, 194]. У вагітних мишей лінії BALB/c з АФС встановлено зростання концентрації прозапальних цитокінів IL-1 β у 4,6 раза, IL-6 у 3,5 раза, TNF- α у 4,8 раза та зниження концентрації протизапальних цитокінів IL-4 у 2,1 раза та IL-10 в 1,7 раза, порівняно із показниками контрольної групи.

У дослідженні [151] було повідомлено про підвищення рівня TNF- α у сироватці крові жінок, які страждають від викиднів. Водночас у вагітних жінок із нормальним перебігом вагітності рівень IL-6 у сироватці крові був високим, тоді як INF- γ і TNF- α були низькими. Отже, підвищення рівня цих цитокінів може бути предиктором викиднів [151].

При взаємодії аФЛ із фосфоліпідами мембран розвивається дисбаланс компонентів цитокинових і кінінових каскадів, реалізуються процеси апоптозу та некрозу [370, 383]. При АФС молекули кардіоліпіну можуть функціонувати як молекули самоантигену. Їх присутність на плазматичній мембрані апоптотичних клітин є важливим фактором для вироблення антикардіоліпінових антитіл. Таким чином, фосфоліпіди при апоптозі можуть бути важливим антигенним стимулом для продукування аФЛ. Більше того, молекулярні білково-фосфоліпідні комплекси, що утворюються під час апоптозу, є мішенню для «патогенних» аФЛ. Зв'язування та кліренс апоптотичних клітин цими аутоантитілами, ймовірно, ще більше посилює аФЛ-опосередковану імунну відповідь. Апоптотичні клітини можуть бути масивним джерелом антигену і являти собою тригер для генерації аФЛ [281].

У результаті проведених нами досліджень встановлено, що при АФС знижується життєздатність лейкоцитів крові вагітних та невагітних мишей лінії

BALB/c, порівняно з контролем. Їх смерть у тварин з АФС до вагітності більшою мірою зумовлена активацією апоптозу, а у тварин з АФС при вагітності – активацією процесів некрозу. Дослідженнями [396, 397] показано, що у мишей з АФС частіше виникала резорбція плодів, що супроводжувалось помітно індукованим тромбозом у плаценті, пов'язаним із посиленням процесів апоптозу. При цьому відмічалось зменшення кількості мітотичних клітин та гігантських клітин трофобласта і збільшення ущільнених клітин у децидуальній оболонці.

Виявлено перерозподіл між двома основними типами лейкоцитів у мишей за умов АФС із переважанням гранулоцитів (до вагітності зростання на 48 % та під час вагітності – на 55 %). Ймовірно, що це пов'язано із активацією запальних процесів [25, 207].

Отримані нами результати під час оцінки ступеня утворення АФО в лейкоцитах вагітних та невагітних мишей з АФС свідчать про зниження продукування АФО у гранулоцитах та агранулоцитах за умов АФС, що сприяє дисфункції імунокомпетентних клітин [263, 264, 393]. Не зважаючи на те, що АФО в основному розглядаються як пошкоджуючі фактори, останні дані свідчать про те, що АФО функціонують як важливі фізіологічні регулятори внутрішньоклітинних сигнальних шляхів. Специфічні ефекти АФО модулюються завдяки ковалентній модифікації залишків цистеїну, яка може призвести до зворотної модифікації ензимної активності. АФО регулюють різні фізіологічні параметри, починаючи від відповіді на стимуляцію фактором росту до генерування запальної реакції, і нерегульована сигналізація АФО може сприяти безлічі порушень [229]. За даними J. Delgado Alves et al., на експериментальній моделі АФС показали, що утворення аФЛ супроводжується посиленням оксидативним стресом у плазмі крові [212]. Інші вчені у експериментах *in vitro* продемонстрували, що анти- β 2ГПІ антитіла, залежно від дози, посилюють вироблення супероксидного аніон-радикала та TF у моноцитах, що сприяє активації системи зсідання крові [228].

Індукція та реалізація апоптозу вимагають взаємодії низки молекул, включаючи сигнальні молекули, рецептори, ензими та регуляторні білки. Важливою у механізмах апоптозу є сигнальна система каскаду каспаз, яка регулюється різними молекулами, такими як інгібітор білка апоптозу, білки родини Bcl-2 та кальпаїн [305]. Каспази розглядають як ефекторні молекули програмованої смерті клітин, зокрема каспаза-3 відіграє важливу роль у реалізації як мітохондріального, так і рецепторного шляху запуску апоптозу [63]. Саме оцінка активності каспаз-3 вважається одним з основних методів визначення рівня апоптозу [75]. У печінці мишей лінії BALB/c за умов АФС до вагітності та при вагітності встановлено зростання вмісту активної форми каспази-3 (p17) в 1,5 раза та у 2,9 раза відповідно, порівняно із показниками мишей контрольних груп. Водночас у печінці експериментальних тварин нами встановлено зростання вмісту β -актину, який бере участь у регуляції реалізації процесів апоптозу, стабілізуючи рецептори TNF- α [192].

Відомо, що при пошкодженні нервової тканини відбуваються інтенсивна проліферація та гіпертрофія астроцитів [102, 253, 278]. Не виключено, що тромботична оклюзія капілярів у поєднанні з легким запаленням може лежати в основі неврологічних дисфункцій, виявлених у мишей з АФС [420]. Астрогліоз характеризується активацією астроцитів, яка супроводжується зворотними змінами в експресії генів і гіпертрофією клітин, що при тяжких ушкодженнях може призвести до незворотного формування гліального рубця і зміни структури тканини. Водночас завдяки синтезу та секреції реактивними гліоцитами низки нейротропних речовин астрогліоз виконує нейропротекторну функцію. Надмірний гліоз та формування щільного гліального рубця можуть мати значні негативні наслідки для структурного та функціонального відновлення нервової тканини через надмірну експресію прозапальних факторів та розвиток ішемії [102, 278]. Філаментні структури, сформовані з GFAP, відіграють ключову роль у підтримці морфології астроцитів і стабілізації їх численних відростків. GFAP бере участь у гліально-нейронній взаємодії, мієлінізації нервових волокон, формуванні архітектури білої речовини,

підтримці цілісності гематоенцефалічного бар'єру в нормі та в умовах розвитку реактивного гліозу, індукованого різними нейротоксичними чинниками та нейропатологічними станами [102, 412].

Зростання вмісту GFAP у мозочку та півкулях великого мозку мишей BALB/c за умов АФС, свідчить про розвиток реактивного астрогліозу. У мозочку мишей з АФС до вагітності та при вагітності встановлено зростання загального вмісту GFAP у 2,8 раза та у 1,9 раза та ізоформи GFAP (37 kDa) у 6,4 раза та у 12,9 раза, порівняно із показниками тварин контрольних груп. Установлено, що в зразках півкуль великого мозку загальний вміст GFAP зростає в 1,2 раза, а вміст ізоформи GFAP (37 kDa) в 1,6 раза у групі тварин з АФС, відносно контролю. У зразках півкуль великого мозку тварин з АФС на 18-й день вагітності зростає загальний вміст GFAP в 1,6 раза та GFAP (37 kDa) в 1,4 раза, порівняно із показниками вагітних тварин без АФС.

Отримані нами результати узгоджуються з даними інших авторів, що пошкодження нервової тканини індукує інтенсивну проліферацію та гіпертрофію астроцитів, яка супроводжується прискореним синтезом GFAP і фібрилогенезом [102, 412]. Наявність більш низькомолекулярного поліпептиду GFAP (37 kDa) у зразках півкуль великого мозку та більшою мірою в тканині мозочка мишей BALB/c із експериментальним АФС свідчить про перебудову проміжних філаментів цитоскелета астроцитів.

Зміни вмісту GFAP при пошкодженні ЦНС вказують на ступінь пошкодження нервової тканини, а визначення цього протеїну в біологічних рідинах дозволяє робити висновки про перебіг деяких нейродегенеративних хвороб, що супроводжуються порушенням цілісності гематоенцефалічного бар'єру. Загальний рівень GFAP у різних відділах головного мозку нерівномірний і залежить від кількості астрогліальних клітин [102].

Основний протеїн мієліну – це один із нейроспецифічних протеїнів, який відіграє важливу діагностичну роль при цілому ряді захворювань ЦНС: травматичних, запальних, судинних, онкологічних та токсичних ураженнях [5]. МВР є одним із ключових структурно-функціональних компонентів мієлінової

оболонки. MBP характеризується надзвичайно високим вмістом (~25 %) основних амінокислот (аргінін, лізин і гістидин), рівномірно розподілених по всій довжині поліпептидного ланцюга. MBP відіграє важливу роль в організації та підтриманні структурної цілісності мієліну. Руйнування мієліну, як відомо, є універсальним механізмом реакції нервової тканини на пошкодження [202, 5].

Властивості MBP дозволяють пов'язати порушення його метаболізму з розвитком процесу демієлінізації [324, 402]. Деструкція білої речовини мозку супроводжується вивільненням MBP з ураженої тканини та накопиченням у цереброспінальній рідині, у зв'язку з чим рівень цього протеїну може бути чутливим індикатором ступеня тяжкості патологічного процесу. Проникаючи крізь гематоенцефалічний бар'єр, MBP та його фрагменти стимулюють синтез антитіл до компонентів мієліну, що підтримує перебіг захворювання. З іншого боку, відомо, що клітини мозку здатні до відновлення пошкодженої структури мієліну. Слід зазначити, що ремієлінізація може відбуватися лише на ранніх стадіях патології, але не у випадку хронічної стадії хвороби, при якій демієлінізація набуває незворотного характеру [324].

У результаті проведеного нами Вестерн-блот аналізу встановлено, що у мозочку невагітних та вагітних мишей за умов АФС рівень олігомерних форм MBP із молекулярною масою 95–110 kDa був збільшений у 5,3 раза та у 5,7 раза, порівняно із показниками контрольних груп. Імунореактивні зони у зразках півкуль великого мозку невагітних та вагітних мишей BALB/c з АФС, які виявлялися антитілами проти MBP (95–110 kDa), достовірно не відрізнялися, порівняно із контрольними групами. Водночас встановлено значне зростання вмісту субодиниці MBP (18,4 kDa) у зразках півкуль великого мозку тварин з АФС – у 256 разів, а в групі вагітних тварин з АФС – в 1935 разів. Субодиниця MBP (18,4 kDa) з'єднує цитозольні поверхні мембран олігодендроцитів і утворює двовимірну структуру, яка обмежує дифузію білка в компактний мієлін. Цей білок виконує додаткові ролі, включаючи зв'язування з SH₃-доменами, участь у опосередкованих Fyn-сигнальних шляхах та підтримку гомеостазу кальцію [250].

Отримані нами результати вказують на активацію процесів ремієлінізації у мишей з експериментальним АФС, що можна розглядати як компенсаторну відповідь на пошкодження [5]. Підсилення деградації МВР у тварин з експериментальним АФС на фоні розвитку реактивного астрогліозу може бути одним із шляхів активної перебудови компонентів пошкоджених мієлінових оболонок. Отримані результати узгоджуються з літературними даними, які демонструють, що демієлінізація, яка супроводжується запальним процесом, призводить до реактивації астроглії головного мозку [274]. Астроцити можуть виконувати функції антиген-презентуючих клітин, активуючи Т-лімфоцити, що відповідають за продукцію антитіл до власного МВР. З іншого боку, клітини реактивної астроглії продукують численні фактори росту, зокрема, CNTF, які захищають олігодендроцити від апоптозу, деструкції речовини мієліну та демієлінізації [268].

При пошкодженні білої речовини мозку при АФС можуть мати значення нейроспецифічні антитіла (антитіла до основного протеїну мієліну, гліального фібрилярного кислого протеїну і нейроспецифічної енолази) [41]. Водночас визначення аутоантитіл у сироватці крові до протеїнів нервової тканини має важливе діагностичне значення у жінок під час вагітності [58, 95].

Концентрація антитіл класу IgG, які проникають через плацентарний бар'єр, у здорових жінок підтримується у вузьких рамках, тоді як у жінок, які страждають невиношуванням вагітності, мали в анамнезі випадки загибелі плода або народження дітей з вадами розвитку, концентрація ембріотропних антитіл виходить за межі фізіологічної норми більш ніж у 90 % випадків. Навіть невеликі відхилення (близько 10–15 % від норми) вмісту ембріотропних антитіл приблизно в одному з восьми випадків призводять до переривання вагітності або народження дитини з порушеннями, а підвищення їх рівня в два рази призводить до несприятливих наслідків більш ніж у 60 % випадків [1, 95]. Підвищення вмісту аутоантитіл пов'язане з невиношуванням вагітності і хронічною плацентарною недостатністю та гестозами [58, 74]. Залежність перебігу гестаційного процесу від вмісту визначених материнських антитіл

класу IgG у сироватці крові на сьогодні не викликає сумнівів. Проте залишається відкритим питання, які саме антитіла слід визначати в діагностичних цілях [1].

У результаті проведених досліджень виявлено, що у сироватці крові мишей BALB/c з АФС зростає вміст аутоантитіл у поліпептидних зонах з величинами молекулярних мас приблизно 120 kDa в 1,5 раза, 150 kDa в 2,5 раза та >170 kDa в 2,4 раза відносно контролю. Встановлено, що у сироватці крові мишей з АФС при вагітності зростає вміст аутоантитіл 120 kDa в 1,9 раза, 150 kDa в 4,4 раза та >170 kDa в 4,3 раза, порівняно з аналогічними показниками у групі вагітних тварин без АФС. Отримані результати свідчать про збільшення вмісту антитіл до власних протеїнів головного мозку в мишей лінії BALB/c з АФС, причому їх кількість у вагітних мишей з АФС переважає таку в інтактних тварин та у вагітних тварин без АФС.

Однією із ланок, що беруть участь у патогенезі АФС, є розвиток оксидативного стресу [212, 325]. Нами встановлено, що у досліджуваних відділах головного мозку (мозочку та півкулях великого мозку) мишей лінії BALB/c за умов АФС до вагітності та на 18-й день вагітності відбувається активація вільнорадикальних процесів, про що свідчило збільшення вмісту ГПЛ та ТБК-АП. Інтенсифікація вільнорадикального окиснення поєднується з дискоординацією в системі прооксиданти – антиоксиданти (зниження активності СОД, КАТ та вмісту G-SH), що призводить до розвитку оксидативного стресу [17, 367]. Вказані зміни супроводжувались порушенням тканинного дихання у мозочку та півкулях великого мозку, про що свідчило зменшення активності мітохондріальних СДГ та ЦХО, порівняно з показниками контрольних груп. Проте у півкулях великого мозку тварин з АФС на 18-й день вагітності активність СДГ та ЦХО достовірно не змінювалась, порівняно з показниками вагітних мишей без АФС.

Встановлено, що у печінці тварин з АФС також відбувалась активація вільнорадикальних процесів, спостерігалось збільшення вмісту ГПЛ на 52 % та ТБК-АП – на 36 %, порівняно з контролем. Встановлено також компенсаторне зростання активності СОД на 45 % та КАТ на 26 %, але зниження вмісту G-SH

у печінці мишей при АФС, порівняно із показниками інтактних тварин. Отримані результати узгоджуються із даними [325]. Відомо, що збільшення продукування супероксидного аніон-радикала на початкових етапах розвитку оксидативного стресу може індукувати зростання активності СОД [65]. Про порушення функціонування дихального ланцюга мітохондрій у печінці тварин з АФС свідчило зменшення активності СДГ на 24 % та ЦХО на 39 %, порівняно з контролем. На 18-й день вагітності у печінці тварин з АФС встановлено зростання вмісту ГПЛ у 1,5 раза, ТБК-АП – у 2,0 рази. Водночас спостерігалось достовірне зниження активності СОД у 1,7 раза і КАТ – у 1,6 раза та вмісту G-SH у 1,6 раза, порівняно з контрольною групою вагітних мишей. У групі вагітних тварин з АФС у печінці також виявлено зменшення активності СДГ та ЦХО.

Отримані у біохімічних дослідженнях результати підтверджуються проведеними гістологічними та субмікроскопічними дослідженнями. Встановлено, що за умов експериментального АФС у печінці тварин розвивалися суттєві розлади судин мікроциркуляторного русла, гемодинамічні розлади, які призводили до деструктивно-дегенеративних змін структурних компонентів часточок печінки.

Встановлено, що у нирках мишей з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності також активуються процеси пероксидного окиснення ліпідів, що проявляється порушенням дисбалансу в системі прооксиданти – антиоксиданти та порушенням процесів тканинного дихання. Отримані результати можна пояснити тим, що при активації процесів переокиснення мембранних ліпідів, у тому числі, знижується енергозабезпечення клітин внаслідок пошкодження мітохондрій [375]. Встановлено, що за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому в нирці порушується загальна гемодинаміка органа та мікроциркуляція у ниркових тільцях і перитубулярній кровоносній сітці, розвиваються деструктивні й дистрофічні зміни епітеліоцитів проксимальних і дистальних каналців. Дослідження ультраструктурного стану компонентів нефронів тварин

за умов АФС показали порушення мікроциркуляції у нирковому тільці та перитубулярній сітці, пошкодження структури епітеліоцитів проксимальних і дистальних каналців.

За даними [73], порушення функції нефроендотеліоцитів підсилює продукцію ренального фактора Віллебранда, молекул клітинної адгезії і тромбомодуліну. Ендотеліальна дисфункція супроводжується дисбалансом активних судинних медіаторів, відповідальних за підтримання нормального тону судин, зміною антитромбогенної активності судинної стінки. Пошкодження стінки капілярів клубочків збільшує проходження макромолекул через мезангій, а підвищений синтез вазоконстрикторів (ЕТ-1, ТхА2) сприяє експресії широкого спектра факторів росту, активуються ниркові фібробласти, накопичуються компоненти позаниркового матриксу і розвивається нефросклероз [73]. ВА вважається антитілом, найтісніше пов'язаним з АФС-нефропатією; також є дані про тісний кореляційний зв'язок АФС-нефропатії з антикардіоліпіновими антитілами (аКЛ). Більше того, частота ураження нирок значно вища у пацієнтів з подвійним чи потрійним підвищенням вмісту аФЛ. Висока поширеність АФС-нефропатії спостерігалася у пацієнтів, позитивних за ВА і аКЛ IgG. Підвищена експресія β 2ГП3, яка спостерігається в ниркових ендотеліальних клітинах пацієнтів із вовчаковим нефритом, відіграє важливу роль у розвитку АФС-нефропатії [18, 205, 365, 406].

За даними Насонова Е. Л. [67], у нирках хворих із АФС спостерігається потовщення інтими і гіперплазія середньої м'язової оболонки. У нирках можна побачити дистрофічні і некротичні зміни. Тромбоз ниркової вени при АФС може проявлятися протеїнурією, гематурією, олігурією і анурією внаслідок гострого пошкодження нирок. Найчастішим проявом тромбозу ниркової артерії є гіпертензія [18, 391].

Порушення синтезу NO та біодоступності L-аргініну при АФС в ендотелії може бути пов'язано як із недостатністю субстрату для синтезу NO – L-аргініну, так і з утворенням підвищеного рівня O_2^{\bullet} , який швидко зв'язує і інактивує NO [67, 188, 285, 394]. При дослідженні екзогенного постачання

субстрату для реакції утворення NO встановлено, що за введення попередника NO L-аргініну тваринам з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності відбувалось зростання вмісту eNOS у крові (відповідно в 1,5 раза та 1,9 раза) та у печінці (в 1,9 раза та 3,7 раза), порівняно з показниками груп мишей з АФС. Водночас у невагітних та вагітних мишей з АФС, яким вводили L-аргінін вміст iNOS у крові достовірно не змінювався. При введенні L-аргініну в печінці встановлено зменшення вмісту iNOS у тварин з АФС до вагітності в 1,2 раза та у вагітних тварин з АФС в 1,3 раза, порівняно з показниками груп мишей з АФС.

При введенні L-аргініну в сироватці крові мишей лінії BALB/c з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності встановлено зростання вмісту стабільних метаболітів NO, порівняно з показниками невагітних та вагітних тварин з АФС. При введенні L-аргініну в мозочку, печінці та нирках мишей лінії BALB/c з АФС до вагітності також встановлено зростання вмісту стабільних метаболітів NO. При введенні L-аргініну мишам з АФС у півкулях великого мозку вміст NO_3^- збільшувався, порівняно з показниками тварин з АФС. У півкулях великого мозку тварин з АФС на 18-й день вагітності, яким вводили L-аргінін, вміст NO_2^- збільшувався на 29 %, а вміст NO_3^- – на 36 %, порівняно з показниками вагітних мишей з АФС. Введення L-аргініну вагітним тваринам з АФС у мозочку не супроводжувалося змінами вмісту NO_2^- , а вміст NO_3^- зростав, у печінці – встановлено зростання вмісту NO_2^- на 92 % та NO_3^- на 19 %, у нирках – встановлено зростання вмісту NO_2^- , а вміст NO_3^- достовірно не змінювався, порівняно з показниками вагітних тварин з АФС.

Встановлено, що при введенні L-аргініну тваринам з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності спостерігається зниження кількості циркулюючих десквамованих ендотеліоцитів у крові в 1,4 раза та в 1,8 раза, порівняно з показниками груп мишей з АФС.

У результаті виконаних досліджень з'ясовано, що при введенні попередника NO L-аргініну у тварин з АФС відбувається зростання кількості тромбоцитів на 51 %, порівняно з показниками в групі мишей з АФС.

У невагітних тварин з АФС, яким вводили L-аргінін встановлено зниження концентрації фібриногену. Водночас встановлено вкорочення АЧТЧ, що свідчить про підвищену здатність до тромбоутворення. Введення L-аргініну вагітним мишам з АФС супроводжувалося зниженням концентрації фібриногену, подовженням АЧТЧ у 2,1 рази, зростанням міжнародного нормалізованого відношення, порівняно з показниками вагітних тварин з АФС.

На сьогодні недостатньо відомостей про роль змін активності системи NO у балансі про- і протизапальних цитокінів при АФС. Відповідно, пошук серед модуляторів синтезу NO ефективних засобів корекції порушень, що виникають при вагітності на фоні АФС, є актуальним завданням. Важливість його підтверджується відсутністю єдиного погляду на роль системи NO у розвитку АФС. У результаті проведених експериментів встановлено, що при введенні попередника NO L-аргініну тваринам з АФС відбувається зниження вмісту IL-1 β та IL-6, порівняно з показниками тварин з АФС. За даними літератури [116], L-аргінін знижує рівень IL-6, що узгоджується з даними, отриманими у нашій роботі. Зниження концентрації TNF- α у тварин з АФС, яким вводили L-аргінін, можна пояснити тим, що L-аргінін бере участь у синтезі глутаміну, який відіграє важливу роль у метаболізмі, а також може знижувати рівень розчинних рецепторів TNF- α [97].

Метаболізм L-аргініну здійснюється шляхом окисного перетворення за участю NOS до NO та L-цитруліну і неокисного за участю аргінази до сечовини та орнітину. Секреція гуморальних протизапальних цитокінів IL-4, IL-10, IL-13 індукує експресію ензиму аргінази I. Аргіназа I регулює синтез NO шляхом зменшення доступності L-аргініну [116]. NO може індукувати синтез білка теплового шоку Hsp 70, який захищає гепатоцити від дії TNF- α [71].

Апоптотичні клітини відіграють роль імуногенів для індукції аФЛ, водночас фосфоліпіди та білково-фосфоліпідні комплекси, що утворюються під час апоптозу, є мішенню для аФЛ [155, 281, 290, 346]. NO індукує апоптоз за допомогою модуляції численних рецепторів сигнальних шляхів, включаючи рецептор смерті та мітохондріальні шляхи [179, 279]. NO бере участь

як у процесах апоптозу, так і некрозу, залежно від редокс-форми NO та його вмісту (високі рівні NO запускають некроз, тоді як тривалий вплив низьких концентрацій – апоптоз) [71].

При застосуванні попередника NO L-аргініну в лейкоцитах крові мишей лінії BALB/c з АФС знижувався показник AV-GFP+, який відповідає за ранній апоптоз, на 46 %, та вміст PI+-клітин, які характеризують інтенсивність некротичних процесів, на 41 %, відносно показників групи тварин з АФС. Антиапоптотична дія NO також включає як рецептор смерті, так і мітохондріальні шляхи апоптозу [360]. Ключовим регуляторним білком мітохондріального шляху апоптозу є Bcl-2, експресія якого регулюється посттрансляційними модифікаціями. Bcl-2 зазнає S-нітрозилювання, у відповідь на численні апоптотичні медіатори, і ця модифікація інгібує убіквітин-протеасомну деградацію Bcl-2. Інгібування продукції NO ефективно інгібує S-нітрозилювання Bcl-2 та сприяє загибелі апоптотичних клітин [162]. Показано, що під впливом донатора NO – нітропрусиду натрію – збільшується співвідношення Bax/Bcl-2 [163].

В індукції активації лейкоцитів при АФС відіграють роль медіатори запалення [207]. Встановлено, що при введенні L-аргініну тваринам з АФС у крові відбувалося подальше зростання кількості гранулоцитів, кількість агранулоцитів знижувалася на 25 %, відносно групи тварин з АФС. У вагітних мишей, яким вводили L-аргінін, встановлено зниження кількості гранулоцитів на 23 % та зростання кількості агранулоцитів на 34 %, відносно групи тварин з АФС на 18-й день вагітності.

Під час оцінки ступеня утворення АФО в лейкоцитах вагітних та невагітних мишей лінії BALB/c з АФС, яким вводили L-аргінін, встановлено зростання вмісту АФО у гранулоцитах та агранулоцитах, відносно показників груп мишей з АФС.

Дисбаланс між рівнями АФО та NO призводить до апоптозу та подальшої дисфункції ендотелію [362]. NO характеризується протективним ефектом на Fas-R-індукований апоптоз у гепатоцитах та в активованих Т-лімфоцитах [71].

Під впливом попередника NO L-аргініну у тканині печінки мишей з АФС встановлено зниження вмісту каспази-3 та β -актину, відносно групи тварин з АФС. У групі вагітних мишей з АФС введення L-аргініну також супроводжувалося зниженням вмісту каспази-3 на 44 % та β -актину в тканині печінки, відносно показників тварин з АФС на 18-й день вагітності. Ймовірно, що зниження вмісту каспази-3 у печінці вагітних та невагітних тварин з АФС, яким вводили L-аргінін, опосередковується цГМФ-залежною кіназою. Інші антиапоптотичні механізми дії NO пов'язані з індукцією синтезу білків теплового шоку HSP32 і HSP70, які пригнічують активність каспаз і стабілізують мембрани мітохондрій [227]. NO може інгібувати мітохондріальний шлях апоптозу через блокування вивільнення проапоптотичних білків: цитохрому c, AIF, Omi/HtrA2, Diablo/Smac [71].

Нейрони, які синтезують NO, складають близько 1–2 % від загальної кількості нервових клітин ЦНС і локалізуються у більшості відділів мозку. Відростки нейронів, що містять NOS, розгалужені так, що практично всі нейрони ЦНС розташовуються в межах декількох мікрометрів від джерела NO. Встановлено, що в головному мозку більшою мірою NO синтезується в мозочку і середньому мозку [61].

Показано чутливість мозочка до введення попередника NO L-аргініну за умов АФС, що підтверджується подальшим зростанням вмісту GFAP у мозочку мишей лінії BALB/c з АФС, яким вводили L-аргінін. Разом з тим, при введенні L-аргініну мишам з АФС на 18-й день вагітності у мозочку встановлено зниження загального вмісту GFAP на 23 % та ізоформи GFAP (37 kDa) на 71 %, порівняно із показниками групи вагітних мишей з АФС. Ймовірно, зниження вмісту ізоформи GFAP (37 kDa) у вагітних мишей з АФС відбувається завдяки антиоксидантним властивостям L-аргініну [62, 331].

Серед досліджених відділів мозку півкулі великого мозку виявилися менш чутливими, ніж мозочок, до дії попередника NO L-аргініну. Загальний вміст GFAP при введенні L-аргініну у зразках півкуль великого мозку мишей лінії BALB/c з АФС статистично не відрізнявся від значення групи тварин з АФС.

У півкулях великого мозку вагітних мишей з АФС, яким вводили L-аргінін, встановлено зниження загального вмісту GFAP та ізоформи GFAP (37 kDa), порівняно із показниками тварин з АФС на 18-й день вагітності.

В останні роки перспективним напрямком стало дослідження нейроспецифічних протеїнів, в тому числі MBR, з метою діагностики різних захворювань, що супроводжуються нейродеструктивними процесами [5, 202].

Як показали результати досліджень, при застосуванні попередника NO L-аргініну у мозочку мишей лінії BALB/c з АФС до вагітності та при вагітності не відбувається достовірних змін вмісту олігомерних форм MBR у діапазоні молекулярних мас 95–110 kDa, порівняно із показниками групи тварин з АФС. Встановлено, що введення L-аргініну не впливало на вміст MBR (95–110 kDa) у півкулях великого мозку невагітних мишей з АФС. При введенні L-аргініну тваринам з АФС у півкулях великого мозку мишей відбувалося подальше зростання вмісту субодиниці MBR (18,4 kDa) в 4,8 раза, порівняно із показниками групи тварин з АФС. Проте, при введенні L-аргініну тваринам з АФС на 18-й день вагітності у півкулях великого мозку відбувалося зниження олігомерних форм MBR (95–110 kDa) та субодиниці MBR (18,4 kDa), порівняно із показниками групи вагітних мишей з АФС.

