

О. З. Яремчук, К. А. Посохова, І. М. Кліщ, М. М. Корда

# АНТИФОСФОЛІПІДНИЙ СИНДРОМ

*Монографія*

Тернопіль  
ТНМУ  
Укрмедкнига  
2022

УДК 616-097.3:543.635.4]-008.6

A72

**Рецензенти:**

**Л. Г. Калачнюк** – доктор біологічних наук, професор, професор кафедри біохімії і фізіології тварин ім. акад. М. Ф. Гулого Національного університету біоресурсів і природокористування України;

**Г. М. Ерстенюк** – доктор біологічних наук, професор, професор кафедри біологічної та медичної хімії ім. акад. Г. О. Бабенка Івано-Франківського національного медичного університету;

**А. О. Тихомиров** – доктор біологічних наук, старший науковий співробітник, завідувач відділу хімії та біохімії ферментів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України.

*Друкується за рішенням вченої ради Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України  
(протокол № 14 від 27 грудня 2022 року)*

*Яремчук О. З.*

A72 **Антифосфоліпідний синдром** : монографія / О. З. Яремчук, К. А. Посохова, І. М. Кліщ, М. М. Корда. – Тернопіль : ТНМУ, 2022. – 240 с.

ISBN 978-966-673-468-9

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

Розширення існуючих уявлень про молекулярні механізми розвитку експериментального антифосфоліпідного синдрому дозволить здійснювати цілеспрямований та обґрунтований вибір методів їх корекції.

Монографія адресована науковцям, аспірантам, докторантам, викладачам закладів вищої освіти.

УДК 616-097.3:543.635.4]-008.6

ISBN 978-966-673-468-9

© О. З. Яремчук, К. А. Посохова,  
І. М. Кліщ, М. М. Корда, 2022  
© ТНМУ, «Укрмедкнига», 2022

## Зміст

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ .....	4
ПЕРЕДМОВА .....	5
РОЗДІЛ 1. Антифосфоліпідний синдром: епідеміологія, етіологія, класифікація та діагностика .....	7
РОЗДІЛ 2. Антифосфоліпідні антитіла у формуванні акушерських ускладнень при антифосфоліпідному синдромі .....	10
РОЗДІЛ 3. Ендотелійна дисфункція та система нітроген оксиду в патогенезі антифосфоліпідного синдрому .....	24
РОЗДІЛ 4. Роль антифосфоліпідних антитіл у механізмах розвитку тромбозу судин при антифосфоліпідному синдромі та під час вагітності .....	42
РОЗДІЛ 5. Роль цитокінів у патогенезі антифосфоліпідного синдрому .....	55
РОЗДІЛ 6. Апоптоз у механізмах розвитку антифосфоліпідному синдромі .....	66
РОЗДІЛ 7. Поліорганні ураження при антифосфоліпідному синдромі .....	87
РОЗДІЛ 8. Механізми дії модуляторів системи нітроген оксиду (L-аргініну та аміногуанідину) за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому .....	167
КОРОТКИЙ ПІДСУМОК .....	206
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ .....	211

## Перелік умовних позначень

АОС	- антиоксидантна система;	СЧВ	- системний червоний вовчак;
АТФ	- аденозинтрифосфат;	ТБК	- тіобарбітурова кислота;
АФО	- активні форми кисню;	ТБК-АП	- продукти реакції з тіобарбітуровою кислотою;
аКЛ	- антикардіоліпінові антитіла;	ФЛ	- фосфоліпіди;
аФЛ	- антифосфоліпідні антитіла;	цГМФ	- циклічний гуанозинмонофосфат;
АФС	- антифосфоліпідний синдром;	ЦХО	- цитохромоксидаза;
АЧТЧ	- активований частковий тромбластиновий час;	ароER2	- рецептор аполіпопротеїну E2;
ВА	- вовчаковий антикоагулянт;	AV	- анексин V;
ВАФС	- вторинний антифосфоліпідний синдром;	β2ГПІ	- β2-глікопротеїн I;
ГПЛ	- гідропероксиди ліпідів	cNOS	- конститутивна ізоформа синтази нітроген оксиду;
ГП	- глікопротеїн;	eNOS	- ендотелійна ізоформа синтази нітроген оксиду;
КАТ	- каталаза;	GFAP	- гліальний фібрилярний кислий протеїн;
КАФС	- катастрофічний антифосфоліпідний синдром;	G-SH	- відновлений глутатіон;
КЛ	- кардіоліпін;	IAP	- інгібітор білка апоптозу;
МНВ	- міжнародне нормалізоване відношення;	IL-4	- інтерлейкін-4;
МВР	- основний протеїн мієліну;	IL-6	- інтерлейкін-6;
ПАФС	- первинний антифосфоліпідний синдром;	IL-10	- інтерлейкін-10;
ПІ	- протромбіновий індекс;	IFN	- інтерферон;
ПОЛ	- пероксидне окиснення ліпідів;	iNOS	- індукцибельна ізоформа синтази нітроген оксиду;
ПЧ	- протромбіновий час;	L - NAME	- метиловий ефір L - N <sup>6</sup> - нітроаргініну.
РДС	- респіраторний дистрес-синдром;	NO	- нітроген оксид;
РМП	- реакція мікропреципітації;	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	- нітрит-аніон;
СОД	- супероксиддисмутаза;	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	- нітрат-аніон;
		NOS	- синтаза нітроген оксиду;
		PI	- пропідій йодид;
		TF	- тканинний фактор;
		TNF-α	- фактор-α некрозу пухлин

## Передмова

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 [1]. Порушення системи згортання крові викликає взаємодія антифосфоліпідних антитіл з фосфоліпідами мембран, а також зв'язаними з цими фосфоліпідами глікопротеїнами [2, 3]. Однією з аутоімунних причин звичного невиношування вагітності є антифосфоліпідний синдром [4, 5], який виявляють у 27–42 % випадків серед пацієнток із невиношуванням вагітності, при цьому в 90 % жінок без адекватного лікування ембріон гине [6, 7]. Антифосфоліпідні антитіла активують прокоагуляційний стан, спричиняють високий ризик виникнення тромбозів, плацентарної недостатності, внутрішньоутробної затримки росту плода, прееклампсії, замирання плода на пізніх термінах вагітності [8–10]. Нещодавно було підтверджено утворення антифосфоліпідних антитіл під час гострої фази COVID-19, проте не завжди це супроводжувалося розвитком тромбозу [11–13]. При антифосфоліпідному синдромі спостерігається порушення функцій внутрішніх органів, ураження центральної нервової системи, легень, нирок, ендокринних залоз, печінки тощо [14–16]. Артеріальні тромбози у хворих із антифосфоліпідними антитілами виникають у різних органах, часто в артеріях головного мозку, що призводить до ішемічного інсульту [17–19]. 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 ендотелійними клітинами і моноцитами, зв'язування із тромбіном та активація системи комплементу, що призводить до утворення тромбів [9, 20, 21]. Важливе значення в механізмах розвитку антифосфоліпідного синдрому має ендотеліальна дисфункція, що проявляється порушенням антитромботичної і протизапальної активності ендотелію [22, 23]. Однією з ланок, що відіграють роль у механізмах розвитку антифосфоліпідного синдрому, є система нітроген оксиду [24]. Проте є лише поодинокі дослідження, суперечливого змісту, про порушення синтезу і біодо-

ступності нітроген оксиду в ендотелії за умов антифосфоліпідного синдрому [24–27]. Відомо, що гіперпродукування нітроген оксиду, опосередковане індуцибельною ізоформою синтази нітроген оксиду, збільшує маткові скорочення і ризик невиношування вагітності. Проте значне зниження його рівня призводить до передчасних пологів [25]. Механізм, за допомогою якого антифосфоліпідні антитіла спричиняють втрату вагітності при антифосфоліпідному синдромі, вивчено недостатньо [28]. Одним із важливих компонентів патогенезу антифосфоліпідного синдрому, що сприяють дисфункції імунокomпетентних клітин і синтезу аутоантитіл, є оксидативний стрес [29]. При взаємодії антифосфоліпідних антитіл із фосфоліпідами мембран розвивається дисбаланс компонентів цитокінових і кінінових каскадів, реалізуються процеси апоптозу та некрозу [30]. 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, яка становить близько 5 нових випадків на 100 тис. осіб на рік [14, 31].

Отже, встановлення молекулярних механізмів, зокрема ролі системи нітроген оксиду в 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, півкулі великого мозку, печінки та нирок при антифосфоліпідному синдромі. Оскільки синтез нітроген оксиду є регульованим процесом [32], 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 індуцибельної 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.

Антифосфоліпідний синдром (АФС) 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  $\beta$ 2-глікопротеїну I ( $\beta$ 2ГПІ) [33–36].

### ***1.1. Поширеність та етіологія антифосфоліпідного синдрому в популяції***

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 [6]. 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 [35]. 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, портальних, поверхневих та інших венах [6, 16, 21].

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) [6, 38, 39].

### **1.2. Класифікація антифосфоліпідного синдрому**

АФС поділяють на первинний (ПАФС) і вторинний (ВАФС). ПАФС – це симптомокомплекс, при якому клінічні прояви будь-якого іншого захворювання відсутні [37]. 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, COVID-19), застосуванням деяких лікарських засобів (гідралазин, фенітоїн, хлорпромазин, новокаїнамід). Частка ПАФС становить 53 %, ВАФС – 47 % [6, 42–44].

Найтяжчий перебіг АФС, незалежно від його варіанту, спостерігається на фоні тромбоцитопенії [45]. Серед інших клінічних варіантів виділяють катастрофічний АФС (КАФС), який є найтяжчою формою АФС. Він проявляється тромбозами життєво важливих органів і розвитком поліорганної недостатності на фоні високого титру аФЛ [6, 40, 41]. Випадки, коли клінічна картина відповідає проявам АФС, однак циркуляція антитіл до кардіоліпіну, антитіл до β2ГПІ 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 [46].

### **1.3. Діагностика антифосфоліпідного синдрому**

Взаємозв'язок між СЧВ і АФС досі залишається суперечливим, тому що невідомо, яка патологія є первинною, оскільки у пацієнтів, хворих на СЧВ, виявляють в крові аФЛ [38, 41, 47, 48]. Діагноз певного типу АФС встановлюють за наявності у пацієнта хоча б одного клінічного й одного лабораторного критерію згідно з Міжнародними Сіднейськими діагностичними критеріями АФС [37, 49–51].

**До клінічних критеріїв** належать судинні тромбози та патологія вагітності:

а) один або більше клінічних випадків тромбозу венозних, артеріальних або дрібних внутрішньоорганних судин будь-якої ло-



калізації, які підтверджено за допомогою інструментальних методів або морфологічно (тромбози глибоких вен кінцівок, тромботичні ураження легеневої артерії, поверхневі тромбофлебії, сітчасте ліведо; ураження мікросудин – поширені некрози шкіри, тромботична мікроангіопатія в нирках);

б) один або більше випадків внутрішньоутробної смерті морфологічно нормального плода на 10-у тиждні 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 аборти до 10 тижнів гестації за відсутності у матері анатомічних і гормональних порушень та при виключенні хромосомних причин з материнської або батьківської ліній [6, 51–53].

**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  $\beta$ 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 антикоагулянт у плазмі, в двох або більше випадках дослідження з проміжком не менше 12 тижнів, що визначається відповідно до рекомендацій Міжнародного Товариства тромбозу і гемостазу [37, 54]

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 [6, 35, 55, 56].

Серед аутоімунних причин невиношування вагітності перше місце займає АФС. 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 [57–60]. У жінок з втратою вагітності поширеність аФЛ в середньому становить 16 %. Встановлено, що у пацієнток з АФС може спостерігатися судинний тромбоз без ускладнень вагітності або, навпаки, тільки акушерські прояви АФС [61]. У всіх новонароджених дітей, що народилися у жінок з АФС, у першу добу життя виявляють циркуляцію аФЛ у крові, що підтверджує їх плацентарну передачу [62, 63].

### ***2.1. Загальна характеристика антифосфоліпідних антитіл***

Антифосфоліпідні антитіла – родина аутоантитіл, спрямованих проти конформаційних епітопів плазмових білків, які утворюються в результаті їх взаємодії з аніонними фосфоліпідами. Ця родина включає антитіла, спрямовані проти фосфоліпідозв'язуючих, або «кофакторних», білків, а саме аβ2ГПІ, анексину V і протромбіну. Також виділяють антитіла до негативно заряджених фосфоліпідів – до кардіоліпіну, фосфатидилгліцеролу, фосфатидилінозитолу, фосфатидилсерину, фосфатидилової кислоти, і нейтрально заряджених фосфоліпідів – фосфатидилетаноламіну, фосфатидилхоліну [9, 58, 64–66]. 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 β2ГПІ, що циркулює в плазмі разом з ліпопротеїнами. β2ГПІ має природну антикоагулянтну активність. Антитіла, при-

сутні в сироватці хворих АФС, розпізнають антигенні детермінанти не аніонних фосфоліпідів, а конформаційні епітопи (неоантигени), що формуються в процесі взаємодії  $\beta$ 2ГПІ з фосфоліпідами. Навпаки, при інфекційних захворюваннях присутні переважно антитіла, які реагують із фосфоліпідами за відсутності  $\beta$ 2ГПІ [67].

Клінічні прояви АФС тісно пов'язані з наявністю в крові антифосфоліпідних аутоантитіл. Розрізняють категорії пацієнтів з більш ніж одним лабораторним критерієм у будь-якій комбінації – тільки ВА, тільки аКЛ, або тільки анти- $\beta$ 2ГПІ антитіла. Вважають також, що одночасне виявлення аКЛ і анти- $\beta$ 2ГПІ-антитіл (переважно IgG) зустрічається у пацієнтів з високим ризиком. Пацієнтки, позитивні тільки за аКЛ і анти- $\beta$ 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 [50, 68].

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 [69, 70].

Важливу роль у процесі взаємодії аФЛ і ендотелійних клітин відіграє  $\beta$ 2ГПІ.  $\beta$ 2ГПІ – один із білків плазми крові, що має в своїй структурі 5 доменів. П'ятий домен відповідає за зв'язування  $\beta$ 2ГПІ з ліпідною мембраною клітини за допомогою залишків лізину, а саме з фосфатидилсерином. Приєднання  $\beta$ 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 [34, 71, 72, 73].

$\beta$ 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  $\beta$ 2ГПІ як фізіологічного нейтралізатора коагуляції. Окрім того,  $\beta$ 2ГПІ пригнічує АДФ-залежну агрегацію тромбоцитів. Пізніше було виявлено, що  $\beta$ 2ГПІ є складовою частиною хіломікронів, ліпопротеїнів дуже низької і висо-

кої щільності, виявлена його роль у метаболізмі ліпідів (активація ліпопротеїнліпази). Хоча в фізіологічних умовах  $\beta$ 2ГПІ зв'язується з аніонними фосфоліпідними мембранами досить слабо, при наявності анти- $\beta$ 2ГПІ антитіл утворюється комплекс перехресно пов'язаних  $\beta$ 2ГПІ і антитіл, який може мати високу здатність зв'язуватися з фосфоліпідною мембраною. При утворенні таких комплексів афінність  $\beta$ 2ГПІ до фосфоліпідів збільшується більш ніж у 100 разів. Ці комплекси зменшують кількість аніонних фосфоліпідних поверхонь і проявляють ефект інгібування фосфоліпідозалежних коагуляційних реакцій *in vitro* [74–76].

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 [77–79].

Антипротромбінові антитіла – це гетерогенна група, що включає антитіла проти протромбіну і антитіла проти фосфатидилсерин-протромбінового комплексу [80]. 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 [81, 82]. У хворих з АФС одночасно виявляють ВА і протромбінові антитіла [83].

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 ендотелійних клітин. Руйнування анексино-

вого 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  $\beta$ 2ГПІ має меншу афінність, ніж анексин V. В умовах АФС спочатку відбувається зв'язування  $\beta$ 2ГПІ з фосфоліпідами. В результаті експресується епітоп G40-R43  $\beta$ 2ГПІ, що викликає конформаційні зміни в молекулі  $\beta$ 2ГПІ. Молекула  $\beta$ 2ГПІ набуває здатності зв'язуватися з двома антигенами. Це призводить до підвищення афінності  $\beta$ 2ГПІ до фосфоліпідів, витіснення анексину V і активації коагуляції [84–86].

Антифосфоліпідні антитіла можуть утворюватися і у безсимптомних пацієнтів-носіїв без розвитку АФС [37]. 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 [51] 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  $\beta$ 2ГПІ, а також з генетичними дефектами імунної системи, такими як системи IgA і комплементу [87, 88].

## ***2.2. Механізми розвитку акушерської патології при антифосфоліпідному синдромі***

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. Вва-

жають, що в основі внутрішньоутробної загибелі плода лежить гіпоксія, зумовлена недостатнім матково-планцентарним кровотоком унаслідок тромбозу судин плаценти і порушення імплантації ембріона [89, 90].

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 ендотелійних поверхонь – фетоплацентарного ендотелію, ендотелію судин матки і ендотелію трофобласта [91].

Основні механізми розвитку акушерської патології при АФС [59, 92–97]:

1. Пригнічення синтезу простацикліну і порушення в системі простациклін-тромбоксан А2 з переважанням останнього. Простациклін є потужним вазодилататором 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. Ендотелійні пошкодження сприяють зниженню активності антитромбіну III, 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 ендотелійних 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 IAP-1, посилюючи фібринолітичну активність. Антикоагулянтний і фібринолітичний ефекти активованого протеїну С посилюються його кофактором – протеїном S.

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  $\beta$ 2ГПІ, а екзогенний  $\beta$ 2ГПІ може зв'язуватися з поверхнею клітин трофобласта. Таким чином, аФЛ можуть зв'язуватися з  $\beta$ 2ГПІ на трофобласті та чинити патогенну дію [28]. Висока частота виявлення комплексу  $\beta$ 2ГПІ з АКЛ на мембранах трофобласта та на ендотелії судин плаценти у жінок з несприятливим завершенням вагітності свідчить про роль  $\beta$ 2ГПІ у розвитку патологічних процесів у плаценті [98].

При взаємодії аФЛ з ендометрієм та ембріоном спостерігаються порушення імплантації, плацентазії, виникнення мікротромбозів у спіральних артеріях, плацентарна недостатність [99].

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 [100–102]. 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 [98, 103].

Відомо, що анти- $\beta$ 2ГПІ-антитіла у пацієнтів з АФС впливають на життєздатність та вироблення цитокінів у трофобластах [28, 104].

У вагітних з АФС встановлено зниження рівня інтерлейкіну-3 (IL-3), який є активним чинником зростання трофобласта, сприяє імплантації і розвитку плаценти, а також має регуляторну дію на фібринолітичні процеси в ендометрії [105, 106]. Антифосфоліпідні антитіла зумовлюють розвиток гострого запалення, спричиняючи міграцію нейтрофілів [92, 98, 107, 108].

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 C5a 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 C5 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 [109–111].

При АФС відбувається зниження активності анексину-V через блокування його транспорту на мембрану трофобласта, а також шляхом його видалення з трофобласта з подальшим протеолізом. аФЛ в присутності  $\beta$ 2ГПІ здатні знижувати експресію анексину-V на поверхні мембран. Інфаркт плаценти також пов'язують із аФЛ-залежним зниженням експресії анексину-V на поверхні плацентарних ворсинок, здатністю аФЛ перехресно реагувати з клітинами трофобласта [86, 112–114].

Оскільки для АФС характерний високий ризик рецидиву тромбозів, більшість пацієнток 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 пацієнток з АФС продовжують використовувати антиагреганти (найчастіше кислоту ацетилсаліцилову) та антикоагулянти прямої (в тому числі низькомолекулярні гепарини) та непрямої дії [10, 52, 115–118].

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 [57, 119, 120].



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

АФС моделювали на мишах-самках лінії BALB/c масою 25–30 г, яких утримували на стандартних світловому, харчовому та температурному режимах віварію відповідно до санітарно-гігієнічних норм, за допомогою кардіоліпіну (Sigma, США), який вводили внутрішньом'язово чотири рази (30 мкг на 1 ін'єкцію, проміжки між ін'єкціями становили 14 діб) [121]. 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. 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 [122–124]. 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 [121]. Мазки брали з піхви самок, забарвлювали їх метиленовим синім та проводили мікроскопію. При переважанні в мазках плос-

ких зроговілих поверхневих клітин констатували фазу еструсу і самок підсаджували до самців. На наступний день при виявленні у мазку сперміїв констатували нульовий день вагітності.

Експерименти виконано на базі Центральної науково-дослідної лабораторії, міжкафедральної навчально-дослідної лабораторії 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 [125] та Директиви Європейського Союзу 2010/10/63 EU щодо експериментів на тваринах.

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою програми STATISTICA 10. Порівняння отриманих величин проводили з використанням U-критерію Манна-Уїтні. Зміни вважали достовірними при  $p \leq 0,05$ .

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 [121]. 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 [126].

Імуноблотинг протеїнів головного мозку мишей лінії BALB/c, оброблених сироватками крові експериментальних та контрольних мишей, представлено на рисунку 2.1.

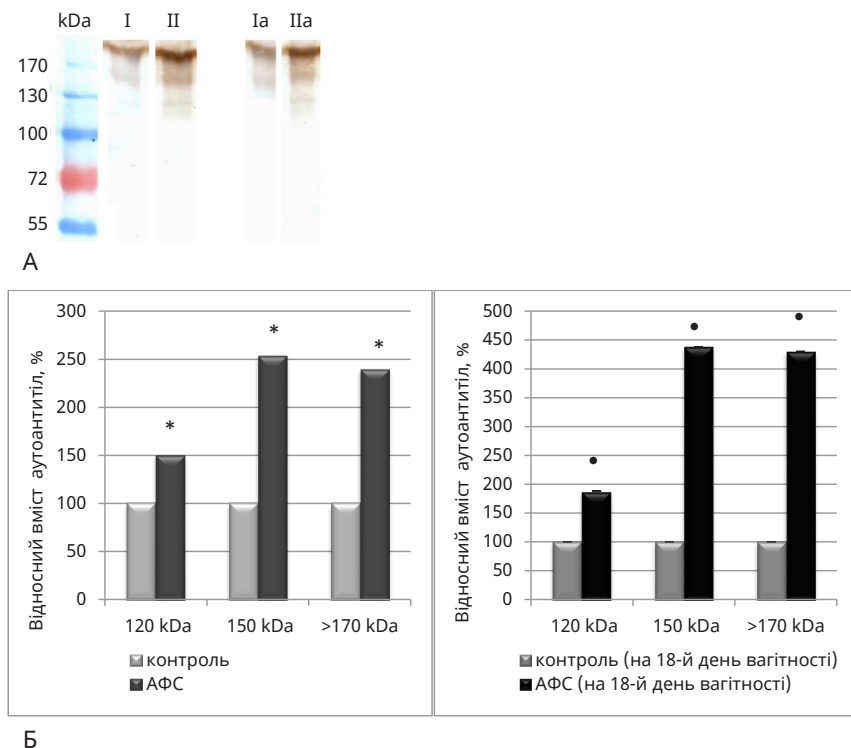


Рис. 2.1. Вестерн-блот аналіз протеїнів головного мозку, що реагують із аутоантитілами контрольних мишей лінії BALB/c та мишей із АФС до вагітності та на 18-й день вагітності: блотограма (А) та результати денситометрії (Б). Дані наведено у відсотках від контролю (n=10).

Примітка. Умовні позначення: \* - 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 [127] 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. 2.1).

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. 2.1).

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» [126, 128].

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

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. Підвищення вмісту аутоантитіл пов'язане з невиношуванням вагітності, хронічною плацентарною недостатністю та гестозами [126, 129, 130, 131].

Результати денситометричного аналізу показали [127], 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. 2.2, рис. 2.3). 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. 2.2, рис. 2.4).

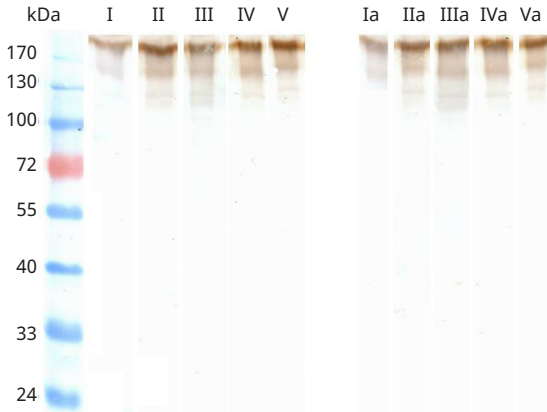


Рис. 2.2. Вестерн-блот аналіз протеїнів головного мозку, що реагують із аутоантитілами мишей лінії BALB/c із АФС до вагітності та на 18-й день вагітності та при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину.

*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 в 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. 2.3). 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. 2.4).

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. 2.3). При порівнянні

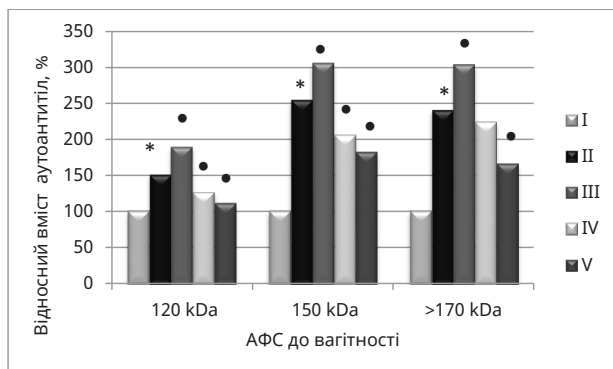


Рис. 2.3. Результати Вестерн-блот аналізу аутоантитіл до протеїнів головного мозку мишей лінії BALB/c з АФС та при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину. Дані наведено у відсотках від контролю (n=10).

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).

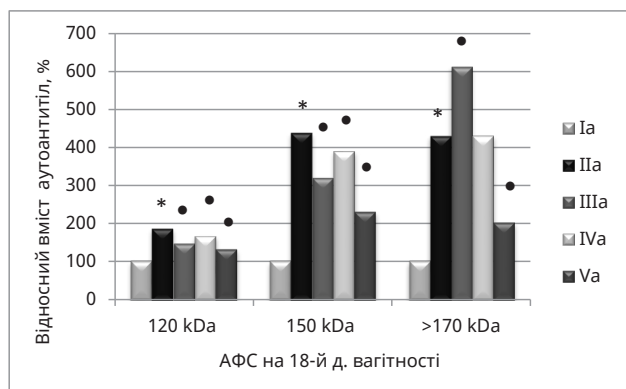


Рис. 2.4. Результати Вестерн-блот аналізу аутоантитіл до протеїнів головного мозку мишей лінії BALB/c із АФС на 18-й день вагітності та при застосуванні L-аргініну і аміногуанідину. Дані наведено у відсотках від контролю (n=10).

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.

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. 2.4). 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. 2.4).

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.

Ендотелій є головною клітинною мішенню аФЛ за умов АФС [24, 71, 107, 132]. Ендотелійна дисфункція, що поєднується з рецидивним тромбозом, є одним із основних та найнебезпечніших проявів АФС [22, 23, 133]. Розвиток ендотелійної дисфункції супроводжується порушенням синтезу та біодоступності NO [25, 134, 135].

### ***3.1. Ендотелійна дисфункція у механізмах розвитку антифосфоліпідного синдрому***

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 ендотелійних клітин відіграє  $\beta$ 2ГПІ [24, 71, 107, 132].  $\beta$ 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 [136, 137]. Ендотелій відіграє важливу роль у регуляції системи гемостазу. Активація ендотелійних клітин відбувається шляхом підвищення експресії молекул адгезії [138].

Основними патобіохімічними механізмами розвитку тромбофілії за умов АФС, які пов'язані з пошкодженням функції ендотелію, є [139–142]:

- а) пригнічення синтезу ендотелійними клітинами простагліну – природного інгібітора агрегації тромбоцитів і вазодилатора;
- б) синтез антиендотелійних антитіл;
- в) пригнічення гепаринзалежної активації антитромбіну-III і гепарин-опосередкованого утворення антитромбін-III-тромбіно-



вого комплексу, посилення синтезу фактора активації тромбоцитів клітинами ендотелію;

г) пошкодження мембран ендотелійних 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 фібрoneктин;

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 ендотелійних клітин, що проявляється збільшенням експресії молекул адгезії (Е-селектину, ICAM-1, VCAM-1), продукції прозапальних цитокінів (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6).

ж) «тромбінової парадокс». При низьких концентраціях тромбіну відбувається переважно активація природного антикоагулянта – протеїну С. Коли формується більше тромбіну, фібриноген перетворюється на фібрин, а FVa і FVIIIa активуються: тромбін проявляє протромботичні властивості.

Однією з причин розвитку ендотелійної дисфункції у мишей з АФС стало підвищення кількості циркулюючих десквамованих ендотеліоцитів. Кількісний аналіз вільноциркулюючих ендотелійних клітин у крові досліджуваних мишей Balb/c проводили за способом Hladovec]. [143] у модифікації Сівак В. В. та ін. [144]. Встановлено, що у тварин з АФС до вагітності кількість десквамованих ендотеліоцитів зростає в 1,6 рази, порівняно з інтактними, а у вагітних мишей з АФС – у 2,4 рази.

При ендотелійній дисфункції порушуються синтез та біодоступність NO [22–25, 133, 134, 135, 145, 146].

### ***3.2. Роль системи нітроген оксиду в патогенезі антифосфоліпідного синдрому***

Однією з ланок, що беруть участь у патобіохімічних механізмах розвитку АФС, є система NO [24, 137, 146]. У фізіологічних умовах NO утворюється трьома ізоформами синтази нітроген оксиду (NOS), включаючи ендотелійну (eNOS), нейрональну (nNOS) та індубельну NOS (iNOS) [147–151]. Ці NOS мають чітку структуру та

функції й в основному існують у різних клітинах. eNOS існує в ендотелійних клітинах, а nNOS – у нейронах. Ці дві ізоформи мають подібний регульовальний механізм, який активується збільшенням внутрішньоклітинної концентрації кальцію, натомість iNOS, активність якої не залежить від концентрації кальцію, в основному функціонує в імунній системі [152–154]. NO в основному виробляється з L-аргініну [155]. 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 [147, 156, 157].

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. При його надлишковому синтезі NO стає шкідливим. 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 [157–159].

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 [24, 157, 160, 161]. 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 [160, 162]. Протизапальний ефект NO реалізується через інгібування адгезії лейкоцитів на судинному ендотелії та перехоплення супероксидного аніона [161].

Роль NO в патогенезі АФС обумовлена як прямою, так і опосередкованою дією. Активуючи розчинну гуанілатциклазу, NO під-

вищує активність  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФази і сприяє виходу  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазму. Вільний  $\text{Ca}^{2+}$  активує ряд протеаз. Відповідно, коли продукція або біодоступність NO пригнічені, виникають вазоконстрикція, тромбози, запальні процеси, гіпертрофія і стеноз судин. Важливу роль у підтриманні судинного тону та запобіганні тромбоутворенню відіграє активність ендотеліальної NO-синтази [156, 161].

аФЛ інгібують eNOS, що супроводжується зменшенням синтезу NO, зростанням адгезії лейкоцитів до ендотелію судин і формуванням тромбів [137].

При первинному АФС середній рівень  $\text{NO}^2$  у плазмі крові знижується, тоді як середній вміст нітротирозину підвищується. Рівень нітратів плазми крові обернено пропорційний титрам аФЛ. Установлено також, що у пацієнтів з АФС рівень аФЛ перебуває у зворотному зв'язку з кількістю метаболітів NO, які виділяються з сечею [24]. З іншого боку, встановлено, що антикардіоліпінові антитіла індукували продукування NO через посилену експресію iNOS [134]. Проте на експериментальних моделях у мишей при АФС встановлено зниження вмісту метаболітів NO у плазмі [163]. Доведено високу специфічність і чутливість визначення стабільних метаболітів NO –  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  у сироватці крові та шийці матки, зниження рівня яких супроводжується підвищенням скоротливої активності міометрія та може бути діагностичним критерієм загрози передчасних пологів [164].

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 [165, 166]. У моделях на мишах введення поліклональних аФЛ, виділених від пацієнтів, або моноклональних антитіл до  $\beta_2$ ГПІ 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 [24]. За даними J. Delgado Alves et al., при експериментальному АФС встановлено посилення зниження рівня NO у плазмі крові [134]. 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  $\beta_2$ ГПІ [167]. Взаємодія аФЛ з  $\beta_2$ ГПІ впливає на трансмембранні рецептори, включаючи рецептор

аполіпропротеїну E2 (ароER2), що супроводжується змінами внутрішньоклітинної сигналізації та пошкодженням цільових клітин аФЛ. На культурі ендотелійних клітин та у дослідгах на мишах було показано, що повне вилучення ароER2 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 [137, 166, 168].

Трансмембранний білок ароER2, 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  $\beta$ 2ГПІ, також вимагає ароER2 [169]. Було виявлено молекулярні зв'язки між взаємодією аФЛ із  $\beta$ 2ГПІ та інгібуванням eNOS. При зв'язуванні аФЛ з  $\beta$ 2ГПІ відбувається димеризація  $\beta$ 2ГПІ та взаємодія його з ароER2, що спричиняє, через ряд проміжних ланок, гальмування активності eNOS та дефіцит NO, що провокує тромбоз [137, 165, 168].

Роль  $\beta$ 2ГПІ в антагонізмі аФЛ щодо eNOS була доведена при порівнянні дії аФЛ за наявності або відсутності  $\beta$ 2ГПІ на поверхні ендотелійних клітин [137]. Коли клітини були позбавлені  $\beta$ 2ГПІ, аФЛ не викликали гальмування активності eNOS, що вказує на необхідність  $\beta$ 2ГПІ для дії аФЛ. Дослідження на культивованих ендотелійних клітинах показують, що для антагонізму з eNOS необхідна додаткова димеризація  $\beta$ 2ГПІ [170].

У дослідженнях *in vitro* стимуляція адгезії моноцитів за допомогою аФЛ супроводжувалась зниженням біодоступності NO [24].

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 [171].

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 спричиняло реактивованій апоптоз [172]. Дисбаланс між рівнями NO та АФО (пригнічення сигналізації

NO – цГМФ та підвищення відповідно рівнів АФО) призводить до апоптозу та подальшої герметичності ендотелію, що підтверджене в умовах *in vivo* та *in vitro* [173].

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 та 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 [150, 174].

АФО беруть участь у патобіохімічних механізмах розвитку АФС [134, 175]. Відомо, що у результаті окисно-відновних реакцій в організмі постійно підбувається генерація АФО ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$ ,  $RO_2^{\cdot}$ ,  $OH_2^{\cdot}$ ,  $H_2O_2$  та ін.), які відіграють важливу роль у багатьох фізіологічних і біохімічних процесах: регуляції тонуусу 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 [176–180]. Пошкодjuвальній дії АФО протистоїть антиоксидантна система, яка запобігає утворенню, забезпечує зв'язування та модифікацію вільних радикалів, руйнування пероксидів, екранування функціональних груп білків та інших молекул [29, 181, 182].

Отже, ключовим механізмом патогенезу АФС є прогресуюче пошкодження ендотелію, розвиток запальної відповіді і активація процесів коагуляції з розвитком тромбозів. Підтверджено важливу роль зменшення синтезу NO ендотелійними клітинами, індукцію запальних та прокоагулянтних процесів, збільшення проліферації ендотелію та порушення судинного ремоделювання та ангіогенезу при АФС [183].

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.

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

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 ендотелійна NO-синтаза [26, 161, 162].

Визначення концентрації eNOS та iNOS в сироватці крові 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) та «Mouse NOS2/iNOS (Nitric Oxide Synthase 2, Inducible) ELISA Kit» (Express Biotech International, USA). У результаті проведених досліджень [184] встановлено, що у мишей з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності знижується вміст eNOS у крові (на 23 % та 67 %) та у печінці (на 66 % та 81 %) (рис. 3.1 А, Б), порівняно із показниками тварин контрольних груп. Отримані результати узгоджуються з даними інших авторів про інгібування eNOS під впливом аФЛ [137].

Установлено також зростання вмісту iNOS у крові (в 4,1 та 4,5 раза) та у печінці (у 2,2 та 3,5 раза) (рис. 3.1 В, Г) невагітних та вагітних тварин з АФС. Підвищення активності iNOS, ймовірно, може бути спричинено зростанням продукції прозапальних цитокінів IL-1 $\beta$ , IL-6 та TNF- $\alpha$  [146].

Про вміст NO у сироватці крові та гомогенатах тканин робили висновок за кількістю його стабільних метаболітів нітрит-аніонів (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) та нітрат-аніонів (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Вміст NO<sub>2</sub><sup>-</sup> визначали високоспецифічним спектрофотометричним методом Green L.C. et al. за даними кольорової реакції з реактивом Гріса [185]. Відновлення нітратів до нітритів здійснювали металічним цинком в оцтовокислому розчині, іони NO<sub>2</sub><sup>-</sup> виявляли діазореакцією з реактивом Гріса, з наступним колориметричним визначенням [186].

За умов АФС до вагітності та на 18-й день вагітності відбувалося зменшення у сироватці крові вмісту NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (на 26 % та 45 %), а вміст NO<sub>3</sub><sup>-</sup> зростав (на 75 % та 60 %), порівняно з показниками контрольних груп (табл. 3.1). Отримані нами результати щодо зни-

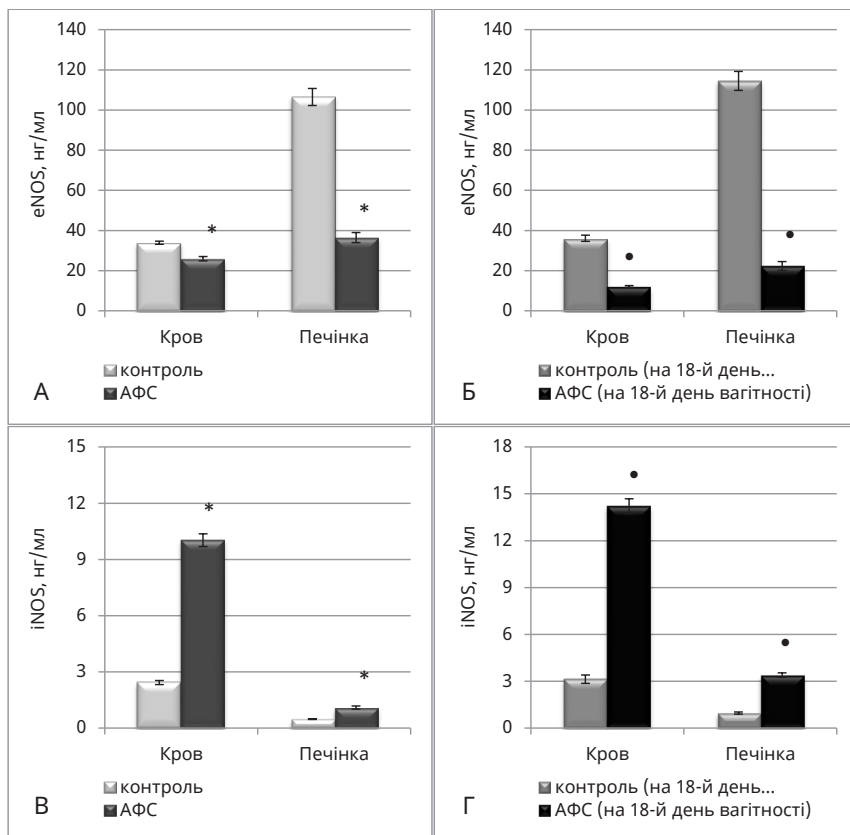


Рис. 3.1. Вміст ендотелійної (А, Б) та індукційної (В, Г) ізоформ синтази нітроген оксиду в сироватці крові та печінці вагітних та невагітних мишей лінії BALB/c з антифосфоліпідним синдромом ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

Примітка. Умовні позначення: \* - достовірна відмінність від відповідних значень у контрольній групі ( $p < 0,05$ ); • - достовірна відмінність від відповідних значень у контрольній групі (на 18-й день вагітності) ( $p < 0,05$ ).

ження вмісту  $NO_2^-$  у сироватці крові за умов АФС узгоджуються з даними інших науковців [24].

NO виконує роль інтегруючого елемента в функціонуванні нервової системи. NO - ефективний регулятор нейронів, глії та судин, включаючи капіляри мозку [147, 187, 188, 189, 190, 191]. Встановлено, що у групі тварин з АФС відбувається зростання вмісту

стабільних метаболітів нітроген оксиду  $\text{NO}_2^-$  на 46 % та  $\text{NO}_3^-$  на 41 % у мозочку, порівняно із показниками інтактних тварин (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Вміст  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  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				
$\text{NO}_2^-$ , мкмоль/л	2,23±0,10	1,65±0,15 $p < 0,05$	1,99±0,08	1,10±0,07 $p < 0,001$
$\text{NO}_3^-$ , 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				
$\text{NO}_2^-$ , мкмоль/кг	3,37±0,08	4,90±0,14 $p < 0,001$	3,45±0,07	5,31±0,14 $p < 0,001$
$\text{NO}_3^-$ , 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				
$\text{NO}_2^-$ , мкмоль/кг	2,79±0,08	3,57±0,15 $p < 0,005$	2,86±0,09	2,43±0,10 $p < 0,05$
$\text{NO}_3^-$ , 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				
$\text{NO}_2^-$ , мкмоль/кг	1,55±0,05	1,35±0,05 $p < 0,05$	2,11±0,08	0,68±0,04 $p < 0,001$
$\text{NO}_3^-$ , 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				
$\text{NO}_2^-$ , мкмоль/кг	0,63±0,03	1,19±0,07 $p < 0,001$	0,72±0,04	1,41±0,04 $p < 0,001$
$\text{NO}_3^-$ , 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:  $p$  – достовірно відмінне від відповідних значень у контрольній групі.



У мишей BALB/c із АФС на 18-й день вагітності у мозочку зареєстровано зростання вмісту стабільних метаболітів нітроген оксиду  $\text{NO}_2^-$  на 54 % та  $\text{NO}_3^-$  на 65 %, порівняно із показниками вагітних тварин контрольної групи. У півкулях великого мозку мишей BALB/c з АФС встановлено зростання  $\text{NO}_2^-$  на 28 % та  $\text{NO}_3^-$  та 20 % відповідно, відносно контролю (див. табл. 3.1).

Проте у зразках півкуль великого мозку вагітних мишей BALB/c за умов АФС відбувається достовірне зниження вмісту  $\text{NO}_2^-$  на 15 % та  $\text{NO}_3^-$  на 19 %, порівняно з контролем. Отримані нами результати узгоджуються з даними літератури про те, що синтез і біодоступність NO порушуються при акушерському АФС [123]. Це може бути пов'язано як із недостатністю субстрату для синтезу NO L-аргініну, так і з утворенням підвищеного рівня супероксиданіону, який швидко зв'яже й інактивує NO [26].

Установлено, що за умов АФС до вагітності та на 18-й день вагітності відбувається зниження вмісту  $\text{NO}_2^-$  у печінці (на 13% та 68 %), а рівень  $\text{NO}_3^-$  зростає (на 20 % та 95 %) відносно показників контрольних груп (див. табл. 3.1). Зростання рівня  $\text{NO}_3^-$  у печінці, ймовірно, зумовлено активацією iNOS [192]. Водночас, незважаючи на гіперпродукцію NO, виникає відносна його недостатність на рівні внутрішньопечінкової мікроциркуляції [193, 194], що узгоджується із зареєстрованим зниженням вмісту  $\text{NO}_2^-$  у печінці.

Установлено, що за умов АФС у нирках вміст  $\text{NO}_2^-$  зростав на 88 %, а  $\text{NO}_3^-$  - в 2,2 раза 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  $\text{NO}_2^-$  на 94 % та  $\text{NO}_3^-$  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  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  і зниження вмісту  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  у вагітних мишей з АФС.

### **3.3. Вплив L-аргініну та аміногуанідину на розвиток ендотеліної дисфункції та нітрооксидативного стресу при антифосфоліпідному синдромі у невагітних та вагітних мишей**

У результаті досліджень, які описані у розділі 3.2, 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 індукційної NOS аміногуанідину на показники функціонального стану мозку, печінки та нирок при АФС, що дозволило з'ясувати роль системи нітроген оксиду в механізмах ураження досліджуваних органів у вагітних та невагітних мишей при АФС. 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. 3.2, А).

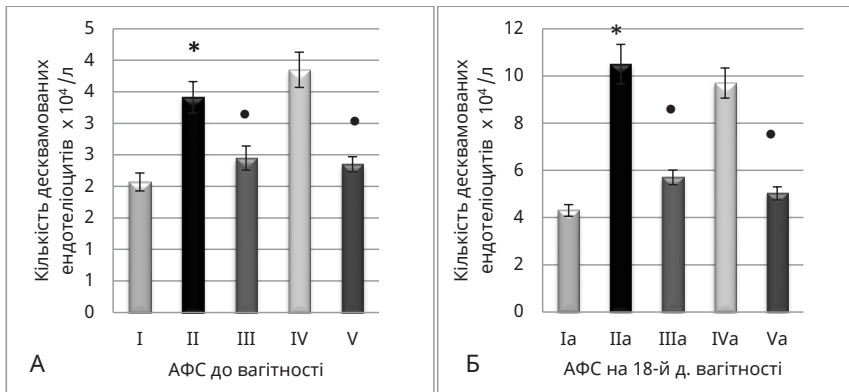
При введенні L-аргініну тваринам з АФС на 18-й день вагітності у крові встановлено зниження кількості циркулюючих десквамованих ендотеліоцитів у 1,8 раза, порівняно з показниками групи вагітних мишей з АФС (рис. 3.2, Б).

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 [25, 26, 146, 195]. 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 [184], 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. 3.3).

Водночас вміст iNOS у крові невагітних і вагітних мишей з АФС, яким вводили L-аргінін, достовірно не змінювався (рис. 3.4).

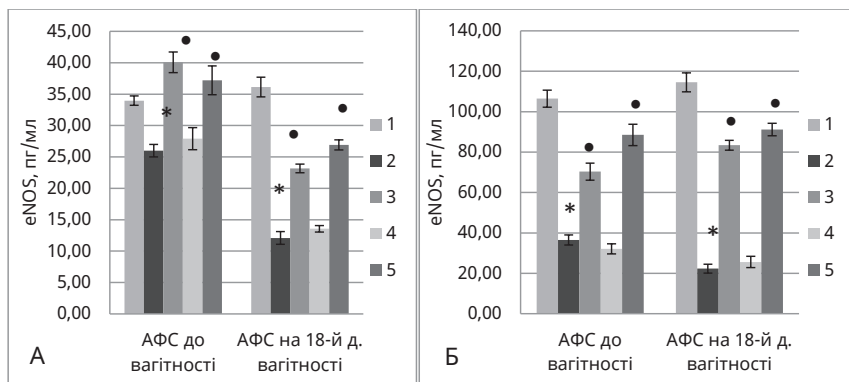
У печінці виявлено зменшення вмісту iNOS у тварин з АФС до вагітності на 21 % та у тварин з АФС на 18-й день вагітності на



**Рис. 3.2.** 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 ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

*Примітка.* 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).

Умовні позначення: \* – достовірно відмінне від відповідних значень у контрольній групі ( $p < 0,05$ ); • – достовірно відмінне від відповідних значень у групі тварин з АФС ( $p < 0,05$ ).



**Рис. 3.3.** 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 в наступних рисунках розділу. 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 ( $p < 0,05$ ).

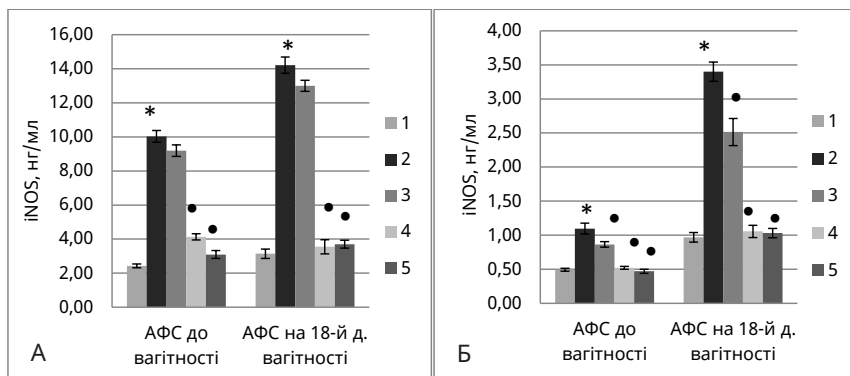


Рис. 3.4. Вміст iNOS у сироватці крові (А) та печінці (Б) мишей лінії BALB/c з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності і при застосуванні L-аргініну й аміногунідину ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

26 %, порівняно з показниками груп мишей з АФС відповідно до термінів дослідження (див. рис. 3.4).

При введенні L-аргініну у сироватці крові невагітних та вагітних мишей лінії BALB/c з АФС встановлено зростання вмісту  $\text{NO}_2^-$  (на 42 % та 30 %) та  $\text{NO}_3^-$  (на 55 % та 60 %), порівняно з показниками тварин з АФС (табл. 3.2). У мозочку мишей з АФС при введенні L-аргініну встановлено подальше зростання вмісту  $\text{NO}_2^-$  на 24 % та  $\text{NO}_3^-$  на 14 %, порівняно з показниками тварин із АФС.

Введення L-аргініну вагітним тваринам з АФС у мозочку не супроводжувалося змінами вмісту  $\text{NO}_2^-$ , а вміст  $\text{NO}_3^-$  зростав на 13 % (табл. 3.3).

При введенні L-аргініну в півкулях великого мозку вміст  $\text{NO}_2^-$  достовірно не змінювався, а вміст  $\text{NO}_3^-$  збільшувався на 13 %, порівняно з показниками тварин із АФС (табл. 3.4).

У півкулях великого мозку тварин з АФС на 18-й день вагітності, яким вводили L-аргінін, вміст  $\text{NO}_2^-$  збільшувався на 29 %, а вміст  $\text{NO}_3^-$  – на 36 %, порівняно з показниками вагітних мишей з АФС.

У печінці тварин з АФС, яким вводили L-аргінін, встановлено зростання вмісту  $\text{NO}_2^-$  на 39 % та  $\text{NO}_3^-$  на 45 %, порівняно з показниками групи мишей з АФС (табл. 3.5). На 18-й день вагітності у печінці тварин з АФС, яким вводили L-аргінін, встановлено зростання вмісту  $\text{NO}_2^-$  на 92 % та  $\text{NO}_3^-$  на 19 %, порівняно з показниками вагітних мишей з АФС.

Таблиця 3.2

Вміст  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  у сироватці крові мишей лінії BALB/c за умов антифосфоліпідного синдрому до вагітності та на 18-й день вагітності та при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )

Група тварин	АФС до вагітності		АФС на 18-й день вагітності	
	$\text{NO}_2^-$ , мкмоль/л	$\text{NO}_3^-$ , мкмоль/л	$\text{NO}_2^-$ , мкмоль/л	$\text{NO}_3^-$ , мкмоль/л
АФС	1,65±0,15 $p < 0,05$	19,65±0,97 $p < 0,001$	1,10±0,07 $p < 0,001$	15,29±0,66 $p < 0,01$
АФС+ L-аргінін	2,35±0,09 $p_1 < 0,01$	30,50±2,12 $p_1 < 0,01$	1,43±0,10 $p_1 < 0,05$	24,44±1,51 $p_1 < 0,01$
АФС + аміногуанідин	1,84±0,10 $p_1 > 0,05$	8,63±0,30 $p_1 < 0,001$	1,04±0,04 $p_1 > 0,05$	7,65±0,37 $p_1 < 0,001$
АФС + L-аргінін + аміногуанідин	2,06±0,05 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 > 0,05$	12,82±1,04 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,01$	1,51±0,11 $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,05$	10,82±0,53 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,01$

Примітка. Тут і в наступних таблицях розділу.  $p$  – достовірно відмінне від відповідних значень у контрольній групі;  $p_1$  – достовірно відмінне від відповідних значень у групі тварин з АФС;  $p_2$  – 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.