Результати денситометричного аналізу показали, що у сироватці крові мишей лінії BALB/c з АФС, яким вводили L-аргінін, зростав вміст нейроспецифічних аутоантитіл у поліпептидних зонах 120 kDa, 150 kDa та >170 kDa, відносно групи тварин з АФС. У сироватці крові вагітних мишей лінії BALB/c з АФС, яким вводили L-аргінін, знижувався вміст аутоантитіл 120 kDa на 20 %, 150 kDa на 23 %, вміст аутоантитіл з молекулярною масою більше 170 kDa зростав на 43 % порівняно з показниками групи вагітних тварин з АФС.

Порушення балансу між вмістом АФО та компонентів АОС, рівноваги в системі прооксиданти/антиоксиданти призводить до оксидативного стресу за умов АФС [212, 285]. NO відіграє важливу роль у функціонуванні головного

мозку, він залучений як до вторинного пошкодження, так і до неврологічного відновлення [168].

Оскільки введення субстрату для синтезу NO L-аргініну тваринам з АФС у мозочку призводить до подальшої активації процесів вільнорадикального окиснення, зниження активності ензимів системи антиоксидантного захисту (СОД, КАТ) та електронотransпортного ланцюга мітохондрій (СДГ, ЦХО), порівняно із показниками групи тварин з АФС, отримані результати опосередковано підтверджують пошкоджувальну роль надлишкового утворення NO у розвитку оксидативного стресу в структурах ЦНС.

Введення L-аргініну вагітним мишам з АФС сприяло пригніченню активності процесів переокиснення мембранних ліпідів у мозочку. Встановлено зниження вмісту ГПЛ на 26 % та ТБК-АП на 12 %, порівняно з групою вагітних тварин з АФС, які не отримували L-аргінін. Про активацію системи антиоксидантного захисту в мозочку у цій групі свідчило підвищення активності СОД на 33 %, КАТ на 26 %. Також встановлено зростання активності мітохондріальних СДГ та ЦХО, порівняно із показниками групи вагітних мишей з АФС. Позитивний вплив попередника NO L-аргініну на показники оксидативного стресу в мозочку вагітних мишей з АФС, ймовірно, відбувається через його антиоксидантні властивості. Можна також припустити, що під час вагітності L-аргінін використовується більшою мірою для забезпечення функціонування плода, матки, плаценти, оскільки у мозочку при введенні L-аргініну вміст NO_2^- достовірно не змінювався, а вміст NO_3^- зростав незначно.

Вплив NO може регулюватися його клітинною локалізацією та рівнем оксидативного стресу в тканині [168]. Реактивні астроцити мають ряд молекулярних механізмів захисту від пошкодження [260], включаючи захист від оксидативного стресу за рахунок активації синтезу глутатіону; секреції нейропротекторних факторів; відновлення проникності гематоенцефалічного бар'єра і зменшення вазогенного набряку, захищають нейрони від токсичності NO за допомогою механізму, що залежить від системи глутатіону [193; 284, 405].

Як свідчать результати виконаних нами досліджень, при введенні L-аргініну у півкулях великого мозку тварин з АФС відбувається пригнічення активності процесів переокиснення мембранних ліпідів, що супроводжується зниженням вмісту ГПЛ та ТБК-АП, підвищенням активності СОД, КАТ та СДГ, порівняно із показниками групи тварин з АФС. У півкулях великого мозку вагітних мишей з АФС, яким вводили L-аргінін, встановлено зниження вмісту ГПЛ та ТБК-АП, підвищення активності СОД, КАТ та вмісту G-SH.

За результатами проведених нами експериментів встановлено, що у печінці мишей з АФС, яким вводили L-аргінін відмічено пригнічення активності процесів переокиснення мембранних ліпідів, що проявлялось зниженням вмісту ГПЛ, відносно тварин з АФС. Водночас встановлено зниження активності СОД, КАТ та зростання вмісту G-SH, порівняно із показниками групи тварин з АФС. Під впливом L-аргініну встановлено також зростання активності мітохондріальних ензимів СДГ та ЦХО у печінці, відносно групи тварин з експериментальним АФС. На фоні введення L-аргініну тваринам з АФС на 18-й день вагітності відбувається зниження вмісту ГПЛ та ТБК-АП, зростання активності СОД в 2,2 раза, КАТ в 1,7 раза та вмісту G-SH. Під впливом L-аргініну у печінці відбувається також зростання активності мітохондріальних ензимів СДГ на 24 % та ЦХО на 42 %, порівняно із показниками групи мишей з АФС на 18-й день вагітності. 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 [51, 168].

При проведенні гістологічних досліджень печінки у тварин з АФС, яким вводили L-аргінін, зберігаються дисциркуляторні порушення. Разом з тим, міжчасточкові, центральні під- і навколочасточкові вени були кровонаповнені меншою мірою, ніж у групі мишей з АФС. Синусоїдні капіляри помірно кровонаповнені переважно на периферії часточок, з чітко вираженими стінками. Порушення часточково-балкової організації печінки спостерігається переважно в периферійних ділянках часточки, меншою мірою – централобулярних.

При проведенні субмікроскопічних досліджень при застосуванні L-аргініну за умов АФС виявлено ознаки відновлення ультраструктури гепатоцитів, гемокапілярів часточок печінки та ендотеліальних клітин. Ядра ендотеліоцитів мають округло-овальну або довгасту форму. Ядерна ділянка цитоплазми цих клітин включає небагато невеликих за розмірами органел, які менш змінені, ніж при АФС. Дещо розширені каналці гранулярної ендоплазматичної сітки. Вузькі цитоплазматичні ділянки ендотеліоцитів мають добре виражені перфорації. У просторах Діссе виявляються добре контуровані мікроворсинки.

Одним з основних органів-мішеней при АФС є нирки [18, 205]. При введенні L-аргініну мишам з АФС встановлено пригнічення активності процесів переокиснення мембранних ліпідів у нирках: зниження вмісту ГПЛ і ТБК-АП, порівняно з показниками тварин з АФС. Встановлено зростання активності мітохондріальних ензимів СДГ і ЦХО, порівняно із показниками групи мишей з АФС. Відновлення балансу в системі прооксиданти – антиоксиданти у нирках при введенні L-аргініну вагітним мишам з АФС супроводжувалось зростанням активності ензимів СДГ на 21 % та ЦХО на 42 %.

Гістологічні зміни нирок тварин із експериментальним АФС, яким вводили L-аргінін, проявлялися зменшенням кровонаповнення судин органа із збереженням цілісності судинної стінки. При застосуванні L-аргініну зменшується кількість гіпер- і гіпотрофованих ниркових тілець, вони переважно звичайних розмірів, без проявів посиленого кровонаповнення. Спостерігаються незначні зміни проксимальних каналців, епітеліоцити дистального відділу нефрона без виразних деструктивних змін.

Субмікроскопічно в нирці встановлено, що за умов АФС при застосуванні L-аргініну в структурних компонентах нефрона відбувається реорганізація, що характерна для відносної регенерації й оновлення. Гемокапіляри судинних клубочків ниркових тілець мають помірні просвіти. Цитоплазма ендотеліоцитів помірної електронної щільності, ядра подовгастої форми і чітко контуровані. Наявні також гіпертрофовані ядра з невеликими інвагінаціями каріолеми, в каріоплазмі є ядерця і багато рибосомальних гранул. Базальна мембрана

відносно рівномірної товщини зі збереженою тришаровою будовою. Добре виражена фенестрація цитоплазматичних ділянок ендотеліоцитів. Зареєстровані позитивні зміни свідчать про відновлення структурно-функціонального стану ендотеліальних клітин гемокапілярів нирок під впливом L-аргініну.

Аміногуанідин – це конкурентний інгібітор індукцйбельної ізоформи NOS [238, 408]. При введенні аміногуанідину вміст iNOS знижувався у крові тварин з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності (в 2,4 раза та 4,0 раза) та у печінці (в 2,1 раза та 3,2 раза), порівняно з показниками мишей з АФС у відповідні терміни дослідження. Введення аміногуанідину не викликало достовірних змін вмісту eNOS у крові та печінці мишей лінії BALB/c з АФС до вагітності та при вагітності. У сироватці крові мишей з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності вміст NO_2^- достовірно не відрізнявся, а вміст NO_3^- знижувався на 56 % та 50 %. У мозочку тварин з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності, яким вводили аміногуанідин, знижувався вміст NO_2^- та NO_3^- . При введенні аміногуанідину тваринам з АФС у півкулях великого мозку знижувався вміст стабільних метаболітів NO, порівняно з показниками тварин з АФС. На 18-й день вагітності у півкулях великого мозку тварин з АФС, яким вводили аміногуанідин, вміст NO_2^- та NO_3^- достовірно не змінювався, порівняно із показниками вагітних мишей з АФС. У печінці вміст NO_2^- достовірно не змінювався до вагітності, а на 18-й день вагітності зростав. Вміст NO_3^- у печінці вагітних та невагітних мишей з АФС знижувався. Отримані результати можуть бути обумовлені порушенням нітритредуктазного балансу при блокуванні ферментативного синтезу NO [92]. У нирках тварин з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності, яким вводили аміногуанідин, знижувався вміст NO_2^- (на 61 % та 44 %) та NO_3^- (на 48 % та 45 %), відносно показників тварин з АФС.

Введення аміногуанідину не викликало достовірних змін показників кількості десквамованих ендотеліоцитів у вагітних та невагітних тварин з АФС.

Введення аміногуанідину мишам з АФС та вагітним мишам з АФС призводить до подальшого прогресування патологічних змін коагулограми. Отримані результати вкорочення протромбінового часу, подовження протромбінового індексу (на 40 %) та зниження міжнародного нормалізованого відношення у тварин з АФС при застосуванні аміногуанідину свідчать про гіперкоагуляцію та ризик тромбоутворення. Введення аміногуанідину тваринам з АФС на 18-й день вагітності супроводжувалося лише зростанням протромбінового індексу на 82 %, порівняно з показником вагітних мишей з АФС.

Введення аміногуанідину супроводжувалося зниженням лише концентрації TNF- α у вагітних та невагітних тварин з АФС й зростанням концентрації IL-4 у вагітних самок з АФС.

При введенні інгібітора iNOS мишам з АФС встановлено зниження вмісту AV-GFP+ на 38 % та вмісту PI+ на 37 % у лейкоцитах крові, порівняно із показниками тварин з АФС, що приводило до підвищення життєздатності лейкоцитів крові. Ймовірно, механізм пригнічення реалізації процесів апоптозу та некрозу в лейкоцитах крові за умов АФС може бути пов'язаний з інгібування iNOS [215]. При введенні аміногуанідину не встановлено достовірних змін кількості гранулоцитів у крові мишей з АФС, а кількість агранулоцитів знижувалася, порівняно із показниками групи тварин з АФС. Введення аміногуанідину вагітним мишам з АФС не впливало на кількість гранулоцитів та агранулоцитів у крові. При введенні аміногуанідину вміст АФО збільшувався у гранулоцитах на 21 % та в агранулоцитах на 31 %, порівняно із показникам тварин з АФС. У вагітних мишей з АФС не встановлено достовірних змін кількості гранулоцитів та агранулоцитів.

Як показали результати досліджень, введення мишам лінії BALB/c з АФС інгібітора iNOS аміногуанідину не викликало достовірних змін вмісту каспази-3, а вміст β -актину знижувався на 24 % у тканині печінки, порівняно із показниками тварин з АФС. Разом з тим, встановлено, що введення аміногуанідину вагітним мишам з АФС супроводжувалось зниженням вмісту

каспази-3 на 63 % та не впливало на вміст β -актину, порівняно із показниками мишей з АФС на 18-й день вагітності. За даними Dingman A. et al. [214], інгібування iNOS аміногуанідином пригнічує експресію каспази-3, що підтверджується результатами, отриманими у нашому дослідженні.

Регуляторний білок апоптозу мітохондріального шляху Bcl-2 зазнає S-нітрозилювання у відповідь на численні апоптотичні медіатори [162]. Підвищене співвідношення Bax/Bcl-2, у свою чергу, призводить до підвищення мітохондріальної проникності та вивільнення цитохрому c. Вивільнення цитохрому c з мітохондрій є важливим механізмом активації каспази-3 та ініціювання загибелі клітин у відповідь на «внутрішні» проапоптотичні подразники, включаючи оксидативний та нітрозативний стрес. Однак вплив NO на проникність мітохондрій та вивільнення цитохрому c залежить від його концентрації. Низький рівень NO зменшує мітохондріальну проникність, тоді як більш високі, ніж фізіологічні, концентрації прискорюють відкриття пор мітохондрій та вихід цитохрому c [185].

При АФС спостерігається підвищення активності індукбельної ізоформи NOS, яка може утворюватися в активованій мікроглії [214] та індукувати численні сигнальні шляхи і призводити до нейрозапалення [374]. При введенні інгібітора iNOS аміногуанідину невагітним та вагітним мишам лінії BALB/c з АФС у мозочку встановлено зниження загального вмісту GFAP на 30 % та 26 % та ізоформи GFAP (37 kDa) на 81 % та 89 % відповідно. Встановлено, що при введенні тваринам з АФС аміногуанідину у зразках півкуль великого мозку відбувається зниження загального вмісту GFAP та ізоформи GFAP (37 kDa), порівняно із показниками групи тварин з АФС. Разом з тим, у півкулях великого мозку вагітних мишей з АФС, яким вводили аміногуанідин, не відбувалось достовірних змін загального вмісту GFAP, водночас встановлено зростання вмісту ізоформи GFAP (37 kDa), порівняно із показниками групи вагітних мишей з АФС. Отримані результати узгоджуються з даними про те, що аміногуанідин, як специфічний інгібітор iNOS, може мати профілактичний вплив щодо нейротоксичності [238].

Як показали результати досліджень, при застосуванні аміногуанідину у мозочку мишей лінії BALB/c з АФС до вагітності не відбувається достовірних змін вмісту олігомерних форм МВР (95–110 kDa), порівняно із показниками групи тварин з АФС. На 18-й день вагітності у мозочку тварин з АФС, яким вводили аміногуанідин зареєстровано зниження вмісту МВР (95–110 kDa) на 43 %, порівняно з показниками вагітних тварин з АФС. При застосуванні аміногуанідину в тканині півкуль великого мозку мишей лінії BALB/c з АФС до вагітності та при вагітності встановлено зростання вмісту субодиниці МВР (18,4 kDa) у 10 разів та в 1,6 раза, порівняно з показниками груп мишей з АФС.

При введенні аміногуанідину в сироватці крові вагітних та невагітних мишей з АФС знижувався вміст нейроспецифічних аутоантитіл 120 kDa, 150 kDa, вміст аутоантитіл з молекулярною масою більше 170 kDa достовірно не змінювався, порівняно з показниками груп тварин з АФС.

При введенні аміногуанідину встановлено послаблення активності процесів пероксидного окиснення мембранних ліпідів у мозочку мишей з АФС: знижувався вміст ГПЛ на 37 % і ТБК-АП на 14 %, відносно показників групи тварин з АФС. Про активацію системи антиоксидантного захисту при застосуванні аміногуанідину свідчило підвищення активності СОД на 74 % і КАТ на 92 %, зростав вміст G-SH на 11 %, порівняно з показниками мишей з АФС. Встановлено підвищення активності СДГ на 23 % та ЦХО на 44 %. В мозочку вагітних мишей з АФС, яким вводили аміногуанідин відбувається пригнічення активності процесів переокиснення мембранних ліпідів: зниження вмісту ГПЛ на 22 % та ТБК-АП на 25 %, порівняно із показниками групи вагітних тварин з АФС. Встановлено зростання активності СОД на 44 % та КАТ на 60 %, СДГ на 23 %, ЦХО на 77 % та вмісту G-SH на 16 %, порівняно з показниками групи вагітних тварин з АФС. Ймовірно, що нейропротекторний ефект відбувається через інгібування iNOS [203].

При введенні аміногуанідину у півкулях великого мозку встановлено зниження вмісту ГПЛ і ТБК-АП. Про активацію системи антиоксидантного

захисту свідчило підвищення активності СОД на 41 % і КАТ на 83 %, порівняно з показниками групи тварин з АФС. Водночас зростав вміст G-SH. Введення аміногуанідину супроводжувалося підвищенням активності ЦХО на 33 %, порівняно із показниками групи тварин з АФС. Отримані результати можна пояснити тим, що аміногуанідин пригнічує пероксидацію ліпідів, зменшуючи розвиток оксидативного стресу [203]. При введенні аміногуанідину встановлено послаблення активності процесів пероксидного окиснення мембранних ліпідів і відновлення активності та вмісту компонентів антиоксидантної системи у півкулях великого мозку вагітних мишей з АФС. Нейропротекторна роль аміногуанідину може реалізуватися через пригнічення утворення АФО, інгібування пероксидації ліпідів у клітинах і тканинах та запобігання апоптозу завдяки його антиоксидантним властивостям [146, 238].

Отже, аміногуанідин за умов експериментального АФС проявляє антиоксидантні властивості, його дія спрямована на відновлення активності та вмісту компонентів АОС, ензимів електронотransпортного ланцюга мітохондрій, зниження рівня ПОЛ у мозочку та півкулях великого мозку вагітних та невагітних мишей з АФС.

При застосуванні аміногуанідину в печінці мишей з АФС встановлено зниження вмісту ГПЛ на і ТБК-АП, порівняно з показниками групи тварин з АФС. Введення аміногуанідину не викликало достовірних змін показників системи антиоксидантного захисту в тварин з АФС. Водночас встановлено підвищення активності ЦХО, порівняно з показниками групи мишей з АФС. При застосуванні аміногуанідину в печінці мишей BALB/c з АФС на 18-й день вагітності не відбувається достовірних змін рівня продуктів вільнорадикального окиснення ліпідів (ГПЛ, ТБК-АП), активності ензимів антиоксидантного захисту (СОД, КАТ), тканинного дихання (СДГ, ЦХО) та вмісту G-SH, порівняно із показниками групи вагітних мишей з АФС.

При гістологічному дослідженні печінки тварин з АФС, яким вводили аміногуанідин, виявили порушення часточково-балкової організації органа

та розлади кровообігу, які суттєво не відрізнялись від змін, зареєстрованих у групі мишей з АФС.

Субмікроскопічні зміни гепатоцитів при застосуванні аміногуанідину за умов АФС подібні до тих, які зареєстровано у групі тварин з АФС, хоча мають не такий значний ступінь ультраструктурної деструкції. Разом з тим, у потовщених, набряклих ділянках цитоплазми ендотеліоцитів розташовано небагато органел. Невеликих розмірів округлі мітохондрії цих клітин включають електроннопрозорий матрикс, у якому мало крист. Простори Діссе нерівномірні, кількість мікроворсинок в них невелика. В складі стінки ендотеліальних клітин наявні клітини Купфера, у цитоплазмі яких є лізосоми та фагосоми.

При застосуванні аміногуанідину встановлено зростання вмісту ГПЛ у нирках, порівняно з показниками тварин із АФС. Активність КАТ знижувалась, водночас зростала активність СОД та вміст G-SH, порівняно із показниками тварин з АФС. При введенні аміногуанідину мишам з АФС при вагітності у нирках відмічено зростання вмісту ТБК-АП з одночасним підвищенням активності КАТ на 21 % та вмісту G-SH – на 30 %, порівняно з аналогічними показниками вагітних мишей з АФС. Водночас встановлено зростання активності ЦХО на 26 %. Таким чином, при застосуванні аміногуанідину у мишей з АФС спостерігається подальша інтенсифікація вільнорадикального окиснення, що поєднується із активацією антирадикального та антиоксидантного захисту.

Мікроскопічні зміни нирок тварин з АФС, яким вводили аміногуанідин, проявляються розширенням і кровонаповненням багатьох судин, переважно дрібних артерій кіркової речовини. Електронномікроскопічні дослідження кіркової речовини нирок тварин за умов АФС при введенні аміногуанідину виявили менші зміни компонентів нефрона, ніж у групі тварин з АФС. Дослідження ультраструктурної організації ниркових тілець встановили помірне розширення і кровонаповнення просвітів гемокапілярів судинного клубочка. Цитоплазма ендотеліоцитів вогнищево набрякла і просвітлена, але наявна фенестрація цитоплазматичних ділянок. Базальна мембрана потовщена,

проте зберігає тришарову будову. Цитотрабекули подоцитів потовщені, мають помірної електронної щільності цитоплазму, органел у ній небагато. В мітохондріях матрикс помірної осміофілії, але в частині їх – світлий, є пошкодження крист.

Наступним завданням нашого дослідження було встановлення впливу L-аргініну та аміногуанідину при їх комбінованому застосуванні за умов АФС.

При комбінованому застосуванні L-аргініну з аміногуанідином у тварин з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності встановлено зростання вмісту eNOS у сироватці крові (в 1,4 раза та 2,2 раза) та печінці (в 2,4 раза та 4,1 раза), порівняно з показниками груп невагітних та вагітних мишей з АФС. Водночас встановлено зниження вмісту iNOS у сироватці крові (в 3,2 та 3,8 рази) та печінці (на 2,3 раза та 3,3 раза), що привело до нормалізації вмісту стабільних метаболітів нітроген оксиду NO_2^- та NO_3^- у крові і в досліджуваних органах при експериментальному АФС до вагітності та на 18-й день вагітності.

У сироватці крові тварин з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності, яким вводили L-аргінін у комбінації з аміногуанідином, вміст NO_2^- збільшувався на 25 % та 38 %, а вміст NO_3^- знижувався на 35 % та 29 %, порівняно з показниками мишей з АФС. При комбінованому застосуванні попередника NO L-аргініну та інгібітора iNOS аміногуанідину в мозочку вагітних та невагітних мишей BALB/c з АФС встановлено зниження вмісту NO_2^- та NO_3^- . У півкулях великого мозку тварин з АФС знижувався вміст NO_2^- та NO_3^- . На 18-й день вагітності при введенні L-аргініну в комбінації з аміногуанідином у півкулях великого мозку тварин з АФС зростав вміст стабільних метаболітів NO. У печінці тварин з АФС, яким вводили L-аргінін у комбінації з аміногуанідином, вміст NO_2^- збільшувався на 25 %, а вміст NO_3^- достовірно не змінювався, порівняно з показниками мишей з АФС. У печінці вагітних тварин з АФС, яким вводили L-аргінін у комбінації з аміногуанідином, вміст NO_2^- зростав на 186 %, а вміст NO_3^- знижувався на 40 %, порівняно з показниками вагітних мишей з АФС. У нирках тварин з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності,

яким вводили L-аргінін в комбінації з аміногуанідином, знижувався вміст стабільних метаболітів, порівняно з показниками тварин з АФС.

Як показали результати досліджень, при комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину відбувається нормалізація кількості циркулюючих десквамованих ендотеліоцитів. Установлено, що за комбінованого введення L-аргініну та аміногуанідину тваринам з АФС до вагітності спостерігається зниження кількості циркулюючих десквамованих ендотеліоцитів у крові в 1,5 раза, а на 18-й день вагітності – в 2,1 раза, порівняно з показниками груп мишей з АФС. Таким чином, на фоні інгібування індукцибельної NO-синтази аміногуанідином спостерігається збереження позитивного впливу L-аргініну на ендотелій судин при АФС.

Встановлено позитивний вплив застосування L-аргініну та аміногуанідину при їх комбінованому введенні на показники системи гемостазу за умов АФС. За комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину у невагітних та вагітних мишей з АФС встановлено зростання кількості тромбоцитів на 53 % та 39 %, зниження концентрації фібриногену на 18 % та 25 %, порівняно із показниками груп тварин з АФС. Встановлено, що у вагітних мишей з АФС, яким вводили L-аргінін у комбінації з аміногуанідином, відбувається подовження АЧТЧ на 59 % та зростання міжнародного нормалізованого відношення, порівняно з показниками групи тварин з АФС на 18-й день вагітності.

Порушення цитокінового балансу з переважанням прозапальних цитокінів може обумовлювати порушення нормального розвитку трофобласта, що зумовлює ризики переривання вагітності [118].

При застосуванні L-аргініну в комбінації з аміногуанідином встановлено достовірне зниження концентрації IL-1 β на 30 %, IL-6 на 16 %, TNF- α на 59 %, відносно показників групи тварин з АФС. Водночас зростала концентрація протизапальних цитокінів IL-4 на 35 % та IL-10 на 25 %, порівняно з показниками тварин з АФС. На 18-й день вагітності при застосуванні L-аргініну та аміногуанідину встановлено зниження концентрації IL-1 β , IL-6,

TNF-а та зростання концентрації IL-4 та IL-10, порівняно з показниками групи вагітних тварин з АФС. Отже, на фоні інгібування індукцйельної NO-синтази аміногуанідином спостерігається збереження позитивного впливу L-аргініну на цитокіновий профіль, змінений при АФС. Більше того, при застосуванні такої комбінації чинників корекції спостерігалось суттєве наростання рівня протизапальних цитокінів, порівняно з групою тварин, які отримували лише L-аргінін.

Відомо, що IL-1 β активує синтез IL-6 та iNOS, викликаючи підвищений синтез NO [419]. Прозапальні цитокіни TNF- α , IFN- γ , IL-2 також збільшують рівень iNOS [116].

Одним з найважливіших маркерів запалення є TNF- α [151]. Визначена провідна роль TNF- α як одного з головних медіаторів запальної відповіді у розвитку акушерських ускладнень при АФС [8, 59]. У дослідженні Aljameil N. et al. (2018) встановлено підвищення рівня TNF- α у сироватці крові жінок, які перенесли викидні, що підтверджується результатами, представленими у нашій роботі. Рівень IL-6 у сироватці крові був високим, тоді як IFN- γ і TNF- α були низькими у вагітних жінок із нормальним перебігом вагітності. аФЛ викликають швидке підвищення децидуальних та системних рівнів TNF- α . аФЛ збільшують TF в нейтрофілах, що посилює окислювальний вибух і, таким чином, активує механізми пошкодження трофобласта та втрати вагітності [147, 347]. Відомі різні механізми, через які TNF- α може спричиняти втрату вагітності. Зокрема, він підсилює синтез простагландинів, що призводить до скорочення матки [118]. Інший механізм – це участь TNF- α в процесах апоптозу. Підвищений рівень TNF- α негативно впливає на імплантацію ембріона і зменшує приплив крові до нього, що призводить до тромбозу в судинах. Підвищення рівня сироваткового TNF- α при АФС, описане у нашій роботі, підтверджується результатами дослідження Aljameil N. et al. (2018). Ці автори встановили, що у здорових вагітних відбувається зниження рівнів прозапальних цитокінів, таких як TNF- α , IL-1 β , та збільшення концентрації протизапальних цитокінів, зокрема IL-10.

За даними Венцківської І. Б. та ін. (2011), вагітні з АФС мали вірогідно менші концентрації протизапальних ІЛ-4 та ІЛ-10, ніж пацієнтки контрольної групи. Під час вагітності відбувається ряд змін, спрямованих на збереження вагітності і запобігання відторгненню плідного яйця, до яких належать посилення гуморального імунітету і продукції цитокінів Th2 (ІЛ-4, ІЛ-10) [118]. За даними Венцківської І. Б. та ін. (2011), роль протизапальних цитокінів при вагітності, крім пригнічення клітинної ланки імунної системи, полягає ще й в антагонізмі з прозапальними цитокінами відносно сполучнотканинних компонентів шийки матки. Своєчасна продукція NO під впливом іNOS та утворення АФО є критичними компонентами ефективної імунної відповіді [361].

При комбінованому введенні L-аргініну та аміногуанідину мишам з АФС встановлено зниження вмісту AV-GFP+ на 55 %, та вмісту PI+ на 31 % у лейкоцитах крові, порівняно із показниками тварин з АФС. Встановлено, що за умов АФС під час вагітності при комбінованому введенні L-аргініну та аміногуанідину спостерігається нормалізація показників життєздатності лейкоцитів. Відновлення рівноваги між кількістю гранулоцитів та агранулоцитів до рівня контролю відбувається під впливом комбінованого застосування L-аргініну й аміногуанідину у вагітних та невагітних мишей з АФС. При введенні L-аргініну в комбінації з аміногуанідином тваринам з АФС до вагітності та при вагітності встановлено зниження кількості гранулоцитів на 28 % та 39 % та зростання кількості агранулоцитів на 36 % та 77 %. Комбіноване застосування L-аргініну та аміногуанідину у мишей з АФС до вагітності та при вагітності призводило до зростання вмісту АФО у гранулоцитах на 32 % та 46 %, та в агранулоцитах на 16 % та 37 %, відносно тварин з АФС. Водночас відбувалася нормалізація показників вмісту АФО у гранулоцитах та агранулоцитах, порівняно з показниками тварин контрольної групи.

Установлено, що при комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину за умов АФС до вагітності та на 18-й день вагітності у тканині

печінки відбувається зниження вмісту каспази-3. Водночас встановлено зростання вмісту β -актину в тварин з АФС до вагітності та зниження вмісту β -актину у вагітних мишей з АФС. Результати дослідження показали, що за комбінованого введення L-аргініну та аміногуанідину вагітним мишам з АФС вміст каспази-3 та β -актину був нижчий, ніж у групі тварин з АФС на 18-й день вагітності, яким вводили окремо L-аргінін та аміногуанідин. Підтримання неактивної каспази-3 на низькому рівні шляхом S-нітрозилування пов'язане з пригніченням апоптозу [360, 378]. Таким чином, співвідношення між токсичними і захисними механізмами NO визначає його роль у пошкодженні клітин та механізмах розвитку апоптозу. Баланс між про- і антиапоптотичними сигнальними механізмами, їх активація або пригнічення в результаті синтезу NO, супроводжується або збереженням структури тканини, або загибеллю клітин у результаті апоптозу [227].

Враховуючи те, що при АФС виникає відносна недостатність NO, який синтезується eNOS, на фоні загальної гіперпродукції NO, що синтезується під впливом iNOS, наступним завданням нашого дослідження було встановлення можливості підвищення нейропротекторного впливу при комбінованому застосуванні аміногуанідину із L-аргініном.

При комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину в мозочку тварин з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності встановлено зниження загального вмісту GFAP та ізоформи GFAP (37 kDa), порівняно із показниками груп мишей з АФС. При порівнянні отриманих результатів у групі тварин з АФС, яким вводили L-аргінін у комбінації з аміногуанідином, із групою тварин з АФС, яким вводили окремо L-аргінін, у мозочку встановлено зниження загального вмісту GFAP на 44 % та ізоформи GFAP (37 kDa) на 66 %. Проте, встановлено зростання вмісту ізоформи GFAP (37 kDa) на 151 %, порівняно з показниками у групі тварин, яким вводили окремо аміногуанідин. На 18-й день вагітності при комбінованому введенні L-аргініну та аміногуанідину в мозочку мишей з АФС встановлено зниження загального вмісту GFAP (на 40 % та 38 %)

та ізоформи GFAP (37 kDa) (на 71 % та 26 %), порівняно із показниками вагітних тварин з АФС, яким вводили окремо L-аргінін та аміногуанідин.

При комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину в тканині півкуль великого мозку тварин з АФС не спостерігалось достовірних змін загального вмісту GFAP, а вміст ізоформи GFAP (37 kDa) знижувався, порівняно з показниками групи тварин з АФС. При комбінованому введенні L-аргініну та аміногуанідину у півкулях великого мозку мишей з АФС встановлено зростання загального вмісту GFAP на 20 %, відносно показників групи тварин з АФС, яким вводили окремо аміногуанідин. Водночас встановлено зниження вмісту ізоформи GFAP (37 kDa) на 25 %, порівняно із показниками мишей з АФС, яким вводили окремо L-аргінін.

У півкулях великого мозку вагітних мишей з АФС, яким вводили L-аргінін у комбінації з аміногуанідином, встановлено зниження загального вмісту GFAP та ізоформи GFAP (37 kDa), відносно показників групи вагітних тварин з АФС. При комбінованому введенні L-аргініну та аміногуанідину у півкулях великого мозку вагітних мишей з АФС встановлено зниження загального вмісту GFAP та ізоформи GFAP (37 kDa), порівняно із показниками вагітних тварин з АФС, яким вводили окремо L-аргінін та аміногуанідин.

аФЛ здатні впливати на проліферацію астроцитів [67]. NO через шлях GC-sGMP-PKG бере участь у регулюванні експресії GFAP в астроцитах. Підвищена експресія GFAP характеризує активацію астроглії та гліоз під час нейродегенерації [182].

При комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину у мозочку вагітних мишей з АФС встановлено зниження вмісту олігомерних форм МВР (95–110 kDa), відносно тварин з АФС. Встановлено, що при комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину вагітним мишам з АФС у мозочку вміст МВР (95–110 kDa) знижувався на 34 %, порівняно з показниками тварин з АФС на 18-й день вагітності, яким вводили L-аргінін.

Встановлено, що при комбінованому застосуванні L-аргініну з аміногуанідином у півкулях великого мозку вміст субодиниці МВР (18,4 kDa)

зростав у 13 разів, порівняно з показниками групи мишей з АФС. Причому, при комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину у півкулях великого мозку вміст субодиниці МВР (18,4 kDa) зростав в 2,7 раза, порівняно з показниками тварин з АФС, яким вводили тільки L-аргінін.

Введення L-аргініну в комбінації з аміногуанідином мишам з АФС на 18-й день вагітності у півкулях великого мозку супроводжувалося зниженням вмісту олігомерних форм МВР (95–110 kDa) та зростанням вмісту субодиниці МВР (18,4 kDa), порівняно із показниками вагітних тварин з АФС. Встановлено, що при комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину вагітним мишам з АФС у півкулях великого мозку вміст субодиниці МВР (18,4 kDa) зростав на 192 % та на 42 %, порівняно з показниками тварин з АФС на 18-й день вагітності, яким вводили окремо L-аргінін та аміногуанідин.

Підсилення деградації МВР у тварин з АФС на фоні розвитку реактивного астрогліозу може бути одним із шляхів активної перебудови компонентів пошкоджених мієлінових оболонок.

Встановлено, що за комбінованого введення L-аргініну та аміногуанідину тваринам з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності у сироватці крові відбувається зниження нейроспецифічних аутоантитіл у поліпептидних зонах 120 kDa, 150 kDa та >170 kDa, відносно груп тварин з АФС. При порівнянні отриманих результатів у групах вагітних та невагітних тварин з АФС, яким вводили L-аргінін у комбінації з аміногуанідином, із групами тварин з АФС, яким вводили окремо L-аргінін та окремо аміногуанідин, у сироватці крові встановлено зниження аутоантитіл 120 kDa, 150 kDa та >170 kDa.

Враховуючи те, що при АФС виникає відносна недостатність NO, який синтезується під впливом eNOS, на фоні загальної гіперпродукції NO, що синтезується під впливом iNOS, наступним завданням нашого дослідження було встановлення можливості підвищення нейропротекторного впливу при комбінованому застосуванні аміногуанідину із L-аргініном.

Встановлено, що за комбінованого введення L-аргініну та аміногуанідину вагітним та невагітним мишам з АФС у мозочку відбуваються зниження процесів

вільнорадикального окиснення, активізація системи АОЗ, зростання активності мітохондріальних ензимів СДГ та ЦХО. Результати дослідження показали, що за комбінованого введення L-аргініну та аміногуанідину у мозочку тварин з АФС до вагітності відбувається гальмування процесів пероксидного окиснення ліпідів, про що свідчило достовірне зниження вмісту ГПЛ на 35 % та ТБК-АП на 40 %, порівняно з показниками мишей з АФС, яким вводили L-аргінін. Про активацію системи антиоксидантного захисту за комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину свідчило підвищення активності СОД на 223 %, КАТ на 123 % та вмісту G-SH на 56 %. Встановлено зростання активності СДГ на 46 % та ЦХО на 125 %, порівняно з показниками групи мишей з АФС, яким вводили L-аргінін. При комбінованому введенні L-аргініну та аміногуанідину в мозочку тварин з АФС на 18-й день вагітності встановлено зниження вмісту ГПЛ та ТБК-АП, зростання активності СОД, КАТ, СДГ, ЦХО та вмісту G-SH, порівняно з показниками вагітних мишей з АФС, яким вводили окремо L-аргінін та аміногуанідин.

На основі вищенаведених результатів можна зробити висновок, що при комбінованому використанні аміногуанідину з L-аргініном відбувається підвищення нейропротекторної активності аміногуанідину в мозочку вагітних та невагітних мишей за умов АФС.

При введенні L-аргініну в комбінації з аміногуанідином у півкулях великого мозку вагітних та невагітних мишей з АФС встановлено відновлення балансу показників системи прооксиданти – антиоксиданти та дихального ланцюга мітохондрій. Результати дослідження показали, що за комбінованого введення L-аргініну та аміногуанідину у півкулях великого мозку тварин з АФС спостерігалось гальмування процесів вільнорадикального окиснення, підвищення активності СОД (на 27 % та 18 %), ЦХО (на 44 % та 17 %) та вмісту G-SH (на 22 % та 13 %), порівняно з показниками мишей з АФС, яким вводили окремо L-аргінін та аміногуанідин. У півкулях великого мозку вагітних мишей з АФС, яким вводили L-аргінін у комбінації з аміногуанідином, спостерігалось зниження вмісту ТБК-АП (на 19 % та 28 %), підвищення активності СОД

(на 37 % та 62 %), КАТ (на 24 % та 45 %) та вмісту G-SH (на 10 % та 23 %), порівняно з показниками мишей з АФС на 18-й день вагітності, яким вводили окремо L-аргінін та аміногуанідин.

Отже, отримані результати свідчать про підвищення нейропротекторної активності L-аргініну та аміногуанідину при їх комбінованому застосуванні у півкулях великого мозку за умов АФС.

При комбінованому введенні L-аргініну та аміногуанідину вагітним та невагітним мишам з АФС встановлено підвищення гепатопротекторної активності L-аргініну, що проявляється зменшенням проявів оксидативного стресу в печінці, зниженням активності процесів пероксидного окиснення ліпідів, підвищенням активності та вмісту компонентів антиоксидантної системи та активності ензимів електронотранспортного ланцюга мітохондрій.

Мікроскопічне вивчення печінки мишей з АФС, яким вводили L-аргінін у комбінації з аміногуанідином, виявило, що зміни в органі супроводжуються помірним кровонаповненням судин як венозного так і артеріального русла органа, тільки в деяких міжчасточкових венах спостерігалось повнокров'я. За умов комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину при АФС ультраструктурно встановлений найбільш позитивний вплив на структурні компоненти часточок печінки. Субмікроскопічна організація ендотеліоцитів має типову будову. Подовгастої форми ядра включають каріоплазму, заповнену еухроматином, що обмежена каріолемою з чіткими ядерними мембранами. Ядерна ділянка цитоплазми ендотеліальних клітин включає невеликих розмірів добре структуровані органели. Помірно розширені короткі каналці гранулярної ендоплазматичної сітки та просвітлений матрикс окремих мітохондрій. Вузькі цитоплазматичні ділянки ендотеліоцитів мають багато піноцитозних пухирців, добре виражені перфорації. У просторах Діссе спостерігаються численні мікрроворсинки, вони добре контуровані.

Комбіноване введення L-аргініну та аміногуанідину при АФС та на 18-й день вагітності у тварин з АФС супроводжується зменшенням проявів вільнорадикального окиснення у нирковій тканині, що проявляється зниженням

активності процесів пероксидного окиснення ліпідів, підвищенням активності та вмісту компонентів антиоксидантної системи та ензимів електронотransпортного ланцюга мітохондрій.

За умов комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину в нирках мишей з АФС виявляються найменші зміни деструктивного характеру, наявна відносна нормалізація судинного компонента органа, залишаються кровонаповненими тільки міжчасткові та міжчасточкові вени. Просвіти каналців, особливо дистальних, чіткі, не розширені. Структурна організація збірних каналців і трубочок також без видимих змін. При дослідженні ультраструктури компонентів нефрона за умов АФС при комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину встановлено найсуттєвіше покращення структурної організації компонентів клітин. У ендотеліоцитах цитоплазма помірної електронної щільності. Форма частини ядер подовгаста, інших – округло-овальна. Контури ядерних мембран у складі каріолеми чіткі. Добре виражена фенестрація цитоплазматичних ділянок ендотеліоцитів. Товщина базальної мембрани відносно рівномірна, зі збереженою тришаровою будовою. Цитотрабекули помірно потовщені, від них відходить багато невисоких цитоподій, які щільно розташовані на базальній мембрані, а між ними – невеликі проміжки. Збереженість компонентів фільтраційного бар'єра, епітеліоцитів каналців нефрона забезпечують відносну нормалізацію фаз сечоутворення у нирках піддослідних тварин.

Інгібування eNOS антифосфоліпідними антитілами є одним із молекулярних механізмів розвитку недостатності NO при АФС [304]. Важливу роль відіграє баланс між ендогенними факторами, які забезпечують вазоконстрикцію та вазодилатацію у функціонуванні ендотелію. Ендотеліальна дисфункція розвивається за умов пригнічення здатності ендотелію синтезувати вазодилатори, тоді як вміст судинозвужуючих факторів зберігається або зростає. Основним проявом ендотеліальної дисфункції є порушення біодоступності NO за рахунок дефіциту його субстрату L-аргініну, порушення експресії eNOS, пришвидшеного метаболізму NO [97, 377].

Застосування попередників NO, збільшуючи кількість субстрату для його синтезу, стимулює утворення NO та зменшує прояви нітрооксидативного стресу [411]. Одним із механізмів дії L-аргініну є відновлення активності ендотеліальної NO-синтази через постачання ензиму субстратом [330, 377]. Під час окиснювальної трансформації L-аргінін перетворюється на гідроксиаргінін, який є інгібітором ензиму аргінази, і який через цей механізм може підвищувати кількість внутрішньоклітинного NO [23]. L-аргінін – це амінокислота, яка через утворення NO у фізіологічних умовах регулює тонус судин, знижує адгезію лейкоцитів та тромбоцитів до судинної стінки, пригнічує активність тромбоцитів і перешкоджає тромбоутворенню, знижує проліферацію гладком'язових клітин судин, отже, L-аргінін може бути ефективним у корекції судинних ускладнень при АФС [243]. Встановлено, що як попередник NO він приводить до позитивних змін у фетоплацентарному кровообігу в пацієнток з передчасними пологами [355]. Важливе значення в реалізації дії L-аргініну за умов АФС мають також його антиоксидантні властивості, які описані при різних патологічних процесах [97].

Застосування іншого попередника NO – S-нітрозо-N-ацетил-dl-пеніциламіну також запобігає інгібувальному впливу аФЛ на eNOS [343]. Відомо, що гідроксихлорохін [241, 306, 392] за рахунок підвищення активності eNOS, що призводить до зростання продукції NO, зменшує прокоагулянтний стан та покращує судинну функцію при АФС. Зменшення частоти передчасних пологів при АФС відбувається і під впливом морфіну, що пояснюють його здатністю модулювати вивільнення NO [257]. Введення неселективного інгібітора NOS L-NAME нівелює цей ефект морфіну, що підтверджує роль системи NO у розвитку АФС.

З іншого боку, на експериментальній моделі АФС продемонстровано неоднозначну дію NO на скоротливу функцію міометрія під час вагітності. Зниження вмісту NO, як зазначено вище, призводить до передчасних пологів та абортів. Водночас гіперпродукція NO збільшує маткові скорочення і ризик невиношування вагітності [188].

Негативний вплив застосування інгібіторів NOS при вагітності встановлений і іншими дослідниками. При пригніченні NOS інгібітором L-NAME спостерігається ініціювання передчасних пологів. Для профілактики передчасних пологів, індукованих блокаторм NOS L-NAME у мишей, дослідниками застосовано прогестерон, який сприяє синтезу NO, активуючи iNOS у матці вагітних, та призводить до зменшення скоротливої активності матки [388].

Враховуючи, що під час вагітності відбувається адаптація системи кровообігу матері та плода до нових умов існування, стан матково-плацентарного кровообігу прямо залежить від функціонування системи NO. Зниження рівня NO в крові вагітних може призводити до виникнення дисбалансу мікроциркуляції у фетоплацентарному колі кровообігу, що супроводжується розвитком плацентарної недостатності, яка спричиняє хронічне кисневе голодування і, як наслідок, гіпоксію плода, виникнення синдрому затримки внутрішньоутробного розвитку плода різного ступеня тяжкості та порушення стану новонародженого [355].

Узагальнюючи літературні дані та отримані нами результати, можна запропонувати схему реалізації дії L-аргініну та аміногуанідину при ураженні печінки мишей лінії BALB/c за умов антифосфоліпідного синдрому, яка наведена нижче (рис. 6.1).

Таким чином, позитивний вплив L-аргініну, зареєстрований у дослідях при антифосфоліпідному синдромі (до вагітності і при його поєднанні з вагітністю), проявляється зростанням вмісту eNOS у крові і печінці, покращанням гістологічної картини печінки та нирок, зокрема їх судинного русла, зменшенням проявів ендотеліальної дисфункції (зниженням кількості циркулюючих десквамованих ендотеліоцитів у крові, відновленням субмікроскопічної структури ендотеліальних клітин та показників системи гемостазу). Встановлено, що L-аргінін за умов АФС проявляє антиоксидантні властивості, зменшує прояви оксидативного стресу та покращує біохімічні процеси у печінці, нирках, головному мозку тварин з АФС. Ці протекторні властивості L-аргініну

реалізуються на тлі активації синтезу нітроген оксиду в досліджуваних органах, що підтверджується зростанням вмісту стабільних метаболітів NO.

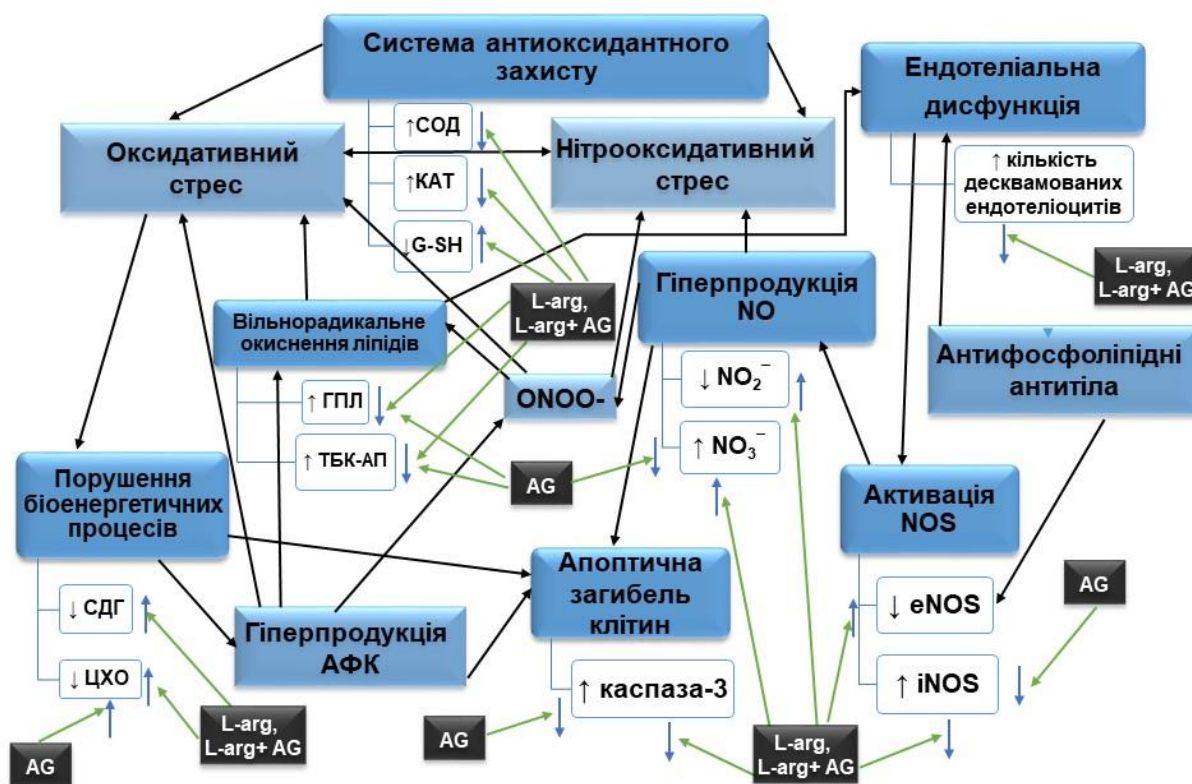


Рис. 6.1. Механізми реалізації дії L-аргініну та аміногуанідину при ураженні печінки мишей лінії BALB/c за умов антифосфоліпідного синдрому

Інгібітор індукцибельної NO-синтази аміногуанідин сприяє зниженню вмісту iNOS у сироватці крові та печінці і вмісту стабільних метаболітів NO в сироватці крові та досліджуваних органах (мозочку, півкулях великого мозку, печінці, нирках) мишей з АФС до вагітності й на 18-й день вагітності. У печінці та нирках мишей з АФС, яким вводили аміногуанідин спостерігають подальшу інтенсифікацію вільнорадикального окиснення, що поєднується з активацією антирадикального й антиоксидантного захисту. Нейропротекторний вплив аміногуанідину при АФС проявляється зменшенням оксидативного стресу в мозочку та півкулях великого мозку (рис. 6.2).

Встановлено нейропротекторний вплив при комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину за умов АФС, про що свідчить зниження загального вмісту гліального фібрилярного кислого протеїну та його ізоформи (37 kDa) у мозочку мишей з АФС до вагітності та на її фоні. В мозочку вагітних тварин з АФС при комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину знижується вміст олігомерних форм MBP (95–110 kDa), порівняно з показниками вагітних мишей із АФС. Встановлено зменшення вмісту нейроспецифічних аутоантитіл до протеїнів головного мозку у тварин з АФС до вагітності та на її фоні при комбінованому застосуванні L-аргініну з аміногуанідином.

Комбіноване застосування попередника NO L-аргініну й інгібітора індукцйбельної NOS аміногуанідину проявляється нейро-, гепато- і нефропротекторною активністю, що підтверджується пригніченням розвитку оксидативного стресу в мозочку, півкулях великого мозку, печінці й нирках. Гепатопротекторний та нефропротекторний вплив на мікроциркуляцію у нирках та печінці при комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину за умов АФС підтверджено гістологічними та субмікроскопічними дослідженнями. Встановлено відновлення структурних компонентів часточок печінки, ниркових тілець та епітеліоцитів канальців нефрона нирки. Встановлено, що використання модуляторів синтезу нітроген оксиду (L-аргініну та аміногуанідину) запобігає і зменшує пошкодження мембранних органел, ядерних і плазматичних мембран ендотеліоцитів, гепатоцитів та нефроцитів паренхіми досліджуваних органів.

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 індукцибельної 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 рази) та печінці (у 2,4 і 4,1 рази) з одночасним зниженням вмісту індукцибельної ізоформи синтази нітроген оксиду у сироватці крові (в 3,2 і 3,8 рази) та печінці (у 2,3 і 3,3 рази) 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 рази, відносно інтактних, а у вагітних мишей з антифосфоліпідним синдромом в 2,4 рази 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 на 53 % та 39 %, зниженню концентрації фібриногену на 18 % та 25 %. Встановлено, що у вагітних мишей з антифосфоліпідним синдромом, яким вводили L-аргінін у комбінації з аміногуанідином, відбувається подовження активованого часткового тромбопластинового 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 β , IL-6, TNF- α) 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 β (на 30 та 13 %), IL-6 (на 16 та 41 %), TNF- α (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- α 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 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 рази, порівняно із показниками контролем. 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-й 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 сироваті 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 ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Алейник ВА, Бабич СМ, Негматшаева ХН, и др. Особенности иммунологических изменений у женщин с невынашиванием беременности при наличии аутоантител. Молодой учёный. 2017;22:411–413.
2. Александрова ЕН, Новиков АА, Решетняк ТМ, Насонов ЕЛ. Иммунологические маркеры антифосфолипидного синдрома. Часть II – маркеры повреждения эндотелия, воспаления и активации клеточного иммунитета. Научно–практическая ревматология. 2010;5:67–74.
3. Амриева ДХ, Ольмесова АР, Склярова СА, Петров ЮА. Антифосфолипидный синдром как причина невынашивания беременности. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2019;8:100–103.
4. Андреева ЛИ, Кожемякин ЛА, Кишкун АА. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой. Лаб. дело. 1988;11:41–43.
5. Астахин АВ., Евлашева ОО, Левитан БН. Клиническое и диагностическое значение основного белка миелина и нейронспецифической енолазы в медицинской практике. Астраханский медицинский журнал. 2016;4(11):9–17.
6. Белолипецкая ЕА, Беляева ИБ, Мазуров ВИ, Трофимов ЕА, Лапин СВ. Клинико–иммунологические взаимосвязи при системной красной волчанке с антифосфолипидным синдромом. Вестник Северо–Западного государственного медицинского университета. 2017;9(3):7–11.
7. Березовская ГА. Апоптоз тромбоцитов: причины недостаточной эффективности антитромбоцитарных препаратов. Бюллетень СО РАМН. 2012;32(4):17–27.
8. Бицадзе ВО, Хизроева ДХ, Идрисова ЛЭ, Абрамян РР, Андреева МД, Макацария АД. Катастрофический антифосфолипидный синдром. Вопросы патогенеза. Акушерство, гинекология и репродукция. 2015;2:32–53.

9. Бицадзе ВО, Хизроева ДХ, Макацария НА, Егорова ЕС, Баймурадова СМ, Машкова ТЯ. Антифосфолипидные антитела, их патогенетическое и диагностическое значение при акушерской патологии. Акушерство, гинекология, репродукция. 2014;8(2):39–60.

10. Брик А, Кузьмак І, Яремчук О. Вплив L–аргініну на деякі показники гемостазу та прооксидантно–антиоксидантної системи нирок при експериментальному антифосфоліпідному синдромі. Матеріали ХХІ Міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених, Тернопіль, 24–26 квітня 2017 р., с. 247–248.

11. Брик А, Яремчук О. Вплив L–аргініну на показники вільнорадикального окиснення у нирках при експериментальному антифосфоліпідному синдромі. Матеріали ХХІІ Міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених, Тернопіль, 23–25 квітня 2018 р., с. 255.

12. Будневский АВ, Куташов ВА, Кравченко АЯ. Клинические проявления антифосфолипидного синдрома при поражении центральной нервной системы. Клиническая медицина. 2016;94(5):391–394. doi 10.18821/0023–2149–2016–94–5–391–394

13. Венцківська ІБ, Біла ВА, Загородня ОС. Роль прихованих тромбофілічних станів в патогенезі загрози передчасних пологів. Здоровье женщины. 2011;2:173–176.

14. Вовк ТБ, Савчук ОМ, Остапченко ЛІ. Аутоімунні антитіла до ключових компонентів системи зсідання крові, які утворюються в кровотоці при системному червоному вовчаку. Фізика живого. 2010;18(3):59–63.

15. Волков ГЛ, Платонова ТН, Савчук ОМ, Горницкая ОВ, Чернышенко ТМ, Краснобрыжая ЕН. Современные представления о системе гемостаза. Киев. Наукова думка, 2005:295.

16. Гаврилов ВБ, Мишкорудная МИ. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови. Лаб. дело. 1983;3:33–35.

17. Говоруха ОЮ, Шнайдерман ОЮ. Значення взаємодії перекисного окиснення ліпідів і антиоксидантних систем в розвитку патологічних процесів. Експериментальна і клінічна медицина. 2016. 4 (73) С. 10–14.
18. Головач ИЮ, Егудина ЕД, Рекалов ДГ. Поражение почек на фоне антифосфолипидного синдрома. Kidneys. 2019;8(3):161–173. doi: 10.22141/2307–1257.8.3.2019.176455
19. Головач ИЮ, Егудина ЕД. Кардіоваскулярні маніфестації у пацієнтів з антифосфоліпідним синдромом: питання діагностики та менеджменту. Артеріальна гіпертензія. 2019;5–6 (67–68):35–44.
20. Гончарова АА, Кравченко ЕН, Кривчик ГВ, Вотрина ИР, Чебакова ВЮ. Антифосфолипидный синдром в акушерской практике. Мать и дитя в Кузбассе. 2018;1(72):52–56.
21. Горальський ЛП, Хомич ВТ, Кононський ОІ. Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології. Житомир: Полісся; 2011. 288.
22. Горницкая О. В. Антифосфолипидный синдром Експериментальна та клінічна фізіологія та біохімія. 2008;1(4):61–70.
23. Граник ВГ. Метаболизм L-аргинина (обзор). Химико–фармацевтический журнал. 2003;37(3):3–20.
24. Губский ЮИ. Смерть клетки: свободные радикалы, некроз, апоптоз: монография. Винница: Нова Книга, 2015:360.
25. Гузик ММ, Дякун КО, Яніцька ЛВ, Кучмеровська ТМ. Вплив інгібіторів полі(ADP–рибозо)полімерази на деякі показники оксидативного стресу в лейкоцитах крові за стрептозотоцинового діабету у щурів. Укр. біохім. журн. 2013;85(1):62–70.
26. Гулин АВ, Назирова АА, Малышева ЕВ. Принципы лабораторной диагностики антифосфолипидного синдрома в акушерстве. Вестник ТГУ. 2010;15(1):29–32.
27. Данилович ЮВ. Оксид азота як регулятор внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу в міоцитах матки. Укр. біохім. журн. 2012;84(3):5–25.

28. Демина ТН. Показатели системы гемостаза у беременных с преэклампсией на фоне приобретенной тромбофилии. Медикосоциальные проблемы семьи. 2016;21(1):5–11.

29. Джобава ЭМ, Данелян СЖ. Плацентарная недостаточность и угрожающие преждевременные роды: актуальные и спорные вопросы диагностики, терапии и профилактики. Лечение и профилактика. 2012; 1:56–60.

30. Долик Н, Брик А, Яремчук О, Драган Н, Фролов М. Роль прооксиданто–антиоксидантної системи в патогенезі ураження нирок при експериментальному антифосфоліпідному синдромі. Матеріали XX Міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених, Тернопіль, 25–27 квітня 2016 р., с. 267.

31. Дубоссарская ЗМ, Дубоссарская ЮА. Антифосфолипидный синдром как причина невынашивания беременности. Неонатология, хірургія та перинатальна медицина. 2013; 2(8): 84 – 88.

32. Есауленко ИЭ, Куташов ВА, Ульянова ОВ. Неврологические проявления вторичного антифосфолипидного синдрома. Саратовский научно–медицинский журнал. 2017;13(1):139–143.

33. Ещенко НД, Вольский ГГ. Определение количества янтарной кислоты и активности сукцинатдегидрогеназы. Методы биохимических исследований. Л.: Изд–во Ленинградского университета; 1982. с. 207–210.

34. Єфремова УП, Личковська НЕ, Фафула РВ, Воробець ЗД. Роль NO–синтазної системи в організмі людини при розвитку патологічних процесів. Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. 2012;1:68–73.