Таблиця 3.3

Вміст  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  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	
	$\text{NO}_2^-$ , мкмоль/кг	$\text{NO}_3^-$ , мкмоль/кг	$\text{NO}_2^-$ , мкмоль/кг	$\text{NO}_3^-$ , мкмоль/кг
АФС	4,90±0,14 $p < 0,001$	23,71±0,83 $p < 0,001$	5,31±0,14 $p < 0,001$	29,29±1,28 $p < 0,001$
АФС + L-аргінін	5,58±0,18 $p_1 < 0,05$	29,49±0,88 $p_1 < 0,01$	5,62±0,18 $p_1 > 0,05$	33,19±0,86 $p_1 < 0,05$
АФС + аміногуанідин	3,22±0,08 $p_1 < 0,001$	18,13±0,45 $p_1 < 0,01$	3,65±0,17 $p_1 < 0,001$	20,60±0,47 $p_1 < 0,01$
АФС + L-аргінін + аміногуанідин	3,55±0,08 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,05$	19,73±0,91 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,001$ $p_3 > 0,05$	3,79±0,13 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 > 0,05$	21,82±0,85 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,001$ $p_3 > 0,05$

Таблиця 3.4

Вміст  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  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	
	$\text{NO}_2^-$ , мкмоль/кг	$\text{NO}_3^-$ , мкмоль/кг	$\text{NO}_2^-$ , мкмоль/кг	$\text{NO}_3^-$ , мкмоль/кг
АФС	3,57±0,15 $p < 0,005$	17,69±0,52 $p < 0,01$	2,43±0,10 $p < 0,05$	12,56±0,33 $p < 0,05$
АФС+ L-аргінін	3,41±0,05 $p_1 > 0,05$	20,02±0,44 $p_1 < 0,05$	3,12±0,18 $p_1 < 0,05$	17,13±0,97 $p_1 < 0,01$
АФС + аміногуанідин	2,91±0,13 $p_1 < 0,05$	14,89±0,64 $p_1 < 0,05$	2,54±0,11 $p_1 > 0,05$	13,90±0,64 $p_1 > 0,05$
АФС + L-аргінін + аміногуанідин	3,02±0,14 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 > 0,05$	15,93±0,33 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,001$ $p_3 > 0,05$	2,94±0,08 $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,05$	15,28±0,78 $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$

Таблиця 3.5

Вміст  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  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	
	$\text{NO}_2^-$ , мкмоль/кг	$\text{NO}_3^-$ , мкмоль/кг	$\text{NO}_2^-$ , мкмоль/кг	$\text{NO}_3^-$ , 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 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,05$

У нирках тварин з АФС, яким вводили L-аргінін, зростав вміст  $\text{NO}_2^-$  на 24 % та  $\text{NO}_3^-$  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  $\text{NO}_2^-$  на 14 %, а вміст  $\text{NO}_3^-$  достовірно не змінився, порівняно з показниками вагітних тварин з АФС (табл. 3.6).

Таблиця 3.6

Вміст  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  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	
	$\text{NO}_2^-$ , мкмоль/кг	$\text{NO}_3^-$ , мкмоль/кг	$\text{NO}_2^-$ , мкмоль/кг	$\text{NO}_3^-$ , мкмоль/кг
АФС	1,19±0,07 $p < 0,001$	15,89±0,89 $p < 0,001$	1,41±0,04 $p < 0,001$	13,70±0,59 $p < 0,001$
АФС+ L-аргінін	1,47±0,06 $p_1 < 0,05$	19,75±0,71 $p_1 < 0,05$	1,60±0,04 $p_1 < 0,05$	13,00±0,32 $p_1 > 0,05$
АФС + аміногуанідин	0,46±0,03 $p_1 < 0,001$	8,21±0,25 $p_1 < 0,001$	0,78±0,04 $p_1 < 0,001$	7,59±0,40 $p_1 < 0,001$
АФС + L-аргінін + аміногуанідин	0,79±0,04 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,001$	9,05±0,19 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,05$	0,86±0,04 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 > 0,05$	8,70±0,54 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,001$ $p_3 > 0,05$

Аміногуанідин – це нуклеофільна гідразинова сполука, яка є конкурентним інгібітором ізоформи NOS – iNOS [32, 196]. Введення аміногуанідину не викликало достовірних змін показників кількості десквамованих ендотеліоцитів у вагітних та невагітних тварин з АФС (див. рис. 3.2). 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. 3.4).

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. 3.3). У сироватці крові мишей з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності вміст  $\text{NO}_2^-$  достовірно не відрізнявся, а вміст  $\text{NO}_3^-$  знижувався на 56 % та 50 % (див. табл. 3.2). У мозочку невагітних та вагітних тварин з АФС, яким вводили аміногуанідин, знижувався вміст  $\text{NO}_2^-$  (на 34 % та 31 %) та  $\text{NO}_3^-$  (на 24 % та 30 %), порівняно з показниками тварин з АФС (див. табл. 3.3). При введенні аміногуанідину тваринам з АФС

у півкулях великого мозку вміст  $\text{NO}_2^-$  знижувався на 18 %, а вміст  $\text{NO}_3^-$  – на 16 %, порівняно з показниками тварин з АФС (див. табл. 3.4). На 18-й день вагітності у півкулях великого мозку тварин з АФС, яким вводили аміногуанідин, вміст  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  достовірно не змінювався. У печінці вміст  $\text{NO}_2^-$  до вагітності достовірно не змінювався, а на 18-й день вагітності зростав на 21 % (табл. 3.5). Вміст  $\text{NO}_3^-$  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  $\text{NO}$  [197]. У нирках невагітних та вагітних тварин з АФС, яким вводили аміногуанідин, знижувався вміст  $\text{NO}_2^-$  (на 61 % та 44 %) та  $\text{NO}_3^-$  (на 48 % та 45 %), порівняно з показниками тварин з АФС (табл. 3.6).

Як показали результати досліджень, при комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину відбувається нормалізація кількості циркулюючих десквамованих ендотеліоцитів (див. рис. 3.2). 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 у 2,1 раза, порівняно з показниками групи вагітних мишей з АФС (див. рис. 3.2 Б). Отже, на фоні інгібування індукцибельної  $\text{NO}$ -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. 3.3). 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) (див. рис. 3.4), що привело до нормалізації вмісту стабільних метаболітів нітроген оксиду  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  у крові і досліджуваних органах при експериментальному АФС до вагітності та на 18-й день вагітності. У сироватці крові тварин з АФС, яким вводили L-аргінін в комбінації з аміногуанідином, до вагітності та на 18-й день вагітності, вміст  $\text{NO}_2^-$  збільшувався на 25 % та 38 %, а вміст



$\text{NO}_3^-$  знижувався на 35 % та 29 %, порівняно з показниками мишей з АФС у відповідні терміни дослідження (див. табл. 3.2). За комбінованого застосування попередника NO L-аргініну та інгібітора iNOS аміногуанідину в мозочку мишей BALB/c з АФС встановлено зниження вмісту  $\text{NO}_2^-$  на 28 % та  $\text{NO}_3^-$  на 17 %, порівняно з показниками тварин з АФС (див. табл. 3.3). За комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину у мозочку мишей BALB/c з АФС на 18-й день вагітності встановлено зниження вмісту  $\text{NO}_2^-$  на 29 % та  $\text{NO}_3^-$  на 25 %, порівняно із показниками групи вагітних тварин з АФС. У півкулях великого мозку тварин з АФС вміст  $\text{NO}_2^-$  знижувався на 16 %, а вміст  $\text{NO}_3^-$  – на 10 %, порівняно з показниками групи мишей з АФС (див. табл. 3.4). На 18-й день вагітності при введенні L-аргініну в комбінації з аміногуанідином у півкулях великого мозку тварин з АФС вміст  $\text{NO}_2^-$  зростав на 21 %, а вміст  $\text{NO}_3^-$  – 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  $\text{NO}_2^-$  збільшувався на 25 %, а вміст  $\text{NO}_3^-$  достовірно не змінювався, порівняно з показниками мишей з АФС (див. табл. 3.5). У печінці вагітних тварин з АФС, яким вводили L-аргінін в комбінації з аміногуанідином, вміст  $\text{NO}_2^-$  зростав на 186 %, а вміст  $\text{NO}_3^-$  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  $\text{NO}_2^-$  (на 33 % та 39 %) та  $\text{NO}_3^-$  (на 43 % та 36 %), порівняно з показниками тварин з АФС у відповідні терміни дослідження (див. табл. 3.6).

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  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  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  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  при експериментальному АФС до вагітності та на 18-й день вагітності, порівняно з показниками мишей лінії BALB/c з АФС.

Мішенню для антифосфоліпідних антитіл можуть бути і білки, що регулюють коагуляційний каскад (протеїни C, S і тромбомодулін) та експресуються на мембрані клітин ендотелію. Антифосфоліпідні антитіла здатні перехресно реагувати з компонентами ендотелію, включаючи фосфатидилсерин та інші негативно заряджені молекули (гепаринсульфат протеоглікану, хондроїтинсульфатний компонент тромбомодуліну). При цьому порушується функціонування ендотелію кровеносних судин, що супроводжується утворенням тромбів [24, 136, 137, 163].

#### ***4.1. Механізми розвитку тромбозу судин при АФС***

Відомо декілька основних механізмів розвитку тромбозу судин при АФС [9, 21]: пряма взаємодія між аФЛ і протеїнами, що регулюють фібринолітичні і коагуляційні шляхи; активація ендотелійних 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 [198]. аФЛ можуть безпосередньо зв'язуватися з тромбіном, блокуючи його взаємодію з антитромбіном, а також з протеїном C 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 ендотелійними клітинами і моноцитами, індукуючи в ендотелії утворення молекул адгезії. Активація системи комплементу під впливом аФЛ призводить до розвитку тромбозів та виникнення клінічних симптомів [9, 21, 110, 111, 199].

Антитіла проти  $\beta 2$ ГПІ можуть викликати у моноцитах і ендотелійних клітинах активацію тканинного фактора, який відіграє важ-

ливу роль в ініціації зовнішнього коагуляційного каскаду [200]. Відомо, що аФЛ зв'язуються з активованими факторами згортання, включаючи тромбін, активованими факторами IX і X, запобігаючи їх інактивації та знижуючи фібриноліз [2]. 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 [9, 21, 201].

$\beta 2$ ГПІ може взаємодіяти з фХІ згортання крові *in vitro* і блокувати його активацію тромбіном і фХІІа.  $\beta 2$ ГПІ також бере участь у регуляції системи фібринолізу.  $\beta 2$ ГПІ є субстратом для плазміну, який у фізіологічних умовах може розривати поліпептидний ланцюг  $\beta 2$ ГПІ між амінокислотними залишками Lys-317 і Thr-318. Такий укорочений  $\beta 2$ ГПІ 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.  $\beta 2$ ГПІ може безпосередньо взаємодіяти з тканинним активатором плазміногену і в 20 разів підвищувати активацію плазміногену.  $\beta 2$ ГПІ пригнічує протромбіназну активність і АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів. аФЛ зв'язуються з ендотелійними клітинами і тромбоцитами тільки в присутності  $\beta 2$ ГПІ [28, 98].

Нещодавно був запропонований новий механізм розвитку АФС за участю  $\beta 2$ ГПІ, в якому бере участь тромбоцитарний фактор 4 (PF4). PF4 є представником C-X-C-сімейства хемокінів, який синтезується мегакаріоцитами і зберігається в  $\alpha$ -гранулах тромбоцитів. PF4 присутній у кровотоці у вигляді тетрамера і після взаємодії з ним  $\beta 2$ ГПІ димеризується. Утворюються білкові комплекси, що складаються з димера  $\beta 2$ ГПІ 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 [202].

аФЛ знижують продукцію простагліцину ендотелійними клітинами, інгібуючи фосфоліпазу  $A_2$ , протеїн S, сприяючи тромбоутворенню [123, 203]. Антитіла до фосфатидилсерину, взаємодіючи з фосфоліпідами мембран тромбоцитів і ендотелійних клітин судин, викликають їх порушення, розвиток тромбозів та тромбо-

емболій [203]. Пряма дія аФЛ на компоненти системи згортання крові є важливим фактором гіперкоагуляції. 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 ендотелійними клітинами і моноцитами, індукуючи в ендотелії утворення молекул адгезії [9, 21].

#### ***4.2. Зміни в системі гемостазу у період вагітності та при акушерському АФС***

При вагітності на фоні захворювань, що перебігають із порушенням системи гемостазу, ризик тромбоутворення в судинах організму вагітної та фетоплацентарного комплексу зростає [129]. 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 [204].

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 [206].

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 [207]. При наявності високого рівня аФЛ пошкодження судин наростають в результаті додаткового впливу специфічних аФЛ на ендотелій судинної стінки. Наявність аФЛ підтверджується у 40 % жінок зі звичними виднями. аФЛ активують прокоагуляційний стан і спричиняють високий ризик виникнення тромбозів, плацентарної недостатності, внутрішньоматкової затримки росту плода, прееклампсії, завмирання плода на пізніх термінах вагітності [10, 53, 116, 208].

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 пологам. 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 [209].

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 [201, 210]. 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. 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 [211, 212, 213].

Протромбін – глікопротеїн, який синтезується в печінці і бере участь у згортанні крові. Протромбін забезпечує утворення на мембрані пошкоджених клітин комплексу факторів Va, Xa. 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 -  $\beta 2$ 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 [214–216].

Тромбоцитопенія, що супроводжується агрегацією тромбоцитів, є одним із основних механізмів АФС та СЧВ. Після слабкої активації тромбоцитів негативно заряджені фосфоліпіди експонуються на їх поверхні. Фосфоліпідозв'язуючі протеїни, наприклад  $\beta 2$ 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 Fc $\gamma$ RII-рецептором із Fc-частиною антитіла, що призводить до трансдукції сигналу і активації тромбоцитів з реакцією звільнення і гіперагрегації. Пряма взаємодія Fc $\gamma$ 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 A<sub>2</sub>, що веде до запуску арахідонового каскаду з утворенням значних кількостей тромбоксану A<sub>2</sub>. Тромбоксан A<sub>2</sub> обумовлює розвиток інтенсивної незворотної внутрішньосудинної агрегації тромбоцитів, вазоконстрикції і призводить до порушень у мікроциркуляторному руслі [107, 199, 217–221].

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 плацентазії та місцеве запалення [208].

### 4.3. Дослідження стану системи гемостазу при антифосфоліпідному синдромі у невагітних та вагітних мишей

Антифосфоліпідні антитіла, взаємодіючи з фосфоліпідами мембран тромбоцитів і ендотелійних 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 [21, 203, 222].

Визначення кількості тромбоцитів проводили на автоматичному гематологічному аналізаторі ABX Micros 60. У результаті виконаних досліджень [223] встановлено зниження кількості тромбоцитів у групі тварин з АФС на 12 %, порівняно з інтактними (рис. 4.1, А).

У вагітних мишей з АФС встановлено подальше зниження кількості тромбоцитів на 27 %, порівняно з аналогічними показниками групи вагітних тварин без АФС (див. рис. 4.1, Б).

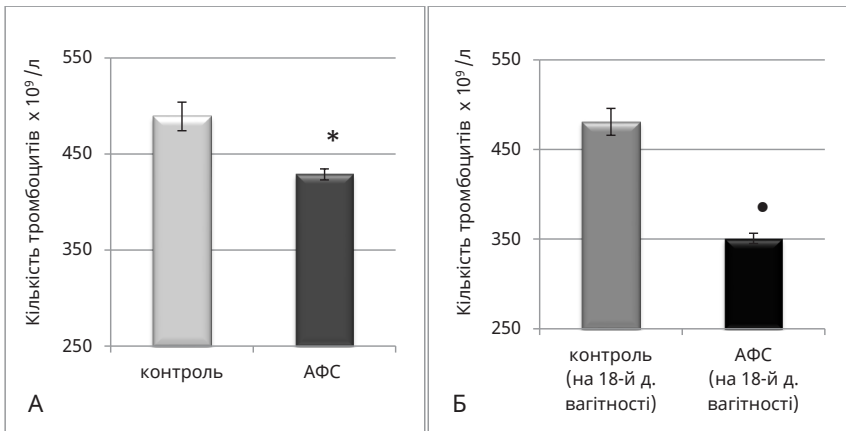


Рис. 4.1. Кількість тромбоцитів у крові контрольних мишей лінії BALB/c та мишей з АФС до вагітності (А) та на 18-й день вагітності (Б) ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

Примітка. Тут і на рисунку 4.2. Умовні позначення: \* – достовірна відмінність від відповідних значень у контрольній групі ( $p < 0,05$ ); • – достовірна відмінність від відповідних значень у контрольній групі (на 18-й день вагітності) ( $p < 0,05$ ).

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

У групі тварин із АФС спостерігається [223] підвищення концентрації фібриногену на 21 %, порівняно із показниками групи інтактних тварин (рис. 4.2, А). У вагітних мишей лінії BALB/c із АФС виявлено зростання концентрації фібриногену на 43 %, порівняно з групою вагітних тварин без АФС (рис. 4.2, Б).

Установлено, що у мишей з АФС відбувається вкорочення активованого часткового тромбoplastинового часу (АЧТЧ) на 19 %, порівняно з показниками групи інтактних тварин (див. рис. 4.2, А), що свідчить про підвищену здатність до тромбоутворення. Встановлено, що у вагітних мишей з АФС відбувається вкорочення АЧТЧ на 46 %, порівняно з групою вагітних тварин без АФС (див. рис. 4.2, Б).

Установлено, що у групі мишей з АФС знижується протромбіновий час на 21 %, порівняно з інтактними тваринами (див. рис. 4.2, А). Спостерігається підвищення протромбінового індексу на 36 %, порівняно з показниками тварин контрольної групи. Вод-

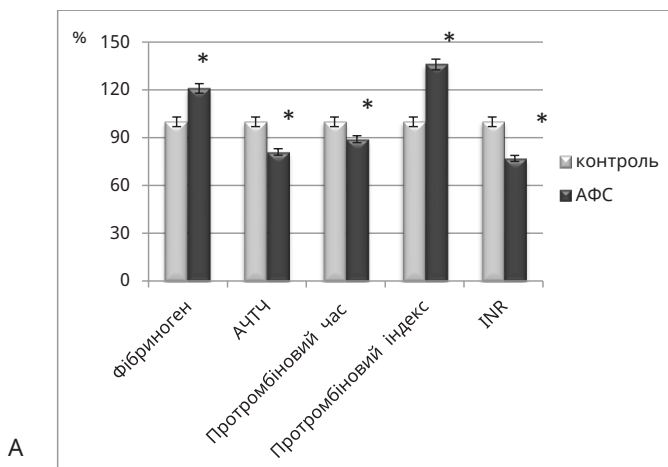


Рис. 4.2. Показники системи згортання крові у мишей лінії BALB/c за умов АФС до вагітності (А) та на 18-й день вагітності (Б) (n=10).



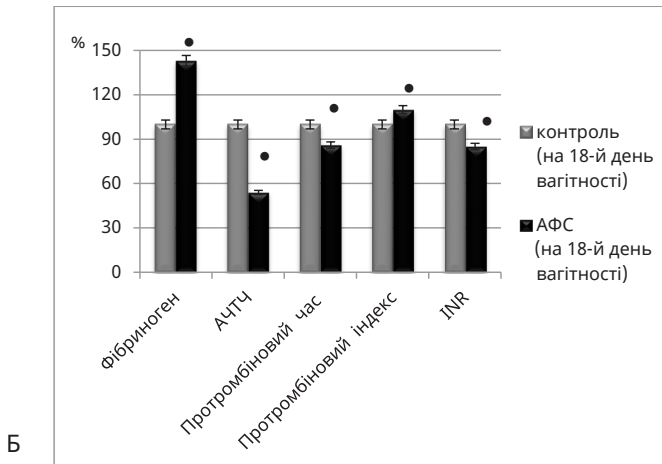


Рис. 4.2 (продовження). Показники системи згортання крові у мишей лінії BALB/c за умов АФС до вагітності (А) та на 18-й день вагітності (Б) (n=10).

ночас 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. 4.2 Б).

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

#### **4.4. 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 [224].

У результаті виконаних досліджень [225] при введенні L-аргініну у тварин з АФС встановлено зростання кількості тромбоцитів на 51 %, порівняно з показниками в групі мишей з АФС (рис. 4.3).

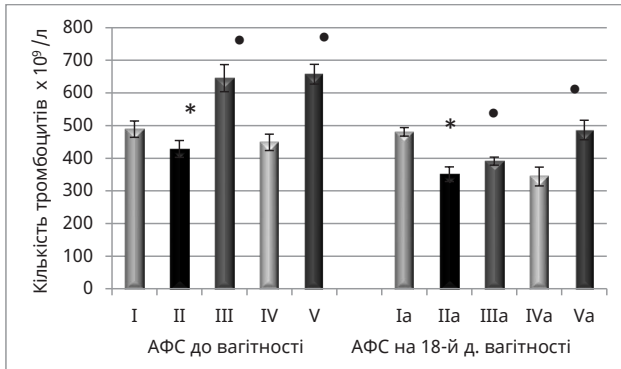


Рис. 4.3. Кількість тромбоцитів у крові мишей лінії BALB/с з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності і при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )

*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). Умовні позначення: \* – 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 вагітним мишам з АФС встановлено зростання кількості тромбоцитів на 11 %, відносно вагітних тварин з АФС без корекції (див. рис. 4.3). На фоні введення L-аргініну у тварин з АФС встановлено зниження концентрації фібриногену на 14 %, відносно групи тварин з АФС (рис. 4.4).

Водночас у тварин з АФС, яким вводили L-аргінін, встановлено вкорочення АЧТЧ на 12 %, що свідчить про підвищену здатність до тромбоутворення (рис. 4.5). Введення L-аргініну мишам з АФС не призводило до достовірних змін показників протромбінового часу, протромбінового індексу та міжнародного нормалізованого відношення (рис. 4.6–4.8).

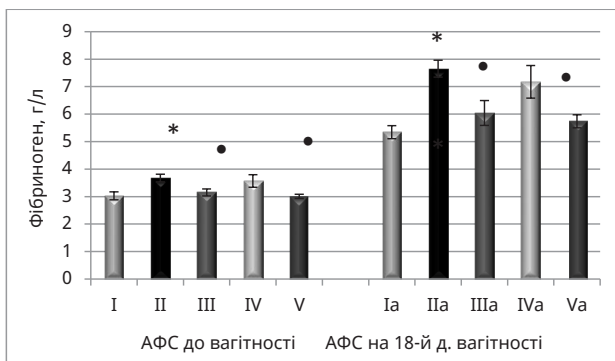


Рис. 4.4. Концентрація фібриногену в крові мишей лінії BALB/c із АФС до вагітності та на 18-й день вагітності і при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину, ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

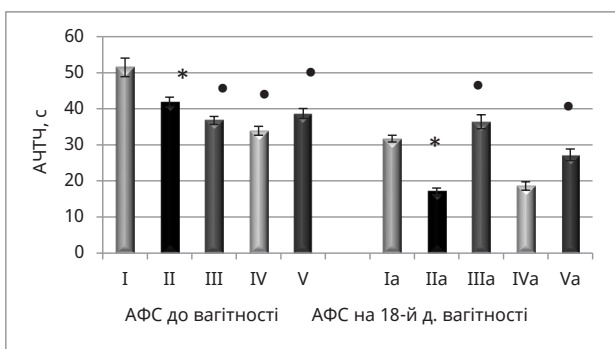


Рис. 4.5. Активований частковий тромбопластиновий час у мишей лінії BALB/c із АФС до вагітності та на 18-й день вагітності і при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

Введення L-аргініну вагітним мишам з АФС супроводжувалося зниженням концентрації фібриногену на 21 % (див. рис. 4.4), подовженням АЧТЧ у 2,1 раза (див. рис. 4.5), зростанням міжнародного нормалізованого відношення на 13 % (рис. 4.8), порівняно з показниками вагітних тварин з АФС.

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. 4.6, 4.7).

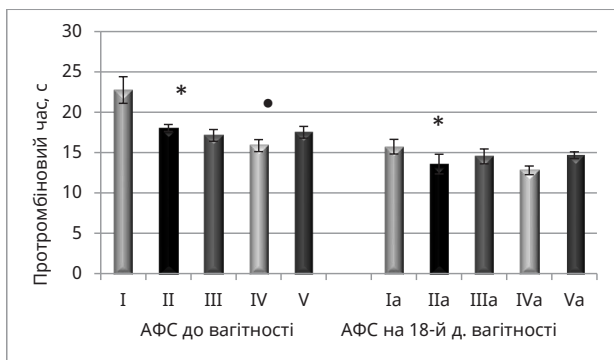


Рис. 4.6. Протромбiновий час у мишей лiнii BALB/c iз АФС до вагітності та на 18-й день вагітності i при застосуванні L-аргiніну й аміногуанiдину ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

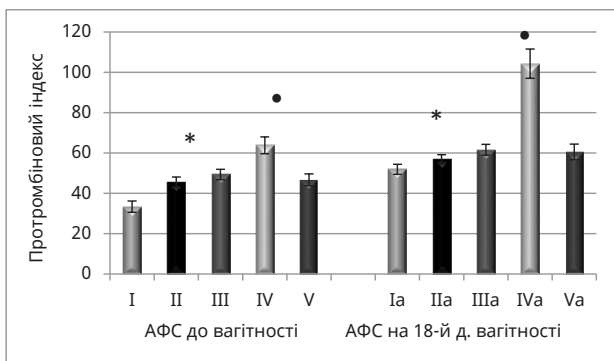


Рис. 4.7. Протромбiновий iндекс у мишей лiнii BALB/c iз АФС до вагітності та на 18-й день вагітності i при застосуванні L-аргiніну й аміногуанiдину ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

У групі тварин із АФС, яким вводили аміногуанiдін, встановлено подальше вкорочення АЧТЧ на 19 % (див. рис. 4.5), зниження протромбiнового часу на 12 % (див. рис. 4.6), зниження міжнародного нормалiзованого вiдношення на 13 % та зростання протромбiнового iндексу на 40 % (див. рис. 4.7) вiдносно мишей з АФС.

Отримані результати вкорочення протромбiнового часу, продовження протромбiнового iндексу та зниження міжнародного нормалiзованого вiдношення свiдчать про гiперкоагуляцію та ризик тромбоеутворення у самок із АФС, яким вводили аміногуанiдін.