35. Зайченко ГВ, Лар'яновська ЮБ, Деєва ТВ, Шевченко ОІ, Старокожко ВЮ, Кудіна ОВ та ін. Морфологічний стан матки та плаценти при експериментальному моделюванні гестаційного антифосфоліпідного синдрому на мишах. Український медичний альманах. 2011;14(4):136–141.

36. Запорожан ВН, Линников ВИ, Евдокимова ВВ. Катастрофический антифосфолипидный синдром в акушерской практике. Scientific Journal «ScienceRise». 2015;5/4(10):61–64.

37. Иванов АВ. Нарушение системы гемостаза при беременности: клинко–диагностические аспекты. Лабораторная медицина. 2014;4(11):60–63.
38. Ижедерова ИР, Иванов ЛН, Охотина ТН. Особенности развития гипоксических повреждений внутриутробного плода и новорожденного при антифосфолипидном синдроме. Медицинский альманах. 2010;4:105–108.
39. Ильина АЯ, Шумилов ПВ, Туркина ТИ, Кириллова НИ, Барина АС, Кузин ИИ, Мищенко АЛ, Кокая ИЮ, Кашин ВН, Побединская ОС. Антифосфолипидный синдром: состояние системы гемостаза и липидного обмена в системе «женщина–плод–новорожденный». Педиатрия. 2016;95(4):74–84.
40. Калашникова ЛА, Джамантаева БД. Неврологические проявления антифосфолипидного синдрома, имитирующие рассеянный склероз нейрохирургия и неврология казахстана. 2015;1(38):15–23.
41. Калашникова ЛА. Цереброваскулярные нарушения при антифосфолипидном синдроме. Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2011;5(1):39–43.
42. Камышников ВС. Справочник по клинко–биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. М.: МЕДпресс–информ, 2004: 920.
43. Кіселик ІО, Луцик МД, Шевченко ЛЮ. Особливості визначення нітратів та нітритів у крові хворих на вірусні гепатити та жовтяниці іншої етіології. Лаб. діагностика. 2001;3:43–45.
44. Клекот ОО. Метаболізм нітрогену оксиду при СЧВ–асоційованій легеневої артеріальній гіпертензії. Український ревматологічний журнал. 2011;1(43):109–111.
45. Кожем’якін ЮМ, Хромов ОС, Болдирєва НЄ, Добреля НВ, Сайфетдінова ГА. Науково–практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними: монографія. К. : Інтерсервіс, 2017. 182.

46. Кондратюк АС, Гриненко ТВ. Кількісне визначення фібриногену в плазмі крові турбідиметричним методом з використанням анцистрону. Фізика живого. 2010;18(1):160–163.

47. Корнюшина ЕА, Чепанов СВ, Сельков СА, Дадаєва ДГ, Шахалиєв РА, Немсцверидзе НН, и др. Профилактика потери беременности у женщин с циркуляцией аутоантител, не входящих в критерии антифосфолипидного синдрома. Журнал акушерства и женских болезней. 2018;67(6):24–30. doi: 10.17816/JOWD67624–30

48. Королюк МА, Иванова ЛИ, Майорова ИГ, та ін. Метод определения активности каталазы. Лаб. дело. 1988;1:16–19.

49. Кривонос МИ, Зайнулина МС, Корнюшина ЕА, и др. Опыт применения внутривенного иммуноглобулина в протоколе ЭКО (ЭКО/ICSI) у женщин с бесплодием и носительством антифосфолипидных антител. Акушерство, гинекология и репродукция. 2017;11(3);11–19. doi: 10.17749/2313–7347.2017.11.3.011–019.

50. Кривченкова РС. Определение активности цитохромоксидазы в суспензии митохондрий. Современные методы в биохимии. Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина; 1977. 47–49.

51. Лавришин ЮЮ, Вархоляк ІС, Мартишук ТВ, та ін. Біологічне значення системи антиоксидантного захисту організму тварин. Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького. 2016;2 (66):100–111.

52. Лазарчук ОО, Орлова ОА, Анісімова НА, Брюховецька ОЮ. Динаміка вмісту метаболітів оксиду азоту та активності супероксиддисмутази в тканинах щурів різного віку. Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. 2012;1:7 – 12.

53. Лисицына ТА, Решетняк ТМ, Дурнев АД, Насонов ЕЛ. Окислительный стресс в патогенезе антифосфолипидного синдрома. Вестник Российской Академии медицинских наук. 2004;(7):19–24.

54. Ліхачов ВК, Тарановська ОО, Семенюк ЛМ, Яремчук ЛВ. Динаміка змін оксиду азоту та розвитку гестаційної ендотеліопатії при прееклампсії. Вісник проблем біології і медицини. 2014;3(112):146–149.
55. Ліщук–Якимович ХО. Антифосфоліпідний синдром у практиці лікаря–репродуктолога. Акушерство. Гінекологія. Генетика. 2016;1:80–82.
56. Лукьянова ЛД. Современные проблемы адаптации к гипоксии. Сигнальные механизмы и их роль в системной регуляции. Пат. физиол. и эксперим. терапия. 2011;1:3–19.
57. Мадей П, Пеха Д, Плута Д та ін. Імунологічні фактори в етіопатогенезі звичних викиднів. Львівський медичний часопис. 2015;3:89–95.
58. Макаров ОГ. Динаміка змін показників системи зсідання крові протягом вагітності у жінок з тромбофілічними станами. Світ медицини та біології. 2016;2(56):40–42.
59. Макацария АД, Бицадзе ВО, Хизроева ДХ, Макацария НА, Яшенина ЕВ. Патогенетическое значение антифосфолипидных антител. Практическая медицина. 2012;5(60):9–21.
60. Макацария АД, Бицадзе ВО, Хизроева ДХ. HELLP–синдром. Акушерство, гинекология, репродукция. 2014;8(2):61–68.
61. Максимович НЕ. Понятие о нитроксидагической системе мозга (роль нейрональных источников). Журнал ГГМУ. 2003;4:7–10.
62. Малахов ВА, Завгородняя АН, Лычко ВС и др. Проблема оксида азота в неврологии, СумГПУ им. А.С. Макаренко, Сумы. 2009.
63. Марущак М.І. Мітохондріальні механізми апоптозу при гострому ушкодженні легень в експерименті. Вісник наукових досліджень. 2017; 1: 121–124. doi. 10.11603/2415–8798.2017.1.7343
64. Менжинская ИВ, Кашенцева ММ, Ионанидзе ТБ, Ванько ЛВ, Сухих ГТ. Спектр антифосфолипидных антител у женщин с привычным невынашиванием беременности и их диагностическое значение. Иммунология. 2016;37: 4–9.

65. Мешишен ІФ. Глутатионова система організму за умов норми та патології. Чернівці: Медакадемія; 1999. 26. с.
66. Назирова АА, Малышева ЕВ, Гулин АВ. Диагностика коагулянтов волчаночного типа у женщин. Вестник ТГУ. 2012;17(1):315–317.
67. Насонов ЕЛ. Антифосфолипидный синдром. М.: Литтерра, 2004, 440 с.
68. Олещук ОМ. Вплив аміногуанідину на показники системи оксиду азоту при експериментальному цирозі печінки. Світ медицини та біології. 2014;3(45):133–137.
69. Олещук ОМ. Стан системи оксиду азоту при експериментальному цирозі печінки. Вісник проблем біології і медицини. 2014;2(111):198–202.
70. Омельченко Ю, Сокур О, Харченко О, Остапченко Л. Метаболізм оксиду азоту в головному мозку щурів із сформованою алкогольною залежністю. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. 2015;2(19):5–8.
71. Остапченко ЛІ, Синельник ТБ, Рибальченко ТВ, Рибальченко ВК. Біохімічні механізми апоптозу. Київ. Київський університет. 2010:312.
72. Острякова ЕВ, Патрушев ЛІ, Решетняк ТМ. Антифосфолипидный синдром и система фибринолиза. Научно–практическая ревматология. 2011;6:57–64.
73. Піліпонова ВВ, Слободянюк ВА. Роль ендотеліальної дисфункції нирок в патогенезі захворювань та їх ускладнень (Огляд літератури). Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2019;3:32–38. doi 10.11603/1811–2471.2019.v.i3.10503
74. Полетаев АБ, Алиева Ф. Аутоантитела и иммунопатология беременности. Практическая медицина. 2010;43:20–24.
75. Попов СС, Пашков АН, Агарков АА и др. Интенсивность процессов апоптоза, активность аконитатгидратазы и уровень цитрата у пациентов с сахарным диабетом 2 типа, осложненным стеатогепатитом, при применении эпифамина на фоне базисного лечения. Биомедицинская химия. 2015;61(3):400–406.

76. Посохова КА, Сак ІЮ, Сампара СР. Акушерський антифосфоліпідний синдром і система оксиду азоту (огляд літератури і результати власних досліджень). Медична хімія. 2014;16(1):73–80.

77. Посохова КА, Яремчук ОЗ, Куліцька МІ. Вплив модюляторів синтезу оксиду азоту на показники гемостазу за умов антифосфоліпідного синдрому в експерименті. Матеріали ХІ Українського біохімічного конгресу, Київ, 6–10 жовтня 2014 року, Український біохімічний журнал. 2014;86(5) (Додаток 2):27–28.

78. Посохова КА, Яремчук ОЗ, Сак ІЮ, Сампара СР, Куліцька МІ. Дослідження деяких параметрів зсідання крові при гестаційному антифосфоліпідному синдромі. Матеріали науково–практичної конференції «Довкілля і здоров'я», Тернопіль, 25–26 квітня 2013 р., с.165.

79. Посохова КА, Яремчук ОЗ, Сак ІЮ. Вплив вагітності на рівень тромбоцитів при експериментальному антифосфоліпідному синдромі. Матеріали науково–практичної конференції «Актуальні питання безпечного застосування ліків», Тернопіль, 17–18 жовтня 2013 року, с. 60.

80. Посохова КА, Яремчук ОЗ, Сампара СР. Зміни деяких показників гемостазу при експериментальному антифосфоліпідному синдромі. Матеріали підсумкової науково–практичної конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини», Тернопіль, 21 травня 2014 року, с. 130.

81. Посохова КА, Яремчук ОЗ, Сампара СС, Сак ІЮ. Роль системи оксиду азоту у патогенезі експериментального антифосфоліпідного синдрому. Матеріали науково–практичної конференції «Актуальні питання безпечного застосування ліків», Тернопіль, 17 –18 жовтня 2013 року, с. 61–62.

82. Посохова КА., Буковська ВВ. Вплив L-аргініну та N-нітро-L-аргініну на деякі показники прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу за умов гострої циркуляторно-гемічної гіпоксії. Буковинський медичний вісник. 2002;6(3):185–190.

83. Прокопюк ВЮ. Экспериментальная оценка эффективности прегравидарной подготовки и лечения антифосфолипидного синдрома. Клінічна та експериментальна патологія. 2011;2(36):79–82.

84. Реутов ВП, Сорокина ЕГ, Самосудова НВ. Оксид азота и цикл оксида азота в системе нейронов, глии и кровеносных сосудов мозга в норме и при інсультах. Евразийское Научное Объединение. 2017;4(26):73–81.

85. Решетняк ДВ, Кузнецова ТВ, Кобылянский АГ, Клюквина НГ, Решетняк ТМ, Насонов ЕЛ. Уровень нитратов в сыворотке крови пациентов с системной красной волчанкой и антифосфолипидным синдромом. Терапевтический архив. 2004;79(5):19–22.

86. Решетняк ТМ. Антифосфолипидный синдром: современное состояние и задачи на будущее. Науч–практич ревматол. 2013; 51(1):11–14.

87. Решетняк ТМ. Новые возможности в лечении антифосфолипидного синдрома. Тромбоз, гемостаз и реология. 2012;2:33–41.

88. Рогожина ИЕ. Малоинвазивные технологии и система гемостаза при миоме матки. Саратов. науч.–мед. журн. 2011;7(3):587–592.

89. Рудзевич АЮ. Изменения гемостаза у беременных с тромбофилией, возможность профилактики осложнений беременности при приобретенной тромбофилии и антифосфолипидном синдроме. Scientific review. 2019;1:48–54.

90. Самохвалова ВВ. Антифосфолипидный синдром как одна из основных причин развития инсульта в молодом возрасте. Крымский терапевтический журнал. 2013;1:35–38.

91. Середавкина НВ, Решетняк ТМ, Александрова ЕН, и др. Маркер воспаления у больных с антифосфолипидным синдромом с кардиоваскулярной патологией. Научно–практическая ревматология. 2010;5:37–43. doi: 10.14412/1995–4484–2010–729

92. Сибірна НО, Люта МЯ, Климишин НІ. Молекулярні механізми депонування оксиду азоту в еритроцитах. Біологічні студії. 2010;4(1):143–160. doi.org/10.30970/sbi.0401.080

93. Сівак ВВ, Тимофієва НВ, Динник ОБ. та ін. Патент України № 25012 UA, G01N33/50 Спосіб визначення вільноциркулюючих ендотеліальних клітин в крові. Опубл. 25. 07. 2007 ; Бюл. № 11.

94. Смирнова ЕВ, Краснова ТН, Проскурнина ЕВ, Мухин Н.А. Роль дисфункции нейтрофилов в патогенезе системной красной волчанки. Терапевтический архив. 2017;89(12):110–113. doi:10.17116/terarkh20178912110

95. Соболев ВА, Прошин ВА, Морозов СГ, и др. Состояние здоровья детей, рожденных от матерей с различным содержанием аутоантител к ряду белков нервной ткани и белковым фракциям. Педиатрия. 2004;5:44–50.

96. Соколік ВВ. Нейрозапалення у біохімічних механізмах амілоїдозу. Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія «Біологія». 2018;30:103–112. doi.org/10.26565/2075-5457-2018-30-12

97. Степанов ЮМ, Кононов ИМ, Журбина АИ, Филиппова АЮ. Аргинин в медицинской практике. Журн. АМН Украины. 2004;10(2):339–351.

98. Суконцева ТА, Каплина ОЮ. К вопросу о патогенезе тромбозов при антифосфолипидном синдроме. Акушерство, гинекология и репродукция. 2018;12(3):72–78. doi: 10.17749/2313–7347.2018.12.3.072–078.

99. Супрун ЕВ, Чекман ІС, Беленічев ІФ та ін. Цитокінова терапія в комплексному лікуванні цереброваскулярних захворювань: стан, перспективи досліджень. Раціональна фармакотерапія. 2017;1(42):19–30.

100. Таран ОІ. Нейропатії при антифосфоліпідному синдромі. Почки. 2014;4(10):74–78.

101. Тирская ЮИ, Рудакова ЕБ, Шакина ИА и др. Современные представления об этиологии и патогенезе синдрома потери плода (обзор литературы). Урал. мед. журнал. 2010;1:100–106.

102. Тихомиров АО, Павлова ОС, Недзвецкий ВС. Гліальний фібрилярний кислий протеїн (ГФКП): до 45–річчя відкриття, Нейрофізіологія. 2016;48(1):58–75.

103. Ткаченко ОЮ, Лапин СВ, Шмонин АА, Соловьева ЛН, Бондарева ЕА, Сельков СА, и др. Анализ спектра антифосфолипидных антител у пациентов

с тромбозами и привычным невынашиванием беременности. Медицинская иммунология. 2018;20(5):753–762. doi: 10.15789/1563–0625–2018–5–753–762

104. Трифонов ВЮ, Прокопюк ВЮ, Зайченко АВ. Криоконсервированная сыворотка кордовой крови в восстановлении репродуктивной функции при антифосфолипидном синдроме. Проблемы криобиологии. 2011;21(1):75–84.

105. Трифонов ВЮ, Прокопюк ВЮ. Современные представления об акушерском антифосфолипидном синдроме. Теоретична і експериментальна медицина. 2010;2:50–55.

106. Трифонов ВЮ, Современные представления об акушерском антифосфолипидном синдроме. Експериментальна і клінічна медицина. 2010;2:50–55.

107. Трофимов ЕА. Антифосфолипидный синдром: особенности течения у беременных и принципы лечения. Вестник новгородского государственного университета. 2016;6(97):63–67.

108. Ульянова ОВ, Куташов ВА, Хабарова ТЮ. Особенности неврологических проявлений у пациентов с антифосфолипидным синдромом. Вестник КазНМУ. 2016;2:333–338.

109. Фролов М, Яремчук О, Сак І, Сампара С. Зміни параметрів зсідання крові при експериментальному гестаційному антифосфоліпідному синдромі. Матеріали XVII Міжнародного медичного конгресу студентів і молодих вчених, Тернопіль, 22–24 квітня 2013 р, с. 256.

110. Халимова ФТ, Гулин АВ, Малышева ЕВ, Назирова АА. Клинико–лабораторные характеристики антифосфолипидного синдрома у женщин с отягощенным акушерским анамнезом. Вестник ТГУ. 2012;17(4):1285–1288.

111. Халимова ФТ, Гулин АВ, Малышева ЕВ, Назирова АА. Характеристика параметров свертывания крови при антифосфолипидном синдроме. Вестник ТГУ. 2012;17(5):1449–1451.

112. Чевари С, Чаба И, Секей И. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения её в биологических материалах. Лаб. дело. 1985;11:678–681.

113. Чепанов СВ, Шляхтенко ТН, Зайнулина МС, Миравшвили МИ, Соколов ДИ, Сельков СА. Антитела к аннексину V у женщин с привычным невынашиванием беременности. Акушерство и гинекология. 2014;7:29–32.

114. Чернышов АВ, Талько ВВ, Андрейченко СВ. Современные вопросы патогенеза и диагностики антифосфолипидного синдрома (обзор литературы). Укр. мед. часопис. 2013;1(93):122–125.

115. Шевчук СВ. Тромбоцитопенія – як маркер ураження серцево–судинної системи у хворих на системний червоний вовчак. Вісник проблем біології і медицини. 2014;6:186–190.

116. Шейбак ВМ, Павлюковец АЮ. Аргинин и иммунная система – возможные механизмы взаимодействия. Вестник ВГМУ. 2013;12(1):6–13.

117. Шляхтенко ТН, Алябьева ЕА, Аржанова ОН, Сельков СА, Плужникова ТА, Чепанов СВ. Антифосфолипидный синдром при невынашивании беременности. Журнал акушерства и женских болезней. 2015;5:69–76.

118. Щурук Н. В. Особливості балансу цитокінів у жінок із репродуктивними втратами в анамнезі в динаміці ускладненої і неускладненої вагітності Акушерство та гінекологія. 2018;1:132–136. doi.org/10.11603/24116–4944.2018.1.8803

119. Яковенко ОК, Гріфф СЛ, Яковенко ТЛ. Антифосфоліпідний синдром під маскою легеневої патології: клінічні спостереження пульмонолога Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія. 2019;7(120):14–23.

120. Якубовська ІО, Генік СІ. Антифосфоліпідний синдром (синдром Х'юза) в лікарській практиці. Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія. 2008;4:31–36.

121. Яремчук ОЗ, Посохова КА, Куліцька МІ. Вплив L–аргініну та аміногуанідину на показники вільнорадикального окиснення у нирках при експериментальному антифосфоліпідному синдромі. Світ медицини та біології. 2018;3(65):210–214.

122. Яремчук ОЗ, Кузьмак ІП, Посохова КА. Дослідження вмісту гліального фібрилярного кислого протеїну у головному мозку мишей з експериментальним антифосфоліпідним синдромом. Матеріали XII Українського біохімічного конгресу, Тернопіль, 30 вересня – 4 жовтня 2019 р., с. 257–258.

123. Яремчук ОЗ, Небесна ЗМ, Крамар СБ, Посохова КА. Морфологічні зміни у нирках при експериментальному антифосфоліпідному синдромі та застосуванні модуляторів синтезу оксиду азоту. Здобутки клінічної та експериментальної медицини. 2020;1:208–215.

124. Яремчук ОЗ, Посохова ЕА, Бандас ІА, Курило КІ, Цибульская ЛС. 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;12:135–140.

125. Яремчук ОЗ, Посохова ЕА, Кузьмак ІП. Влияние L–аргинина на содержание некоторых провоспалительных цитокинов при экспериментальном антифосфолипидном синдроме. Проблемы биологии и медицины. 2020;1(116):200–204.

126. Яремчук ОЗ, Посохова ЕА, Лихацкий ПГ, Летняк НЯ, Кулицкая МІ, Кузьмак ІП, и др. Продукция активных форм кислорода и развитие апоптоза в лейкоцитах крови при экспериментальном антифосфолипидном синдроме. Georgian Medical News. 2020;2(299):120–125.

127. Яремчук ОЗ, Посохова ЕА, Сорока ЮВ, Кулицкая МІ, Кузьмак ІП, Черняшова ВВ, и др. Нейропротекторный эффект амингуанидина при экспериментальном антифосфолипидном синдроме на фоне беременности. Georgian Medical News. 2020;4(301):159–165.

128. Яремчук ОЗ, Посохова ЕА. Влияние L–аргинина и амингуанидина на некоторые биохимические показатели состояния печени при экспериментальном антифосфолипидном синдроме на фоне беременности. Проблемы биологии и медицины. 2019;4:171–175.

129. Яремчук ОЗ, Посохова КА, Брик АР, Куліцька МІ, Кузьмак ІП, Мехно НЯ. Показники прооксидантно–антиоксидантної системи печінки при експериментальному антифосфоліпідному синдромі та застосуванні L–аргініну. Медична та клінічна хімія. 2017;3:63–70.

130. Яремчук ОЗ, Посохова КА, Габор ГГ, Гузик ММ. 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):53–62.

131. Яремчук ОЗ, Посохова КА, Гузик ММ. 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):36–43.

132. Яремчук ОЗ, Посохова КА, Кузьмак ІП. Вплив L–аргініну та аміногуанідину на рівень синтезу оксиду азоту в мозочку та великих півкулях головного мозку за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому. Медична та клінічна хімія. 2019;4:105–112.

133. Яремчук ОЗ, Посохова КА, Куліцька МІ. Вплив L–аргініну на розвиток апоптозу та продукцію активних форм оксигену у лейкоцитах крові при експериментальному антифосфоліпідному синдромі на фоні вагітності. Матеріали підсумкової LXIII науково–практичної конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини», Тернопіль, 12 червня 2020 р., с. 74

134. Яремчук ОЗ, Посохова КА, Куліцька МІ. Вплив L–аргініну та аміногуанідину на розвиток оксидативного стресу у мозку при експериментальному антифосфоліпідному синдромі. Sciences of Europe. 2020;3(48):20–24.

135. Яремчук ОЗ, Посохова КА, Куліцька МІ, Шевчук ОО, Кузьмак ІП. 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) заявлено 22.11.2019; опубліковано 12.05.2020; Бюл. № 9.

136. Яремчук ОЗ, Посохова КА, Летняк НЯ. Дослідження вмісту каспази-3 у тканині печінки за умов антифосфоліпідного синдрому та при застосуванні модуляторів синтезу оксиду азоту. Здобутки клінічної та експериментальної медицини. 2019;4:167–175.

137. Яремчук ОЗ, Посохова КА, Токарський ОС. 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):39–45.

138. Яремчук ОЗ, Посохова КА. Вплив L-аргініну та аміногуанідину на деякі показники прооксиданто–антиоксидантної системи печінки та нирок за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому. Матеріали Всеукраїнської науково–практичної конференції «Актуальні питання фармакології та фармакотерапії», Тернопіль, 26–27 вересня 2019 р., с. 80–81.

139. Яремчук ОЗ, Посохова КА. Дослідження показників системи гемостазу та цитокінового профілю при експериментальному антифосфоліпідному синдромі до вагітності та на фоні вагітності. Матеріали Всеукраїнської науково–практичної конференції з міжнародною участю «Сучасні питання молекулярно–біохімічних досліджень та лабораторного скринінгу у клінічній та експериментальній медицині – 2020», Запоріжжя, 05–06 березня 2020 р., с. 34.

140. Яремчук ОЗ. Вплив L-аргініну та аміногуанідину на вміст каспази-3 та β -актину при акушерському антифосфоліпідному синдромі в експерименті. Вісник проблем біології і медицини. 2020;1(155):215–218.

141. Яремчук ОЗ. Вплив модуляторів синтезу оксиду азоту на показники гемостазу при експериментальному антифосфоліпідному синдромі. Медична та клінічна хімія. 2020;1:99–106.

142. Яремчук ОЗ. Дослідження деяких показників гемостазу при експериментальному антифосфоліпідному синдромі. Медична та клінічна хімія. 2015;17(3):76–79.

143. Яремчук ОЗ. Нейропротекторна роль аміногуанідину у механізмах ураження головного мозку вагітних мишей BALB/c з антифосфоліпідним синдромом. Sciences of Europe. 2020;2(47):14–18.

144. Яремчук ОЗ. Патобіохімічні механізми ураження нирок при експериментальному антифосфоліпідному синдромі. Вісник проблем біології і медицини. 2015;4(1):167–170.

145. Яремчук ОЗ. Стан прооксидантно–антиоксидантної системи нирок при експериментальному антифосфоліпідному синдромі та за дії модуляторів синтезу оксиду азоту. Медична та клінічна хімія. 2019;3:85–91.

146. Abraham P, Rabi S. Protective effect of aminoguanidine against cyclophosphamide-induced oxidative stress and renal damage in rats. Redox Rep. 2011;16(1):8–14. doi: 10.1179/174329211X12968219310837.

147. Abrahams VM, Chamley LW, Salmon JE. Emerging treatment models in rheumatology: antiphospholipid syndrome and pregnancy: pathogenesis to translation. Arthritis Rheumatology. 2017;69(9):1710–1721. doi:10.1002/art.40136.

148. Albaugh VL, Pinzon-Guzman C, Barbul A. Arginine–Dual roles as an onconutrient and immunonutrient. J Surg Oncol. 2017;115(3):273–280. doi: 10.1002/jso.24490.

149. Alchi B, Griffiths M, Jayne D. What nephrologists need to know about antiphospholipid syndrome. Nephrol Dial Transplant. 2010;25:3147–3154.

150. Alijotas-Reig J. Treatment of refractory obstetric antiphospholipid syndrome: the state of the art and new trends in the therapeutic management. Lupus. 2013;22(1):6–17.

151. Aljameil N, Tabassum H, AlMayouf H, Alshenefy A, Almohizea MM, Ali M N. Identification of serum cytokines as markers in women with recurrent pregnancy loss or miscarriage using MILLIPLEX analysis. Biomedical Research. 2018;29:3512–3517.

152. Ambrosino P, Lupoli R, Spadarella G, Tarantino P, Di Minno A, Tarantino L, et al. Autoimmune liver diseases and antiphospholipid antibodies positivity: a meta-analysis of literature studies. *J Gastrointest Liver Dis.* 2015;24(1):25–34, doi: 10.15403/jgld.2014.1121.amb.
153. Ames PR, Batuca JR, Ciampa A, Iannaccone L, Delgado Alves J. Clinical relevance of nitric oxide metabolites and nitrative stress in thrombotic primary antiphospholipid syndrome. *The Journal of rheumatology.* 2010;37(12):2523–2530.
154. Amitrano L, Ames PR, Guardascione MA, Lopez LR, Menchise A, Brancaccio V, et al. Antiphospholipid antibodies and antiphospholipid syndrome: role in portal vein thrombosis in patients with and without liver cirrhosis. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2011;17(4):367–70. doi: 10.1177/1076029610369797.
155. Andreoli L, Fredi M, Nalli C et al. Antiphospholipid antibodies mediate autoimmunity against dying cells. *Autoimmunity.* 2013;46(5):302–6.
156. Appenzeller S, Souza FH, Wagner Silva de Souza A, Shoenfeld Y, de Carvalho JF. HELLP syndrome and its relationship with antiphospholipid syndrome and antiphospholipid antibodies. *Semin Arthritis Rheum.* 2011;41(3):517–523. doi:10.1016/j.semarthrit.2011.05.007.
157. Arachchillage DRJ, Laffan M. Pathogenesis and management of antiphospholipid syndrome. *British Journal of Haematology.* 2017;178:181–195.
158. Arad A, Proulle V, Furie RA, Furie BC, Furie B. β_2 -Glycoprotein-I autoantibodies from patients with antiphospholipid syndrome are sufficient to potentiate arterial thrombus formation in a mouse model. *Blood.* 2011;117(12):3453–3459. doi:10.1182/blood-2010-08-300715.
159. Arslan E, Branch DW. Antiphospholipid syndrome: Diagnosis and management in the obstetric patient. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2020;64:31–40. doi:10.1016/j.bpobgyn.2019.10.001.
160. Asher BF, Guilford FT. Oxidative Stress and Low Glutathione in Common Ear, Nose, and Throat Conditions: A Systematic Review. *Altern Ther Health Med.* 2016;22(5):44–50.

161. Ayala A, Munoz MF, Arguelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014;360438:1–31. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/360438>.
162. Azad N, Vallyathan V, Wang L, Tantishaiyakul V, Stehlik C, Leonard SS et al. S-nitrosylation of Bcl-2 inhibits its ubiquitin-proteasomal degradation. A novel antiapoptotic mechanism that suppresses apoptosis. *J. Biol. Chem*. 2006;281:34124–34. doi: 10.1074/jbc.M602551200.
163. Baek MW, Seong KJ, Jeong YJ, et al. Nitric oxide induces apoptosis in human gingival fibroblast through mitochondria-dependent pathway and JNK activation. *Int Endod J*. 2015;48(3):287–297. doi:10.1111/iej.12314.
164. Baradaran A, Nasri H, Rafieian-Kopaei M. Protection of renal tubular cells by antioxidants: current knowledge and new trends. *Cell J*. 2015;16(4):568–571. doi:10.22074/cellj.2015.503.
165. Barnado A, Crofford LJ, Oates JC. At the Bedside: Neutrophil extracellular traps (NETs) as targets for biomarkers and therapies in autoimmune diseases. *J Leukoc Biol*. 2016;99(2):265–78. doi: 10.1189/jlb.5BT0615–234R.
166. Baroni G, Banzato A, Bison E, Denas G, Zoppellaro G, Pengo V. The role of platelets in antiphospholipid syndrome. *Platelets*. 2017;28(8):762–766. doi:10.1080/09537104.2017.1280150
167. Bauer G. Synergistic interactions between nitric oxide and reactive oxygen species cause selective apoptosis induction in malignant cells. *Redox Biology*. Session 2: nitric oxide regulation of cell death pathways. 2015;5:415.
168. Bayır H, Kagan VE, Borisenko GG, et al. Enhanced oxidative stress in iNOS-deficient mice after traumatic brain injury: support for a neuroprotective role of iNOS. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2005;25:673–684.
169. Becarevic M, Ignjatovic S, Majkic-Singh N. Apoptosis, annexin a5 and anti-annexin a5 antibodies in the antiphospholipid syndrome. *J Med Biochem*. 2013;32:89–95.

170. Becarevic M. TNF–alpha and annexin A2: inflammation in thrombotic primary antiphospholipid syndrome. *Rheumatol Int.* 2016;36(12):1649–1656. doi: 10.1007/s00296–016–3569–1.
171. Belizna C, Lartigue A, Favre J, et al. Antiphospholipid antibodies induce vascular functional changes in mice: a mechanism of vascular lesions in antiphospholipid syndrome? *Lupus.* 2008;17(3):185–194.
172. Belov S, Buneva VN, Nevinsky GA. How human IgGs against myelin basic protein (MBP) recognize oligopeptides and MBP. *J Mol Recognit.* 2017;30(10). doi: 10.1002/jmr.2637.
173. Benhamou Y, Miranda S, Armengol G, et al. Infliximab improves endothelial dysfunction in a mouse model of antiphospholipid syndrome: Role of reduced oxidative stress. *Vascul Pharmacol.* 2015;71:93–101. doi:10.1016/j.vph.2015.03.014.
174. Becarevic M. Detrimental roles of TNF–alpha in the antiphospholipid syndrome and de novo synthesis of antiphospholipid antibodies induced by biopharmaceuticals against TNF–alpha. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis.* 2017;44(4):565–570. doi: 10.1007/s11239–017–1571–4.
175. Billoir P, Miranda S, Damian L, Richard V, Benhamou Y, Le Cam Duchez V. Development of a thrombin generation test in cultured endothelial cells: Evaluation of the prothrombotic effects of antiphospholipid antibodies. *Thromb Res.* 2018;169:87–92. doi:10.1016/j.thromres.2018.07.021
176. Binder C, Schulz M, Hiddemann W, Oellerich M. Caspase–activation and induction of inducible nitric oxide–synthase during TNF alpha–triggered apoptosis *Anticancer Res.* 1999;19(3A):1715–1720.
177. Bleier L, Dröse S. Superoxide generation by complex III: from mechanistic rationales to functional consequences. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1827(11–12):1320–31. doi: 10.1016/j.bbabbio.2012.12.002.
178. Boger RH. The pharmacodynamics of L–arginine. *Altern Ther Health Med.* 2014;20(3):48–54.

179. Bonavida B. Regulation of cell death apoptotic pathways by nitric oxide in cancer: reversal of drug/immune resistance. *Redox Biology*. Session 2: nitric oxide regulation of cell death pathways. 2015;5:415.

180. Bontadi A, Ruffatti A, Falcinelli E, et al. Platelet and endothelial activation in catastrophic and quiescent antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost*. 2013;109(5):901–908. doi:10.1160/TH12–03–0212

181. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem*. 1976;72:248–254.

182. Brahmachari S, Fung Yu K, Pahan K. Induction of Glial Fibrillary Acidic Protein Expression in Astrocytes by Nitric Oxide. *The Journal of Neuroscience*. 2006;26(18):4930–4939.

183. Branch DW. What's new in obstetric antiphospholipid syndrome. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2019;2019(1):421–425. doi: 10.1182/hematology.2019000043.

184. Brann E, Edvinsson A, Rostedt Punga A, Sundström–Poromaa I, Skalkidou A. Inflammatory and anti–inflammatory markers in plasma: from late pregnancy to early postpartum. *Scientific Reports*. 2019;9:1863. doi:10.1038/s41598–018–38304–w.

185. Brookes PS, Salinas EP, Darley–Usmar K, Eiserich JP, Freeman BA, Darley–Usmar VM et al. Concentration-dependent effects of nitric oxide on mitochondrial permeability transition and cytochrome c release. *J. Biol. Chem*. 2000;275:20474–9. doi: 10.1074/jbc.M001077200

186. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate—polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*. 1981;112(2):195–203. doi: 10.1016/0003-2697(81)90281-5.

187. Carecchio M, Cantello R, Comi C. Revisiting the molecular mechanism of neurological manifestations in antiphospholipid syndrome: beyond vascular

damage. Journal of Immunology Research. 2014;2014:239398.
doi: 10.1155/2014/239398.

188. Cella M, Farina MG, Dominguez Rubio AP et al. Dual effect of nitric oxide on uterine prostaglandin synthesis in a murine model of preterm labour. Br. J. Pharmacol. 2010;161(4):844–855.

189. Cervera R. Antiphospholipid syndrome Thrombosis Research. 2017;151(1):43–47.

190. Chai J, Shi Y. Apoptosome and inflammasome: conserved machineries for caspase activation. National Science Review. 2014;1(1):101–118.
<https://doi.org/10.1093/nsr/nwt025>.

191. Chaturvedi S, Brodsky RA, McCrae KR. Complement in the Pathophysiology of the Antiphospholipid Syndrome. Front Immunol. 2019;10:449. doi:10.3389/fimmu.2019.00449

192. Chen H, Leng Y, Li Z. Beta-actin in the signaling of transmembrane TNF- α -mediated cytotoxicity. Methods Mol Biol. 2014;1155:55–68.

193. Chen Y, Vartiainen NE, Ying W, et al. Astrocytes protect neurons from nitric oxide toxicity by a glutathione-dependent mechanism. J. Neurochem. 2001;77:1601–1610.

194. Chighizola CB, Andreoli L, de Jesus GR, et al. The association between antiphospholipid antibodies and pregnancy morbidity, stroke, myocardial infarction, and deep vein thrombosis: a critical review of the literature. Lupus. 2015;24(9):980–984. doi:10.1177/0961203315572714.

195. Choi BM, Pae HO, Jang SI, Kim YM, Chung HT. Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator. J Biochem Mol Biol. 2002;35(1):116–126. doi:10.5483/bmbrep.2002.35.1.116.

196. Chouchani ET, Methner C, Nadtochiy SM, Logan A, Pell VR, Ding S, et al. Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I. Nat. Med. 2013; 19(6):753–759. doi:10.1038/nm.3212.

197. Cinelli MA, Do HT, Miley GP, Silverman RB. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Med Res Rev.* 2020;40(1):158–189. doi:10.1002/med.21599.
198. Cobb CA, Cole MP. Oxidative and nitrative stress in neurodegeneration. *Neurobiol Dis.* 2015;84:4–21. doi: 10.1016/j.nbd.2015.04.020.
199. Collicot M, Buhagiar SW, Mercieca C. Catastrophic antiphospholipid syndrome in pregnancy: a life-threatening condition. *BMJ Case Rep.* 2019;12(9):230863. doi: 10.1136/bcr-2019-230863.
200. Corban MT, Duarte-Garcia A, McBane RD, Matteson EL, Lerman LO, Lerman A. Antiphospholipid Syndrome: Role of Vascular Endothelial Cells and Implications for Risk Stratification and Targeted Therapeutics. *J Am Coll Cardiol.* 2017;69(18):2317–2330. doi:10.1016/j.jacc.2017.02.058.
201. Cuadrado MJ, Mujic F, Muñoz E, et al. Thrombocytopenia in the antiphospholipid syndrome. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 1997;56:194–196.
202. D'Aversa TE, Eugenin L, Lopez, et al. Myelin basic protein induces inflammatory mediators from primary human endothelial cells and blood–brain barrier disruption : implications for the pathogenesis of multiple sclerosis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2013;39:270–283.
203. Danielisova V, Burda J, Nemethova M, Gottlieb M. Aminoguanidine Administration Ameliorates Hippocampal Damage After Middle Cerebral Artery Occlusion in Rat. *Neurochem Res.* 2011;36:476–486. doi 10.1007/s11064-010-0366-1.
204. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int.* 2019;43(6):582–592. doi: 10.1002/cbin.11137.
205. de Azevedo FVA, Maia DG, de Carvalho JF, Rodrigues CEM. Renal involvement in antiphospholipid syndrome. *Rheumatol Int.* 2018;38(10):1777–1789. doi:10.1007/s00296-018-4040-2

206. de Groot PG, de Laat B. Mechanisms of thrombosis in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2017;31(3):334–341. doi: 10.1016/j.berh.2017.09.008.

207. de Groot PG, Urbanus RT. Antiphospholipid syndrome – not a noninflammatory disease. *Semin Thromb Hemost*. 2015;41(6):607–14. doi: 10.1055/s-0035-1556725.

208. de Groot PG. Mechanisms of anti-phospholipid antibody formation and action. *Thromb Res*. 2011;127 Suppl 3:S40–S42. doi:10.1016/S0049-3848(11)70011-1.

209. de Groot PG. Platelets as pivot in the antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2014;124(4):475–476.

210. de Jesús GR, Rodrigues G, de Jesús NR, Levy RA. Pregnancy morbidity in antiphospholipid syndrome: what is the impact of treatment? *Curr Rheumatol Rep*. 2014;16(2):403. doi: 10.1007/s11926-013-0403-6.

211. de Laat B, de Groot PG. Autoantibodies directed against domain I of beta2-glycoprotein I. *Curr.Rheumatol.Rep*. 2011;13:70–76.

212. Delgado Alves J, Mason LJ, Ames PR, Chen PP, Rauch J, Levine JS et al. Antiphospholipid antibodies are associated with enhanced oxidative stress, decreased plasma nitric oxide and paraoxonase activity in an experimental mouse model. *Rheumatology (Oxford)*. 2005;44(10):1238–1244. doi:10.1093/rheumatology/keh722.

213. Devreese KMJ, Linskens EA, Benoit D, Peperstraete H. Antiphospholipid antibodies in patients with COVID-19: A relevant observation? [published online ahead of print, 2020 Jul 3]. *J Thromb Haemost*. 2020;10.1111/jth.14994. doi:10.1111/jth.14994.

214. Dingman A, Lee SY, Derugin N, Wendland MF, Vexler ZS. Aminoguanidine inhibits caspase-3 and calpain activation without affecting microglial activation following neonatal transient cerebral ischemia. *Journal of Neurochemistry*. 2006;96:1467–1479. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03672.x.

215. Du AJ, Ren B, Gao XW, Yang L, Fu Y, Zhao XD. Effects of aminoguanidine on retinal apoptosis in mice with oxygen-induced retinopathy. *Int J Ophthalmol*. 2013;6(4):436–41. doi: 10.3980/j.issn.2222–3959.2013.04.05.
216. Duarte–García A, Pham MM, Crowson CS, Amin S, Moder KG, Pruthi RK, Warrington KJ, Matteson EL. The Epidemiology of Antiphospholipid Syndrome: A Population–Based Study. *Arthritis Rheumatol*. 2019;71(9):1545–1552. doi: 10.1002/art.40901.
217. Dugina V., Khromova N., Rybko V., Blizniukov O., Shagieva G., Chaponnier C., Kopnin B., Kopnin P. Tumor promotion by γ and suppression by β non-muscle actin isoforms. *Oncotarget*. 2015; 6: 14556-14571.
218. d'Ythurbide G, Rousset P, Carbonne B, et al. Liver infarcts with early HELLP syndrome and probable catastrophic antiphospholipid syndrome. *Rev Med Interne*. 2009;30(3):255–259. doi:10.1016/j.revmed.2008.09.013.
219. Dzoljic E, Grbatinic I, Kostic V. Why is nitric oxide important for our brain? *Funct Neurol*. 2015;30(3):159–63. doi: 10.11138/fneur/2015.30.3.159.
220. Edwards L, Wanless IR. Mechanisms of liver involvement in systemic disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2013;27:471–483.
221. El–Assaad F, Krilis SA, Giannakopoulos B. Posttranslational forms of beta 2–glycoprotein I in the pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *Thrombosis J*. 2016;14:20. <https://doi.org/10.1186/s12959–016–0115–z>.
222. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* – 1959;82:70–77.
223. Eruslanov E, Kusmartsev S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flowcytometry. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 2010;594:57–72.
224. Falahzadeh Kh, Banaei-Esfahani A, Shahhoseini M. The potential roles of actin in the nucleus. *Cell J*. 2015;17(1):7-14.
225. Farzaneh–Far A, Roman MJ, Lockshin MD, Devereux RB, Paget SA, Crow MK, et al. Relationship of antiphospholipid antibodies to cardiovascular manifestations of systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism: Official*

Journal of the American College of Rheumatology. 2006;54(12):3918–25. doi: 10.1002/art.22265 18.

226. Fernandez–Checa JC, Fernandez A, Morales A, Mari M, Garcia–Ruiz C, Colell A. Oxidative stress and altered mitochondrial function in neurodegenerative diseases: lessons from mouse models. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*. 2010;9:439–454.

227. Ferreira EI, Serafim RAM. Nitric Oxide Synthase Inhibitors, Nitric Oxide Synthase – Simple Enzyme–Complex Roles, Seyed Soheil Saeedi Saravi, IntechOpen, 2017. doi: 10.5772/67027. Available at <https://www.intechopen.com/books/nitric-oxide-synthase-simple-enzyme-complex-roles/nitric-oxide-synthase-inhibitors>.

228. Ferro D, Saliola M, Meroni PL, et al. Enhanced monocyte expression of tissue factor by oxidative stress in patients with antiphospholipid antibodies: effect of antioxidant treatment. *J Thromb Haemost*. 2003;1(3):523–531. doi:10.1046/j.1538–7836.2003.00108.x.

229. Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol*. 2011; 194:7–15. doi: 10.1083/jcb.201102095.

230. Fleetwood T, Cantello R, Comi C. Antiphospholipid Syndrome and the Neurologist: From Pathogenesis to Therapy. *Front. Neurol*. 2018;9:1001. doi: 10.3389/fneur.2018.01001

231. Forastiero R. Bleeding in the antiphospholipid syndrome. *Hematology*. 2012;1:153-155. doi: 10.1179/102453312X13336169156654.

232. Forastiero RR, Martinuzzo ME, De Larranaga GF. Circulating levels of tissue factor and proinflammatory cytokines in patients with primary antiphospholipid syndrome or leprosy related antiphospholipid antibodies. *Lupus*. 2005 Feb;14(2):129–36. doi: 10.1191/0961203305lu2048oa.

233. Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandes MS, Xu Q, Griendling KK. Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circ Res*. 2018;122(6):877–902. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.311401.

234. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012;33(7):829–837d. doi:10.1093/eurheartj/ehr304.

235. Fukai T, Ushio–Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(6):1583–606. doi: 10.1089/ars.2011.3999.
236. Gabeta S, Norman GL, Gatselis N, Liaskos C, Papamichalis PA, Garagounis A, et al. IgA anti–b2GPI antibodies in patients with autoimmune liver diseases. *J Clin Immunol*. 2008;28(5):501–11. doi: 10.1007/s10875-008-9211-6.
237. Gardiner C, Hills J, Machin SJ, Cohen H. Diagnosis of antiphospholipid syndrome in routine clinical practice. *Lupus*. 2013; 22(1):18–25.
238. Genc H, Baysal B, Eren B, et al. The Protective Effect of Aminoguanidine, an Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibitor, on Aluminium Sulphate Neurotoxicity in the Rat (Wistar albino) Cerebellar Purkinje Cells: Stereological Study. *Middle Black Sea Journal of Health Science*. 2017;3(3):7–14 doi: 10.19127/mbsjohs.322015.
239. Giannakopoulos B, Krilis SA. The Pathogenesis of the Antiphospholipid Syndrome. *The New England Journal of Medicine*. 2013;368(11):1033–1044. doi: 10.1056/NEJMra1112830.
240. Giannella L, Beraldi R, Giulini S, et al. Nitric oxide metabolite levels and assessment of cervical length in the prediction of preterm delivery among women undergoing symptomatic preterm labor. *Int. J. Gynaecol. Obstet*. 2012;116(3):223–227.
241. Gomez–Guzman M, Jiménez R, Romero M, et al. Chronic hydroxychloroquine improves endothelial dysfunction and protects kidney in a mouse model of systemic lupus erythematosus. *Hypertension*. 2014;64(2):330–337. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03587.
242. Gomez–Puerta J A, Cervera R. Diagnosis and classification of the antiphospholipid syndrome. *Journal of Autoimmunity*. 2014;48–49:20–25.
243. Gornik HL, Creager MA. Arginine and endothelial and vascular health. *J. Nutr*. 2004;134(10):2880S–2887S.
244. Graf J. Central Nervous System Manifestations of Antiphospholipid Syndrome. *Rheum Dis Clin North Am*. 2017;43(4):547–560.

245. Green LC, Davie AW, Golawski J. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal. biochem.* 1982;126(1):131–138.
246. Grenn RC, Yalavarthi S, Gandhi AA, et al. Endothelial progenitor dysfunction associates with a type I interferon signature in primary antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2017;76(2):450–457. doi:10.1136/annrheumdis-2016-209442.
247. Gris JC, Bouvier S. Antiphospholipid syndrome: looking for are focusing. *Thromb. Res.* 2013;131(1):28–31.
248. Gropp K, Weber N, Reuter M et al. β 2-glycoprotein I, the major target in antiphospholipid syndrome, is a special human complement regulator. *Blood.* 2011; 118:2774–2783.
249. Gutmann C, Siow R, Gwozdz AM, Saha P, Smith A. Reactive Oxygen Species in Venous Thrombosis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(6):1918. doi:10.3390/ijms21061918.
250. Harauz G, Boggs JM. Myelin management by the 18.5-kDa and 21.5-kDa classic myelin basic protein isoforms. *J Neurochem.* 2013;125(3):334–61. doi: 10.1111/jnc.12195.
251. Heush P, Aker S, Boenger K. Increased inducible nitric oxide synthase and arginase II expression in heart failure: no net nitrite/nitrate production and protein S-nitrosylation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2010;299:446–453.
252. Hladovec J. *Physiol. Bohemoslov.* 1978;27:140–144.
253. Hol EM, Pekny M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Curr Opin Cell Biol.* 2015;32:121–30. doi: 10.1016/j.ceb.2015.02.004.
254. Howes A, Taubert C, Blankley S, Spink N et al. Differential production of type I IFN determines the reciprocal levels of IL-10 and proinflammatory cytokines produced by C57BL/6 and BALB/c macrophages. *J Immunol.* 2016;197(7):2838–2853.
255. Iwakiri Y. Nitric oxide in liver fibrosis: The role of inducible nitric oxide synthase. *Clin Mol Hepatol.* 2015;21(4):319–25. doi: 10.3350/cmh.2015.21.4.319.

256. Jadeja RN, Devkar RV, Nammi S. Oxidative Stress in Liver Diseases: Pathogenesis, Prevention, and Therapeutics. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:8341286. doi: 10.1155/2017/8341286.
257. Javadi–Paydar M, Lesani A, Vakilipour R, et al. Evaluation of the tocolytic effect of morphine in a mouse model of lipopolysaccharide–induced preterm delivery: the role of nitric oxide. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol*. 2009;147(2):166–172.
258. Jin RC, Mahoney CE, Coleman Anderson L, et al. Glutathione peroxidase–3 deficiency promotes platelet–dependent thrombosis in vivo. *Circulation*. 2011;123(18):1963–1973. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.000034.
259. Kagan VE, Borisenko GG, Tyurina YY, Janesko KL, Vagni VA et al. Enhanced oxidative stress in iNOS–deficient mice after traumatic brain injury: support for a neuroprotective role of iNOS. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2005;25:673–84.
260. Kamphuis W, Mamber C, Moeton M, Kooijman L, Sluijs JA, Jansen AH, et al. GFAP isoforms in adult mouse brain with a focus on neurogenic astrocytes and reactive astrogliosis in mouse models of Alzheimer disease. *PLoS One*. 2012;7(8):e42823. doi: 10.1371/journal.pone.0042823.
261. Katusic ZS, Austin SA. Endothelial nitric oxide: protector of a healthy mind. *Eur Heart J*. 2014;35(14):888–94. doi: 10.1093/eurheartj/eh544.
262. Katzav A, Shoenfeld Y, Chapman J. The pathogenesis of neural injury in animal models of the antiphospholipid syndrome. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2010;38(2–3):196–200. doi:10.1007/s12016-009-8154-x.
263. Kelkka T, Kienhofer D, Hoffmann M, et al. Reactive oxygen species deficiency induces autoimmunity with type 1 interferon signature. *Antioxid Redox Signal*. 2014;21(16):2231–2245. doi: 10.1089/ars.2013.5828.
264. Kienhofer D, Boeltz S, Hoffmann MH. Reactive oxygen homeostasis – the balance for preventing autoimmunity. *Lupus*. 2016;25(8):943–954. <https://doi.org/10.1177/0961203316640919>.

265. Kim B, Kim S, Jin MS. Crystal structure of the human glial fibrillary acidic protein 1B domain. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;503(4):2899–2905. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.08.066.
266. Kim JH, Yee C, Kuk JY, et al. Hepatic infarction in a pregnant woman with antiphospholipid syndrome and triple antibody positivity: A case report focusing on catastrophic antiphospholipid syndrome. *Obstet Gynecol Sci*. 2016;59(5):397–402. doi:10.5468/ogs.2016.59.5.397.
267. Kimber–Trojnar Z, Leszczyńska–Gorzelak B, Marciniak B, Bartosiewicz J, Oleszczuk J. Tocolytic therapy in threatened preterm labor. *Ginekol. Pol*. 2010;81(2):120–124.
268. Kiray H, Lindsay LS, Hosseinzadeh S, et al. The multifaceted role of astrocytes in regulating myelination. *Exp. Neurol*. 2016;283:541–549.
269. Koenig M, Roy M, Baccot S, Cuilleron M, de Filippis JP, Cathébras P. Thrombotic microangiopathy with liver, gut, and bone infarction (catastrophic antiphospholipid syndrome) associated with HELLP syndrome. *Clin Rheumatol*. 2005;24(2):166–168. doi:10.1007/s10067–004–1017–1.
270. Koike T. Antiphospholipid syndrome: 30 years and our contribution. *Int J Rheum Dis*. 2015;18(2):233–41. doi: 10.1111/1756–185X.12438.
271. Kontogiorgis C, Hadjipavlou–Litina D. Nitric Oxide Synthases and Their Natural Inhibitors. *Current Enzyme Inhibition*. 2016;12:3. doi.org/10.2174/1573408012666151126185628.
272. Kristi L. Allen, Anne Hamik, Mukesh K. Jain, Keith R. McCrae. Endothelial cell activation by antiphospholipid antibodies is modulated Kruppel–like transcription factors. *Blood*. 2011;117(23):6383–6391.
273. Krone KA, Allen KL, McCrae KR. Impaired Fibrinolysis in the Antiphospholipid Syndrome. *Curr Rheumatol Rep*. 2010;12(1):53–57.
274. Kuipers HF, Yoon J, Horssen J, et al. Phosphorylation of α B–crystallin supports reactive astrogliosis in demyelination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017;114(9):1745–1754.

275. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680–685.

276. Lai ZW, Marchena–Mendez I, Perl A. Oxidative stress and Treg depletion in lupus patients with anti–phospholipid syndrome. *Clin Immunol*. 2015;158(2):148–152. doi:10.1016/j.clim.2015.03.024.

277. Leah E. Connective tissue diseases: blockade of NO production drives thrombosis in APS. *Nat Rev Rheumatol*. 2011;7(2):71. doi: 10.1038/nrrheum.2010.219.

278. Lee KM, MacLean AG. New advances on glial activation in health and disease. *World J Virol*. 2015;4(2):42–55.

279. Leon–Bollotte L, Subramaniam S, Cauvard O, Plenchette–Colas S, Paul C, Godard C. et al. S–nitrosylation of the death receptor fas promotes fas ligand–mediated apoptosis in cancer cells. *Gastroenterology*, 2011;140(7):2009–18, 2018.e1–4 doi: 10.1053/j.gastro.2011.02.053.

280. Li S, Tan HY, Wang N, Zhang ZJ, Lao L, Wong CW, et al. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *Int J Mol Sci*. 2015;16(11):26087–124. doi: 10.3390/ijms161125942.

281. Li XX, Tsoi B, Li YF, Kurihara H, He RR. Cardiolipin and its different properties in mitophagy and apoptosis. *J Histochem Cytochem*. 2015;63(5):301–311. doi:10.1369/0022155415574818.

282. Lind M, Hayes A, Caprnda M, et al. Inducible nitric oxide synthase: Good or bad? *Biomed Pharmacother*. 2017;93:370–375. doi:10.1016/j.biopha.2017.06.036.

283. Liu G, Geng J. Glial fibrillary acidic protein as a prognostic marker of acute ischemic stroke. *Hum Exp Toxicol*. 2018;37(10):1048–1053. doi: 10.1177/0960327117751236.

284. Liu H, Li Q, Wang Y et al. Elevated nitric oxide levels associated with hepatic cell apoptosis during liver injury. *Hepatol Res*. 2017;47(2):178–185.

285. Lopez–Pedrera Ch, Barbarroja N, Jimenez–Gomez Y, Collantes–Estevez E, Aguirre MaA, Cuadrado MaJ. Oxidative stress in the pathogenesis

of atherothrombosis associated with anti-phospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus: new therapeutic approaches. *Rheumatology*. 2016;55:2096–2108.

286. Lourenco CF, Ledo A, Barbosa RM, Laranjinha J. Neurovascular–neuroenergetic coupling axis in the brain: master regulation by nitric oxide and consequences in aging and neurodegeneration. *Free Radic Biol Med*. 2017;108:668–682. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.026.

287. Lowry OM, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 1951;193(1):265–275.

288. Lushchak, V. I. Classification of oxidative stress based on its intensity. *EXCLI Journal*. 2014. Vol. 13. C. 922–937.

289. Maioli G, Calabrese G, Capsoni F, Gerosa M, Meroni PL, Chighizola CB. Lung Disease in Antiphospholipid Syndrome. *Semin Respir Crit Care Med*. 2019;40(2):278–294. doi:10.1055/s-0039-1683994.

290. Manganelli V, Capozzi A, Recalchi S. et al. Altered traffic of cardiolipin during apoptosis: exposure on the cell surface as a trigger for “antiphospholipid antibodies. *Journal of Immunology Research*. 2015;847985:9. doi.org/10.1155/2015/847985

291. Marchi R, Garmendia J, Kanzler D, Fuenmayor J. Study of the fibrinolytic process in a patient with antiphospholipid syndrome. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2015;26(3):239–245. doi:10.1097/MBC.0000000000000062.

292. Mari M, Morales A, Colell A, Garcia–Ruiz C, Fernández–Checa JC. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11:2685–2700. doi: 10.1089/ARS.2009.2695.

293. Mari M, Morales A, Colell A, Garcia–Ruiz C, Kaplowitz N, Fernandez–Checa JC. Mitochondrial glutathione: features, regulation and role in disease. *Biochim. Biophys. Acta*. 2013;1830(5):3317–3328. doi:10.1016/j.bbagen.2012.10.018

294. Matsubara K, Higaki T, Matsubara Y, Nawa A. Nitric oxide and reactive oxygen species in the pathogenesis of preeclampsia. *Int J Mol Sci*. 2015;16(3):4600–14. doi: 10.3390/ijms16034600.

295. Mayer M, Cerovec M, Rados M. et al. Antiphospholipid syndrome and central nervous system. *Clin Neurol Neurosurg.* 2010;112(7):602–608.
296. McDonnell T, Wincup C, Buchholz I, Pericleous C, Giles I, Ripoll V et al. The role of beta-2-glycoprotein I in health and disease associating structure with function: more than just APS. *Blood Reviews.* 2019;33:100610. doi:10.1016/j.blre.2019.100610.
297. Menachem A, Chapman J, Katzav A. Significant changes in the levels of secreted cytokines in brains of experimental antiphospholipid syndrome mice. *Autoimmune diseases.* 2012;2012:404815. doi: 10.1155/2012/404815.
298. Mendoza-Pinto C, Escárcega RO, García-Carrasco M, Bailey DJO, Gálvez-Romero JL, Cervera R. Viral infections and their relationship with catastrophic antiphospholipid syndrome: a possible pathogenic mechanism of severe COVID-19 thrombotic complications [published online ahead of print, 2020 Jun 7]. *J Intern Med.* 2020;10.1111/joim.13123. doi:10.1111/joim.13123.
299. Meroni P, Chighizola C, Rovelli F, Gerosa M. Antiphospholipid syndrome in 2014: more clinical manifestations, novel pathogenic players and emerging biomarkers. *Arthritis Res. Ther.* 2014;6(2):209.
300. Michel T, Vanhoutte PM. Cellular signaling and NO production. *Pflugers Arch.* 2010;459(6):807–816. doi:10.1007/s00424-009-0765-9.
301. Middeldorp J, Hol EM. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol.* 2011;93(3):421–43. doi: 10.1016/j.pneurobio.2011.01.005.
302. Mineo C, Lanier L, Jung E, Sengupta S, Ulrich V, Sacharidou A, et al. Identification of a Monoclonal Antibody That Attenuates Antiphospholipid Syndrome-Related Pregnancy Complications and Thrombosis. *PLOS ONE.* 2016;11(7): e0158757. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158757>.
303. Mineo C, Shaul PW. New Insights into the Molecular Basis of the Antiphospholipid Syndrome. *Drug Discov Today Dis Mech.* 2011;8(1–2):47–52. doi:10.1016/j.ddmec.2011.12.002.