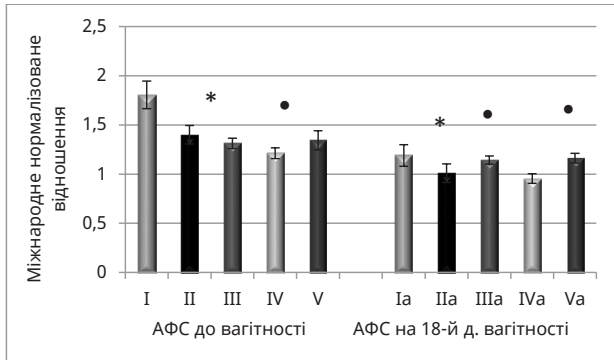


Рис. 4.8. Міжнародне нормалізоване відношення у мишей лінії BALB/c з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності і при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

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. 4.7) 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.

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. 4.3), 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. 4.4). 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. 4.5–4.8). При порівнянні результатів, отриманих у групі тварин з АФС, яким вводили L-аргінин у комбінації з аміногуанідином, із результатами групи тварин із АФС, яким вводили окремо L-аргінин, достовірних

змін досліджуваних показників системи згортання 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. 4.3). 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. 4.4). Установлено, що у вагітних мишей з АФС, яким вводили L-аргінін у комбінації з аміногуанідином, відбувається подовження АЧТЧ на 59 % (див. рис. 4.5) та зростання міжнародного нормалізованого відношення на 15 % (див. рис. 4.8), 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 тромбоемболії. Встановлено позитивний вплив застосування L-аргініну та аміногуанідину при їх комбінованому введенні на показники системи гемостазу в невагітних та вагітних мишей за умов АФС.

## РОЗДІЛ 5 || РОЛЬ ЦИТОКІНІВ У ПАТОГЕНЕЗІ АНТИФОСФОЛІПІДНОГО СИНДРОМУ

При взаємодії антифосфоліпідних антитіл з фосфоліпідами мембран розвивається дисбаланс компонентів цитокинових і кінінових каскадів [30, 226]. Згідно з сучасними уявленнями про механізми розвитку АФС, його клінічні прояви під час вагітності можуть бути реалізованими не лише через надлишкове тромбоутворення [40, 227], а й через порушення співвідношення імуномодулювальних та імуносупресивних ефектів у організмі матері, які впродовж гестаційного періоду здійснюють регуляторну функцію за допомогою різних механізмів, спрямованих на збереження і розвиток вагітності [4].

### ***5.1. Дисрегуляція цитокинового балансу в механізмах розвитку антифосфоліпідного синдрому***

Цитокіни є необхідними трансмітерами міжклітинної взаємодії в нормі та 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 [4, 208, 228].

Основними джерелами цитокинів є CD4+ Т-лімфоцити, які поділяють на Т-хелпери типу 1 (Th1), які зумовлюють формування клітинної імунної відповіді, і типу 2 (Th2), які синтезують IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 і зумовлюють розвиток гуморальної імунної відповіді. При аутоімунних захворюваннях в основному виявляється активація Th1-клітинної відповіді [229]. 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 [208]. Цитокіни зв'язуються зі специфічними рецепторами на цитоплазматичній мембрані клітин-мішеней, активуючи каскад ре-

акцій, що веде до індукції, посилення або пригнічення активності регульованих ними генів [228]. Процеси запалення контролюють прозапальні (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN) та протизапальні (IL-4, IL-10) цитокіни [230].

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- $\alpha$ , IL-6, IL-1, які обумовлюють прояви системної відповіді на запалення при АФС, активують ендотелійні клітини і макрофаги, індукуючи експресію молекул адгезії, регулюють синтез NO ендотелійними клітинами [231, 232].

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 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , рецепторний антагоніст IL-1 (IL-1Ra), рецептори IL-1R [228].

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  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IFN- $\gamma$  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  $\kappa$ B, таких як перетворювач ядерного фактора 1 та активатор транскрипції 1 $\alpha$ . Потім активні фактори транслюкуються в ядро, де вони зв'язуються з промоторною ділянкою гена iNOS та індукують експресію iNOS [149]. 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 $\beta$  індукуює синтез IL-6, S100B,  $\alpha$ 1-антихімотрипсину та активує ензими iNOS, що призводить до підвищеного синтезу NO [228, 233].

IL-1 $\beta$  і TNF- $\alpha$  є потужними регуляторами-індукторами молекул лейкоцитарно-ендотелійної 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 [228]. IL-1, TNF- $\alpha$  та ендотоксини індукують експресію TF у клітинах ендотелію, моноцитах, макрофагах, сприяючи згортанню крові [208, 234]. Інгібіторами продукції IL-1 є IL-4, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$  [228].

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- $\alpha$  [4]. IL-6 діє і як прозапальний цитокін, і як протизапальний міокін. Протизапальний ефект IL-6 реалізується через інгібування синтезу TNF- $\alpha$  і IL-1 $\beta$  та активацію IL-1Ra і IL-10. 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 [228, 235].

TNF- $\alpha$  продукується обома типами Т-хелперів, тому може відігравати як захисну, так і ушкоджувальну роль. TNF- $\alpha$  активує ендотелій, сприяє адгезії лейкоцитів, активує лейкоцити, індукує продукцію інших прозапальних цитокінів: IL-1, IL-6, IFN, GM-CSF, які мають синергічну з TNF- $\alpha$  дію [228, 234, 236]. TNF- $\alpha$  і розчинний TNF- $\alpha$ -рецептор 1 (pTNF  $\alpha$ R1) беруть участь у розвитку аутоімунних захворювань, апоптозу [237, 238].

Активація В2ГПІ, який зв'язують аФЛ, відбувається за посередництвом TNF- $\alpha$ , IL-3, IFN- $\gamma$  [208]. Після активізації ендотелійних клітин регуляція TF може бути додатково посилена синергетичним ефектом TNF- $\alpha$  та фактора Ха, відбувається експресія молекул адгезії (ICAM-1, VCAM-1, селектини E і P) [234]. Прозапальні цитокіни TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2 індукують синтез iNOS [239]. Водночас в експериментальних умовах показано, що TNF- $\alpha$  може проявляти антитромбоцитарну активність [234]. Збільшення концентрації TNF- $\alpha$  пов'язують із невиношуванням вагітності при АФС [241], активацією ендотеліоцитів і ампліфікацією хемокінів, що призводить до субендотеліальної акумуляції лейкоцитів, дисфункції ендотелію, порушення мікроциркуляції [228, 240].

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-клітин-

ну проліферацію. Пошкодження балансу між запальним процесом та протизапальною відповіддю може призводити до імуносупресії [230]. IL-10 пригнічує секрецію IL-4, IL-5 та IFN, факторів росту та хемокінів, а тому діє як ключовий регулятор аутоімунних процесів [226]. Однією з функцій IL-10 є пригнічення синтезу прозапальних цитокінів (IL-1, IL-6, IL-12 і TNF- $\alpha$ ) через STAT3-залежний механізм та посилення експресії антагоніста рецептора IL-1. 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 [226, 241, 242].

АФС є однією із причин перинатальної смертності, пов'язаної з такими патологічними станами як затримка внутрішньоутробного розвитку плода, передчасні пологи, гестоз [117]. При спонтанному розвитку загрози переривання вагітності найчастіше відбувається активація IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8 [4].

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, плацентажію та підготовку до пологів. Відомо, що при фізіологічній вагітності переважає Th2-клітинна відповідь, тоді як підвищення продукції прозапальних цитокінів асоціюється з розвитком невиношування вагітності і гестозів [243].

Антитіла проти  $\beta$ 2ГПІ активують продукцію цитокінів у першому триместрі вагітності [208]. 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 [229, 233].

Домінування прозапальних цитокінів викликає патологію розвитку плаценти та плода і може зумовити його внутрішньоматкову загибель. Проте, вони також можуть запобігати патологічно-

му розростанню трофобласта, а TNF- $\alpha$  здатний захищати фетоплацентарний комплекс [208]. аФЛ-індуковане запалення трофобластів призводить до синтезу прозапальних IL-1 $\beta$  та IL-8 за допомогою активації Toll-подібного рецептора 4 та його адаптерного протеїну MyD88 [244]. Ендотелійні 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 [4].

Роль експресії IL-6 під час вагітності, а також її прогностичне значення для результату вагітності, вивчені недостатньо [229]. У нормі спостерігається мінімальна продукція IL-6, який є маркером інфекції під час вагітності [4].

Визначена провідна роль TNF- $\alpha$  як одного з головних медіаторів запальної відповіді у розвитку акушерських ускладнень при АФС. аФЛ викликають швидке підвищення децидуальних та системних рівнів TNF- $\alpha$ . TNF- $\alpha$  – це посередник, який зв'язує взаємодію комплементу C5a-C5aR та аФЛ з ураженням плода [244]. Відомі різні механізми, через які TNF- $\alpha$  може спричиняти втрату вагітності. TNF- $\alpha$  підсилює синтез простагландинів, що призводить до скорочення матки [4]. Інший механізм – це участь TNF- $\alpha$  у процесах апоптозу. Підвищений рівень TNF- $\alpha$  негативно впливає на імплантацію ембріона і зменшує приплив крові до нього, що призводить до тромбозу в судинах. Висока концентрація TNF- $\alpha$  може бути пов'язана з розвитком таких ускладнень як гестоз та гестаційний цукровий діабет [229].

За даними І. Б. Венцківської [40], вагітні з АФС мали вірогідно менші концентрації протизапальних IL-4 та IL-10, ніж пацієнтки контрольної групи. 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- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , та збільшення концентрації протизапальних цитокінів, таких як IL-10 [229]. 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) [4]. Роль протизапальних цитокінів при вагітності, крім пригнічення клітинної ланки імунної системи, полягає ще й в антагонізмі з прозапальними цитокінами відносно сполучнотканинних компонентів шийки матки [40].

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

## **5.2. Цитокиновий профіль при антифосфоліпідному синдромі у невагітних та вагітних мишей**

Результати досліджень показали [245], що при АФС у мишей BALB/c відбувається зростання концентрації IL-1  $\beta$  у 3,2 раза та IL-6 у 2,3 раза, порівняно із показниками інтактних тварин (табл. 5.1). Секреція IL-1 $\beta$  індукує синтез IL-6, S100B,  $\alpha$ 1-антихімотрипсину та активує ензим iNOS, що призводить до підвищеного синтезу нітроген оксиду [246].

Як свідчать отримані нами результати, вміст TNF- $\alpha$  у сироватці крові мишей BALB/c із АФС зростає в 4,5 раза відносно контролю (див. табл. 5.1). Отримані нами результати щодо підвищення кон-

Таблиця 5.1

Вміст цитокинів 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 $\beta$ , 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- $\alpha$ , 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

Примітка. p – достовірно відмінне від відповідних значень у контрольній групі.

центрації прозапальних цитокінів (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) у сироватці крові при АФС узгоджуються з даними інших авторів [247, 248].

Встановлено зниження концентрації протизапальних цитокінів IL-4 в 1,9 раза та IL-10 у 2,2 раза у сироватці крові мишей BALB/c з АФС, порівняно із показниками контролю (див. табл. 5.1).

Цитокіни відіграють важливу роль у збереженні вагітності, беруть участь в ембріогенезі, процесі закладки та розвитку ряду органів, у тому числі й імунної системи [249].

У мишей BALB/c з АФС на 18-й день вагітності встановлено зростання концентрації прозапальних цитокінів IL-1 $\beta$  у 4,6 раза, IL-6 – у 3,5 раза, TNF- $\alpha$  – у 4,8 раза, порівняно із показниками вагітних тварин без АФС (див. табл. 5.1).

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. 5.1). Отримані результати узгоджуються з даними інших науковців [40].

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) [4, 229].

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

### ***5.3. 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 [30]. Прозапальні Th1 цитокіни, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  і IL-18, синтез який опосередковано  $\beta$ 2ГПІ, компоненти комплементу (C3b, C3b і C5a, C5b-9) і аутоантитіла активують ендотелійні клітини і макрофаги, індукуючи експресію молекул адгезії (VCAM-1, ICAM-1, P-селектин, E-селектин), регулюють синтез NO ендотелійними клітинами [111]. На сьогодні недостатньо відомостей про роль змін активності сис-

теми 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 [245], що за введення попередника NO L-аргініну тваринам з АФС відбувається зниження вмісту IL-1 $\beta$  на 25 % та вмісту IL-6 на 20 %, порівняно з показниками тварин з АФС (табл. 5.2).

При введенні L-аргініну встановлено зниження TNF- $\alpha$  на 13 %, порівняно з показниками групи тварин з АФС (табл. 5.2). Отримані результати 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- $\alpha$  [250]. 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- $\alpha$  на 57 %, порівняно з показниками тварин з АФС (табл. 5.2). Введення аміногуанідину не викликало достовірних змін концентрації IL-1 $\beta$ , 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.

За застосування попередника NO L-аргініну в комбінації з аміногуанідином встановлено достовірне зниження концентрації IL-1 $\beta$  на 30 %, IL-6 на 16 %, TNF- $\alpha$  на 59 %, порівняно з показниками групи тварин з АФС (див. табл. 5.2). 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 $\beta$  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. Установлено зниження концентрації TNF- $\alpha$  на 53 %, порівняно з показниками мишей лінії BALB/c, яким вводили L-аргінін (див. табл. 5.2). Отже, на фоні інгібування індукцибельної NO-синтази аміногуанідином спостерігається збереження позитивного впливу L-аргініну на цитокіновий профіль, змінений при АФС.

Таблиця 5.2

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

Показник	Група тварин			
	АФС	АФС+ L-аргінін	АФС+ аміногуанідин	АФС+ L-аргінін+ аміногуанідин
IL-1 $\beta$ , 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- $\alpha$ , 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 $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,05$

Примітка. Тут і в наступних таблицях розділу,  $p$  – достовірно відмінне від відповідних значень у контрольній групі;  $p_1$  – достовірно відмінне від відповідних значень у групі тварин з АФС;  $p_2$  – 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.

При АФС наявні порушення як у ланці Th1, так і в ланці Th2. При фізіологічній вагітності переважає Th2-клітинна відповідь, тоді як підвищення продукції прозапальних цитокінів асоціюється з розвитком невиношування вагітності та гестозів [243], 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 $\beta$  на 13 %, IL-6 на 41 %, TNF- $\alpha$  на 15 %, порівняно з показ-

никами групи вагітних тварин з АФС (табл. 5.3). Водночас концентрація протизапальних цитокінів IL-4 зростала на 29 %, IL-10 – на 18 %, порівняно з показниками групи вагітних тварин з АФС.

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 $\beta$  на 25 %, IL-6 на 35 %, TNF- $\alpha$  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. 5.3).

Установлено 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 $\beta$  на

Таблиця 5.3

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 $\beta$ , 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- $\alpha$ , 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 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,01$



21 %, IL-6 на 29 %, TNF- $\alpha$  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 $\beta$  на 14 %, TNF- $\alpha$  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 (див. табл. 5.3).

У вагітних тварин з АФС комбіноване введення попередника нітроген оксиду та блокатора iNOS також супроводжувалось збереженням позитивного впливу L-аргінину 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-аргінину у вагітних та невагітних мишей при АФС відбувалось зниження концентрації прозапальних цитокінів та зростання концентрації протизапальних цитокінів. Введення аміногуанідину супроводжувалось зниженням лише концентрації TNF- $\alpha$  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-аргінину та інгібітора індукцибельної NOS аміногуанідину.

## РОЗДІЛ 6 || АПОПТОЗ У МЕХАНІЗМАХ РОЗВИТКУ АНТИФОСФОЛІПІДНОГО СИНДРОМУ

Апоптоз – це запрограмований та генетично врегульований процес загибелі клітин [251]. 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 [252, 253].

### ***6.1. 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 мітохондрійний 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 [251, 254].

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. 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) викону-

ється 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 апоптосо-мою, 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 [254–256].

Активність каспаз піддається гальмуванню родиною білків IAP. Ідентифіковано вісім чітких IAP 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 фосfolіпідів 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 мітохондрійній мембрані. аКЛ IgG, отриманий з сироватки пацієнтів з АФС, зв'язується з КЛ на поверхні апоптотичних клітин. Вивільнення TNF- $\alpha$  може посилити цей процес, викликаючи подальший апоптоз [252].

Показано, що мішенню багатьох аФЛ є комплекс між аніонним ФЛ та  $\beta$ 2ГПІ [257]. Хоча аніонні ФЛ на зовнішній поверхні клітинних мембран зазвичай відсутні, при апоптозі вони перерозподіляються від внутрішнього до зовнішнього шару біомембрани.  $\beta$ 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 [258].

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 фосfolіпиду – КЛ, який переважно знаходиться у внутрішній мітохондрійній мембрані [259]. Після стимуляції рецепторів смерті КЛ концентрується у мітохондрійних «raft-like» мікродоменах у місцях контактів між внутрішньою та зовнішньою мітохондрійними 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 органи з перетворенням на немітохондрійні ліпіди [252, 259, 260].

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 мітохондрійні 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 мітохондрійного шляху, експресія якого значною мірою контролюється посттрансляційними модифікаціями. Bcl-2 зазнає S-нітрозилювання ендogenous NO у відповідь на численні апоптотичні медіатори [191, 261, 262].

І мітохондрійно 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-нітрузування [263].

Вивільнення цитохрому С із мітохондрій є важливим механізмом активації каспази-3 та ініціювання загибелі клітин у відповідь на «внутрішні» проапоптоптичні подразники. У свою чергу, каспази та пов'язані з мітогеном протеїн-кінази можуть модулювати вивільнення цитохрому С завдяки їх впливу на білки родини Bcl-2. Клітинне середовище відіграє важливу роль у визначенні ролі NO та здатності S-нітрузування регулювати мітохондрійно-залежний апоптоз [264].

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) [256]. XIAP – це найширше експресований інгібітор апоптозу, який регулює виживання клітин за рахунок зв'язування з каспазами. Дослідники продемонстрували, що S-нітрозилування XIAP погіршує його здатність інгібувати активність каспази-3. Антиапоптотична дія NO включає як рецептор смерті, так і мітохондрійні шляхи апоптозу. Активність каспази-3 інгібується її посттрансляційним S-нітрозилуванням [263].

Активацію каспаз, індукцію iNOS та рівень апоптозу досліджували в клітинній культурі, обробленій TNF- $\alpha$ . Інкубація з TNF- $\alpha$  призвела до активації каспазного каскаду і супроводжувалася апоптозом. Одночасно, TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  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 [265].

Деякі вчені [30] постулюють більш високі рівні у плазмі залежного від TNF-фактора ліганду, що індукує апоптоз (sTRAIL), IL-10 та TNF- $\alpha$  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 [266, 267]. 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 протеїнкіназ, 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 [268].

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: як імуногени для індукції аФЛ та як мішені для аФЛ, що призводить до хронізації запалення та розвитку аутоімунних захворювань [269].

## ***6.2. Показники процесу апоптозу, продукції активних форм Оксигену у лейкоцитах крові та вміст каспази-3 у печінці невагітних та вагітних мишей при антифосфоліпідному синдромі***

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 [270]. Зразки аналізували за допомогою протокового цитофлуориметра COULTER EPICS XL (Beckman Coulter, США) з аргоновим лазе-

ром. 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.

У результаті проведених нами досліджень встановлено [271], що при АФС знижується життєздатність лейкоцитів крові вагітних та невагітних мишей лінії BALB/c, порівняно з контролем (рис. 6.1). Ймовірно, що їх смерть частково зумовлена активацією апоптозу, оскільки відомо, що лейкоцити гинуть унаслідок індукції апоптозу [272].

Отримані нами результати свідчать про перерозподіл між двома основними типами лейкоцитів у мишей за умов АФС (рис. 6.2). 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 у організмі тварин. Зміни в перерозподілі лейкоцитів можуть бути обумовлені захворюваннями системи крові та розвитком запальної реакції при різних патологічних станах [272]. Отримані нами результати узгоджуються з даними інших авторів [273] 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.

Ключова роль у розвитку апоптозу належить каспазі-3 [192]. Визначення вмісту каспази-3 та  $\beta$ -актину у тканині печінки виконували методом Вестерн-блот аналізу [274, 275]. Вміст загального протеїну лізатів визначали за методом Bradford [276]. Електрофоретичне розділення протеїнів лізатів у поліакриламідному гелі (ПААГ) (12,5 %) проводили в буферній системі Леммлі (100 мкг протеїну на лунку) при силі струму 20 мА – концентруючий гель, 30 мА – розділяючий гель за методом Laemmli [277]. 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.

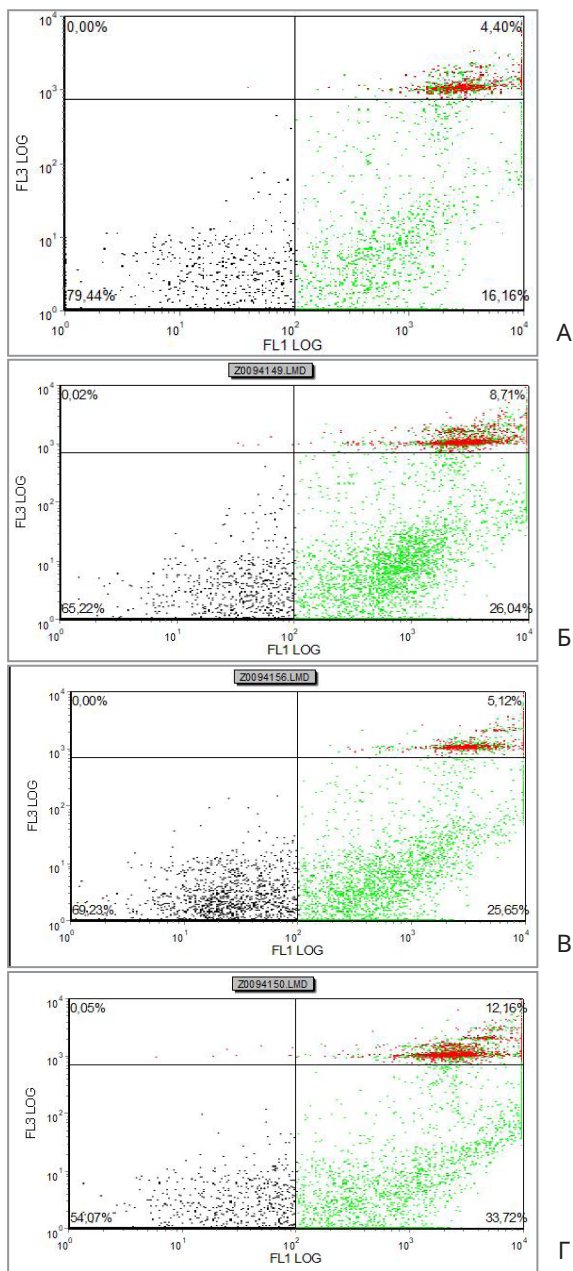


Рис. 6.1. Точкові діаграми розподілу апоптотичних і життєздатних клітин контрольних мишей лінії BALB/c (А, В) та мишей з АФС (Б, Г) до вагітності та при вагітності в режимі DotPlot (інтенсивність флуоресценції за каналом FL1 (515–535 нм) і FL3 (620–630 нм)).

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



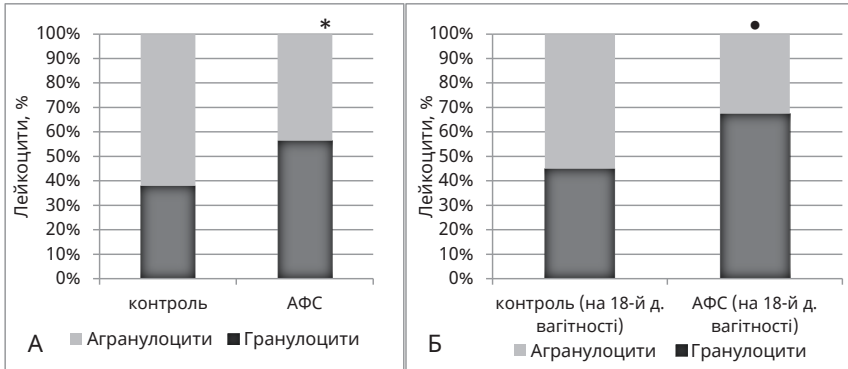


Рис. 6.2. Перерозподіл лейкоцитів крові у мишей лінії BALB/c за умов антифосфоліпідного синдрому до вагітності (А) та на 18-й день вагітності (Б).

Примітка. Умовні позначення: \* – достовірна відмінність від відповідних значень у контрольній групі ( $p < 0,05$ ); • – достовірна відмінність від відповідних значень у контрольній групі (на 18-й день вагітності) ( $p < 0,05$ ).

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- $\beta$ -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.

У результаті проведених досліджень встановлено [278] зростання вмісту активної форми каспази-3 (p17) на 48 % в печінці мишей лінії BALB/c за умов АФС (рис. 6.3). 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. 6.3) [279].

Підвищення вмісту каспази-3, ймовірно, зумовлено активацією мітохондрійного шляху апоптозу, який пов'язаний з надходженням проапоптогенних сигналів, до яких належать АФО [280].

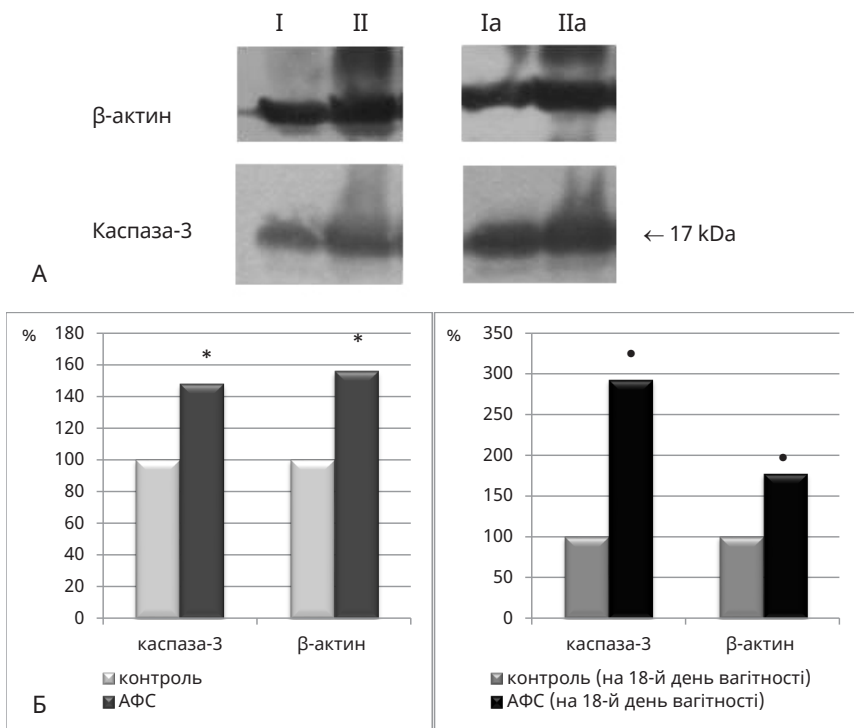


Рис. 6.3. Вестерн-блот аналіз вмісту активної форми каспази-3 та  $\beta$ -актину в печінці контрольних мишей лінії BALB/c та експериментальних мишей з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності: блотограма (А) та результати денситометрії (Б). Дані наведено у відсотках від контролю (n=10).