304. Mineo C. Inhibition of nitric oxide and antiphospholipid antibody-mediated thrombosis. *Curr Rheumatol Rep*. 2013;15(5):324. doi:10.1007/s11926-013-0324-4
305. Ming MS, Kanneganti T-D. Converging roles of caspases in inflammasome activation, cell death and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(1):7–21.
306. Miranda S, Billoir P, Damian L, Thiebaut PA, Schapman D, Le Besnerais M, et al. Hydroxychloroquine reverses the prothrombotic state in a mouse model of antiphospholipid syndrome: Role of reduced inflammation and endothelial dysfunction. *PLoS ONE*. 2019;14(3):e0212614. doi:10.1371/journal.pone.0212614
307. Miranda-Díaz AG, Cardona-Muñoz EG, Pacheco-Moisés FP. The Role of Cardiolipin and Mitochondrial Damage in Kidney Transplant. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:3836186. doi:10.1155/2019/3836186.
308. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T. et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J. Thromb. Haemost.*, 2006;4(2):295–306.
309. Moore C, Tymvios C, Emerson M. Functional regulation of vascular and platelet activity during thrombosis by nitric oxide and endothelial nitric oxide synthase. *ThrombHaemost*. 2010;104(2):342–349.
310. Morales JM, Serrano M, Martinez-Flores JA, Perez D, Serrano A. Antiphospholipid Syndrome and Renal Allograft Thrombosis. *Transplantation*. 2019;103(3):481–486. doi:10.1097/TP.0000000000002510.
311. Mulla MJ, Brosens JJ, Chamley LW, et al. Antiphospholipid antibodies induce a pro-inflammatory response in first trimester trophoblast via the TLR4/MyD88 pathway. *Am J Reprod Immunol*. 2009;62(2):96–111. doi:10.1111/j.1600-0897.2009.00717.x.
312. Muller-Calleja N, Hollerbach A, Ritter S, et al. Tissue factor pathway inhibitor primes monocytes for antiphospholipid antibody-induced thrombosis. *Blood*. 2019;134(14):1119–1131. doi:10.1182/blood.2019001530.

313. Muscal E, Brey RL. Antiphospholipid syndrome and the brain in pediatric and adult patients. *Lupus*. 2010;19(4):406–411.
314. Napoli C, Ignarro LJ. Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases. *Arch Pharm Res*. 2009;32(8):1103–1108.
315. Naseeb F, Arfaj AA, Hamdani A, Kfoury H, Parvez K, Mogairen SA. Histological features of antiphospholipid nephropathy in patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2015;25(5):332–336.
316. Negrini S, Pappalardo F, Murdaca G, Indiveri F, Puppo F. The antiphospholipid syndrome: from pathophysiology to treatment. *Clin Exp Med*. 2017 Aug;17(3):257-267. doi: 10.1007/s10238-016-0430-5.
317. Oaks Z, Winans T, Caza T, Fernandez D, Liu Y, Landas SK, Banki K, Perl A. Mitochondrial Dysfunction in the Liver and Antiphospholipid Antibody Production Precede Disease Onset and Respond to Rapamycin in Lupus-Prone Mice. *Arthritis Rheumatol*. 2016;68(11):2728–2739. doi: 10.1002/art.39791.
318. Obed A, Bashir A, Jarrad AA. Case of Live Donor Liver Transplantation in Acute-on-Chronic Liver Failure with Budd-Chiari Syndrome: Donor and Recipient with Antiphospholipid Antibody Syndrome. *Am J Case Rep*. 2018;19:767–772. doi:10.12659/AJCR.909694.
319. Ohmura K, Oku K, Atsumi T. The pathogenesis, diagnosis and treatment of antiphospholipid syndrome. *Nihon. Rinsho*. 2014;72(7):1309–1313.
320. Oku K, Nakamura H, Kono M, Ohmura K, Kato M, Bohgaki T, et al. Complement and thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Autoimmun Rev*. 2016;15(10):1001–1004. doi: 10.1016/j.autrev.2016.07.020
321. Orozco-López G, Rubio-Jurado B, Nava-Zavala AH. Concepts of hemostasis, thrombophilia and antiphospholipid syndrome. *Residente*. 2015;10(3):142–153.
322. Ozaras R, Mert A, Yilmaz MH, Kumbasar H, Tabak F, Ozturk R. Liver involvement in catastrophic antiphospholipid syndrome. *Intern Med*. 2004;43(4):346–347. doi:10.2169/internalmedicine.43.346.

323. Passam FH, Giannakopoulos B, Mirarabshahi P, Krilis SA. Molecular pathophysiology of the antiphospholipid syndrome: the role of oxidative post-translational modification of beta 2 glycoprotein I. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2011;9:275–282.
324. Patrikios P, Stadelmann C, Kutzelnigg A, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, et al. Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. *Brain*. 2006;129(12):3165–3172.
325. Perez-Sanchez C, Ruiz-Limon P, Aguirre MA, et al. Mitochondrial dysfunction in antiphospholipid syndrome: implications in the pathogenesis of the disease and effects of coenzyme Q(10) treatment. *Blood*. 2012;119(24):5859–5870. doi:10.1182/blood-2011-12-400986.
326. Petzold A. Glial fibrillary acidic protein is a body fluid biomarker for glial pathology in human disease. *Brain Res*. 2015;1600:17–31. doi: 10.1016/j.brainres.2014.12.027.
327. Picon-Pages P, Garcia-Buendia J, Munoz FJ. Functions and dysfunctions of nitric oxide in brain. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2019;1865(8):1949–1967. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.11.007.
328. Plenchette S. Role Of S-Nitrosylation In The Extrinsic Apoptotic Signalling Pathway In Cancer. *Redox Biol*. 2015;5:415. doi:10.1016/j.redox.2015.09.017.
329. Pontara E, Banzato A, Bison E, et al. Thrombocytopenia in high-risk patients with antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost*. 2018;16(3):529–532. doi:10.1111/jth.13947
330. Pope AJ, Karrupiah K, Kearns PN, et al. Role of dimethylarginine dimethylaminohydrolases in the regulation of endothelial nitric oxide production. *J. Biol. Chem*. 2009;284(51):35338–35347.
331. Popolo A, Adesso S, Pinto A, Autore G, Marzocco S. L-Arginine and its metabolites in kidney and cardiovascular disease. *Amino Acids*. 2014;46(10):2271–86. doi: 10.1007/s00726-014-1825-9.

332. Porta C, Buggia I, Bonomi I, Caporali R, Scatola C, Montecucco C. Nitrite and nitrate plasma levels, as markers of nitric oxide synthesis, in antiphospholipid antibodies–related conditions and in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost.* 1997;78(2):965–967.

333. Posokhova KA, Sampara SR, Sak IY, Yaremchuk OZ. The effectiveness of nitric oxide precursor in experimental gestational antiphospholipid syndrome. 9th Meeting of the European Forum on Antiphospholipid Antibodies, Krakow, 16–18 May 2013, p. 61.

334. Poulos TL, Li H. Nitric oxide synthase and structure–based inhibitor design. *Nitric Oxide.* 2017;63:68–77. doi:10.1016/j.niox.2016.11.004.

335. Poulos TL, Li H. Structural basis for isoform–selective inhibition in nitric oxide synthase. *Acc Chem Res.* 2013;46(2):390–398. doi:10.1021/ar300175n.

336. Poulton K, Rahman A, Giles I. Examining how antiphospholipid antibodies activate intracellular signaling pathways: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum.* 2012 Apr;41(5):720–36. doi: 10.1016/j.semarthrit.2011.09.004.

337. Poulton K, Ripoll VM, Pericleous C, Meroni PL, Gerosa M, Ioannou Y, et al. Purified IgG from patients with obstetric but not IgG from non-obstetric antiphospholipid syndrome inhibit trophoblast invasion. *Am J Reprod Immunol.* 2015;73(5):390–401. doi: 10.1111/aji.12341.

338. Preiser JC. Oxidative stress. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2012;36(2):147–54. doi: 10.1177/0148607111434963.

339. Proulle V, Furie RA, Merrill–Skoloff G, Furie BC, Furie B. Platelets are required for enhanced activation of the endothelium and fibrinogen in a mouse thrombosis model of APS. *Blood.* 2014;124(4):611–622. doi:10.1182/blood–2014–02–554980.

340. Quao ZC, Tong M, Bryce E, Guller S, Chamley LW, Abrahams VM. Low molecular weight heparin and aspirin exacerbate human endometrial endothelial cell responses to antiphospholipid antibodies. *Am J Reprod Immunol.* 2018;79(1). doi: 10.1111/aji.12785.

341. Rahman A. Antiphospholipid syndrome in pregnancy. *Indian J Rheumatol* 2016;11:117–21.
342. Rahman T, Hosen I, Islam M, Shekhar H. Oxidative stress and human health. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2012;3:997–1019. doi: [10.4236/abb.2012.327123](https://doi.org/10.4236/abb.2012.327123).
343. Ramesh S, Morrell CN, Tarango C, et al. Antiphospholipid antibodies promote leukocyte–endothelial cell adhesion and thrombosis in mice by antagonizing eNOS via β 2GPI and apoER2. *J Clin Invest*. 2011;121(1):120–131. doi:10.1172/JCI39828.
344. Raschi E, Testoni C, Bosisio D. Role of the MyD88 transduction signaling pathway in endothelial activation by antiphospholipid antibodies. *Blood*. 2003;101:3495–500.
345. Rathnasamy G, V. Sivakumar, P. Rangarajan, WS. Foulds, EA. Ling and C. Kaur: NF–kappaB–mediated nitric oxide production and activation of caspase–3 cause retinal ganglion cell death in the hypoxic neonatal retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55:5878–89.
346. Rauch J, Salem D, Subang R, Kuwana M, Levine JS. β 2–Glycoprotein I – Reactive T Cells in Autoimmune Disease. *Front Immunol*. 2018;9:2836. doi: [10.3389/fimmu.2018.02836](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02836).
347. Redecha P, Franzke CW, Ruf W, Mackman N, Girardi G. Neutrophil activation by the tissue factor/Factor VIIa/PAR2 axis mediates fetal death in a mouse model of antiphospholipid syndrome. *J Clin Invest*. 2008;118(10):3453–3461. doi:10.1172/JCI36089.
348. Renato AS, Cavazzana I, Nuzzo M, Vianelli M, Napodano P, Scaini P, Tincani A. Renal involvement in primary antiphospholipid syndrome: retrospective analysis of 160 patients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010 Jul;5(7):1211–1217. doi: [10.2215/CJN.00460110](https://doi.org/10.2215/CJN.00460110).
349. Reshetnyak TM, Seredavkina NV, Satybaldyeva MA, Nasonov EL, Reshetnyak VI. Liver transplantation in a patient with primary antiphospholipid

syndrome and Budd–Chiari syndrome. *World J Hepatol.* 2015;7(19):2229–2236. doi:10.4254/wjh.v7.i19.2229.

350. Ribas V, García–Ruiz C, Fernández–Checa JC. Glutathione and mitochondria. *Front Pharmacol.* 2014;5:151. doi:10.3389/fphar.2014.00151

351. Ricarte IF, Dutra LA, Abrantes FF, et al. Neurologic manifestations of antiphospholipid syndrome. *Lupus.* 2018;27(9):1404–1414. doi:10.1177/0961203318776110.

352. Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuk JD, Barreda DR. Modified annexin v/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *Journal of Visualized Experiments: JoVE.* 2011;50:2597. doi: 10.3791/2597.

353. Rimessi A, Previati M, Nigro F, Wieckowski MR, Pinton P. Mitochondrial reactive oxygen species and inflammation: molecular mechanisms, diseases and promising therapies. *Int J Biochem Cell Biol.* 2016;81:281–293. doi: 10.1016/j.biocel.2016.06.015.

354. Ruiz–Irastorza G, Crowther M, Branch W, Khamashta MA. Antiphospholipid syndrome. *Lancet.* 2010;376:1498–1509.

355. Rytlewski K, Olszanecki R, Lauterbach R, Grzyb A. Effects of oral L–arginine on the pulsatility indices of umbilical artery and middle cerebral artery in preterm labor. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2008;138(1):23–28.

356. Sacharidou A, Chambliss KL, Ulrich V, et al. Antiphospholipid antibodies induce thrombosis by PP2A activation via apoER2–Dab2–SHC1 complex formation in endothelium. *Blood.* 2018;131(19):2097–2110. doi:10.1182/blood–2017–11–814681.

357. Sacharidou A, Shaul PW, Mineo C. New Insights in the Pathophysiology of Antiphospholipid Syndrome. *Semin Thromb Hemost.* 2018;44(5):475–482. doi:10.1055/s–0036–1597286.

358. Sada PR, Cohen H, Isenberg D. The Pathophysiology of Antiphospholipid Syndrome. *The Open Urology & Nephrology Journal.* 2015;8:2–9.

359. Sakhel K, Usta IM, Hannoun A, Arayssi T, Nassar AH. Liver infarction in a woman with systemic lupus erythematosus and secondary anti–phospholipid

and HELLP syndrome. *Scand J Rheumatol.* 2006;35(5):405–408. doi:10.1080/03009740600588343

360. Saligrama PT, Fortner KA, Secinaro MA, Collins CC, Russell JQ, Budd RC. IL-15 maintains T-cell survival via S-nitrosylation-mediated inhibition of caspase-3. *Cell Death Differ.* 2014;21:904–14

361. Salim T, Serksen CL, May EE. Investigating the role of TNF- α and IFN- γ activation on the dynamics of iNOS gene expression in LPS stimulated macrophages. *PLoS One.* 2016;11(6), e0153289.

362. Saran U, Mani KP, Balaguru UM et al. sFRP4 signalling of apoptosis and angiostasis uses nitric oxide-cGMP-permeability axis of endothelium. *Nitric Oxide.* 2017;66:30–42.

363. Satta R, Biondi G Antiphospholipid syndrome and pregnancy. *G Ital Dermatol Venereol.* 2019;154(3):277–285. doi: 10.23736/S0392–0488.18.06152–7.

364. Schreiber K, Hunt BJ. Pregnancy and Antiphospholipid Syndrome. *Semin Thromb Hemost.* 2016;42(7):780–788. doi: 10.1055/s–0036–1592336.

365. Sciascia S, Baldovino S, Schreiber K, Solfietti L, Roccatello D. Antiphospholipid Syndrome and the Kidney. *Semin Nephrol.* 2015;35(5):478–486. doi:10.1016/j.semnephrol.2015.08.009.

366. Scioli MG, Storti G, D'Amico F, Guzmán RR, Centofanti F, Doldo E. et al. Oxidative Stress and New Pathogenetic Mechanisms in Endothelial Dysfunction: Potential Diagnostic Biomarkers and Therapeutic Targets. *J Clin Med.* 2020;9(6):1995. doi:10.3390/jcm9061995.

367. Segal BM, Thomas W, Zhu X, et al. Oxidative stress and fatigue in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2012;21(9):984–992. doi:10.1177/0961203312444772.

368. Serrano M, Martínez-Flores JA, Pérez D, García F, Cabrera-Marante O, Pleguezuelo D, et al. β_2 -Glycoprotein I/IgA Immune Complexes: A Marker to Predict Thrombosis After Renal Transplantation in Patients With Antiphospholipid Antibodies. *Circulation.* 2017;135(20):1922–1934. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.025992.

369. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 2015;4:180–3. doi: 10.1016/j.redox.2015.01.002.

370. Sikara MP, Grika EP, Vlachoyiannopoulos PG. Pathogenic Mechanisms of Thrombosis in Antiphospholipid Syndrome (APS), Thrombophilia, Andrea Luigi Tranquilli. 2011. IntechOpen, doi: 10.5772/25522. Available from: <https://www.intechopen.com/books/thrombophilia/pathogenic-mechanisms-of-thrombosis-in-antiphospholipid-syndrome-aps->

371. Simoes JS, Davies B, Sangle SR, Davies RJ, D'Cruz DP. Hepatic artery stenosis in antiphospholipid syndrome. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2012;18(4):432–433. doi:10.1177/1076029611430957.

372. Simoncini S, Sapet C, Camoin-Jau L, et al. Role of reactive oxygen species and p38 MAPK in the induction of the pro-adhesive endothelial state mediated by IgG from patients with anti-phospholipid syndrome. *Int Immunol.* 2005;17(4):489–500. doi:10.1093/intimm/dxh229.

373. Soltesz P, Der H, Veres K, Laczik R, Sipka S, Szegedi G, et al. Immunological features of primary anti-phospholipid syndrome in connection with endothelial dysfunction. *Rheumatology.* 2008;47:1628–1634. doi:10.1093/rheumatology/ken349.

374. Song Y, Zhang F, Ying C, Kumar KA, Zhou X. Inhibition of NF- κ B activity by aminoguanidine alleviates neuroinflammation induced by hyperglycemia. *Metab Brain Dis.* 2017;32(5):1627–37. doi: 10.1007/s11011-017-0013-5.

375. Stanisavljevic N, Stojanovich L, Marisavljevic D, et al. Lipid peroxidation as risk factor for endothelial dysfunction in antiphospholipid syndrome patients. *Clin Rheumatol.* 2016;35:2485–2493. <https://doi.org/10.1007/s10067-016-3369-8>.

376. Stojanovich L, Kontic M, Smiljanic D, Djokovic A, Stamenkovic B, Marisavljevic D. Association between non-thrombotic neurological and cardiac manifestations in patients with antiphospholipid syndrome. *Clin Exp Rheumatol.* 2013;31(5):756–760.

377. Strohle A, von Bibra H, Hahn A. L-Arginine and vascular health. *Med Monatsschr Pharm.* 2016;39(12):515–20.

378. Stuehr DJ, Vasquez–Vivar J. Nitric oxide synthases—from genes to function. *Nitric Oxide*. 2017;63:29. doi:10.1016/j.niox.2017.01.005.
379. Sulagna D, Pallav S. Defining pregnancy phases with cytokine shift. *Journal of Pregnancy and Reproduction*. 2017;1(4):1–3.
380. Svenungsson E, Andersson M, Brundin L, van Vollenhoven R, Khademi M, Tarkowski A, et al. Increased levels of proinflammatory cytokines and nitric oxide metabolites in neuropsychiatric lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2001;60:372–379.
381. Swadzba J, Iwaniec T, Musial J. Increased level of tumor necrosis factor– α in patients with antiphospholipid syndrome: marker not only of inflammation but also of the prothrombotic state. *Rheumatology International*. 2011;31(3):307–13. doi: 10.1007/s00296–009–1314–8.
382. Tabatabaei SN, Girouard H. Nitric oxide and cerebrovascular regulation. *Vitam Horm*. 2014;96:347–385. doi:10.1016/B978–0–12–800254–4.00014–3.
383. Tang KT, Hsieh TY, Chao YH, Li J P, Lan J L, Lin C C, Chen DY. Apoptosis in patients with primary antiphospholipid antibody syndrome. *International Journal of Rheumatic Diseases*. 2019;22(4):677–685.
384. Taysi S, Tascan AS, Ugur MG, Demir M. Radicals, Oxidative/Nitrosative Stress and Preeclampsia. *Mini Rev Med Chem*. 2019;19(3):178–193. doi: 10.2174/1389557518666181015151350.
385. Tektonidou MG, Sotsiou F, Nakopoulou L, Vlachoyiannopoulos PG, Moutsopoulos HM. Antiphospholipid syndrome nephropathy in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid antibodies: prevalence, clinical associations, and long–term outcome. *Arthritis Rheum*. 2004;50(8):2569–2579. doi:10.1002/art.20433.
386. Tektonidou MG. Antiphospholipid Syndrome Nephropathy: From Pathogenesis to Treatment. *Front Immunol*. 2018;9:1181–1187.
387. Tektonidou MG. Antiphospholipid syndrome–associated nephropathy in systemic lupus erythematosus. *Int. J. Clin. Rheumatol*. 2012;7(2):31–134.

388. Tiboni GM, Corso AD, Marotta F. Progestational agents prevent preterm birth induced by a nitric oxide synthesis inhibitor in the mouse. *In vivo*. 2008;22(4):447-450.

389. Tong M, Viall CA, Chamley LW. Antiphospholipid antibodies and the placenta: a systematic review of their in vitro effects and modulation by treatment. *Hum. Reprod. Update*. 2015;21(1):97–118.

390. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979;76(9):4350–4354.

391. Turrent-Carriles A, Herrera-Félix JP, Amigo MC. Renal Involvement in Antiphospholipid Syndrome. *Front Immunol*. 2018;9:1008. doi: 10.3389/fimmu.2018.01008.

392. Urbanski G, Caillon A, Poli C, Kauffenstein G, Begorre MA, Loufrani L, et al. Hydroxychloroquine partially prevents endothelial dysfunction induced by anti-beta-2-GPI antibodies in an in vivo mouse model of antiphospholipid syndrome. *PLoS One*. 2018;13(11):e0206814. doi:10.1371/journal.pone.0206814.

393. Urbonaviciute V, Luo H, Sjowall Ch, Bengtsson A, Holmdahl R. Low Production of Reactive Oxygen Species Drives Systemic Lupus Erythematosus. *Trends in Molecular Medicine*. 2019;25(10):826–835. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.06.001>

394. Velasquez M, Granada MA, Galvis JC, Alvarez AM, Cadavid A. Oxidative stress in endothelial cells induced by the serum of women with different clinical manifestations of the antiphospholipid syndrome. *Biomedica*. 2019;39(4):673–688. doi:10.7705/biomedica.4701

395. Velasquez M, Rojas M, Abrahams VM, Escudero C, Cadavid AP. Mechanisms of endothelial dysfunction in antiphospholipid syndrome: association with clinical manifestations. *Front Physiol*. 2018;21(9):1840. doi: 10.3389/fphys.2018.01840.

396. Velayuthaprabhu S, Matsubayashi H, Archunan G. Beta-2 GPI induced tissue factor and placental apoptosis for the pathophysiology of pregnancy loss

in antiphospholipid syndrome. *International Journal of Research in Medical Sciences*. 2016;4(8):3109–3113.

397. Velayuthaprabhu S, Matsubayashi H, Sugi T, Nakamura M, Ohnishi Y, Ogura T, Archunan G. Expression of apoptosis in placenta of experimental antiphospholipid syndrome mouse. *Am J Reprod Immunol*. 2013;69(5):486–94. doi: 10.1111/aji.12084

398. Venditti P, Di Stefano L, Di Meo S. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Mitochondrion*. 2013;13(2):71–82. doi:10.1016/j.mito.2013.01.008.

399. Vitecek J, Lojek A, Valacchi G, Kubala L. Arginine–Based Inhibitors of Nitric Oxide Synthase: Therapeutic Potential and Challenges. *Mediators of Inflammation*. 2012;318087:22. doi.org/10.1155/2012/318087.

400. Wang G, Li H, Firoze Khan M. Differential oxidative modification of proteins in MRL^{+/+} and MRL^{/lpr} mice: Increased formation of lipid peroxidation – derived aldehyde–protein adducts may contribute to accelerated onset of autoimmune response. *Free Radic Res*. 2012;46(12):1472–1481. doi:10.3109/10715762.2012.727209.

401. Wang K. Autophagy and apoptosis in liver injury. *Cell Cycle*. 2015;14(11):1631–42. doi: 10.1080/15384101.2015.1038685.

402. Weil MT, Möbius W, Winkler A, Ruhwedel T, Wrzos C, Romanelli E, et al. Loss of Myelin Basic Protein Function Triggers Myelin Breakdown in Models of Demyelinating Diseases. *Cell Rep*. 2016;16(2):314–322. doi: 10.1016/j.celrep.2016.06.008.

403. Wiest R, Groszmann RJ. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough. *Hepatology*. 2002;35(2):478–491.

404. Wijetilleka S, Scoble T, Khamashta M. Novel insights into pathogenesis, diagnosis and treatment of antiphospholipid syndrome. *Curr Opin Rheumatol*. 2012;24(5):473–81.

405. Wilkins HM, Kirchhof D, Manning E, Joseph JW, Linseman DA. Mitochondrial glutathione transport is a key determinant of neuronal susceptibility

to oxidative and nitrosative stress. *J Biol Chem.* 2013;288(7):5091–5101. doi:10.1074/jbc.M112.405738.

406. Willis R, Gonzalez EB. Antiphospholipid Antibodies and APS Nephropathy. *The Open Urology & Nephrology Journal.* 2015;8:10–17.

407. Willis R, Gonzalez EB. Pathogenetic mechanisms of antiphospholipid antibody production in antiphospholipid syndrome. *World J Rheumatol.* 2015; 5(2):59–68.

408. Wong V, Lerner E. Nitric oxide inhibition strategies. *Future Sci OA.* 2015;1(1):FSO35. doi: 10.4155/fso.15.35

409. Xie X, Venit T, Drou N, Percipalle P. In mitochondria actin regulates mtDNA transcription and is required for mitochondrial quality control. *Science.* 2018;25(3):226–237.

410. Yalavarthi S, Gould TJ, Rao AN, et al. Release of neutrophil extracellular traps by neutrophils stimulated with antiphospholipid antibodies: a newly identified mechanism of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(11):2990–3003. doi:10.1002/art.39247.

411. Yang Y, Yu T, Lian YJ, Ma R, Yang S, Cho JY. Nitric oxide synthase inhibitors: a review of patents from 2011 to the present. *Expert Opin Ther Pat.* 2015;25(1):49–68. doi:10.1517/13543776.2014.979154.

412. Yang Z, Wang KK. Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends Neurosci.* 2015;38(6):364–374. doi:10.1016/j.tins.2015.04.003.

413. Yaremchuk OZ, Posokhova KA, Kuzmak IP, Kulitska MI, Shevchuk OO, Volska AS, et al. Influence of nitric oxide synthesis modulators on the cytokines profile in experimental antiphospholipid syndrome. *International Journal of Medicine and Medical Research.* 2019;2:113–121.

414. Yaremchuk OZ, Posokhova KA, Kuzmak IP, Kulitska MI, Klishch IM, Korda MM. Indexes of nitric oxide system in experimental antiphospholipid syndrome. *Ukr. Biochem. J.* 2020;92(1):75–83.

415. Yaremchuk OZ, Posokhova KA, Lykhatskyi PH, Letniak NYa, Moseychuk IP. L-arginine and aminoguanidine effect on the cytokine profile in obstetric antiphospholipid syndrome. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2020;11(4):136–139.
416. Yaremchuk OZ, Posokhova KA. Content of GFAP in the Brain of BALB/c Mice with the Antiphospholipid Syndrome: Effects of L-Arginine and Aminoguanidine. *Neurophysiology*. 2019;51(6):409–415.
417. Yaremchuk OZ. Contents of Myelin Basic Protein and Autoantibodies against Brain Proteins in the Experimental Antiphospholipid Syndrome. *Neurophysiology*. 2020;52(2):116–123.
418. Zhang N, Diao Y, Hua R et al. Nitric oxide-mediated pathways and its role in the degenerative diseases. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2017 Jan 1;22:824–834.
419. Zhou Q, Lian Y, Zhang Y, Li L, Li H, Shen D, et al. Platelet-derived microparticles from recurrent miscarriage associated with antiphospholipid antibody syndrome influence behaviours of trophoblast and endothelial cells. *Mol Hum Reprod*. 2019;25(8):483–494. doi: 10.1093/molehr/gaz019.
420. Ziporen L, Polak-Charcon S, Korczyn DA, et al. Neurological dysfunction associated with antiphospholipid syndrome: histopathological brain findings of thrombotic changes in a mouse model. *Clin Dev Immunol*. 2004;11(1):67–75. doi:10.1080/10446670410001670526.
421. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev*. 2014;94:909–950. doi: 10.1152/physrev.00026.2013.
422. Zuo Y, Estes SK, Gandhi AA, Yalavarthi S, Ali RA, Shi H, et al. Prothrombotic antiphospholipid antibodies in COVID-19. *Medrxiv [Preprint]*. 2020:2020.06.15.20131607. doi: 10.1101/2020.06.15.20131607.

ДОДАТКИ

Додаток А

Список праць, опублікованих 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 аміногуанідину на рівень синтезу оксиду азоту в мозочку та великих півкулях головного мозку за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому. *Медицина 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 аміногуанідину на вміст каспази-3 та β -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 И. А., Курило К. И., Цибульская 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).