Примітка. I – Контроль; II – АФС; Ia – контроль (вагітність); IIa – АФС (на 18-й день вагітності). Умовні позначення: \* – 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).

Білки цитоскелета клітин та зв'язані з ними регуляторні протеїни необхідні для підтримання нормальної структури клітин та їх росту.  $\beta$ -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 [281, 282].

У результаті проведених нами досліджень встановлено, що у печінці мишей лінії BALB/c за умов АФС відбувається зростання

вмісту  $\beta$ -актину в 1,6 раза, порівняно із показниками групи контрольних тварин (див. рис. 6.3). У печінці вагітних мишей BALB/c за умов АФС вміст  $\beta$ -актину був у 1,8 раза вищим, ніж у печінці вагітних мишей без АФС.

$\beta$ -актин регулює апоптоз, стабілізуючи рецептори TNF- $\alpha$  [283]. У мітохондріях  $\beta$ -актин регулює транскрипцію mtDNA і підтримання їх мембранного потенціалу [284]. Ремодельовання  $\beta$ -актину необхідне для процесів міграції, інфільтрації лімфоцитів та апоптозу [283].

Одним із важливих компонентів патогенезу АФС, що сприяє дисфункції імункомпетентних клітин і синтезу аутоантитіл, є утворення АФО [285, 286, 287]. 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 [272]. 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 [288]. 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.

Під час оцінки ступеня утворення АФО в лейкоцитах мишей BALB/c із АФС встановлено [271], що базальний рівень продукування АФО у гранулоцитах знижується на 27 %, а в агранулоцитах – на 19 %, порівняно із контрольною групою (рис. 6.4, А, 6.5, 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. 6.4, Б, 6.5, Б).

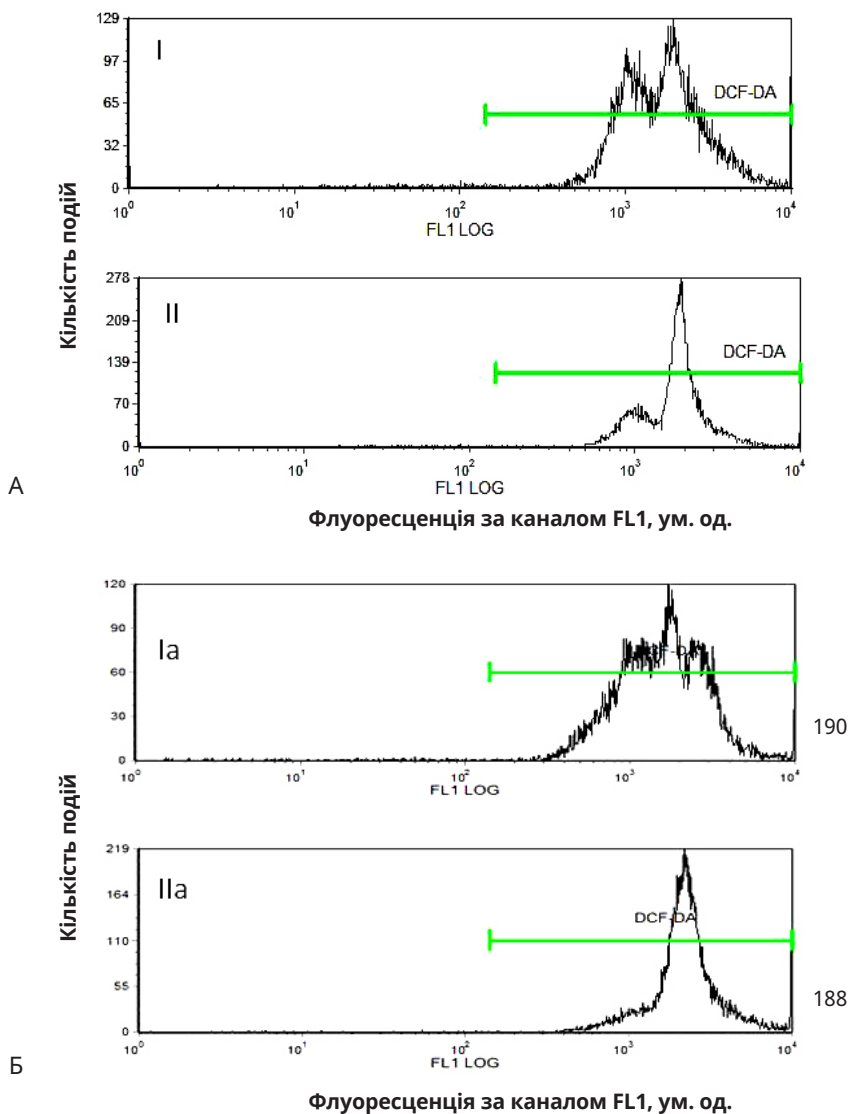


Рис. 6.4. Типові гістограми флуоресценції DCF-DA в зразках лейкоцитів крові контрольних мишей лінії BALB/c і експериментальних мишей з АФС до вагітності (А) та на 18-й день вагітності (Б) за каналом log FL1.

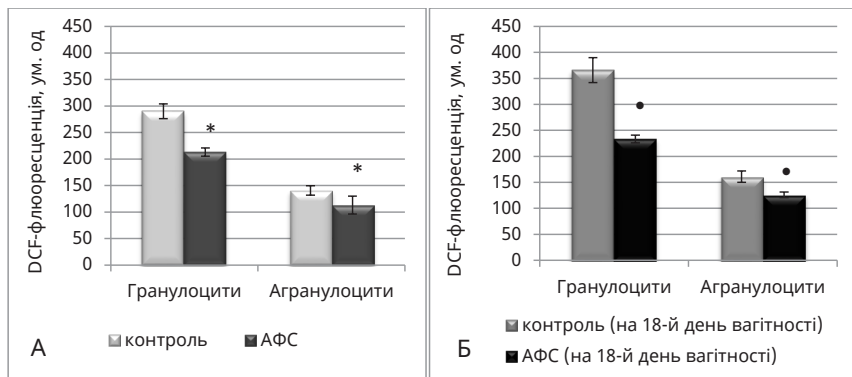


Рис. 6.5. Рівень АФО у лейкоцитах крові контрольних мишей лінії BALB/c та мишей з АФС до вагітності (А) та на 18-й день вагітності (Б) ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

Примітка. Умовні позначення: \* – достовірна відмінність від відповідних значень у контрольній групі ( $p < 0,05$ ); • – достовірна відмінність від відповідних значень у контрольній групі (на 18-й день вагітності) ( $p < 0,05$ ).

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  $\beta$ -актину у печінці вагітних та невагітних тварин.

### **6.3. 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 [252, 253, 259, 269]. NO індукує апоптоз за допомогою модуляції численних рецепторів сигнальних шляхів, включаючи рецептор смерті і мітохондрійні шляхи [261]. 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) [289].

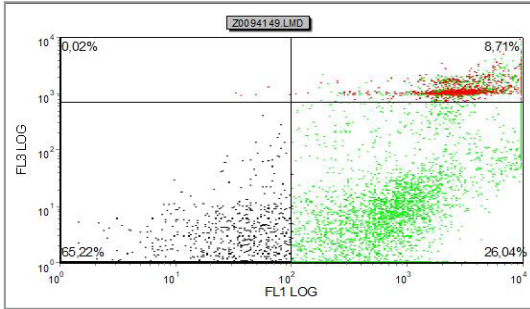
У результаті проведених досліджень встановлено [271], що при застосуванні попередника NO L-аргініну в лейкоцитах крові мишей лінії BALB/c з АФС знижувався показник AV-GFP+, який відповідає за ранній апоптоз, на 46 %, та вміст PI+-клітин, які характеризують інтенсивність некротичних процесів, на 41 %, порівняно з показниками групи тварин з АФС (рис. 6.6).

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. 6.7).

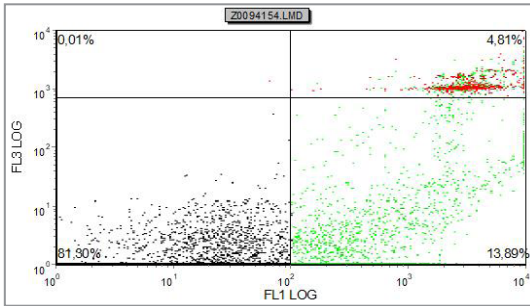
Антиапоптотична дія NO також включає як рецептор смерті, так і мітохондрійні шляхи апоптозу [263]. Медіатори запалення відіграють роль в індукції ендотеліної дисфункції при АФС та активації лейкоцитів [273].

Отримані нами результати [271] 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. 6.8). 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.

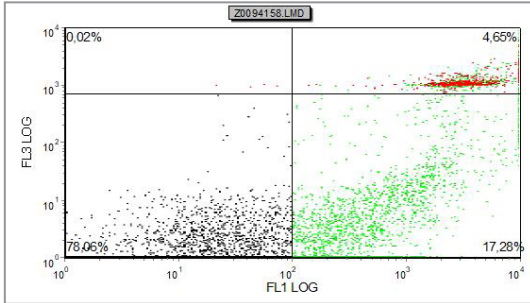
При введенні аміногуанідину не виявлено достовірних змін кількості гранулоцитів у крові мишей з АФС, а кількість агранулоцитів знижувалася на 14 % ( $p < 0,05$ ), порівняно із показниками групи тварин з АФС. Введення аміногуанідину вагітним тваринам з АФС не впливало на кількість гранулоцитів та агранулоцитів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



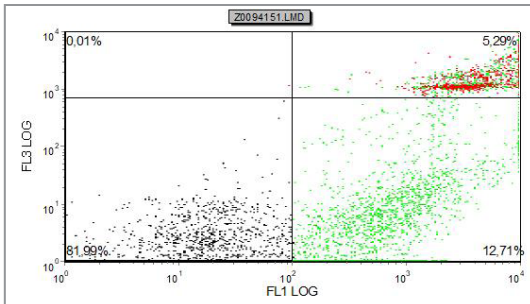
A



Б



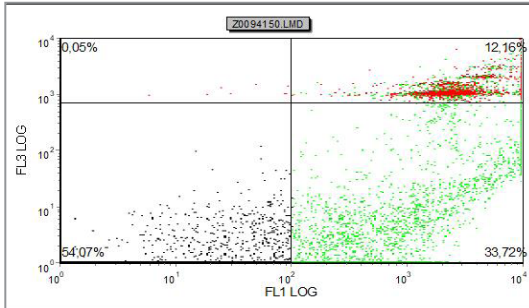
В



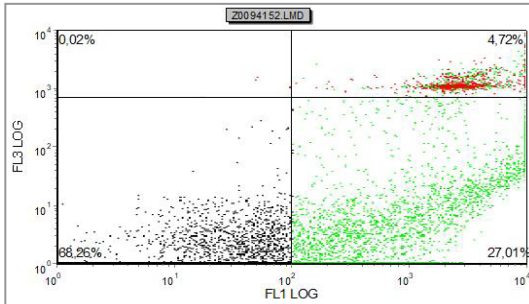
Г

Рис. 6.6. 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 nm) і FL3 (620–630 nm)).

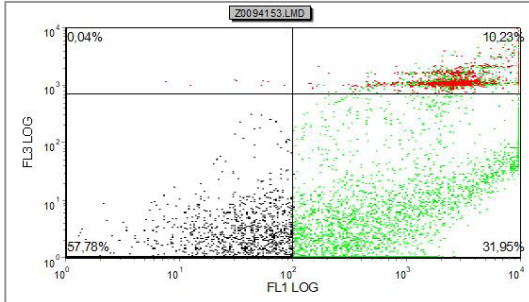
Примітка. Тут і на рисунку 6.7. Чорним кольором позначено живі клітини, червоним кольором – клітини PI-позитивні і анексин V-GFP-позитивні (некротичні), а зеленим – тільки анексин V-GFP позитивні (апоптотичні). Позначення груп: А – Антифосфоліпідний синдром (АФС); Б – АФС + L-аргінін; В – АФС + аміногуанідин; Г – АФС + L-аргінін + аміногуанідин.



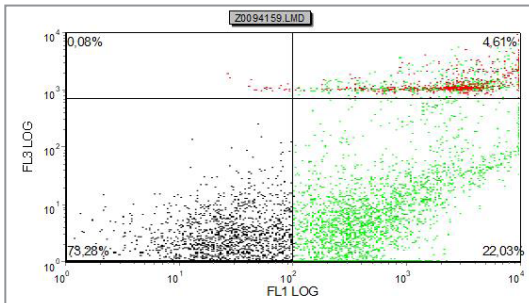
А



Б



В



Г

Рис. 6.7. 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)).



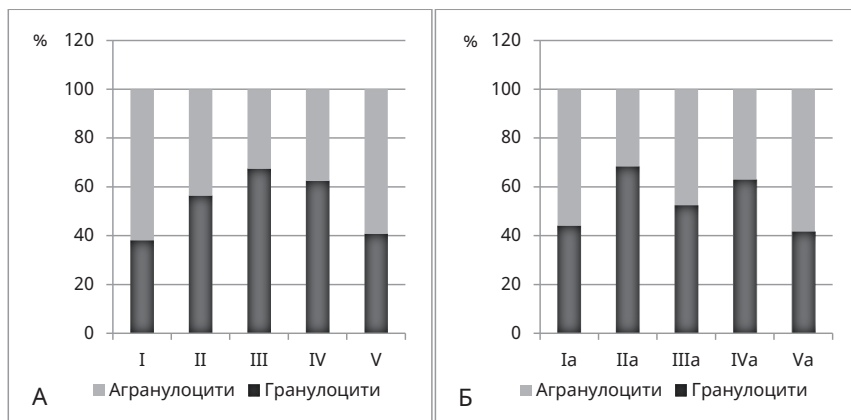


Рис. 6.8. Перерозподіл лейкоцитів крові у мишей лінії BALB/c за умов АФС до вагітності (А) та на 18-й день вагітності (Б) і при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину.

Примітка. 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).

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 (див. рис. 6.8). 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 [272].

Одним із важливих компонентів патогенезу АФС, що сприяє дисфункції імункомпетентних клітин і синтезу аутоантитіл, є оксидативний стрес, розвиток якого безпосередньо пов'язаний з активацією програмованої клітинної загибелі – апоптозу [251]. Відомо, що у механізмах розвитку апоптозу клітин важливу роль відіграють мітохондрії, які продукують АФО, інтегрують внутрішньоклі-

тинні сигнальні шляхи [280]. Порушення 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 пероксинітриду [26].

Під час оцінки ступеня утворення АФО в лейкоцитах мишей лінії BALB/с з АФС, яким вводили L-аргінін [271], встановлено зростання вмісту АФО у гранулоцитах на 16 % та в агранулоцитах на 34 %, порівняно з показниками групи мишей з АФС (рис. 6.9).

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. 6.9).

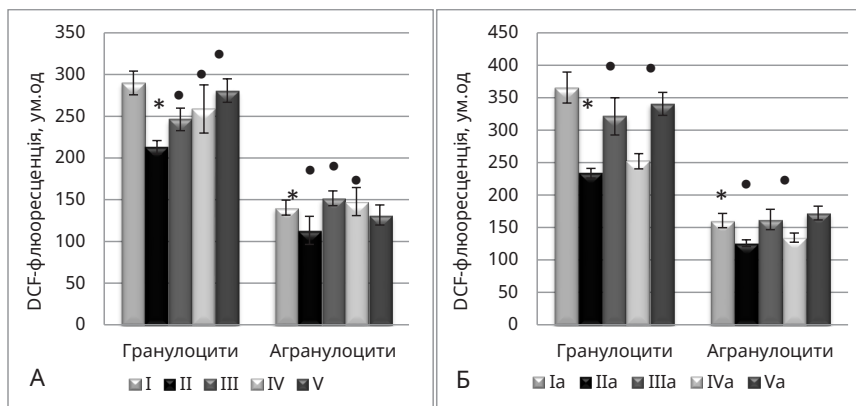


Рис. 6.9. Рівень АФО у лейкоцитах крові мишей лінії BALB/с за умов АФС до вагітності (А) та на 18-й день вагітності (Б) та при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

*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). Умовні позначення: \* – 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 аміногуанідину вміст АФО збільшувався в гранулоцитах на 21 % та агранулоцитах на 31 %, порівняно із показниками тварин з АФС (див. рис. 6.9). У вагітних мишей з АФС не вста-

новлено 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 [145], що підтверджено в умовах *in vivo* та *in vitro* [173]. 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 анти-апоптотичних Bcl-2, транслокацією цитохрому c, активацією каспаза-3-подібних протеаз [289].

Під впливом попередника NO L-аргініну у тканині печінки мишей з АФС встановлено зниження вмісту каспази-3 на 16 % та  $\beta$ -актину на 20 %, порівняно з показниками групи тварин з АФС (рис. 6.10, 6.11, А, 6.12, А) [278]. У групі вагітних мишей з АФС введення L-аргініну супроводжувалося зниженням вмісту каспази-3 на 44 % та  $\beta$ -актину на 10 % у тканині печінки, порівняно з показниками тварин з АФС на 18-й день вагітності (рис. 6.10, 6.11, Б, 6.12, Б) [279].

Ймовірно, що зниження вмісту каспази-3 у печінці тварин з АФС опосередковується цГМФ-залежною кіназою. Інші анти-апоптотичні механізми дії NO пов'язані з індукцією синтезу білків теплового шоку, які пригнічують активність каспаз і стабілізують мембрани мітохондрій [152]. NO може інгібувати мітохондрійний шлях апоптозу через блокування вивільнення проапоптотичних білків: цитохрому c, AIF, Omi/HtrA2, Diablo/Smac [289].

Як показали результати досліджень, введення мишам лінії BALB/c з АФС інгібітора iNOS аміногуанідину не викликало достовірних змін вмісту каспази-3, а вміст  $\beta$ -актину знижувався на 24 % у тканині печінки, порівняно із показниками тварин з АФС (див. рис. 6.11, А, 6.12, А). Разом з тим, встановлено, що введення аміногуанідину вагітним мишам з АФС супроводжувалося зниженням вмісту каспази-3 на 63 % та не впливало на вміст  $\beta$ -актину,

порівняно з показниками мишей з АФС на 18-й день вагітності (див. рис. 6.11, Б, 6.12, Б). За даними Dingman A. et al. [290], інгібування iNOS аміногуанідином пригнічує експресію каспази-3, що підтверджується результатами, отриманими у нашому дослідженні.

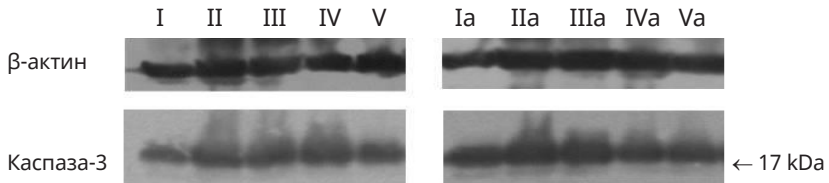


Рис. 6.10. Вестерн-блот аналіз вмісту активної форми каспази-3 та  $\beta$ -актину в печінці мишей лінії BALB/c за умов АФС до вагітності та на 18-й день вагітності і при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину.

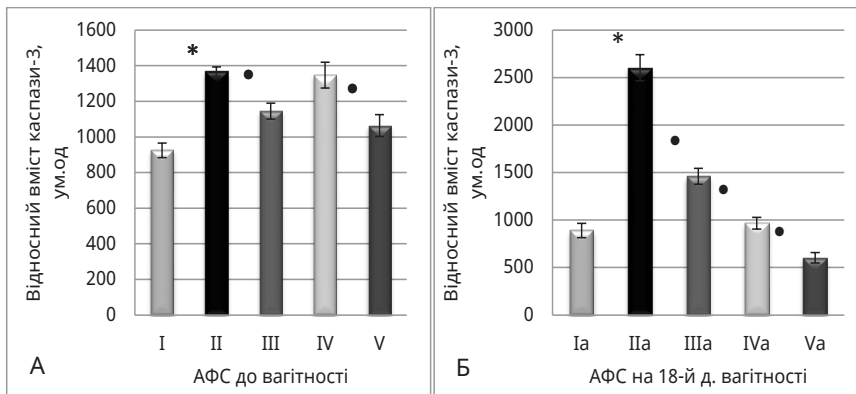


Рис. 6.11. Результати Вестерн-блот аналізу вмісту активної форми каспази-3 в печінці мишей лінії BALB/c за умов АФС до вагітності (А) та на 18-й день вагітності (Б) і при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

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  $\beta$ -актину на 14 %, порівняно з показниками групи тварин з АФС (див. рис. 6.11, А, 6.12, А) [278]. За комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину в печінці мишей лінії BALB/c з АФС на 18-й день вагітності встановлено зниження вмісту каспази-3 на 77 % та  $\beta$ -актину на

29 %, порівняно із показниками групи вагітних мишей з АФС (див. рис. 6.11, Б, 6.12, Б) [279].

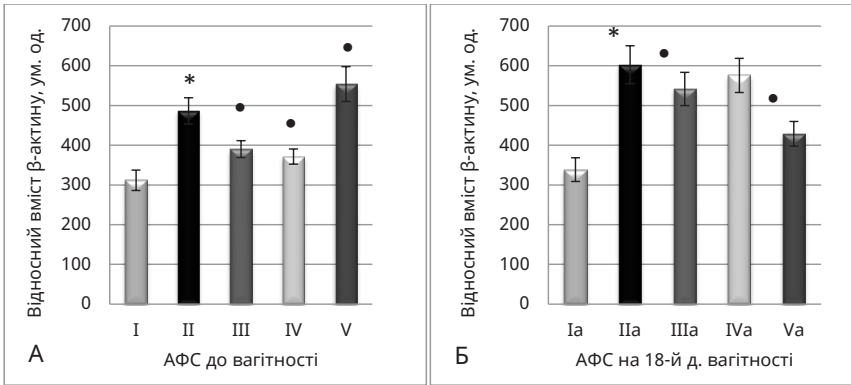


Рис. 6.12. Результати Вестерн-блот аналізу вмісту β-актину в печінці мишей лінії BALB/c за умов АФС до вагітності (А) та на 18-й день вагітності (Б) і при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

Активність каспази-3 інгібується її посттрансляційним S-нітрозюванням [263, 291].

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 ме-

ханізмах 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 [152].

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 індукцибельної 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.

## РОЗДІЛ 7 || ПОЛІОРГАННІ УРАЖЕННЯ ПРИ АНТИФОСФОЛІПІДНОМУ СИНДРОМІ

Для КАФС найхарактерніші ниркові, легеневі, церебральні та гастроінтестинальні тромбози. У незначній кількості пацієнтів з КАФС розвиваються тромбози великих судин (вен нижніх кінцівок, коронарних і церебральних артерій), тобто прояви, характерні для класичного АФС. При АФС порушуються функції ЦНС, нирок, печінки, ендокринних залоз, серцево-судинної системи, шлунково-кишкового тракту [6, 292].

### ***7.1. Механізми виникнення поліорганної недостатності при катастрофічному антифосфоліпідному синдромі***

Поліорганні ураження найяскравіше проявляються при КАФС, який характеризується швидким розвитком та супроводжується поліорганною недостатністю на фоні високого титру антитіл до фосфоліпідів [19].

Активація ендотелійних клітини, ймовірно, сприяє утворенню підготовчого сигналу для КАФС – комплексу імунних стимулів, що включає цитокіни (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN), компоненти комплементу (C3b, C3b і C5a, C5b-9) і аутоантитіла [111, 293, 294]. аФЛ мають прокоагулянтну і прозапальну активність, реалізуючи свій вплив на гуморальному і клітинному рівнях. Антитіла до  $\beta$ 2ГПІ забезпечують транслокацію фактора транскрипції NF- $\kappa$ B в ядро ендотелійної клітини, що призводить до активації експресії прозапальних цитокінів (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8) і прокоагулянтних факторів (TF, інгібітора активатора плазміногену PAI-1) [294].

Отже, КАФС є тромботичним мікроангіопатичним станом, що характеризується дифузною тромботичною мікроваскулопатією. Подібні порушення можуть виникати і при таких захворюваннях як 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 ендотелієвих 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 [295, 296].

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  $\beta$ 2ГПІ). 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 [297, 298].

Неврологічна дисфункція може бути пов'язана з безліччю імуноопосередкованих судинних, запальних та прямих нейронних ефектів. аФЛ можуть активувати ендотелієві клітини, тромбоцити та каскади згортання крові. Зокрема, аФЛ індують прозапальні та прокоагулянтні процеси в ендотелієвих клітинах мікроциркуляторного русла мозку [299, 300]. У багатьох хворих з АФС спостерігаються неврологічні порушення, зумовлені пошкодженням головного мозку [18, 19, 301, 292]. 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 [302]. Зв'язування аФЛ з  $\beta$ 2ГПІ супроводжується пригніченням цереброваскулярного атерогенезу. В експериментальних моделях це призводить до пошкодження мембран ней-



ронів та астроцитів і знижує життєздатність клітин. аФЛ також деполаризують синаптичні екстракти мозку, чинять нейротоксичний вплив на клітини через перенапруження рецепторів глутамату або шляхом прямої реакції з ліпідами головного мозку [300].

Неврологічні прояви АФС найчастіше представлені цереброваскулярними порушеннями – рецидивними ішемічними атаками та ішемічними інсультами [303]. 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 пребігають за типом прогресуючого недоумства: погіршуються пам'ять і когнітивні здібності, порушуються емоційний контроль і соціальна поведінка [304, 305].