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 амингуанидина 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 аминоксантидина 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 аміноксантидину 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 І. 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 аміноксантидину 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. 9th 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 оксигену 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).*

Додаток Б

Апробація результатів дослідження

1. 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).*

2. 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).*

3. Posokhova K. A., Sampara S. R., Sak I. Y., **Yaremchuk O. Z.** The effectiveness of nitric oxide precursor in experimental gestational antiphospholipid syndrome. 9th 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).*

4. 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).*

5. 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).*

6. 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).*

7. 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).*

8. 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).*

9. Брик А., Кузьмак І., **Яремчук О.** Вплив L-аргініну на деякі показники гемостазу та прооксидантно-антиоксидантної системи нирок при

експериментальному антифосфоліпідному синдрому. 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).*

10. 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).*

11. **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).*

12. **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).*

13. **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).*

14. **Яремчук О. З.**, Посохова К. А., Куліцька М. І. Вплив L-аргініну на розвиток апоптозу та продукцію активних форм оксигену 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).*

Додаток В

Акти впровадження

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної
роботи

Харківського національного
університету ім. В. Н. Каразіна
проф. М. О. Азаренков



2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи

1. Пропозиція для впровадження: Нейропротекторний ефект селективного інгібітора синтази нітроген оксиду за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому.

2. Установа, автор: Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медичної біохімії, доцент Яремчук О.З.

3. Джерела інформації:

1. Нейропротекторный эффект аминоксидина при экспериментальном антифосфолипидном синдроме на фоне беременности / О. З. Яремчук, Е. А. Посохова, Ю. В. Сорока [и др.] // Georgian Medical News. – 2020. – № 4 (301). – С. 159-165.

2. Яремчук О. З. Вплив аміноксидину на вміст гліального фібрилярного кислого протеїну у мозочку при експериментальному антифосфоліпідному синдромі на фоні вагітності / О. З. Яремчук, К. А. Посохова, М. М. Гузик // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2020. – №1 (89). – С. 36-43.

3. Яремчук О. З. Вплив L-аргініну та аміноксидину на рівень синтезу оксиду азоту в мозочку та великих півкулях головного мозку за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому / О. З. Яремчук, К. А. Посохова, І. П. Кузьмак // Медична та клінічна хімія. – 2019. – № 4. – С. 105-112.

4. Базова установа, яка проводить впровадження: Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна, кафедра біохімії.

5. Термін впровадження: 2020 р.

6. Форма впровадження: у науково-педагогічний процес.

7. Зауваження та пропозиції: немає.

Завідувач кафедри біохімії
д-р біол. наук, проф.

Перський Є. Е.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної
роботи

Харківського національного університету

ім. В. Н. Каразіна

проф. М. О. Азаренков



2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи

1. Пропозиція для впровадження: Особливості гепатопротекторного та нефропротекторного впливу попередника синтезу нітроген оксиду L-аргініну за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому.

2. Установа, автор: Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медичної біохімії, доцент Яремчук О.З.

3. Джерела інформації:

1. Yaremchuk O. Z. Indexes of nitric oxide system in experimental antiphospholipid syndrome / O. Z. Yaremchuk, K. A. Posokhova, I. P. Kuzmak, M. I. Kulitska, I. M. Klishch, M. M. Korda // Ukr. Biochem. J. – 2020. – Vol. 92, N 1. – P. 75-83.

2. Яремчук О. З. Вплив L-аргініну та аміногуанідину на показники вільнорадикального окиснення у нирках при експериментальному антифосфоліпідному синдромі / О. З. Яремчук, К. А. Посохова, М. І. Куліцька // Світ медицини та біології. – 2018. – № 3 (65). – С. 210-214.

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

4. Базова установа, яка проводить впровадження: Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна, кафедра біохімії.

5. Термін впровадження: 2020 р.

6. Форма впровадження: у науково-педагогічний процес.

7. Зауваження та пропозиції: немає.

Завідувач кафедри біохімії
д-р біол. наук, проф.

Перський Є. Є.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної
роботи



Харківського національного
університету ім. В. Н. Каразіна
проф. М. О. Азаренков

2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ матеріалів дисертаційної роботи

1. Найменування пропозиції для впровадження: Роль системи нітроген оксиду при експериментальному антифосфоліпідному синдромі.

2. Установа, автор: Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медичної біохімії, доцент Яремчук О.З.

3. Джерела інформації:

1. Indexes of nitric oxide system in experimental antiphospholipid syndrome / O. Z. Yaremchuk, K. A. Posokhova, I. P. Kuzmak, M. I. Kulitska, I. M. Klishch, M. M. Korda // Ukr. Biochem. J. – 2020. – Vol. 92, N 1. – P. 75-83.

2. Yaremchuk O. Z. Content of GFAP in the Brain of BALB/C Mice with the Antiphospholipid Syndrome: Effects of L-Arginine and Aminoguanidine / O. Z. Yaremchuk, K. A. Posokhova // Neurophysiology. – 2019. – Vol. 51, No. 6. P. 409-415.

3. Вплив модуляторів синтезу оксиду азоту на механізми розвитку апоптозу та продукцію активних форм Оксигену у лейкоцитах крові при антифосфоліпідному синдромі в експерименті / О. З. Яремчук, К. А.Посохова, Г. Г. Габор, М. М. Гузик // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2019. – №4 (88). – С. 53-62.

4. Базова установа, яка проводить впровадження: Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна, кафедра біохімії.

5. Термін впровадження: 2020 р.

6. Форма впровадження: у науково-педагогічний процес.

7. Зауваження та пропозиції: немає.

Завідувач кафедри біохімії
д-р біол. наук, проф.

Перський Є. Е.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи

Львівського національного медичного
університету імені Данила Галицького,
д. мед. наук, професор Наконечний А.Й.

«27» 08 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи

1. Найменування пропозиції для впровадження: Роль системи нітроген оксиду при експериментальному антифосфоліпідному синдромі.

2. Установа, автор: Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медичної біохімії, доцент Яремчук О.З.

3. Джерела інформації:

1. Indexes of nitric oxide system in experimental antiphospholipid syndrome / O. Z. Yaremchuk, K. A. Posokhova, I. P. Kuzmak, M. I. Kulitska, I. M. Klishch, M. M. Korda // Ukr. Biochem. J. – 2020. – Vol. 92, N 1. – P. 75-83.

2. Yaremchuk O. Z. Content of GFAP in the Brain of BALB/C Mice with the Antiphospholipid Syndrome: Effects of L-Arginine and Aminoguanidine / O. Z. Yaremchuk, K. A. Posokhova // Neurophysiology. – 2019. – Vol. 51, No. 6. P. 409-415.

3. Вплив модуляторів синтезу оксиду азоту на механізми розвитку апоптозу та продукцію активних форм Оксигену у лейкоцитах крові при антифосфоліпідному синдромі в експерименті / О. З. Яремчук, К. А. Посохова, Г. Г. Габор, М. М. Гузик // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2019. – №4 (88). – С. 53-62.

4. Базова установа, яка проводить впровадження: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, кафедра біологічної хімії.

5. Термін впровадження: 2020 р.

6. Форма впровадження: у науково-педагогічний процес

7. Зауваження та пропозиції: немає.

Завідувач кафедри біологічної хімії
д-р мед. наук, проф.



Скляров О. Я.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи
Львівського національного медичного
університету імені Данила Галицького,
д. мед.наук, професор Наконечний А.Й.

«27» _____ 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ
матеріалів дисертаційної роботи

1. Пропозиція для впровадження: Особливості гепатопротекторного та нефропротекторного впливу попередника синтезу нітроген оксиду L-аргініну за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому.

2. Установа, автор: Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медичної біохімії, доцент Яремчук О.З.

3. Джерела інформації:

1. Yaremchuk O. Z. Indexes of nitric oxide system in experimental antiphospholipid syndrome / O. Z. Yaremchuk, K. A. Posokhova, I. P. Kuzmak, M. I. Kulitska, I. M. Klishch, M. M. Korda // Ukr. Biochem. J. – 2020. – Vol. 92, N 1. – P. 75-83.

2. Яремчук О. З. Вплив L-аргініну та аміногуанідину на показники вільнорадикального окиснення у нирках при експериментальному антифосфоліпідному синдромі / О. З. Яремчук, К. А. Посохова, М. І. Куліцька // Світ медицини та біології. – 2018. – № 3 (65). – С. 210-214.

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

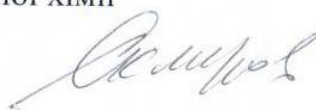
4. Базова установа, яка проводить впровадження: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, кафедра біологічної хімії.

5. Термін впровадження: 2020 р.

6. Форма впровадження: у науково-педагогічний процес.

7. Зауваження та пропозиції: немає.

Завідувач кафедри біологічної хімії
д-р мед. наук, проф.



Скляров О. Я.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор

Миколаївського національного університету

імені В. О. Сухомлинського

доц. Овчаренко А.В.



2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи

Ольги Зеновіївни Яремчук

1. Пропозиція для впровадження: Особливості гепатопротекторного та нефропротекторного впливу попередника синтезу нітроген оксиду L-аргініну за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому.

2. Установа, автор: Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медичної біохімії, доцент **Яремчук О.З.**

3. Джерела інформації:

- 1) Yaremchuk O. Z. Indexes of nitric oxide system in experimental antiphospholipid syndrome / O. Z. Yaremchuk, K. A. Posokhova, I. P. Kuzmak, M. I. Kulitska, I. M. Klishch, M. M. Korda // Ukr. Biochem. J. – 2020. – Vol. 92, N 1. – P. 75-83.
- 2) Яремчук О. З. Вплив L-аргініну та аміногуанідину на показники вільнорадикального окиснення у нирках при експериментальному антифосфоліпідному синдромі / О. З. Яремчук, К. А. Посохова, М. І. Куліцька // Світ медицини та біології. – 2018. – № 3 (65). – С. 210-214.
- 3) Яремчук О. З. Вплив L-аргініну та аміногуанідину на вміст каспази-3 та β -актину при акушерському антифосфоліпідному синдромі в експерименті / Яремчук О. З. // Вісник проблем біології і медицини. – 2020. – Вип. 1 (155). – С. 215-218.

4. Базова установа, яка проводить впровадження: Миколаївський національний університет імені В.О. Сухомлинського, кафедра хімії.

5. Термін впровадження: 2020 р.

6. Форма впровадження: у науково-педагогічний процес кафедри хімії при проведенні навчальних занять та при виконанні науково-дослідних робіт.

7. Зауваження та пропозиції: немає.

Завідувач кафедри хімії,
д-р хім. наук, проф.

В.І. Єзіков

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор

Миколаївського національного університету

імені В. О. Сухомлинського

доц. Овчаренко А.В.



2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи

Ольги Зеновіївни Яремчук

1. **Пропозиція для впровадження:** Нейропротекторний ефект селективного інгібітора синтази нітроген оксиду за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому.
2. **Установа, автор:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медичної біохімії, доцент **Яремчук О.З.**
3. **Джерела інформації:**
 - 1) Нейропротекторный эффект амингуанидина при экспериментальном антифосфолипидном синдроме на фоне беременности / О. З. Яремчук, Е. А. Посохова, Ю. В. Сорока [и др.] // Georgian Medical News. – 2020. – № 4 (301). – С. 159-165.
 - 2) Вплив аміногуанідину на вміст гліального фібрилярного кислого протеїну у мозочку при експериментальному антифосфоліпідному синдромі на фоні вагітності / О. З. Яремчук, К. А. Посохова, М. М. Гузик // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2020. – №1 (89). – С. 36-43.
 - 3) Вплив L-аргініну та аміногуанідину на рівень синтезу оксиду азоту в мозочку та великих півкулях головного мозку за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому / О. З. Яремчук, К. А. Посохова, І. П. Кузьмак // Медична та клінічна хімія. – 2019. – № 4. – С. 105-112.
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** Миколаївський національний університет імені В.О. Сухомлинського, кафедра хімії.
5. **Термін впровадження:** 2020 р.
6. **Форма впровадження:** у науково-педагогічний процес кафедри хімії при проведенні навчальних занять та при виконанні науково-дослідних робіт.
7. **Зауваження та пропозиції:** немає.

Завідувач кафедри хімії,
д-р хім. наук, проф.

В.І. Єзіков

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор

Миколаївського національного університету

імені В.О. Сухомлинського

доц. Овчаренко А.В.



2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи

Ольги Зеновіївни Яремчук

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Роль системи нітроген оксиду при експериментальному антифосфоліпідному синдромі.
2. **Установа, автор:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медичної біохімії, доцент **Яремчук О.З.**
3. **Джерела інформації:**
 - 1) Indexes of nitric oxide system in experimental antiphospholipid syndrome / O. Z. Yaremchuk, K. A. Posokhova, I. P. Kuzmak, M. I. Kulitska, I. M. Klishch, M. M. Korda // Ukr. Biochem. J. – 2020. – Vol. 92, N 1. – P. 75-83.
 - 2) Yaremchuk O. Z. Content of GFAP in the Brain of BALB/C Mice with the Antiphospholipid Syndrome: Effects of L-Arginine and Aminoguanidine / O. Z. Yaremchuk, K. A. Posokhova // Neurophysiology. – 2019. – Vol. 51, No. 6. P. 409-415.
 - 3) Вплив модуляторів синтезу оксиду азоту. на механізми розвитку апоптозу та продукцію активних форм Оксигену у лейкоцитах крові при антифосфоліпідному синдромі в експерименті / О. З. Яремчук, К. А.Посохова, Г. Г. Габор, М. М. Гузик // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2019. – №4 (88). – С. 53-62.
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** Миколаївський національний університет імені В.О. Сухомлинського, кафедра хімії.
5. **Термін впровадження:** 2020 р.
6. **Форма впровадження:** у науково-педагогічний процес кафедри хімії при проведенні навчальних занять та при виконанні науково-дослідних робіт.
7. **Ефект від впровадження:** поглиблення знань студентів про роль системи нітроген оксидів організму при експериментальному антифосфоліпідному синдромі при викладанні дисциплін «Біохімія» та «Клінічна біохімія».
8. **Зауваження та пропозиції:** немає.

Завідувач кафедри хімії,
д-р хім. наук, проф.

В.І. Єзіков

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи
Вищого державного навчального закладу
України «Буковинський державний
медичний університет»
доц. Геруш І.В.



2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ матеріалів дисертаційної роботи

1. Пропозиція для впровадження: Особливості гепатопротекторного та нефропротекторного впливу попередника синтезу нітроген оксиду L-аргініну за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому.

2. Установа, автор: Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медичної біохімії, доцент Яремчук О.З.

3. Джерела інформації:

1. Yaremchuk O. Z. Indexes of nitric oxide system in experimental antiphospholipid syndrome / O. Z. Yaremchuk, K. A. Posokhova, I. P. Kuzmak, M. I. Kulitska, I. M. Klishch, M. M. Korda // Ukr. Biochem. J. – 2020. – Vol. 92, N 1. – P. 75-83.

2. Яремчук О. З. Вплив L-аргініну та аміногуанідину на показники вільнорадикального окиснення у нирках при експериментальному антифосфоліпідному синдромі / О. З. Яремчук, К. А. Посохова, М. І. Куліцька // Світ медицини та біології. – 2018. – № 3 (65). – С. 210-214.

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

4. Базова установа, яка проводить впровадження: Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет», кафедра біоорганічної і біологічної хімії та клінічної біохімії.

5. Термін впровадження: 2020 р.

6. Форма впровадження: у науково-педагогічний процес.

7. Зауваження та пропозиції: немає.

Завідувач кафедри

біоорганічної і біологічної хімії та клінічної біохімії

канд. біол. наук, доц.

Григор'єва Н. П.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи
Вищого державного навчального закладу
України «Буковинський державний
медичний університет»
доц. Геруш І.В.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи

- 1. Найменування пропозиції для впровадження:** Роль системи нітроген оксиду при експериментальному антифосфоліпідному синдромі.
- 2. Установа, автор:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медичної біохімії, доцент Яремчук О.З.
- 3. Джерела інформації:**
 1. Indexes of nitric oxide system in experimental antiphospholipid syndrome / O. Z. Yaremchuk, K. A. Posokhova, I. P. Kuzmak, M. I. Kulitska, I. M. Klishch, M. M. Korda // Ukr. Biochem. J. – 2020. – Vol. 92, N 1. – P. 75-83.
 2. Yaremchuk O. Z. Content of GFAP in the Brain of BALB/C Mice with the Antiphospholipid Syndrome: Effects of L-Arginine and Aminoguanidine / O. Z. Yaremchuk, K. A. Posokhova // Neurophysiology. – 2019. – Vol. 51, No. 6. P. 409-415.
 3. Вплив модуляторів синтезу оксиду азоту на механізми розвитку апоптозу та продукцію активних форм Оксигену у лейкоцитах крові при антифосфоліпідному синдромі в експерименті / О.З. Яремчук, К. А.Посохова, Г. Г. Габор, М. М. Гузик // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2019. – №4 (88). – С. 53-62.
- 4. Базова установа, яка проводить впровадження:** Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет», кафедра біоорганічної і біологічної хімії та клінічної біохімії.
- 5. Термін впровадження:** 2020 р.
- 6. Форма впровадження:** у науково-педагогічний процес
- 7. Зауваження та пропозиції:** немає.

Завідувач кафедри
біоорганічної і біологічної хімії та клінічної біохімії
канд. біол. наук, доц.

Григор'єва Н. П.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор
Івано-Франківського національного
медичного університету
проф. Г.М. Ерстенюк

«10»

2020 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи

1. Пропозиція для впровадження: Нейропротекторний ефект селективного інгібітора синтази нітроген оксиду за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому.

2. Установа, автор: Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медичної біохімії, доцент Яремчук О.З.

3. Джерела інформації:

1) Нейропротекторный эффект амингуанидина при экспериментальном антифосфолипидном синдроме на фоне беременности / О. З. Яремчук, Е. А. Посохова, Ю. В. Сорока [и др.] // Georgian Medical News. – 2020. – № 4 (301). – С. 159-165.

2) Вплив аміногуанідину на вміст гліального фібрилярного кислого протеїну у мозочку при експериментальному антифосфоліпідному синдромі на фоні вагітності / О. З. Яремчук, К. А. Посохова, М. М. Гузик // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2020. – №1 (89). – С. 36-43.

3) Вплив L-аргініну та аміногуанідину на рівень синтезу оксиду азоту в мозочку та великих півкулях головного мозку за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому / О. З. Яремчук, К. А. Посохова, І. П. Кузьмак // Медична та клінічна хімія. – 2019. – № 4. – С. 105-112.

4. Базова установа, яка проводить впровадження: Івано-Франківський національний медичний університет, кафедра біологічної та медичної хімії імені академіка Г. О. Бабенка.

5. Термін впровадження: 2020 р.

6. Форма впровадження: у науково-педагогічний процес.

7. Зауваження та пропозиції: немає.

В.о. завідувача кафедри біологічної та медичної хімії
імені академіка Г. О. Бабенка
доцент

Максимчук Т.П.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор
Івано-Франківського національного
медичного університету
проф. Г.М. Ерстанюк

«10»

2020 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ
матеріалів дисертаційної роботи

1. Пропозиція для впровадження: Особливості гепатопротекторного та нефропротекторного впливу попередника синтезу нітроген оксиду L-аргініну за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому.

2. Установа, автор: Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медичної біохімії, доцент Яремчук О.З.

3. Джерела інформації:

1) Yaremchuk O. Z. Indexes of nitric oxide system in experimental antiphospholipid syndrome / O. Z. Yaremchuk, K. A. Posokhova, I. P. Kuzmak, M. I. Kulitska, I. M. Klishch, M. M. Korda // Ukr. Biochem. J. – 2020. – Vol. 92, N 1. – P. 75-83.

2) Яремчук О. З. Вплив L-аргініну та аміногуанідину на показники вільнорадикального окиснення у нирках при експериментальному антифосфоліпідному синдромі / О. З. Яремчук, К. А. Посохова, М. І. Куліцька // Світ медицини та біології. – 2018. – № 3 (65). – С. 210-214.

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

4. Базова установа, яка проводить впровадження: Івано-Франківський національний медичний університет, кафедра біологічної та медичної хімії імені академіка Г. О. Бабенка.

5. Термін впровадження: 2020 р.

6. Форма впровадження: у науково-педагогічний процес.

7. Зауваження та пропозиції: немає.

В.о. завідувача кафедри біологічної та медичної хімії
імені академіка Г. О. Бабенка
доцент

Максимчук Т.П.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор

Івано-Франківського національного

медичного університету

проф. Г.М. Ерстенюк

«10»

06

2020 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи

1. Найменування пропозиції для впровадження: Роль системи нітроген оксиду при експериментальному антифосфоліпідному синдромі.

2. Установа, автор: Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медичної біохімії, доцент Яремчук О.З.

3. Джерела інформації:

1) Indexes of nitric oxide system in experimental antiphospholipid syndrome / O. Z. Yaremchuk, K. A. Posokhova, I. P. Kuzmak, M. I. Kulitska, I. M. Klishch, M. M. Korda // Ukr. Biochem. J. – 2020. – Vol. 92, N 1. – P. 75-83.

2) Yaremchuk O. Z. Content of GFAP in the Brain of BALB/C Mice with the Antiphospholipid Syndrome: Effects of L-Arginine and Aminoguanidine / O. Z. Yaremchuk, K. A. Posokhova // Neurophysiology. – 2019. – Vol. 51, No. 6. P. 409-415.

3) Вплив модуляторів синтезу оксиду азоту на механізми розвитку апоптозу та продукцію активних форм Оксигену у лейкоцитах крові при антифосфоліпідному синдромі в експерименті / О. З. Яремчук, К. А.Посохова, Г. Г. Габор, М. М. Гузик // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2019. – №4 (88). – С. 53-62.

4. Базова установа, яка проводить впровадження: Івано-Франківський національний медичний університет, кафедра біологічної та медичної хімії імені академіка Г. О. Бабенка.

5. Термін впровадження: 2020 р.

6. Форма впровадження: у науково-педагогічний процес

7. Зауваження та пропозиції: немає.

В.о. завідувача кафедри біологічної та медичної хімії
імені академіка Г. О. Бабенка
доцент

Максимчук Т.П.



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної
(навчальної) роботи
Вінницького національного медичного
університету
ім. М. І. Пирогова
д. мед. н., проф. Ю. Й. Гумінський

«28» 08 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Особливості гепатопротекторного та нефропротекторного впливу попередника синтезу нітроген оксиду L-аргініну за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому.
2. **Установа-розробник, її адреса, виконавці:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медичної біохімії, м. Тернопіль, Майдан Волі, 1, 46001, Україна, доцент Яремчук Ольга Зеновіївна.
3. **Джерела інформації:**
 1. Yaremchuk O. Z. Indexes of nitric oxide system in experimental antiphospholipid syndrome / O. Z. Yaremchuk, K. A. Posokhova, I. P. Kuzmak, M. I. Kulitska, I. M. Klishch, M. M. Korda // Ukr. Biochem. J. – 2020. – Vol. 92, N 1. – P. 75-83.
 2. Яремчук О. З. Вплив L-аргініну та аміногуанідину на показники вільнорадикального окиснення у нирках при експериментальному антифосфоліпідному синдромі / О. З. Яремчук, К. А. Посохова, М. І. Куліцька // Світ медицини та біології. – 2018. – № 3 (65). – С. 210-214.
 3. Яремчук О. З. Вплив L-аргініну та аміногуанідину на вміст каспази-3 та β -актину при акушерському антифосфоліпідному синдромі в експерименті / Яремчук О. З. // Вісник проблем біології і медицини. – 2020. – Вип. 1 (155). – С. 215-218.
4. **Де і коли впроваджено:** у науково-педагогічний процес кафедри біологічної та загальної хімії ВНМУ ім. М.І. Пирогова.
5. **Термін впровадження:** 2020 р.
6. **Результати впровадження:** Використання результатів наукових досліджень Яремчук О. З. в навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів про особливості патобіохімічних механізмів порушень функції печінки та нирок при експериментальному антифосфоліпідному синдромі та методи їх корекції, що сприяє кращій підготовці з тем „Біохімічні функції печінки“, „Сечоутворювальна функція нирок. Патобіохімія нирок“.
7. **Зауваження та пропозиції:** не вносились.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри біологічної та загальної хімії ВНМУ ім. М.І. Пирогова, протокол №1 від 28 серпня 2020 р.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри біологічної та загальної хімії
д-р мед. наук, професор

Заїчко Н. В.



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної
(навчальної) роботи
Вінницького національного медичного
університету ім. М. І. Пирогова
д. мед. н., проф. Ю. Й. Гумінський

«28» 08 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- 1. Назва пропозиції для впровадження:** Роль системи нітроген оксиду при експериментальному антифосфоліпідному синдромі.
- 2. Установа-розробник, її адреса, виконавці:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медичної біохімії, м. Тернопіль, Майдан Волі, 1, 46001, Україна, доцент Яремчук Ольга Зеновіївна.
- 3. Джерела інформації:**
 1. Indexes of nitric oxide system in experimental antiphospholipid syndrome / O. Z. Yaremchuk, K. A. Posokhova, I. P. Kuzmak, M. I. Kulitska, I. M. Klishch, M. M. Korda // Ukr. Biochem. J. – 2020. – Vol. 92, N 1. – P. 75-83.
 2. Yaremchuk O. Z. Content of GFAP in the Brain of BALB/C Mice with the Antiphospholipid Syndrome: Effects of L-Arginine and Aminoguanidine / O. Z. Yaremchuk, K. A. Posokhova // Neurophysiology. – 2019. – Vol. 51, No. 6. P. 409-415.
 3. Вплив модуляторів синтезу оксиду азоту на механізми розвитку апоптозу та продукцію активних форм Оксигену у лейкоцитах крові при антифосфоліпідному синдромі в експерименті / О. З. Яремчук, К. А. Посохова, Г. Г. Габор та ін. // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2019. – №4 (88). – С. 53-62.
- 4. Де і коли впроваджено:** у науково-педагогічний процес кафедри біологічної та загальної хімії ВНМУ ім. М.І. Пирогова.
- 5. Термін впровадження:** 2020 р.
- 6. Результати впровадження:** Використання результатів наукових досліджень Яремчук О.З. в навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів про особливості патобіохімічних механізмів розвитку експериментального антифосфоліпідного синдрому та методи їх корекції, про механізми реалізації дії модуляторів активності ферментів, зокрема NO-синтаз, що сприяє кращій підготовці з тем „Біохімія крові”, “Механізм дії ферментів, кінетика ферментативного каталізу. Регуляція активності ферментів”.
- 7. Зауваження та пропозиції:** не вносились.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри біологічної та загальної хімії ВНМУ ім. М.І. Пирогова, протокол №1 від 28 серпня 2020 р.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри біологічної та загальної хімії
д-р мед. наук, професор


Заїчко Н. В.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи
Тернопільського національного
медичного університету імені
І. Я. Горбачевського МОЗ України
проф. Кліш І. М.

«03» 03 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ матеріалів дисертаційної роботи

1. Найменування пропозиції для впровадження: Роль системи нітроген оксиду при експериментальному антифосфоліпідному синдромі.

2. Установа, автор: Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медичної біохімії, доцент Яремчук О.З.

3. Джерела інформації:

1. Indexes of nitric oxide system in experimental antiphospholipid syndrome / O. Z. Yaremchuk, K. A. Posokhova, I. P. Kuzmak, M. I. Kulitska, I. M. Klishch, M. M. Korda // Ukr. Biochem. J. – 2020. – Vol. 92, N 1. – P. 75-83.

2. Yaremchuk O. Z. Content of GFAP in the Brain of BALB/C Mice with the Antiphospholipid Syndrome: Effects of L-Arginine and Aminoguanidine / O. Z. Yaremchuk, K. A. Posokhova // Neurophysiology. – 2019. – Vol. 51, No. 6. P. 409-415.

3. Вплив модуляторів синтезу оксиду азоту на механізми розвитку апоптозу та продукцію активних форм Оксигену у лейкоцитах крові при антифосфоліпідному синдромі в експерименті / О.З. Яремчук, К. А.Посохова, Г. Г. Габор, М. М. Гузик // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2019. – №4 (88). – С. 53-62.

4. Базова установа, яка проводить впровадження: Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра функціональної і лабораторної діагностики.

5. Термін впровадження: 2020 р.

6. Форма впровадження: у науково-педагогічний процес

7. Зауваження та пропозиції: немає.

Завідувач кафедри
функціональної і лабораторної діагностики
д-р мед. наук, проф.



Марущак М.І.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи
Тернопільського національного
медичного університету імені
І. Я. Горбачевського МОЗ України
проф. Кліш І. М.

«03»

2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи

1. Пропозиція для впровадження: Нейропротекторний ефект селективного інгібітора синтази нітроген оксиду за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому.

2. Установа, автор: Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медичної біохімії, доцент Яремчук О.З.

3. Джерела інформації:

1. Нейропротекторный эффект амингуанидина при экспериментальном антифосфолипидном синдроме на фоне беременности / О. З. Яремчук, Е. А. Посохова, Ю. В. Сорока [и др.] // Georgian Medical News. – 2020. – № 4 (301). – С. 159-165.

2. Вплив аміногуанідину на вміст гліального фібрилярного кислого протеїну у мозочку при експериментальному антифосфоліпідному синдромі на фоні вагітності / О. З. Яремчук, К. А. Посохова, М. М. Гузик // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2020. – №1 (89). – С. 36-43.

3. Вплив L-аргініну та аміногуанідину на рівень синтезу оксиду азоту в мозочку та великих півкулях головного мозку за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому / О. З. Яремчук, К. А. Посохова, І. П. Кузьмак // Медична та клінічна хімія. – 2019. – № 4. – С. 105-112.

4. Базова установа, яка проводить впровадження: Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра функціональної і лабораторної діагностики.

5. Термін впровадження: 2020 р.

6. Форма впровадження: у науково-педагогічний процес.

7. Зауваження та пропозиції: немає.

Завідувач кафедри
функціональної і лабораторної діагностики
д-р мед. наук, проф.



Марущак М.І.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи
Тернопільського національного
медичного університету імені
І. Я. Горбачевського МОЗ України
проф. Кліш І. М.

«03» 03 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи

1. Пропозиція для впровадження: Особливості гепатопротекторного та нефропротекторного впливу попередника синтезу нітроген оксиду L-аргініну за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому.

2. Установа, автор: Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медичної біохімії, доцент Яремчук О.З.

3. Джерела інформації:

1. Yaremchuk O. Z. Indexes of nitric oxide system in experimental antiphospholipid syndrome / O. Z. Yaremchuk, K. A. Posokhova, I. P. Kuzmak, M. I. Kulitska, I. M. Klishch, M. M. Korda // Ukr. Biochem. J. – 2020. – Vol. 92, N 1. – P. 75-83.

2. Яремчук О. З. Вплив L-аргініну та аміногуанідину на показники вільнорадикального окиснення у нирках при експериментальному антифосфоліпідному синдромі / О. З. Яремчук, К. А. Посохова, М. І. Куліцька // Світ медицини та біології. – 2018. – № 3 (65). – С. 210-214.

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

4. Базова установа, яка проводить впровадження: Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра функціональної і лабораторної діагностики.

5. Термін впровадження: 2020 р.

6. Форма впровадження: у науково-педагогічний процес.

7. Зауваження та пропозиції: немає.

Завідувач кафедри
функціональної і лабораторної діагностики
д-р мед. наук, проф.



Марущак М.І.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи
Тернопільського національного
медичного університету імені
І. Я. Горбачевського МОЗ України
проф. Кліщ І. М.

«19»

2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи

1. Пропозиція для впровадження: Нейропротекторний ефект селективного інгібітора синтази нітроген оксиду за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому.

2. Установа, автор: Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медичної біохімії, доцент Яремчук О.З.

3. Джерела інформації:

1. Нейропротекторный эффект аминугуанидина при экспериментальном антифосфолипидном синдроме на фоне беременности / О. З. Яремчук, Е. А. Посохова, Ю. В. Сорока [и др.] // Georgian Medical News. – 2020. – № 4 (301). – С. 159-165.

2. Вплив аміногуанідину на вміст гліального фібрилярного кислого протеїну у мозочку при експериментальному антифосфоліпідному синдромі на фоні вагітності / О. З. Яремчук, К. А. Посохова, М. М. Гузик // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2020. – №1 (89). – С. 36-43.

3. Вплив L-аргініну та аміногуанідину на рівень синтезу оксиду азоту в мозочку та великих півкулях головного мозку за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому / О. З. Яремчук, К. А. Посохова, І. П. Кузьмак // Медична та клінічна хімія. – 2019. – № 4. – С. 105-112.

4. Базова установа, яка проводить впровадження: Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медичної біохімії.

5. Термін впровадження: 2020 р.

6. Форма впровадження: у науково-педагогічний процес.

7. Зауваження та пропозиції: немає.

Завідувач кафедри медичної біохімії
д-р мед. наук, доц.

Підручна С. Р.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи
Тернопільського національного
медичного університету імені
І. Я. Горбачевського МОЗ України
проф. Кліщ І. М.

«19» 02 2020 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи

1. Найменування пропозиції для впровадження: Роль системи нітроген оксиду при експериментальному антифосфоліпідному синдромі.

2. Установа, автор: Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медичної біохімії, доцент Яремчук О.З.

3. Джерела інформації:

1. Indexes of nitric oxide system in experimental antiphospholipid syndrome / O. Z. Yaremchuk, K. A. Posokhova, I. P. Kuzmak, M. I. Kulitska, I. M. Klishch, M. M. Korda // Ukr. Biochem. J. – 2020. – Vol. 92, N 1. – P. 75-83.

2. Yaremchuk O. Z. Content of GFAP in the Brain of BALB/C Mice with the Antiphospholipid Syndrome: Effects of L-Arginine and Aminoguanidine / O. Z. Yaremchuk, K. A. Posokhova // Neurophysiology. – 2019. – Vol. 51, No. 6. P. 409-415.

3. Вплив модуляторів синтезу оксиду азоту на механізми розвитку апоптозу та продукцію активних форм Оксигену у лейкоцитах крові при антифосфоліпідному синдромі в експерименті / О. З. Яремчук, К. А. Посохова, Г. Г. Габор, М. М. Гузик // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2019. – №4 (88). – С. 53-62.

4. Базова установа, яка проводить впровадження: Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медичної біохімії.

5. Термін впровадження: 2020 р.

6. Форма впровадження: у науково-педагогічний процес

7. Зауваження та пропозиції: немає.

Завідувач кафедри медичної біохімії
д-р мед. наук, доц.

Підручна С. Р.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи
Тернопільського національного
медичного університету імені
І. Я. Горбачевського МОЗ України
проф. Кліш І. М.

«28» 02 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи

1. Пропозиція для впровадження: Особливості гепатопротекторного та нефропротекторного впливу попередника синтезу нітроген оксиду L-аргініну за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому.

2. Установа, автор: Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медичної біохімії, доцент Яремчук О.З.

3. Джерела інформації:

1. Yaremchuk O. Z. Indexes of nitric oxide system in experimental antiphospholipid syndrome / O. Z. Yaremchuk, K. A. Posokhova, I. P. Kuzmak, M. I. Kulitska, I. M. Klishch, M. M. Korda // Ukr. Biochem. J. – 2020. – Vol. 92, N 1. – P. 75-83.

2. Яремчук О. З. Вплив L-аргініну та аміногуанідину на показники вільнорадикального окиснення у нирках при експериментальному антифосфоліпідному синдромі / О. З. Яремчук, К. А. Посохова, М. І. Куліцька // Світ медицини та біології. – 2018. – № 3 (65). – С. 210-214.

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

4. Базова установа, яка проводить впровадження: Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медичної біохімії.

5. Термін впровадження: 2020 р.

6. Форма впровадження: у науково-педагогічний процес.

7. Зауваження та пропозиції: немає.

Завідувач кафедри медичної біохімії
д-р мед. наук, доц.

Підручна С. Р.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи
Тернопільського національного
медичного університету імені
І. Я. Горбачевського МОЗ України
проф. Кліщ І. М.

«19» 02 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи

1. Найменування пропозиції для впровадження: Роль системи нітроген оксиду при експериментальному антифосфоліпідному синдромі.

2. Установа, автор: Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медичної біохімії, доцент Яремчук О.З.

3. Джерела інформації:

1. Indexes of nitric oxide system in experimental antiphospholipid syndrome / O. Z. Yaremchuk, K. A. Posokhova, I. P. Kuzmak, M. I. Kulitska, I. M. Klishch, M. M. Korda // Ukr. Biochem. J. – 2020. – Vol. 92, N 1. – P. 75-83.

2. Yaremchuk O. Z. Content of GFAP in the Brain of BALB/C Mice with the Antiphospholipid Syndrome: Effects of L-Arginine and Aminoguanidine / O. Z. Yaremchuk, K. A. Posokhova // Neurophysiology. – 2019. – Vol. 51, No. 6. P. 409-415.

3. Вплив модуляторів синтезу оксиду азоту на механізми розвитку апоптозу та продукцію активних форм Оксигену у лейкоцитах крові при антифосфоліпідному синдромі в експерименті / О. З. Яремчук, К. А.Посохова, Г. Г. Габор, М. М. Гузик // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2019. – №4 (88). – С. 53-62.

4. Базова установа, яка проводить впровадження: Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра патологічної фізіології.

5. Термін впровадження: 2020 р.

6. Форма впровадження: у науково-педагогічний процес

7. Зауваження та пропозиції: немає.

Завідувач кафедри патологічної фізіології
д-р мед. наук, проф.

Денефіль О.В.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи
Тернопільського національного
медичного університету імені
І. Я. Горбачевського МОЗ України
проф. Кліш І. М.

«19» 02 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи

1. Пропозиція для впровадження: Нейропротекторний ефект селективного інгібітора синтази нітроген оксиду за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому.

2. Установа, автор: Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медичної біохімії, доцент Яремчук О.З.

3. Джерела інформації:

1. Нейропротекторный эффект аминоксидина при экспериментальном антифосфолипидном синдроме на фоне беременности / О. З. Яремчук, Е. А. Посохова, Ю. В. Сорока [и др.] // Georgian Medical News. – 2020. – № 4 (301). – С. 159-165.

2. Вплив аміногуанідину на вміст гліального фібрилярного кислого протеїну у мозочку при експериментальному антифосфоліпідному синдромі на фоні вагітності / О. З. Яремчук, К. А. Посохова, М. М. Гузик // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2020. – №1 (89). – С. 36-43.

3. Вплив L-аргініну та аміногуанідину на рівень синтезу оксиду азоту в мозочку та великих півкулях головного мозку за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому / О. З. Яремчук, К. А. Посохова, І. П. Кузьмак // Медична та клінічна хімія. – 2019. – № 4. – С. 105-112.

4. Базова установа, яка проводить впровадження: Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра патологічної фізіології.

5. Термін впровадження: 2020 р.

6. Форма впровадження: у науково-педагогічний процес.

7. Зауваження та пропозиції: немає.

Завідувач кафедри патологічної фізіології
д-р мед. наук, проф.

Денефіль О.В.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи
Тернопільського національного
медичного університету імені
І. Я. Горбачевського МОЗ України
проф. Кlish І. М.

«28» 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи

1. Пропозиція для впровадження: Особливості гепатопротекторного та нефропротекторного впливу попередника синтезу нітроген оксиду L-аргініну за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому.

2. Установа, автор: Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медичної біохімії, доцент Яремчук О.З.

3. Джерела інформації:

1. Yaremchuk O. Z. Indexes of nitric oxide system in experimental antiphospholipid syndrome / O. Z. Yaremchuk, K. A. Posokhova, I. P. Kuzmak, M. I. Kulitska, I. M. Klishch, M. M. Korda // Ukr. Biochem. J. – 2020. – Vol. 92, N 1. – P. 75-83.

2. Яремчук О. З. Вплив L-аргініну та аміногуанідину на показники вільнорадикального окиснення у нирках при експериментальному антифосфоліпідному синдромі / О. З. Яремчук, К. А. Посохова, М. І. Куліцька // Світ медицини та біології. – 2018. – № 3 (65). – С. 210-214.

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

4. Базова установа, яка проводить впровадження: Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра патологічної фізіології.

5. Термін впровадження: 2020 р.

6. Форма впровадження: у науково-педагогічний процес.

7. Зауваження та пропозиції: немає.

Завідувач кафедри патологічної фізіології
д-р мед. наук, проф.

Денефіль О.В.

Додаток Г
Патент на корисну модель





УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **142063** (13) **U**
(51) МПК (2020.01)**A61K 31/00****A61P 13/12** (2006.01)**G01N 33/50** (2006.01)**G09B 23/28** (2006.01)МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

(21) Номер заявки: u 2019 11363	(72) Винахідник(и): Яремчук Ольга Зеновіївна (UA), Посохова Катерина Андріївна (UA), Куліцька Марія Іванівна (UA), Шевчук Оксана Олегівна (UA), Кузьмак Ірина Петрівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 22.11.2019	(73) Власник(и): ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО МОЗ УКРАЇНИ, вул. Майдан Волі, 1, м. Тернопіль, 46001 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 12.05.2020	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 12.05.2020, Бюл.№ 9	
(54) СПОСІБ КОРЕКЦІЇ УРАЖЕННЯ НИРОК ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АНТИФОСФОЛІПІДНОГО СИНДРОМУ	

(57) Реферат:

Спосіб корекції ураження нирок за умов антифосфоліпідного синдрому включає призначення селективного інгібітора індукцйбельної NO-синтази аміногуанідину. Внутрішньоочередовно лабораторним тваринам - мишам-самкам BALB/c вводять аміногуанідин по 10 мг/кг один раз на день впродовж 10 діб після моделювання антифосфоліпідного синдрому. Додатково з інтервалом у 10 хв. застосовують внутрішньоочередовно попередник синтезу оксиду азоту - L-аргінін з розрахунку 25 мг/кг. Про ефективність корекції ураження нирок роблять висновок за позитивними змінами біохімічних показників у гомогенаті нирок і сироватці крові.

UA 142063 U

Корисна модель належить до медицини, а саме до експериментальної патології, і може бути використана для корекції ураження нирок за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому.

Відомий спосіб корекції ураження нирок за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому, що включає призначення селективного інгібітора NO-синтази аміногуанідину [1]. За відомим способом, аміногуанідин призначають для блокування синтезу оксиду азоту (NO). Позитивний ефект досягається завдяки пригніченню рівня оксиду азоту та зниженні його нефротоксичного впливу.

Недоліком відомого способу є недостатня лікувальна ефективність: застосування аміногуанідину не забезпечує знешкодження активних форм кисню, особливо із врахуванням того, що аміногуанідин не властива пряма антиоксидантна та нефропротекторна дія.

В основу корисної моделі поставлена задача вдосконалити відомий спосіб, шляхом застосування додаткового чинника - L-аргініну, що спрямовано на зменшення вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів, відновлення компонентів антиоксидантної системи та дихального ланцюга мітохондрій та нормалізацію рівня синтезу оксиду азоту та вмісту креатиніну, чим досягають підвищення ефективності способу корекції ураження нирок при експериментальному антифосфоліпідному синдромі.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі корекції ураження нирок за умов антифосфоліпідного синдрому, що включає призначення селективного інгібітора індукційної NO-синтази аміногуанідину, згідно з корисною моделлю, внутрішньоочеревинно лабораторним тваринам - мишам-самкам BALB/c вводять аміногуанідин по 10 мг/кг один раз на день впродовж 10 діб після моделювання антифосфоліпідного синдрому, а додатково з інтервалом у 10 хв. застосовують внутрішньоочеревинно попередник синтезу оксиду азоту - L-аргінін з розрахунку 25 мг/кг, про ефективність корекції ураження нирок роблять висновок за позитивними змінами біохімічних показників у гомогенаті нирок і сироватці крові.

Здатність впливати на рівень синтезу NO притаманна L-аргініну. Відомо, що однією з причин дисфункції ендотелію в умовах оксидативного стресу є порушення біодоступності NO. Враховуючи те, що в патогенезі експериментального антифосфоліпідного синдрому виникає відносна недостатність NO індукованого ендотеліальною NO-синтазою на фоні загальної гіперпродукції NO, що синтезується під впливом індукційної NO-синтази [1], доцільним є застосування L-аргініну для корекції ураження нирок за умов антифосфоліпідного синдрому. Попередник синтезу NO L-аргінін виявляє цитопротекторні та антиоксидантні властивості в організмі за рахунок зниження інтенсивності процесів перекисного окиснення ліпідів та активації ферментів антиоксидантної системи та дихального ланцюга мітохондрій. Протекторний вплив L-аргініну також пов'язаний зі здатністю попереджувати агрегацію та адгезію тромбоцитів [2].

Спосіб здійснюють таким чином.

Лабораторній тварині - миші-самці лінії BALB/c моделюють антифосфоліпідний синдром за допомогою кардіоліпіну, який вводять внутрішньом'язово, чотири рази (30 мкг на 1 ін'єкцію, проміжки між ін'єкціями становлять 14 діб). Для підвищення ефективності імунної відповіді кардіоліпін емульгують в 75 мкл повного ад'юванту Фрейнда (перша ін'єкція), наступні ін'єкції проводять з неповним ад'ювантом Фрейнда [3]. Антифосфоліпідний синдром формується через 2 тижні після останньої ін'єкції кардіоліпіну. Після моделювання антифосфоліпідного синдрому миші-самці лінії BALB/c вводять аміногуанідин в дозі 10 мг/кг внутрішньоочеревинно один раз на день впродовж 10 діб, а додатково після введення аміногуанідину з інтервалом у 10 хв. застосовують внутрішньоочеревинно L-аргінін з розрахунку 25 мг/кг. Висновок про ефективність проведеної корекції ураження нирок за умов антифосфоліпідного синдрому здійснюють за результатами аналізу біохімічних показників, зокрема за активністю і вмістом компонентів антиоксидантної системи - супероксиддисмутази (СОД), каталази (КАТ), відновленого глутатіону (ВГ), вмістом продуктів перекисного окиснення ліпідів - гідропероксидів ліпідів (ГПЛ) і ТБК-активних продуктів (ТБК-АП), активністю ферментів електронно-транспортного ланцюга мітохондрій сукцинатдегідрогенази (СДГ) та цитохромоксидази (ЦХО), концентрацією стабільних метаболітів оксиду азоту - нітриту-аніону (NO_2^-) та нітрату-аніонів (NO_3^-) у гомогенаті нирок та сироватці крові, концентрацією креатиніну, ендотеліальної NO-синтази (eNOS) та індукційної NO-синтази (iNOS) у сироватці крові.

Проведено дослід на 40 мишах-самках лінії BALB/c, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Піддослідних тварин розділили на 4 групи: 1 (контроль) - інтактні тварини; 2 (контрольна патологія) - тварини з експериментальним антифосфоліпідним синдромом (АФС), 3 - тварини з АФС, корекцію якого проводили за способом-найближчим аналогом (тваринам вводили аміногуанідин), а до 4-ї групи увійшли тварини з АФС, ураження нирок в яких коригували за запропонованим способом (тваринам вводили аміногуанідин в комбінації з L-

аргініном). Аміногуанідин ("Химлабораторреактив", Україна) вводили в дозі 10 мг/кг внутрішньоочеревинно один раз на день упродовж 10 діб після формування АФС, а додатково після введення аміногуанідину з інтервалом у 10 хв. застосовували внутрішньоочеревинно L-аргінін ("Sigma", USA) з розрахунку 25 мг/кг. Тварини контрольних груп отримували внутрішньоочеревинно ідентичні об'єми розчинника. АФС моделювали за допомогою кардіоліпіну ("Sigma", USA), який вводили внутрішньом'язово, чотири рази (30 мкг на 1 ін'єкцію, проміжки між ін'єкціями становили 14 діб). Для підвищення ефективності імунної відповіді кардіоліпін емульгували в 75 мкл повного ад'юванта Фрейнда (перша ін'єкція), наступні ін'єкції проводили з неповним ад'ювантом Фрейнда. АФС формувався через 2 тижні після останньої ін'єкції кардіоліпіну [3]. Через 10 діб після початку терапії тварин виводили з експерименту в умовах тіопентал-натрієвого наркозу (внутрішньоочеревинне введення 1 % розчину, з розрахунку 50 мг/кг маси тварини).

Експерименти здійснювали з дотриманням принципів біоетики відповідно до "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах", узгоджених з положеннями "Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях" (Страсбург, 1986). Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою програми STATISTICA 10. Порівняння отриманих величин проводили з використанням U-критерію Манна-Уїтні. Зміни вважали достовірними при $p \leq 0,05$.

Аналіз дослідження виявив позитивний коригуючий вплив запропонованого способу на ураження нирок за умов АФС.

Встановлено, що у мишей BALB/c з АФС у сироватці крові зростала концентрація креатиніну на 87 %, знижувалася концентрація eNOS на 23 %, а концентрація індукбельної NOS при цьому зростала в 4,1 рази відповідно, порівняно із показниками тварин контрольної групи (Таблиця 1). Встановлено, що за умов АФС у сироватці крові відбувається зменшення вмісту стабільного метаболіту оксиду азоту NO_2^- на 26 %, а рівень NO_3^- зростає на 75 %, в нирках вміст NO_2^- зростає на 88 %, а NO_3^- в 2,2 рази відповідно, відносно контролю (Таблиця 2). Встановлено збільшення вмісту ГПЛ на 27 % та ТБК-АП на 57 % відповідно, порівняно з контролем (Таблиця 3). Встановлено зростання активності СОД на 23 %, зниження активності КАТ на 13 % та пулу G-SH на 14 % у нирках за умов АФС, порівняно із показниками інтактних тварин. Вказані зміни супроводжувались порушенням функціонування електронно-транспортного ланцюга мітохондрій у нирках, про що свідчило зменшення активності СДГ на 22 % та ЦХО на 33 %, порівняно з контролем (Таблиця 3).

Селективний інгібітор індукбельної ізоформи NOS аміногуанідин не викликав достовірних змін концентрації eNOS у сироватці крові мишей BALB/c, концентрація креатиніну знижувалася на 12 %, а iNOS в 2,4 рази, порівняно з показниками тварин контрольної патології (Таблиця 1). Рівень NO_2^- у сироватці крові достовірно не відрізнявся, а у нирках знижувався на 61 %, рівень NO_3^- знижувався у сироватці крові на 56 % та у нирках на 48 % (Таблиця 2). На фоні застосування аміногуанідину встановлено зростання вмісту ГПЛ на 15 % порівняно з показниками тварин з АФС. Вміст ТБК-АП достовірно не змінювався. Активність КАТ знижувалась на 10 %, у той же час зростала активність СОД на 12 % та вміст G-SH на 12 %, порівняно із показниками тварин 2-ї групи. При введенні аміногуанідину активність СДГ та ЦХО достовірно не змінювалась, порівняно із показниками тварин з АФС (Таблиця 3).

Так, комбінований вплив аміногуанідину та L-аргініну мишам з АФС забезпечив достовірне зростання концентрації eNOS у сироватці крові в 1,4 рази та зниження концентрації iNOS в 3,2 рази та креатиніну на 40 %, що призвело до нормалізації вмісту стабільних метаболітів оксиду азоту NO_2^- та NO_3^- при експериментальному АФС, як у крові, так і в нирках, порівняно із показниками мишей BALB/c з АФС (Таблиці 1, 2). При комбінованому застосуванні аміногуанідину з L-аргініном у тварин з АФС встановлено зниження у нирках вмісту ТБК-АП на 33 %, порівняно з показниками тварин з АФС. Встановлено нормалізацію активності СОД, про що свідчить достовірне зниження останньої на 15 %, порівняно з показниками тварин з АФС. Спостерігалось зростання активності КАТ на 12 % та вмісту G-SH на 23 %, порівняно з показниками тварин 2-ї групи. Встановлено зростання активності мітохондріальних СДГ на 16 % і ЦХО на 13 % відповідно, порівняно із показниками тварин з АФС 3-ї групи (Таблиця 3).

Із наведених у Таблицях 1-3 даних видно, що при введенні аміногуанідину і L-аргініну за умов АФС у сироватці крові встановлено зниження концентрації креатиніну на 31 % та нормалізацію показників eNOS та iNOS: концентрація eNOS зростала на 33 %, а концентрація iNOS знижувалася на 25 %, вміст NO_2^- достовірно не змінювався, а вміст NO_3^- зростає на 48 % відповідно, порівняно із аналогічними показниками у групі тварин, яким проводили корекцію ураження нирок за способом-найближчим аналогом. На фоні комбінованого застосування аміногуанідину і L-аргініну за умов АФС у нирках відбувається нормалізація показників

активності СОД (зниження на 23 %), зростання активності КАТ на 24 % та СДГ на 11 %, зниження вмісту ГПЛ на 9 %, ТБК-АП на 29 %, NO_2^- на 71 % та NO_3^- на 10 % відповідно, порівняно із аналогічними показниками у групі тварин, яким проводили корекцію ураження нирок за способом - найближчим аналогом.

5

Таблиця 1

Вміст креатиніну, eNOS та iNOS у сироватці крові мишей BALB/c при антифосфоліпідному синдромі ($M \pm m$, $n=10$)

Група тварин	Показник		
	eNOS, нг/мл	iNOS, нг/мл	Креатинін, мкмоль/л
1-ша (контроль)	33,96±0,75	2,43±0,11	23,70±0,49
2-га (контрольна патологія)	25,99±1,10 $p < 0,001$	10,03±0,34 $p < 0,001$	44,40±1,60 $p < 0,001$
3-тя (спосіб-найближчий аналог)	27,90±1,76 $p_1 < 0,001$	4,13±0,18 $p_1 < 0,001$	38,87±1,48 $p_1 < 0,05$
4-та (дослідна)	37,20±2,30 $p_1 < 0,005$ $p_2 < 0,05$	3,09±0,23 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$	26,77±0,71 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$

Примітка: в Таблицях 1, 2, 3

p - зміни достовірні порівняно з показниками тварин контрольної групи;

p_1 - зміни достовірні порівняно з контрольною патологією;

p_2 - зміни достовірні порівняно з показниками групи тварин з антифосфоліпідним синдромом, корекцію якого проводили за способом - найближчим аналогом.

Таблиця 2

Вміст NO_2^- та NO_3^- у сироватці крові та нирках мишей BALB/c при антифосфоліпідному синдромі ($M \pm m$, $n=10$)

Група тварин	Показник			
	сироватка крові		нирки	
	NO_2^- , мкмоль/л	NO_3^- , мкмоль/л	NO_2^- , мкмоль/кг	NO_3^- , мкмоль/кг
1-ша (контроль)	2,23±0,10	11,22±0,48	0,63±0,03	7,20±0,19
2-га (контрольна патологія)	1,65±0,15 $p < 0,05$	19,65±0,97 $p < 0,001$	1,19±0,07 $p < 0,001$	15,89±0,89 $p < 0,001$
3-тя (спосіб-найближчий аналог)	1,84±0,10 $p_1 > 0,05$	8,63±0,30 $p_1 < 0,001$	0,46±0,03 $p_1 < 0,001$	8,21±0,25 $p_1 < 0,001$
4-та (дослідна)	2,06±0,05 $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$	12,82±1,04 $p_1 < 0,005$ $p_2 < 0,01$	0,79±0,04 $p_1 < 0,005$ $p_2 < 0,001$	9,05±0,19 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$

Таблиця 3

Показники системи прооксиданти-антиоксиданти у мишей BALB/c при антифосфоліпідному синдромі ($M \pm m$, $n=10$)

Показник	Група тварин			
	1-ша (контроль)	2-га (контрольна патологія)	3-тя (спосіб-найближчий аналог)	4-та (дослідна)
ГПЛ, у.о./г тканини	10,8±0,43	13,7±0,60 $p < 0,01$	11,0±0,52 $p_1 < 0,05$	14,2±0,30 $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,05$
ТБК-АП, нмоль/г тканини	4,97±0,21	7,79±0,53 $p < 0,01$	5,17±0,26 $p_1 < 0,005$	5,26±0,31

				$p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,01$
СОД, у.о./мг білка	$7,33 \pm 0,57$	$9,02 \pm 0,34$ $p < 0,05$	$7,63 \pm 0,41$ $p_1 < 0,05$	$7,71 \pm 0,40$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,005$
КАТ, нмоль/хв. на 1 мг білка	$7,05 \pm 0,23$	$6,16 \pm 0,13$ $p < 0,05$	$6,73 \pm 0,45$ $p_1 > 0,05$	$6,89 \pm 0,20$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,005$
G-SH, мкмоль/г тканини	$2,81 \pm 0,08$	$2,43 \pm 0,07$ $p < 0,05$	$2,84 \pm 0,10$ $p_1 < 0,05$	$3,00 \pm 0,13$ $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$
СДГ, нмоль/хв. · мг білка	$6,70 \pm 0,43$	$5,25 \pm 0,02$ $p < 0,05$	$5,53 \pm 0,15$ $p_1 > 0,05$	$6,11 \pm 0,16$ $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,05$
ЦХО, мкмоль/хв. · мг білка	$5,45 \pm 0,37$	$3,67 \pm 0,14$ $p < 0,005$	$3,93 \pm 0,24$ $p_1 > 0,05$	$4,13 \pm 0,08$ $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$

Таким чином, застосування аміногуанідину в комбінації з L-аргініном для корекції ураження нирок за умов АФС є більш ефективним, ніж використання лише аміногуанідину, тому що запропонований метод забезпечує зниження вмісту креатиніну та концентрації eNOS та iNOS в сироватці крові експериментальних тварин, що супроводжується зниженням вмісту стабільних метаболітів NO, інтенсивності ПОЛ та активацією системи антиоксидантного захисту та енергетичного забезпечення тканини нирок.

Отже, корисна модель забезпечує вищу, ніж відомий спосіб-найближчий аналог, лікувальну ефективність при антифосфоліпідному синдромі у лабораторних тварин, дозволяє покращити функціональний стан нирок та чинить нефропротекторну дію, і може знайти застосування в експериментальній патології.

Джерела інформації:

1. Вплив L-аргініну та аміногуанідину на показники вільнорадикального окиснення у нирках при експериментальному антифосфоліпідному синдромі/ О.З. Яремчук, К.А. Посохова, М.І. Куліцька// Світ медицини та біології. - 2018. - № 3(65). - С. 210-214.

2. Аргинин в медицинской практике (обзор литературы)/ Ю.М. Степанов, И.Н. Кононов, А.И. Журбина [та ін.]// Журн. АМН України. - 2004. - Т. 10, № 1. - С. 340-352.

3. Морфологічний стан матки та плаценти при експериментальному моделюванні гестаційного антифосфоліпідного синдрому на мишах/ Зайченко Г.В., Лар'яновська Ю.Б., Деева Т.В. [та ін.]// Український медичний альманах. - 2011. - Т. 14, № 4. - С. 136-141.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб корекції ураження нирок за умов антифосфоліпідного синдрому, що включає призначення селективного інгібітора індукційної NO-синтази аміногуанідину, який відрізняється тим, що внутрішньоочередово лабораторним тваринам - мишам-самкам BALB/c вводять аміногуанідин по 10 мг/кг один раз на день впродовж 10 діб після моделювання антифосфоліпідного синдрому, а додатково з інтервалом у 10 хв. застосовують внутрішньоочередово попередник синтезу азоту - L-аргінін з розрахунку 25 мг/кг, про ефективність корекції ураження нирок роблять висновок за позитивними змінами біохімічних показників у гомогенаті нирок і сироватці крові.

Комп'ютерна верстка М. Мацело

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601