Ряд неврологічних порушень при АФС не пов'язані з ішемією, а є наслідком первинного імуноопосередованого пошкодження мозку і периферійної нервової системи [306, 307]. З цим механізмом пов'язане виникнення епілептичних нападів, головного болю, хореї, синдрому, що імітує розсіяний склероз, невropатій та деяких інших розладів [308, 309].

Епілептичні напади є другим за частотою неврологічним проявом АФС. 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 [220, 308, 310].

Неврологічні прояви АФС, що імітують розсіяний склероз, нерідко помилково розцінюють як розсіяний склероз. При АФС за умов неврологічних проявів, які імітують розсіяний склероз, часто виробляються антитіла до нейтральних фосfolіпідів – фосфатидилетаноламіну, тоді як у хворих із АФС з порушеннями мозкового кровообігу вони виявляються рідше, що, ймовірно, вказує на їх роль у патогенезі пошкодження білої речовини головного мозку [311, 312].

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 [16, 313–315].

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 [16, 295–298, 316–320]. Ураження печінки при АФС супроводжується, в основному, непрохідністю печінкових вен або нижньої порожнистої вени, вузловою регенераторною гіперплазією, яка асоціюється з наявністю аФЛ. При взаємодії аФЛ із фосфоліпідами мембран гепатоцитів реалізуються процеси апоптозу та некрозу, дисбаланс компонентів коагуляційно-фібринолітичних цитокінових і кінінових каскадів [30, 314, 321].

Нирки є одним із основних органів-мішеней при всіх клінічних формах АФС. При первинному і вторинному АФС зростає кількість хворих із ознаками пошкодження мікроциркуляторного русла нирок. Ураження нирок є одним із найчастіших проявів КАФС [322, 323, 324–326].

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 [313, 327].

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 [183]. 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 [328].

Залежно від локалізації тромбозів у судинному руслі нирок, тривалості та швидкості розвитку процесу тромбоутворення, клі-

нічні 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 рено-васкулярних тромбозів ниркових артерій, внутрішньопаренхіматозних артерій, клубочкових капілярів або ниркових вен із розвитком так званої тромботичної мікроангіопатії внутрішньо-ниркових судин. Це призводить до розвитку ішемії нирок і прогресуючої ниркової недостатності внаслідок наростання нефросклерозу [327, 329–332].

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 [324, 326]. Наявність аФЛ є важливим фактором ризику гострої дисфункції ниркового трансплантата [333, 334].

При АФС спостерігається розвиток первинної патології коронарних артерій, гострого коронарного синдрому й інфаркту міокарда у пацієнтів віком до 45 років. Описано випадки внутрішньошлуночкового тромбозу при утворенні аФЛ і тромбоцитопенії. При АФС важливо диференціювати ураження серця від інфекційного ендокардиту та кардіоміопатії [226]. АФС також може викликати пошкодження міокарда, дисфункцію шлуночків [37].

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 [37]. 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» [313].

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 [313, 335].

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 пологамі. 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 зростан-

ням частоти АФС та відсутністю єдиного погляду на роль системи нітроген оксиду в його розвитку.

## ***7.2. Механізми ураження центральної нервової системи при антифосфоліпідному синдромі***

У багатьох хворих із АФС спостерігаються неврологічні порушення, зумовлені пошкодженням головного мозку [18, 19, 292, 301]. Нейрозапалення – це складний багатофакторний 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 [290]. Порушення балансу між концентрацією АФО та компонентів АОС, рівноваги в системі прооксиданти/антиоксиданти призводить до оксидативного стресу, пошкодження структури ДНК, протеїнів та ліпідів [26, 134].

### *7.2.1. Роль оксидативного стресу в механізмах ураження мозочка, півкуль великого мозку невагітних та вагітних мишей при антифосфоліпідному синдромі*

Відомо, що оксидативний стрес відіграє важливу роль у патобіохімічних механізмах ураження центральної нервової системи за умов АФС [336].

Рівень продуктів вільнорадикального окиснення ліпідів визначали за вмістом гідропероксидів ліпідів (ГПЛ) за методом В. Б. Гаврилов і співавт. [337], який ґрунтується на здатності екстрагованих гептан-ізопропіловою сумішшю ГПЛ інтенсивно поглинати світло при довжині хвилі  $\lambda=232$  нм та ТБК-активних продуктів (ТБК-АП) за методом Л.И. Андреевої і співавт. [338] (визначали в реакції з 2-тіобарбітуровою кислотою).

В результаті проведених експериментів встановлено [339, 340], 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. 7.1).

Таблиця 7.1

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 ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )

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

Примітка. p – достовірно відмінне від відповідних значень у контрольній групі.

Первинні продукти пероксидного окиснення ліпідів нестійкі і швидко розкладаються з утворенням вторинних продуктів: альдегідів, кетонів, спиртів [341, 342]. Відповідно, спостерігається збільшення вмісту ТБК-АП – на 56 % у мозочку тварин з АФС відносно контролю (табл. 7.1).

Відомо, що інтенсифікація вільнорадикального окиснення поєднується з дискоординацією в системі прооксиданти-антиоксиданти [343]. Порушення балансу між концентрацією АФО та АОС призводить до оксидативного стресу [176, 344–347]. Окиснювальні пошкодження сприяють ішемічно-реперфузійним пошкодженням. Механізм, за допомогою якого відбувається збільшення АФО, на сьогодні вивчений недостатньо [348].

СОД каталізує перетворення супероксиданіон радикалу в  $H_2O_2$ , відіграє важливу роль у пригніченні окислювальної інактивації NO, запобігаючи утворенню пероксинітриду та дисфункції

ендотелію і мітохондрій [349]. Активність супероксиддисмутази (СОД, КФ 1.15.1.1) визначали за ступенем зниження відновлення нітротетразолію синього у присутності НАДН<sub>2</sub> і феназинметасульфату [350]. Активність каталази (КАТ, КФ 1.11.1.6) визначали згідно методу [351], фіксуючи зміну оптичної щільності в результаті реакції пероксиду водню з молібдатом амонію. Встановлено зниження активності антиоксидантних ензимів: СОД на 55 % та КАТ на 60 % у мозочку мишей за умов АФС, порівняно із показниками інтактних тварин [339, 340].

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 [352–355]. Вміст відновленого глутатіону (G-SH) визначали за здатністю його вільних SH-груп взаємодіяти з 5,5'-дитіо-біс-2-нітробензойною кислотою з утворенням тіонітрофенільного аніону, кількість якого прямопропорційна вмісту G-SH [356]. 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 [357, 358].

Нагромадження продуктів ПОЛ призводить до пошкодження генетичного апарата клітин, гальмує клітинний поділ, пригнічує окисне фосфорилування [29, 352]. 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 [357, 359, 360].

Стан енергозабезпечувальних процесів мітохондрій досліджували за активністю сукцинатдегідрогенази (СДГ, КФ 1.3.99.1) та цитохромоксидази (ЦХО, КФ 1.9.3.1). Активність СДГ визначали за відновленням ферриціаніду калію до ферроціаніду калію сукцинатом під дією СДГ [361]. Принцип методу визначення ЦХО ґрунтується на здатності останньої окиснювати диметил-пара-фенілендіамін і  $\alpha$ -нафтол з утворенням індофенолового синього [362]. У результаті досліджень [339, 340] 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 зни-

ження 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 (див. табл. 7.1).

У півкулях великого мозку мишей за умов АФС вміст ГПЛ зростав на 75 %, а кількість ТБК-АП збільшувалася на 44 % відносно контролю (табл. 7.2).

Таблиця 7.2

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±m, n=10)

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

Примітка. p – достовірно відмінне від відповідних значень у контрольній групі.

Водночас, активність СОД зменшувалась на 48 %, функціональна здатність КАТ знижувалась на 56 % (див. табл. 7.2). 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 % (табл. 7.2),



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 [353, 355, 357, 363].

Відомо, що при активації процесів переокиснення мембранних ліпідів знижується енергозабезпечення клітин унаслідок роз'єднання дихання і окисного фосфорилування в мітохондріях та розвитку їх дисфункції [359]. 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.

Установлено, 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 електронотранспортного ланцюга мітохондрій (СДГ та ЦХО) достовірно не змінювалася, порівняно з контролем (див. табл. 7.2).

Таким чином, за умов експериментального АФС у тканині мозочка, півкуль великого мозку 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 електронотранспортного ланцюга мітохондрій.

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

Відомо, що важливу роль у функціонуванні нейронів, глії і кровоносних судин відіграє NO як інтегруючий фактор [364]. При цьому NO залучений як до вторинного пошкодження, так і до неврологічного відновлення. При порушенні балансу активних форм нітрогену і кисню NO і  $O_2^{\cdot-}$  взаємодіють між собою, утворюється

пероксинітри, що призводить до пошкодження судин мозку. 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 [180, 365–367].

Встановлено, що у мозочку мишей з АФС, яким вводили L-аргінін [340], відбувається збільшення вмісту ГПЛ на 22 % та ТБК-АП на 11 %, порівняно із показниками групи тварин з АФС (табл. 7.3).

Таблиця 7.3

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

*Примітка.* Тут і в наступних таблицях розділу.  $p$  – достовірно відмінне від відповідних значень у контрольній групі;  $p_1$  – достовірно відмінне від відповідних значень у групі тварин з АФС;  $p_2$  – 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.

Водночас встановлено зниження активності СОД на 41 % та КАТ на 30 %, вмісту G-SH на 22 % (див. табл. 7.3) та активності ензимів електронотранспортного ланцюга мітохондрій СДГ на 12 % та ЦХО на 18 %, порівняно із показниками групи тварин з АФС (табл. 7.4).

Таблиця 7.4

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 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,05$

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.

Однак, хоча рівень стабільних метаболітів NO у мозочку вагітних мишей з АФС зростав, 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. 7.5). Про активацію системи антиоксидантного захисту в мозочку тварин у цій групі свідчило підвищення активності СОД на 33 %, КАТ на 26 %. Також встановлено

зростання активності мітохондрійних СДГ на 12 % та ЦХО на 13 %, порівняно із показниками групи вагітних мишей з АФС (див. табл. 7.4).

Таблиця 7.5

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  $\text{NO}_2^-$  достовірно не змінювався, а вміст  $\text{NO}_3^-$  зростав незначно. Вплив

NO може регулюватися його клітинною локалізацією та рівнем оксидативного стресу в тканині [365].

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. 7.3). 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. 7.4).

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. 7.5). Установлено зростання активності СОД на 44 % та КАТ на 60 % (див. табл. 7.5), СДГ на 23 %, ЦХО на 77 % (див. табл. 7.4) та вмісту G-SH на 16 % (див. табл. 7.5), 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 [368].

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. 7.3). 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 мітохондрійних ензимів СДГ на 27 % та ЦХО на 84 %, порівняно з групою тварин з експериментальним АФС (див. табл. 7.4). 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. 7.5). Спостерігали зростання активності СДГ на 41 % та ЦХО на 97 %, порівняно з показниками вагітних мишей з АФС (див. табл. 7.4). 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. 7.6).

Таблиця 7.6

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±0,28 p<0,001	9,37±0,44 p <sub>1</sub> <0,001	9,28±0,62 p <sub>1</sub> <0,01	8,7±0,35 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> >0,05 p <sub>3</sub> >0,05
ТБК-АП, нмоль/г тканини	5,59±0,23 p<0,001	4,92±0,13 p <sub>1</sub> <0,05	4,58±0,15 p <sub>1</sub> <0,05	3,94±0,14 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,01 p <sub>3</sub> <0,05
СОД, у.о./мг протеїну	2,11±0,14 p<0,001	2,77±0,17 p <sub>1</sub> <0,05	2,98±0,07 p <sub>1</sub> <0,005	3,52±0,19 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05
КАТ, нмоль/хв·мг протеїну	2,67±0,21 p<0,001	4,35±0,28 p <sub>1</sub> <0,005	4,89±0,26 p <sub>1</sub> <0,001	4,59±0,30 p <sub>1</sub> <0,005 p <sub>2</sub> >0,05 p <sub>3</sub> >0,05
G-SH, мкмоль/г тканини	4,19±0,10 p<0,001	4,42±0,12 p <sub>1</sub> >0,05	4,81±0,17 p <sub>1</sub> <0,05	5,41±0,14 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,01 p <sub>3</sub> <0,05

Водночас відмічено підвищення активності СОД на 31 % та КАТ на 63 %, СДГ на 17 %, порівняно із показниками групи тварин з АФС (табл. 7.7).

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. 7.8). 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 % (див. табл. 7.6).

Таблиця 7.7

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±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 <sub>1</sub> <0,01	3,88±0,16 p <sub>1</sub> >0,05	5,23±0,12 p <sub>1</sub> >0,05	6,84±0,22 p <sub>1</sub> >0,05
АФС + аміно- гуанідин	4,96±0,14 p <sub>1</sub> >0,05	4,79±0,10 p <sub>1</sub> <0,001	5,39±0,19 p <sub>1</sub> >0,05	7,34±0,30 p <sub>1</sub> >0,05
АФС + L-аргінін + аміногуанідин	5,50±0,16 p <sub>1</sub> <0,005 p <sub>2</sub> >0,05 p <sub>3</sub> <0,05	5,60±0,15 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001 p <sub>3</sub> <0,01	5,22±0,12 p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>2</sub> >0,05 p <sub>3</sub> >0,05	7,87±0,42 p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>2</sub> >0,05 p <sub>3</sub> >0,05

Таблиця 7.8

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±m, n=10)

Показник	Група тварин			
	АФС	АФС + L-аргінін	АФС + аміногуанідин	АФС + L-аргінін + аміногуанідин
1	2	3	4	5
ГПЛ, у.о./г тканини	12,44±0,67 p<0,01	9,82±0,35 p <sub>1</sub> <0,05	10,32±0,25 p <sub>1</sub> <0,05	8,98±0,42 p <sub>1</sub> <0,01 p <sub>2</sub> >0,05 p <sub>3</sub> <0,05
ТБК-АП, нмоль/г тканини	9,24±0,20 p<0,001	7,06±0,24 p <sub>1</sub> <0,001	8,01±0,33 p <sub>1</sub> <0,05	5,76±0,23 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,01 p <sub>3</sub> <0,01



Продовження табл. 7.8

1	2	3	4	5
СОД, у.о./мг протеїну	1,88±0,10 p<0,001	2,58±0,18 p <sub>1</sub> <0,05	2,19±0,06 p <sub>1</sub> <0,05	3,55±0,21 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,001
КАТ, нмоль/хв·мг протеїну	3,33±0,11 p<0,001	4,67±0,20 p <sub>1</sub> <0,01	3,97±0,11 p <sub>1</sub> <0,01	5,77±0,20 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,01 p <sub>3</sub> <0,001
G-SH, мкмоль/г тканини	2,92±0,11 p<0,001	4,05±0,04 p <sub>1</sub> <0,001	3,61±0,15 p <sub>1</sub> <0,05	4,45±0,14 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,01

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. 7.7).

Нейропротекторна роль аміногуанідину може реалізуватися через пригнічення утворення АФО, інгібування пероксидації ліпідів у клітинах і тканинах та запобігання апоптозу завдяки його антиоксидантним властивостям [32, 369].

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. 7.8). Установлено підвищення активності СОД на 17 % і КАТ на 19 %, порівняно з показниками групи тварин з АФС. Одночасно зростав вміст G-SH на 24 %, порівняно з показниками групи вагітних тварин з АФС. Отримані результати можна пояснити тим, що аміногуанідин впливає на пероксидацію ліпідів, зменшуючи розвиток оксидативного стресу [368].

Отже, аміногуанідин за умов експериментального АФС проявляє антиоксидантні властивості, його дія спрямована на відновлення активності та вмісту компонентів АОС, ензимів електронотранспортного 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. 7.6). 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 %.

Встановлено зростання активності ензимів дихального ланцюга мітохондрій СДГ на 19 % та ЦХО на 56 %, порівняно з показниками тварин із АФС (див. табл. 7.7). 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. 7.8). 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.

*7.2.3. 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 [18, 19]. Астроцити виконують різноманітні функції мозку, забезпечуючи структурну, метаболічну та трофічну підтримку нейронів, беруть активну участь у модуляції синаптичної передачі [370].

Враховуючи те, що деякі клітини інших гістотипів здатні синтезувати GFAP, але лише в обмежених кількостях, цей протеїн використовується як специфічний молекулярний маркер астроглії [370–373]. Вестерн-блот аналіз гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP) проводили за методикою [274, 275]. З метою імунохімічної детекції GFAP після закінчення електрофорезу протеїни переносили з гелю на нітроцелюлозні мембрани (GE Healthcare, Amersham Bioscience, RPN 203D, діаметр пор 0,45 мкм) методом електроблоту. Мембрани обробляли відповідними кролячими антитілами проти GFAP (anti-GFAP, Santa Cruz Biotechnology, sc-9065) у розведенні 1:2500 при 4 °C 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, протягом 90 хв при 37 °C. Денситометричний аналіз імунореактивних зон проводили із застосуванням програми TotalLab TL120 (Nonlinear Inc, США). Вміст GFAP виражали в умовних одиницях.

Блотограми зразків мозочка та півкулях великого мозку мишей BALB/c (антитіла проти GFAP) представлено на рисунку 7.1.

У результаті виконаних досліджень встановлено [374, 375] зростання загального вмісту GFAP у мозочку мишей з АФС у 2,8 раза, порівняно із показниками тварин контрольної групи (рис. 7.2).

Вказані зміни супроводжувались підвищенням вмісту GFAP (37 kDa) продукту щеплення (обмеженого протеолізу) інтактного поліпептиду GFAP (49 kDa) у 6,4 раза, порівняно з показниками інтактних тварин (рис. 7.3). 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.

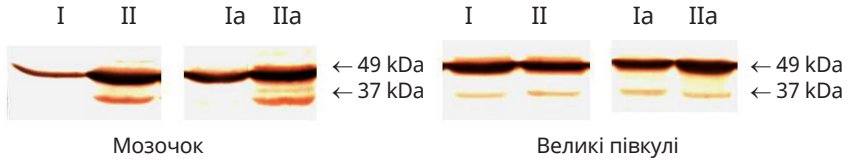


Рис. 7.1. Вестерн-блот аналіз зразків мозочка та півкуль великого мозку контрольних мишей лінії BALB/c та експериментальних мишей з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності (антитіла проти GFAP).

Примітка. Тут і на рис. 7.4. Умовні позначення груп тварин: I – контроль; II – АФС; Ia – контроль (вагітність); IIa – АФС (на 18-й день вагітності).

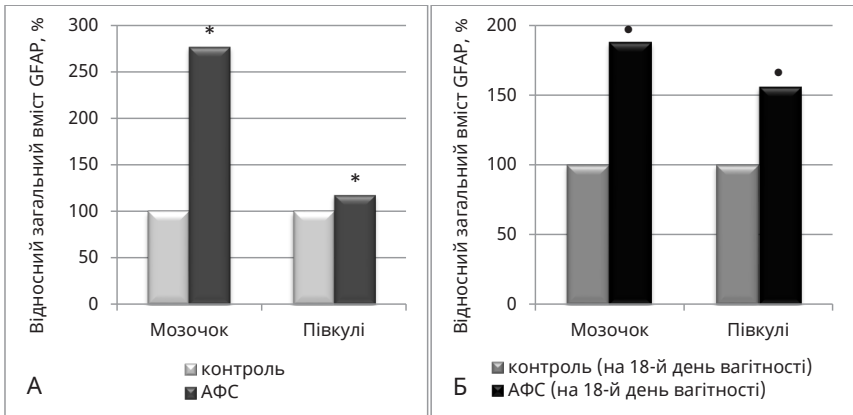
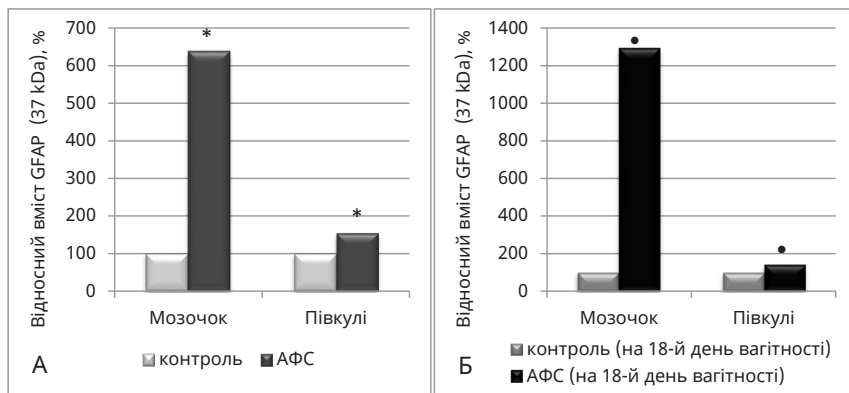


Рис. 7.2. Результати Вестерн-блот аналізу гліального фібрилярного кислого протеїну (загальний вміст GFAP) у зразках мозочка та півкуль великого мозку контрольних мишей лінії BALB/c та мишей з АФС до вагітності (А) та на 18-й день вагітності (Б). Дані наведено у відсотках від контролю (n=10).

Примітка. Тут і на рис. 7.3. та 7.5. Умовні позначення: \* – достовірна відмінність від відповідних значень у контрольній групі ( $p < 0,05$ ); • – достовірна відмінність від відповідних значень у контрольній групі (на 18-й день вагітності) ( $p < 0,05$ ).

Встановлено, що загальний вміст GFAP у зразках півкуль великого мозку в групі тварин з АФС зростає на 18 %, порівняно з контролем (див. рис. 7.2). Водночас спостерігалось зростання GFAP (37 kDa) на 55 %, порівняно з показниками контрольної групи (рис. 7.3). 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. 7.3.* 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).

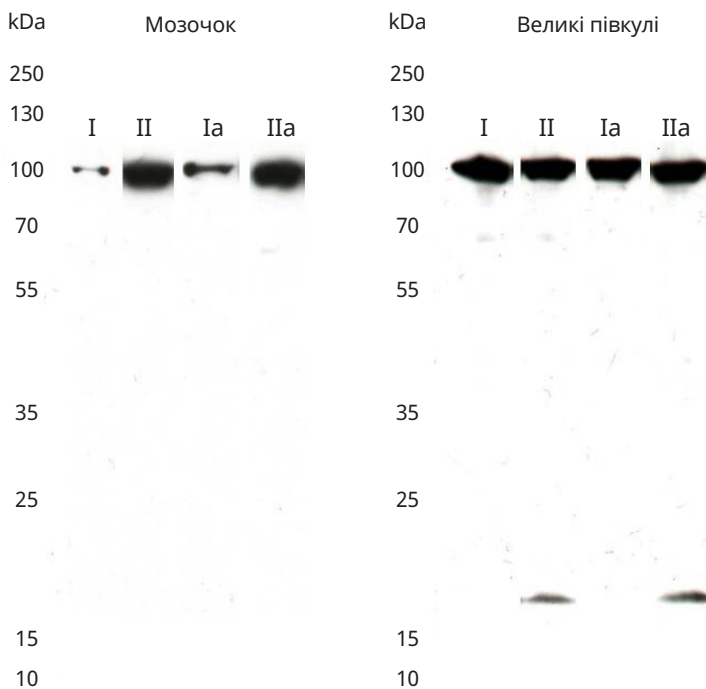
Зростання вмісту GFAP у мозочку та півкулях великого мозку мишей BALB/c за умов АФС, порівняно з контрольними тваринами, вказує на виникнення реактивного астрогліозу у відповідь на розвиток патології [371, 376, 377].

Основний протеїн мієліну (MBP) є маркерним білком олігодендроцитів. 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 [378, 379].

Вестерн-блот аналіз основного протеїну мієліну (MBP) проводили за методикою [274, 275]. З метою імунохімічної детекції MBP після закінчення електрофорезу протеїни переносили з гелю на нітроцелюлозні мембрани (GE Healthcare, Amersham Bioscience, RPN 203D, діаметр пор 0,45 мкм) методом електроблоту. Мембрани обробляли мишачими антитілами проти MBP (sc-66064, Santa Cruz Biotechnology) у розведенні 1:1000 при 4 °C 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 вторинними антитілами проти імуноглобуліну G миші, кон'югованими з пероксидазою хрому (A9044, Sigma Aldrich), взятими у розве-

денні 1:7000, протягом 90 хв при 37 °С. Денситометричний аналіз імунореактивних зон проводили із застосуванням програми TotalLab TL120 (Nonlinear Inc, США). Вміст MBP виражали в умовних одиницях.

Блотограми зразків мозочка та півкуль великого мозку (антитіла проти MBP) вагітних та невагітних мишей лінії BALB/c представлено на рисунку 7.4.



*Рис. 7.4.* 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 [380], що у мозочку мишей лінії BALB/c за умов експериментального АФС рівень олігомерних форм MBP із молекулярною масою 95–110 kDa був збільшений у 5,3 раза, порівняно із контролем (рис. 7.5, А). Встановлено, що за умов АФС на 18-й день вагітності у

мозочку мишей лінії BALB/c рівень MBP (95–110 kDa) зростав у 5,7 раза, порівняно із показниками вагітних тварин без АФС (рис. 7.5, Б), тоді як субодиноцю MBP із молекулярною масою 18,4 kDa у мозочку невагітних та вагітних мишей виявлено у дуже незначній кількості.

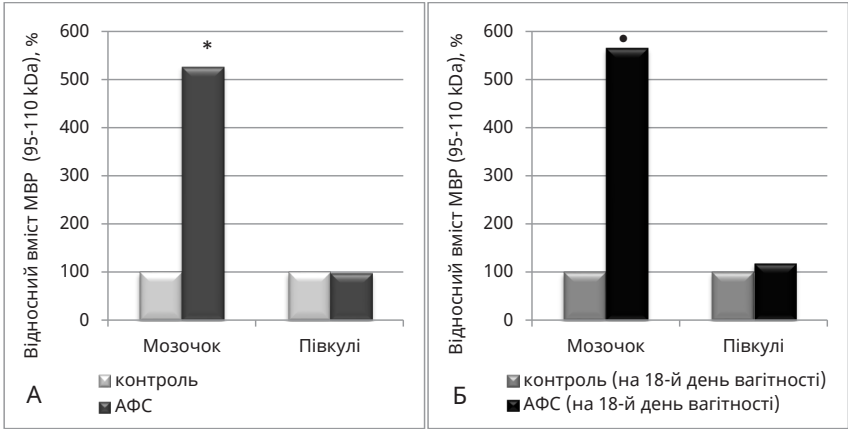


Рис. 7.5. Результати Вестерн-блот аналізу основного протеїну мієліну (95–110 kDa) у зразках мозочка та півкуль великого мозку контрольних мишей лінії BALB/c та мишей з АФС до вагітності (А) та на 18-й день вагітності (Б). Дані наведено у відсотках від контролю (n=10).

Імунореактивні зони у зразках півкуль великого мозку вагітних та невагітних мишей лінії BALB/c з АФС, виявлені антитілами проти MBP (95–110 kDa), достовірно не відрізнялися, порівняно із контрольними групами (див. рис. 7.5). Водночас встановлено значне зростання вмісту субодиноці MBP (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 субодиноці MBP (18,4 kDa) в 1935 разів, порівняно із показниками вагітних тварин без АФС. Ці імунореактивні зони, ймовірно, можуть бути олігомерними формами MBP. Підсилення деградації MBP 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 [381].

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 МВР вказують на активацію процесів ремієлінізації у тварин із експериментальним АФС, що можна розглядати як компенсаторну відповідь на пошкодження.

#### *7.2.4. 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 [18, 192, 301]. GFAP вивільняється в кров після пошкодження мозку та є інформативним показником перебігу широкого кола нейродегенеративних розладів, спричинених різними несприятливими факторами [371, 377].

Як показали результати досліджень, при введенні L-аргініну мишам з АФС у мозочку відбувається зростання загального вмісту GFAP на 17 % та GFAP (37 kDa) на 42 %, порівняно з показниками групи тварин із АФС (рис. 7.6, 7.7).

При введенні L-аргініну мишам з АФС на 18-й день вагітності у мозочку встановлено зниження загального вмісту GFAP на 23 % та GFAP (37 kDa) на 71 %, порівняно із показниками групи вагітних мишей з АФС. Ймовірно, зниження вмісту GFAP (37 kDa) відбувається завдяки відомим антиоксидантним властивостям L-аргініну [382].



*Рис. 7.6.* 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).

*Примітка.* Тут і на рисунках 7.8. та 7.11 та 7.12. Умовні позначення груп тварин: 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).



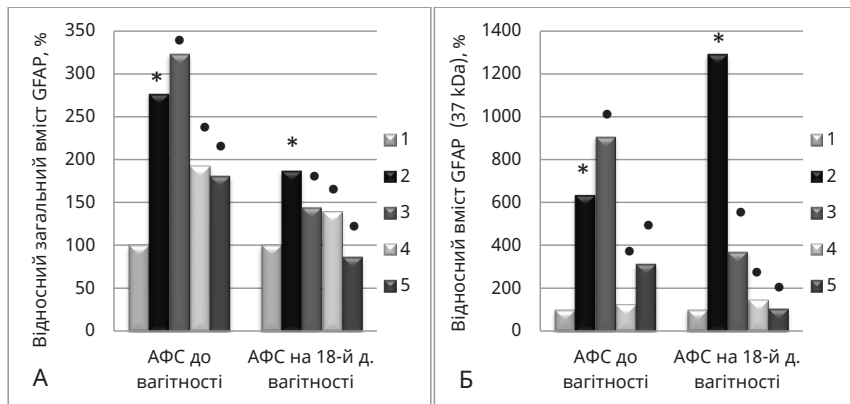


Рис. 7.7. Результати Вестерн-блот аналізу гліального фібрилярного кислого протеїну (загальний вміст GFAP (А) та вміст ізоформи GFAP (37 kDa) (Б)) у мозочку мишей лінії BALB/c з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності і при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину. Дані наведено у відсотках від контролю (n=10).

Примітка. Тут і на рисунку 7.9. 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).

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. 7.8, 7.9) [374, 375].

Під впливом L-аргініну в тканині півкуль великого мозку встановлено зниження вмісту GFAP (37 kDa) на 28 %, порівняно з групою тварин з АФС (рис. 7.9). У півкулях великого мозку вагітних мишей з АФС, яким вводили L-аргінін, встановлено зниження за-



Рис. 7.8. 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).

гального вмісту GFAP на 14 % та GFAP (37 kDa) на 19 %, порівняно із показниками тварин з АФС на 18-й день вагітності.

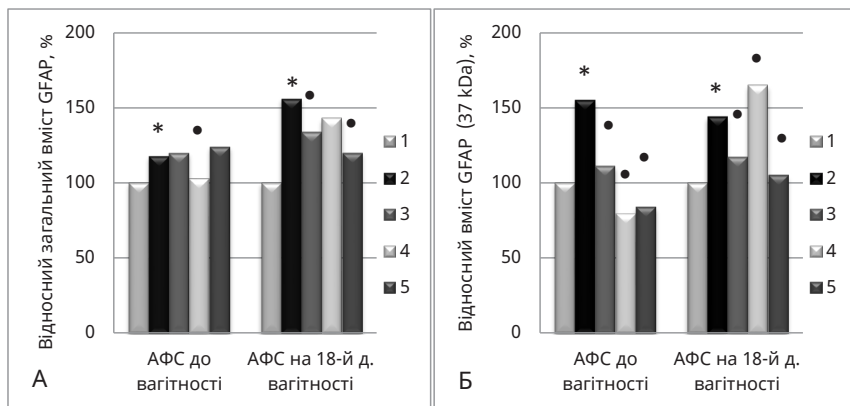


Рис. 7.9. Результати Вестерн-блот аналізу гліального фібрилярного кислого протеїну (загальний вміст GFAP (А) та вміст ізоформи GFAP (37 kDa) (Б)) у півкулях великого мозку мишей лінії BALB/c з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності і при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину. Дані наведено у відсотках від контролю (n=10).

При цереброваскулярних порушеннях спостерігається активація генерації NO в різних тканинах [382]. При АФС підвищується вміст індукцибельної ізоформи NOS, що може бути спричинено зростанням продукції прозапальних цитокінів IL-1 $\beta$ , IL-6 та TNF- $\alpha$  [146]. iNOS є продуктом активованої мікроглії [290]. Збільшення активності iNOS у мозку активує численні сигнальні шляхи і призводить до нейрозапалення [384].

При введенні інгібітора індукцибельної ізоформи ензиму NOS аміногуанідину мишам лінії BALB/c з АФС у мозочку встановлено зниження загального вмісту GFAP на 30 % та GFAP (37 kDa) на 81 %, порівняно із показниками групи тварин з АФС (див. рис. 7.7). При введенні аміногуанідину в мозочку вагітних мишей з АФС встановлено зниження загального вмісту GFAP на 26 % та GFAP (37 kDa) на 89 %, порівняно з показниками групи вагітних тварин з АФС.

Установлено, що при введенні тваринам з АФС аміногуанідину в зразках півкуль великого мозку відбувається зниження загального вмісту GFAP на 13 % та GFAP (37 kDa) на 48 %, порівняно із

показниками групи тварин з АФС (див. рис. 7.9). Отримані результати узгоджуються з даними про те, що аміногуанідин, як специфічний інгібітор iNOS, може мати профілактичний вплив щодо нейротоксичності [32]. 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 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 GFAP (37 kDa) на 51 %, порівняно з аналогічними показниками групи мишей з АФС (див. рис. 7.7). 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 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 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 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 GFAP (37 kDa) (на 71 % та 26 %), порівняно з показниками вагітних тварин з АФС, яким вводили окремо L-аргінін та аміногуанідин.

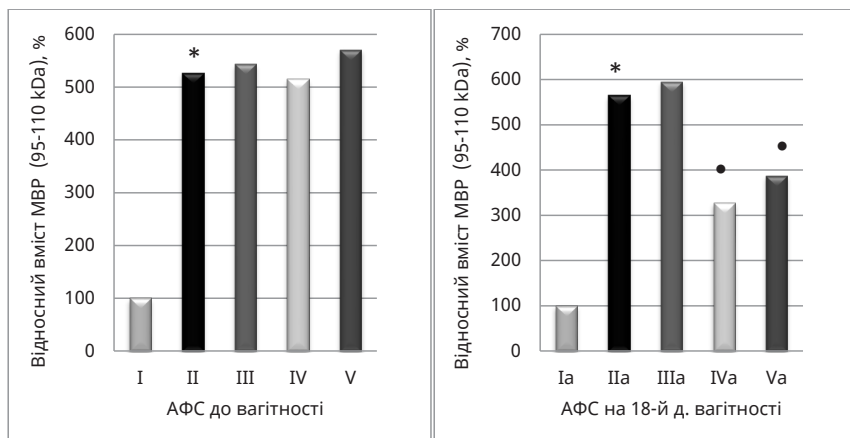
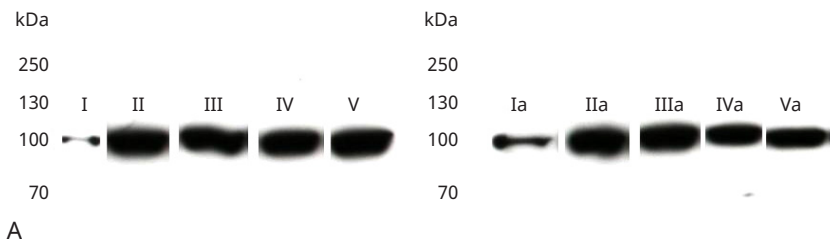
За комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину в тканині півкуль великого мозку тварин з АФС не спостерігалось достовірних змін загального вмісту GFAP, порівняно із показниками групи мишей-самок лінії BALB/c з АФС (див. рис. 7.9). Встанов-

лено, що при комбінованому введенні L-аргініну з аміногуанідином у тканині півкуль великого мозку тварин з АФС відбувається зниження 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 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 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 GFAP (37 kDa) (на 14 % та 39 %), порівняно з показниками вагітних тварин з АФС, яким вводили окремо L-аргінін та аміногуанідин. Підвищена експресія GFAP характеризує астрогліальну активацію та гліоз під час нейродегенерації [377, 385].

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 MBP при цілому ряді захворювань ЦНС. Руйнування мієліну є універсальним механізмом реакції нервової тканини на пошкодження. MBP становить основну частину білкового складу мієліну [386].

У результаті проведеного Вестерн-блот аналізу встановлено, що у мозочку невагітних та вагітних мишей за умов АФС рівень олігомерних форм MBP (95–110 kDa) був збільшений, натомість субодиницю MBP (18,4 kDa) виявлено у дуже незначній кількості (рис. 7.10).

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 MBP у діапазоні молекулярних мас 95–110 kDa, порівняно із показниками групи тварин з АФС.



Б

Рис. 7.10. Вестерн-блот аналіз основного протеїну мієліну (95–110 kDa) у зразках мозочка мишей лінії BALB/с 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).

Примітка. 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). Умовні позначення: \* – достовірно відмінне від відповідних значень у контрольній групі (p<0,05); • – достовірно відмінне від відповідних значень у групі тварин з АФС (p<0,05).

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. 7.10). За комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину в мозочку вагітних мишей з АФС встановлено зни-

ження 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. 7.11).

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. 7.11, 7.12).

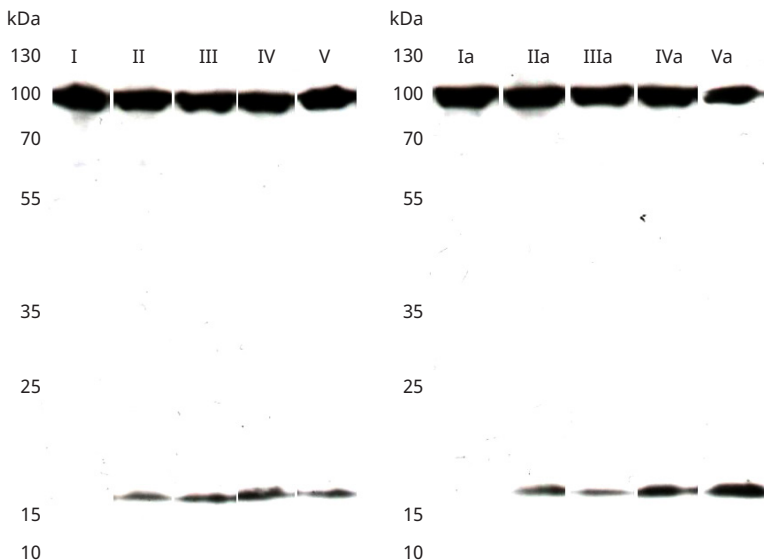


Рис. 7.11. Вестерн-блот аналіз основного протеїну мієліну (95–110 kDa кДа та 18,4 kDa) у зразках півкуль великого мозку мишей лінії BALB/c з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності і при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину.

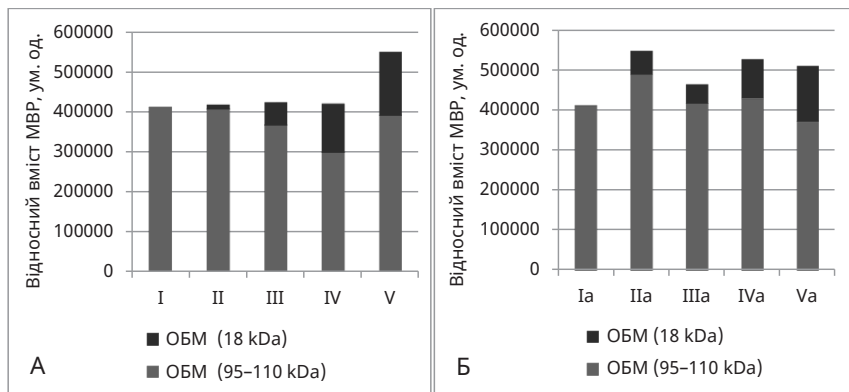


Рис. 7.12. Результати Вестерн-блот аналізу основного протеїну мієліну (95–110 kDa та 18,4 kDa) у зразках півкуль великого мозку мишей лінії BALB/c з АФС до вагітності (А) та на 18-й день вагітності (Б) і при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину (n=10).

При введенні L-аргініну тваринам з АФС у півкулях великого мозку мишей відбувалося подальше зростання вмісту субодиноці MBP (18,4 kDa) в 4,8 раза, 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 MBP (95–110 kDa) на 14 % та субодиноці MBP (18,4 kDa) на 20 %, порівняно із показниками групи вагітних мишей з АФС.

При застосуванні інгібітора iNOS аміногуанідину у тканині півкуль великого мозку мишей лінії BALB/c з АФС встановлено зростання вмісту MBP (18,4 kDa) у 10 разів, порівняно із показниками тварин з АФС (див. рис. 7.11, 7.12). Введення аміногуанідину тваринам з АФС на 18-й день вагітності не супроводжувалося змінами вмісту MBP (95–110 kDa) у півкулях великого мозку. Водночас встановлено подальше зростання вмісту MBP (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 MBP (18,4 kDa) зростав у 13 разів, порівняно з показниками групи мишей з АФС (див. рис. 7.11, 7.12). Причому, при комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину у півкулях великого мозку вміст MBP (18,4 kDa) зростав у 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 MBP (18,4 kDa), порівняно з показниками тварин з АФС, яким вводили аміногуанідин.

Введення L-аргініну в комбінації з аміногуанідином мишам з АФС на 18-й день вагітності супроводжувалося зниженням у півкулях великого мозку вмісту MBP (95–110 kDa) на 24 % та зростанням вмісту MBP (18,4 kDa) на 133 %, порівняно з показниками вагітних тварин з АФС (див. рис. 7.11, 7.12). При комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину вагітним мишам з АФС у півкулях великого мозку вміст MBP (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.

### ***7.3. Механізми ураження печінки при антифосфоліпідному синдромі.***

Ураження печінки при АФС супроводжується, в основному, непрохідністю печінкових вен або нижньої порожнистої вени, вузловою регенераторною гіперплазією. При ушкодженні гепатоцитів реалізуються процеси апоптозу та некрозу [30, 314, 321]. Незважаючи на існування ряду наукових досліджень, присвячених вивченню значення оксидативного стресу у механізмах розвитку АФС [24, 29, 134], його роль у патобіохімічних механізмах ураження печінки при цій патології, залишається недостатньо з'ясованою.



### 7.3.1. Роль оксидативного стресу у механізмах ураження печінки невагітних та вагітних мишей при антифосфоліпідному синдромі

Оксидативний стрес сприяє дисфункції імункомпетентних клітин та синтезу аутоантитіл [29]. Встановлено позитивні кореляційні зв'язки антитіл аКЛ з рівнем F2-ізопростанів, чутливими маркерами переокисного окиснення ліпідів *in vivo*, що свідчить про посилення оксидативного стресу при АФС [29, 387, 388]. Проте, в основному дослідники проаналізували роль оксидативного стресу викликаного аКЛ при АФС лише на рівні плазми [24, 134]. Водночас, клітинні та молекулярні механізми розвитку та регуляції оксидативного стресу залишаються не вивченими.

Визначення активності АлАТ та АсАТ проводили за методом Райтмана-Френкеля, використовуючи стандартний набір реактивів «Lachema» на біохімічному аналізаторі Humalyzer 2000, відповідно до інструкції фірми виробника. Активність АлАТ та АсАТ у сироватці крові виражали у Од/л. У результаті проведених досліджень встановлено зростання активності АлАТ (у 2,1 та 2,6 раза) та АсАТ (у 2,6 та 1,9 раза) у сироватці крові невагітних та вагітних мишей з АФС, порівняно із показниками контрольних груп (табл. 7.9), що свідчило про розвиток цитолізу у печінці. Водночас у печінці тварин з АФС відбувалася активація вільнорадикальних процесів [389]. Спостерігалось збільшення вмісту ГПЛ на 52 % та ТБК-АП – на 36 % у печінці тварин з АФС відносно показників групи інтактних тварин (табл. 7.10).

Таблиця 7.9

Показники активності амінотрансфераз 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
АлАТ, Од/л	50,33±2,62	105,86±5,63 $p < 0,001$	54,56±3,74	140,87±7,94 $p < 0,001$
АсАТ, Од/л	119,57±7,52	306,59±13,53 $p < 0,001$	122,19±7,67	236,96±13,16 $p < 0,001$

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

Таблиця 7.10

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

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 (табл. 7.10). Отримані результати узгоджуються із даними інших авторів [29].

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 [177, 357, 390]. У печінці мишей з АФС встановлено зменшення вмісту

G-SH на 21 %, порівняно з контрольною групою. За даними літератури [357], 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. 7.10).

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. 7.10). 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. 7.10).

Таким чином, за умов експериментального АФС у тканині печінки 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 електронотранспортного ланцюга мітохондрій.

### *7.3.2. Вплив L-аргініну та аміногуанідину на показники системи прооксиданти – антиоксиданти у печінці невагітних та вагітних мишей при антифосфоліпідному синдромі.*

Установлено, що в 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. 7.11).

За результатами проведених нами експериментів встановлено [389], 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. 7.12).

Таблиця 7.11

Вплив L-аргініну та аміногуанідину на показники активності амінотрансфераз 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±5,63 $p < 0,001$	306,59±13,53 $p < 0,001$	140,87±7,94 $p < 0,001$	236,96±13,16 $p < 0,001$
АФС + L-аргінін	75,68±4,31 $p_1 < 0,01$	191,20±11,87 $p_1 < 0,01$	85,53±5,89 $p_1 < 0,01$	190,89±9,88 $p_1 < 0,05$
АФС + аміногуанідин	86,60±3,53 $p_1 < 0,05$	254,25±11,20 $p_1 < 0,05$	109,62±7,82 $p_1 < 0,05$	210,53±10,51 $p_1 > 0,05$
АФС + L-аргінін + аміногуанідин	59,43±4,45 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,01$	126,97±6,67 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,01$ $p_3 < 0,001$	73,65±5,85 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,05$	155,33±14,04 $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,05$

*Примітка.* Тут і в наступних таблицях розділу.  $p$  – достовірно відмінне від відповідних значень у контрольній групі;  $p_1$  – достовірно відмінне від відповідних значень у групі тварин з АФС;  $p_2$  – 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.

Таблиця 7.12

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
1	2	3	4	5
ГПЛ, ум.од./г тканини	10,86±0,27 $p < 0,001$	8,57±0,27 $p_1 < 0,01$	9,30±0,48 $p_1 < 0,05$	7,93±0,38 $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$
ТБК-АП, нмоль/г тканини	5,60±0,22 $p < 0,05$	4,97±0,21 $p_1 > 0,05$	4,18±0,15 $p_1 < 0,01$	3,93±0,14 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,01$ $p_3 > 0,05$

Продовження табл. 7.12

1	2	3	4	5
СОД, ум.од./мг протеїну	4,36±0,23 p<0,01	3,64±0,18 p <sub>1</sub> <0,05	4,06±0,49 p <sub>1</sub> >0,05	3,54±0,17 p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> >0,05 p <sub>3</sub> >0,05
КАТ, нмоль/хв·мг протеїну	17,13±0,79 p<0,05	14,67±0,56 p <sub>1</sub> <0,05	15,59±0,68 p <sub>1</sub> >0,05	13,86±0,82 p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> >0,05 p <sub>3</sub> >0,05
G-SH, мкмоль/г тканини	3,24±0,17 p<0,05	3,86±0,07 p <sub>1</sub> <0,05	3,10±0,13 p <sub>1</sub> >0,05	3,68±0,06 p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> >0,05 p <sub>3</sub> <0,01

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 мітохондрійних ензимів у печінці: СДГ на 21 % та ЦХО на 19 %, порівняно з групою тварин із експериментальним АФС (табл. 7.13).

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. 7.14). 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 мітохондрійних ензимів СДГ на 24 % та ЦХО на 42 %, порівняно із показниками групи мишей з АФС на 18-й день вагітності (див. табл. 7.13).

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 [352, 365].

Отже, L-аргінін за умов експериментального АФС проявляє гепатопротекторні властивості, його дія спрямована на відновлення активності та вмісту компонентів АФС, ензимів електроно-

транспортного ланцюга мітохондрій, зниження рівня ПОЛ у печінці при експериментальному антифосфоліпідному синдромі.

Таблиця 7.13

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±0,30 $p < 0,01$	4,29±0,14 $p < 0,01$	5,21±0,29 $p < 0,001$	4,04±0,23 $p < 0,001$
АФС + L-аргінін	7,18±0,36 $p_1 < 0,05$	5,10±0,26 $p_1 < 0,05$	6,45±0,16 $p_1 < 0,05$	5,75±0,30 $p_1 < 0,01$
АФС + аміногуанідин	5,62±0,17 $p_1 > 0,05$	5,05±0,23 $p_1 < 0,05$	5,43±0,41 $p_1 > 0,05$	4,88±0,11 $p_1 < 0,05$
АФС + L-аргінін + аміногуанідин	7,36±0,46 $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,05$	6,11±0,32 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	7,39±0,34 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	6,77±0,22 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,001$

Таблиця 7.14

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
1	2	3	4	5
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 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$

Продовження табл. 7.14

1	2	3	4	5
СОД, ум.од./мг протеїну	1,14±0,08 p<0,001	2,48±0,13 p <sub>1</sub> <0,001	1,31±0,07 p <sub>1</sub> >0,05	2,84±0,07 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,001
КАТ, нмоль/хв·мг протеїну	6,20±0,61 p<0,001	10,26±1,00 p <sub>1</sub> <0,05	7,27±0,65 p <sub>1</sub> >0,05	13,79±0,90 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,001
G-SH, мкмоль/г тканини	1,11±0,07 p<0,001	1,75±0,08 p <sub>1</sub> <0,001	1,28±0,09 p <sub>1</sub> >0,05	2,04±0,07 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <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. 7.11).

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. 7.12). 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. 7.13).

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 (див. табл. 7.14).

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

Установлено, 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. 7.11).

Установлено, 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. 7.12). 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 ферментів дихального ланцюга мітохондрій СДГ на 24 % та ЦХО на 42 %, порівняно з показниками тварин з АФС (див. табл. 7.13). 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. 7.14). 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 рази і КАТ у 2,2 рази та зростання вмісту G-SH на 83 %, порівняно з показниками вагітних тварин з АФС. Водночас спостерігалось достовірне зростання активності ферментів дихального ланцюга мітохондрій СДГ на 42 % та ЦХО на 68 % (див. табл. 7.13). 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-аргінин та аміногуанідин. Про активацію системи антиоксидантного захисту при комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину свід-



чило 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 електронотранспортного ланцюга мітохондрій.

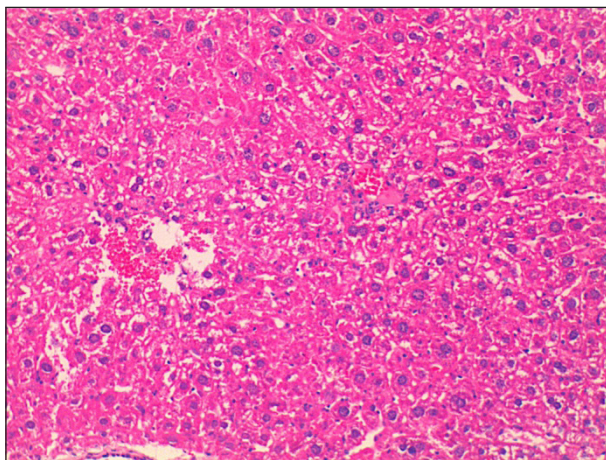
### *7.3.3. Морфологічні зміни у печінці при експериментальному антифосфоліпідному синдромі та застосуванні модуляторів синтезу нітроген оксиду*

Для гістологічних досліджень зразки тканини печінки піддослідних тварин фіксували в 10 % розчині формаліну, дегідрували у спиртах зростаючої концентрації та заливали у парафінові блоки за загальноприйнятими методиками. Виготовлені зрізи, завтовшки 5–6 мкм, фарбували гематоксиліном та еозином [391]. Огляд мікропрепаратів проводили за допомогою світлового мікроскопа MIKROmed SEO SCAN та фотодокументували за допомогою відеокамери Vision CCD Camera з системою виведення зображення гістологічних препаратів.

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. 7.13).

Для стінки артерій характерні деструкція, потовщення. В більшості полів зору наявне порушення часточково-балкової структури органа. В централобулярних ділянках виявлялися дистрофічно змінені гепатоцити з утворенням локусів некрозу та лізису, визначалися точкові крововиливи. Для гепатоцитів були характерні зменшення оксифілії, набряк, ознаки гідропічної дистрофії цито-

плазми. 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. 7.13).

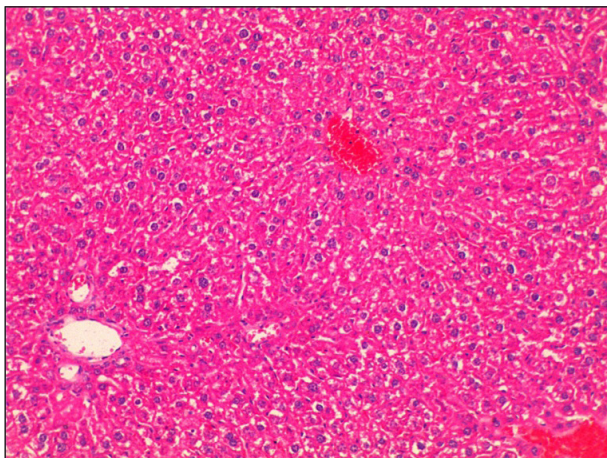


*Рис. 7.13.* Гістологічні зміни печінки тварини за умов АФС. Дискompлексація печінкових балок, деструктивно-дистрофічні зміни гепатоцитів, зони лізису та деструкції гепатоцитів, пошкодження стінки судини з формуванням крововиливу. Забарвлення гематоксиліном та еозином.  $\times 200$ .

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. 7.14).

Визначаються різко кровонаповнені центральні вени, та спустошені судини триад. Гепатоцити набрякли, 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, тролобулярно наявні помірно кровонаповнені або звужені з нечітким просвітом капіляри (див. рис. 7.14).

Вивчення гістологічної перебудови печінки мишей при застосуванні L-аргініну за умов АФС виявило порушення кровообі-



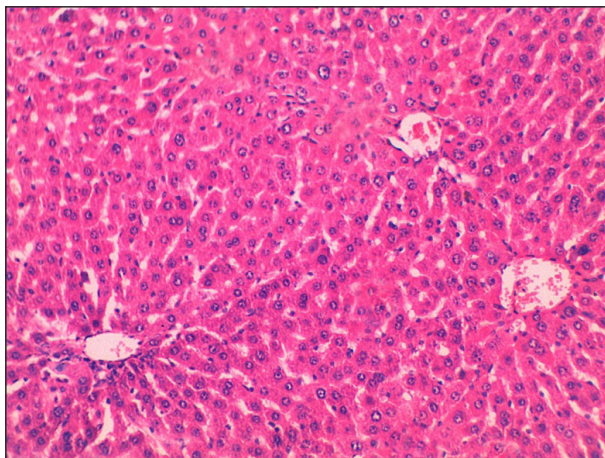
*Рис. 7.14.* Мікроскопічний стан печінки тварини за умов АФС та застосування аміногуанідину. Помірно порушена часточково-балкова організація органа, деструкція гепатоцитів, помірно коронованоповнені центральні вени. Забарвлення гематоксиліном і еозином.  $\times 200$ .

гу органа, що проявлялися кровонаповненням міжчасточкових, центральних та, особливо, підчасточкових вен (рис. 7.15).

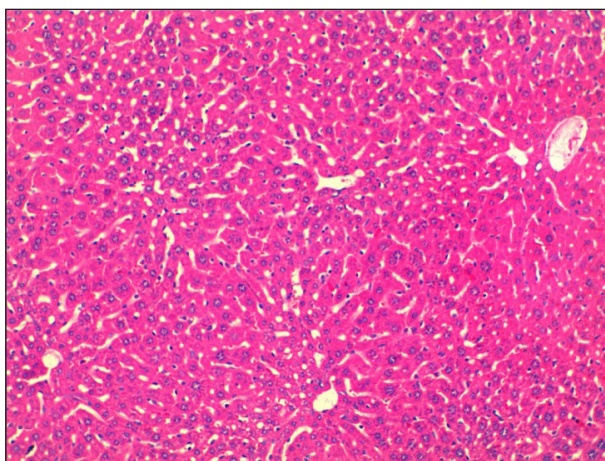
Для синусоїдних капілярів характерне кровонаповнення переважно в периферійних ділянках часточки, їх стінки чітко контуровані. Паравазальні лейкогістіоцитарні інфільтрати невеликі. Впорядковане, балкове розташування гепатоцитів визначається переважно на периферії часточки, дезорієнтоване – централобулярно. Цитоплазма гепатоцитів набрякла, помірно оксифільна, більшість ядер нормохромні, темні клітини не виявляються (див. рис. 7.15).

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. 7.16).

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,



*Рис. 7.15.* 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.  $\times 200$ .



*Рис. 7.16.* 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 гематоксиліном та еозином.  $\times 200$ .

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. 7.16).

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.

#### *7.3.4. Субмікроскопічні зміни у печінці при експериментальному антифосфоліпідному синдромі та застосуванні модуляторів синтезу нітроген оксиду*

Для електронномікроскопічних досліджень маленькі шматочки печінки фіксували в 2,5 % розчині глютаральдегіду, постфіксували в 1 % розчині тетраоксиду осмію на фосфатному буфері рН 7,2–7,4, зневоднювали в спиртах і пропіленоксиді та заливали в суміш епоксидних смол з аралдитом [391]. Ультратонкі зрізи, виготовлені на ультрамікромомі LKB-3 (Швеція), контрастували уранілацетатом та цитратом свинцю за методом Рейнольдса і вивчали за допомогою електронного мікроскопа ПЕМ-125К.

Проведені електронномікроскопічні дослідження печінки мишей лінії BALB/с інтактною групи показали, що гепатоцити містять округлі ядра, які мають центральне розташування. Каріолема чітко структурована, виявляються численні ядерні пори. Каріоплазма містить переважно еухроматин, наявні ядерця (рис. 7.17).

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 ендоплаз-

матичної сітки, численні грудки. По всій площі цитоплазми клітин визначаються численні округлі мітохондрії із електронноспвітлим матриксом та кристами. Плазмолемі клітин чітко виражені, обмежують у відповідних ділянках жовчні капіляри, в місцях з'єднання наявні прості десмосомальні та щільні замикальні міжклітинні контакти (див. рис. 7.17).

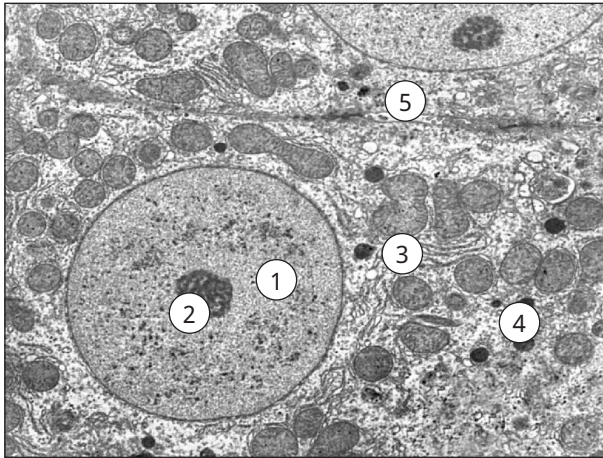
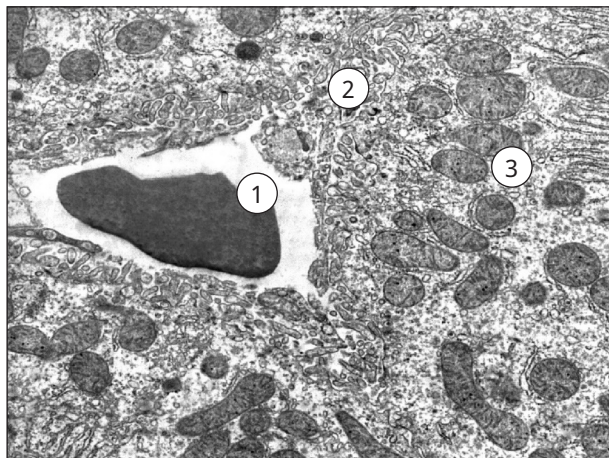


Рис. 7.17. Субмікроскопічна організація гепатоцита печінки миші лінії BALB/c інтактної групи. Кругле ядро (1), ядерце (2), мітохондрії (3), гранулярна ендоплазматична сітка (4), лізосоми (5).  $\times 12\ 000$ .

Васкулярні поверхні клітин утворюють численні мікрворсинки, 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 органи за загального призначення, і основною особливістю їх є наявність у цитоплазмі лізосом. Ендотелійні клітини містять об'ємну ядерну ділянку та зону органел, найбільшу площу має периферійна стоншена цитоплазматична з вакуолями та мікропухирцями (див. рис. 7.18).

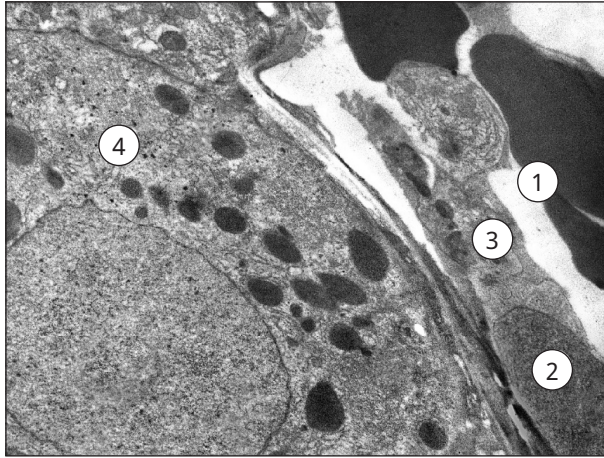
Отримані дані щодо субмікроскопічної організації компонентів часточки печінки миші лінії BALB/c є контролем і необхідні для встановлення змін у наступних дослідних групах.



*Рис. 7.18.* Ультраструктура гемокапіляра печінки миші лінії BALB/c інтактної групи. Просвіт із еритроцитом (1), простір Діссе з мікроворсинками (2), гепатоцит (3).  $\times 13\ 000$ .

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 ендотелійних 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 плазмолему васкулярної поверхні гепатоцитів погано контуруються, у просторах Діссе визначається мало мікроворсинок, вони фрагментовані (рис. 7.19).

У різних ділянках часточок печінки експериментальних тварин за умов АФС ультраструктурно виявляються поліморфні зміни гепатоцитів. Спостерігаються «темні», пошкоджені клітини, з ін-



*Рис. 7.19.* Фрагмент гемокапіляра печінки миші лінії BALB/c за умов АФС. Просвіт з форменими елементами крові (1), ядро (2) і цитоплазма (3) ендотеліоцита, гепатоцит (4).  $\times 18\ 000$ .

тенсивно 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. Різномісний зміни визначаються у мітохондріях: для частини з них характерні зростання розмірів, гіпертрофія, фрагментація крист. В інших, зменшених за розмірами органелах, в осміюфільному 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 мікрворсинок (рис. 7.20).

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. 7.21).

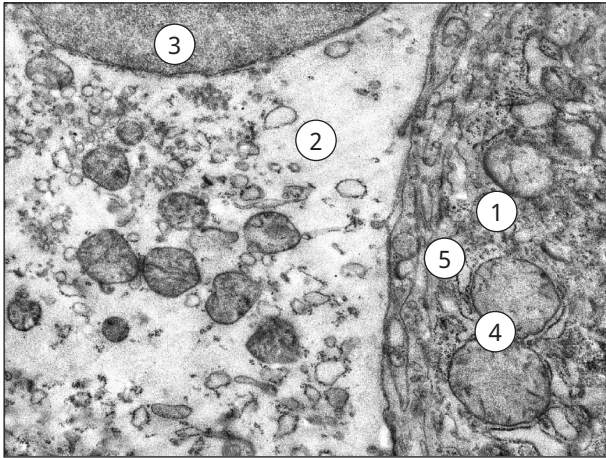


Рис. 7.20. Ультраструктурні зміни гепатоцитів печінки миші лінії BALB/с за умов АФС. Осміофільна гіалоплазма «темного» гепатоцита (1), електронно-прозора гіалоплазма «світлого» гепатоцита (2), ядро (3), мітохондрії (4), гранулярна ендоплазматична сітка (5).  $\times 22\ 000$ .

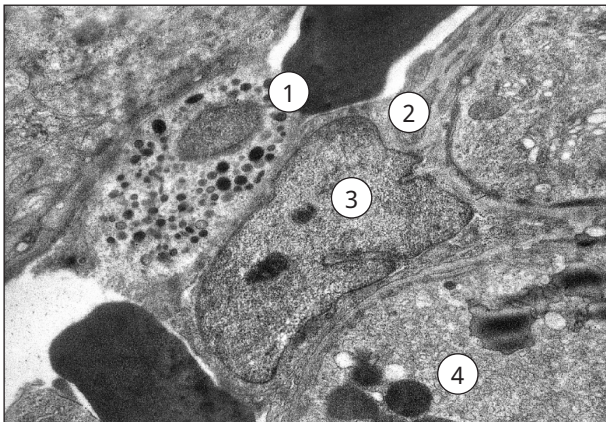


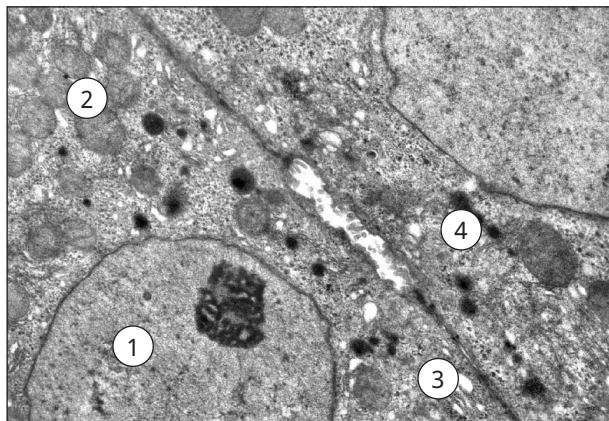
Рис. 7.21. Ультраструктурні зміни гемокапіляра печінки миші лінії BALB/с за умов АФС та при застосуванні аміногуанідину. Просвіт з форменими елементами крові (1), цитоплазма (2) і ядро ендотеліоцита (3), фрагмент гепатоцита (4).  $\times 19\ 000$ .

У потовщених набряклих ділянках цитоплазми ендотеліоцитів розташовано небагато органел. Непротяжні каналці ендоплазматичної сітки потовщені. Невеликих розмірів округлі мітохондрії включають електронноосвітлий матрикс, у якому мало крист. Цитоплазматичні ділянки ендотеліоцитів мають небагато піноцитозних пухирців і кавеол. Простори Діссе нерівномірні, включають розширені і вузькі ділянки, а кількість мікрворсинок у них невелика. Виявляються також тонкі осміофільні ділянки цитоплазми ендотелійних 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 електронноосвітлі ділянки гіалоплазми, в них мало рибосом и полірибосом. Привертає увагу гіпертрофія частини мітохондрій, вони мають подовгасту округло-овальну форму, гомогеній, 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 вакуолоподібні 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 мікрворсинки (рис. 7.22).

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 ендотелійних клітин округлі, сплюснені, каріоплазма відносно електронноосвітла, в ній переважає еухроматин, мембрани каріолеми чітко виражені, рідко виявляється розширення пери-



*Рис. 7.22.* 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).  $\times 15\ 000$ .

нуклеарного простору. В цитоплазмі навколо ядра визначаються органели, які не так значно змінені, як у групі тварин з АФС. Канальці ендоплазматичної сітки помірно розширені, в мітохондріях кристи незначно деструктуризовані, матрикс просвітлений. У периферійних цитоплазматичних ділянках клітин зростає кількість мікропіноцитозних міхурців, наявні наскрізні перфорації. Добре визначаються мікрворсинки у просторі Діссе (рис. 7.23).

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 ядерець. 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.

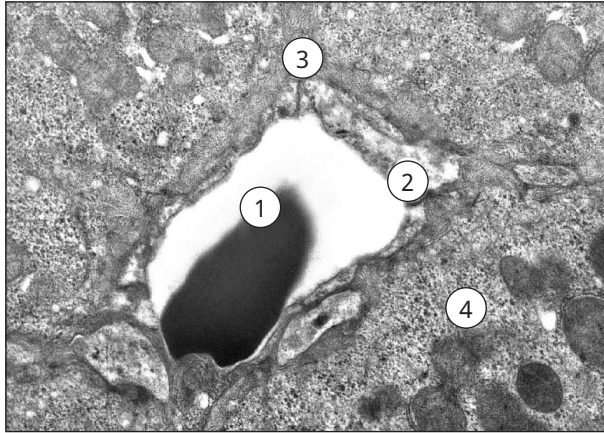


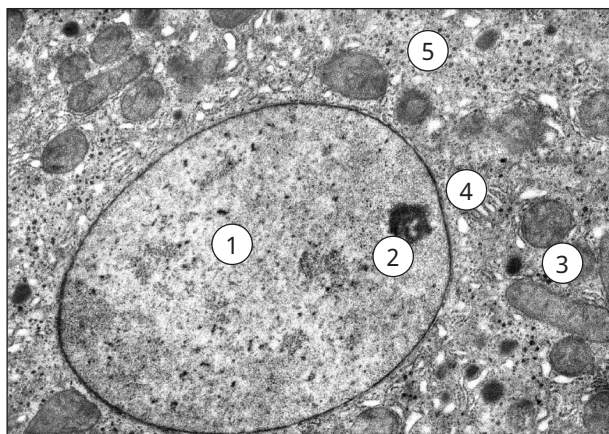
Рис. 7.23. Ультраструктурна гемокапіляра печінки миші лінії BALB/с за умов АФС при застосуванні L-аргініну. Еритроцит у просвіті гемокапіляра (1), цитоплазма ендотеліоцита (2), простір Діссе (3), гепатоцит (4).  $\times 15\ 000$ .

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 мікрворсинки. Щільні замикаючі контакти та десмосоми, що їх з'єднують, збережені (див. рис. 7.24).

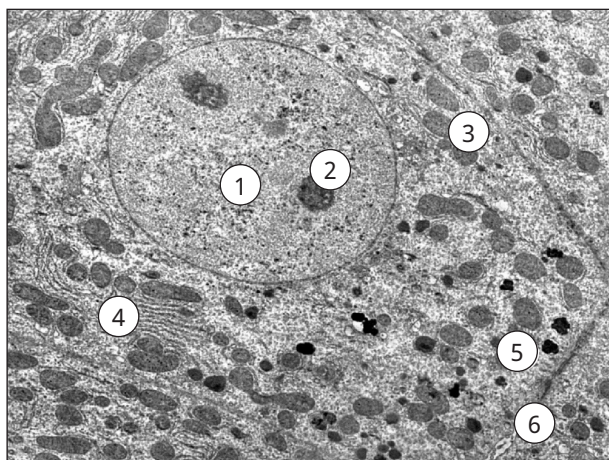
За умов комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину при АФС субмікроскопічно виявлений найзначніший позитивний вплив на компоненти печінки дослідних тварин. Ультраструктура гепатоцитів та кровоносних капілярів подібна до компонентів печінки тварин інтактної групи. Ядра клітин округлі, мембрани каріолеми добре контуровані, перинуклеарний простір різномірний, не розширений (рис. 7.25).

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. 7.25).



*Рис. 7.24.* 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).  $\times 17\ 000$ .



*Рис. 7.25.* Ультраструктура гепатоцита в складі часточки печінки миші лінії BALB/c 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).  $\times 12\ 000$ .

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 ендотелійних клітин відновлена, видовжені електронноосвітлі ядра містять у каріоплазмі еухроматин (рис. 7.26).

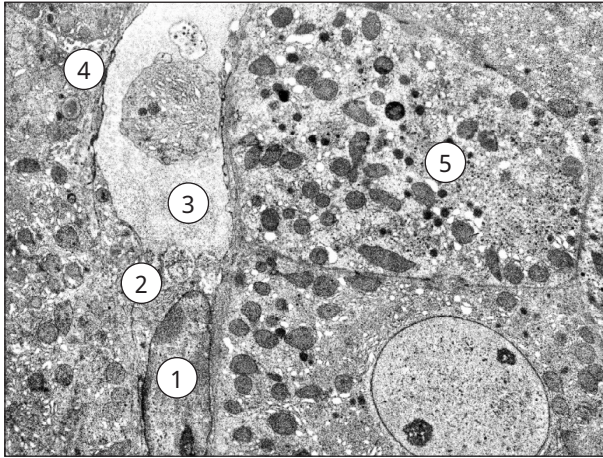


Рис. 7.26. Субмікроскопічний стан гемокапіляра в складі часточки печінки миші лінії BALB/с за умов АФС при комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину. Ядро (1) і цитоплазма (2) ендотеліоцита, просвіт капіляра (3), простір Діссе (4), гепатоцит (5).  $\times 9\ 000$ .

Каріолема чітка, мембрани не ушкоджені, суцільні, наявні численні ядерні пори. Перинуклеарно наявні структурно незмінні органели загального призначення. Тільки деякі канальці 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. 7.26).

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 часточки

чок 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.

#### ***7.4. Механізми ураження нирок при антифосфоліпідному синдромі***

Нирки є одним з основних органів-мішеней при всіх клінічних формах АФС. Ураження нирок є одним з найчастіших проявів катастрофічного АФС [392, 393]. Нирковий ендотелій реагує в першу чергу на системну ендотелію дисфункцію у хворих з АФС. При цьому спостерігається гіперпродукція судинного ендотеліального фактора росту (VEGF), ендотеліну-1, Е-селектину, пошкодження капілярів клубочків та артеріол нирок [328].

##### *7.4.1. Роль оксидативного стресу у механізмах ураження нирок невагітних та вагітних мишей при антифосфоліпідному синдромі*

Ураження нирок переважно пов'язані з розвитком оксидативного стресу [394]. Встановлено, що у нирках мишей з АФС активуються процеси пероксидного окиснення ліпідів [395–398]. Спостерігалось підвищення вмісту ГПЛ на 27 %, ТБК-АП на 57 %, порівняно із аналогічними показниками інтактних тварин (табл. 7.15).

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 літера-

Таблиця 7.15

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

тури, збільшення активних форм кисню, зокрема супероксидного аніон-радикала, може індукувати зростання активності СОД на початкових етапах оксидативного стресу [134]. 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. 7.15). 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. 7.15).



У вагітних мишей з АФС також виявлено порушення функціонування електронотранспортного 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. [29]. При активації процесів переокиснення мембранних ліпідів, у тому числі, знижується енергозабезпечення клітин унаслідок пошкодження мітохондрій [71].

Визначення концентрації сечовини та креатиніну проводили використовуючи стандартні набори реактивів «Lachema» на біохімічному аналізаторі Humalyzer 2000, відповідно до інструкцій фірми виробника. Встановлено зростання вмісту сечовини (в 1,8 та 2,0 раза) та креатиніну (в 1,9 та 2,2 раза) у сироватці крові невагітних та вагітних мишей лінії BALB/c з АФС відносно показників контрольних груп (табл. 7.16), що свідчить про порушення видільної функції нирок.

Таблиця 7.16

Показники вмісту сечовини та креатиніну 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
Креатинін, мкмоль/л	23,70±0,49	44,40±1,60	24,85±1,59	54,82±2,67 p<0,001
Сечовина, ммоль/л	6,41±0,21	11,27±0,51 p<0,001	6,05±0,48	11,96±0,77 p<0,01

Таким чином, за умов експериментального АФС у тканині 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 електронотранспортного ланцюга мітохондрій.

*7.4.2. Вплив L-аргініну та аміногуанідину на показники системи прооксиданти – антиоксиданти у нирках невагітних та вагітних мишей при антифосфоліпідному синдромі*

Установлено, 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. 7.17).

*Таблиця 7.17*

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±1,60 $p < 0,001$	11,27±0,51 $p < 0,001$	54,82±2,67 $p < 0,001$	11,96±0,77 $p < 0,01$
АФС + L-аргінін	30,82±1,22 $p_1 < 0,01$	12,76±1,02 $p_1 > 0,05$	34,36±2,99 $p_1 < 0,01$	10,35±0,93 $p_1 > 0,05$
АФС + аміногуанідин	38,87±1,48 $p_1 < 0,05$	9,57±0,36 $p_1 < 0,05$	45,47±2,08 $p_1 < 0,05$	10,79±0,95 $p_1 > 0,05$
АФС + L-аргінін + аміногуанідин	26,77±0,71 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,001$	7,79±0,34 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,01$ $p_3 < 0,05$	28,67±1,83 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,001$	7,02±0,43 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$

При введенні L-аргініну мишам з АФС встановлено пригнічення активності процесів переокиснення мембранних ліпідів у нирках [396-398]: зниження вмісту ГПЛ на 20 % і ТБК-АП на 34 %, порівняно з показниками тварин з АФС (табл. 7.18). 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 мітохондрійних ензимів СДГ на 14 % і ЦХО на 16 % відповідно, порівняно із показниками групи мишей з АФС (табл. 7.19).

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 %

Таблиця 7.18

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 $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$

і 32 % (табл. 7.20). 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.

Відновлення балансу в системі прооксиданти – антиоксиданти у нирках супроводжувалось зростанням активності ензимів СДГ на 21 % та ЦХО на 42 % (табл. 7.19).

Отже, введення L-аргініну вагітним та невагітним тваринам з АФС супроводжується зменшенням проявів оксидативного стресу у нирковій тканині, що проявляється зниженням активності

Таблиця 7.19

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±0,02 $p < 0,05$	3,67±0,14 $p < 0,01$	4,51±0,06 $p < 0,001$	3,72±0,31 $p < 0,001$
АФС + L-аргінін	5,99±0,24 $p_1 < 0,05$	4,27±0,09 $p_1 < 0,01$	5,47±0,06 $p_1 < 0,001$	5,28±0,36 $p_1 < 0,05$
АФС + аміногуанідин	5,53±0,15 $p_1 > 0,05$	3,93±0,24 $p_1 > 0,05$	4,72±0,08 $p_1 > 0,05$	4,70±0,14 $p_1 < 0,05$
АФС + L-аргінін + аміногуанідин	6,11±0,16 $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,05$	4,13±0,08 $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$	5,30±0,07 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,01$	6,50±0,36 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,01$

процесів пероксидного окиснення ліпідів, підвищенням активності та вмісту компонентів антиоксидантної системи та ензимів електронотранспортного ланцюга мітохондрій.

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. 7.17).

При застосуванні аміногуанідину встановлено зростання вмісту ГПЛ на 15 %, порівняно з показниками тварин з АФС (див. табл. 7.18). 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. 7.19).

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. 7.20). Водночас встановлено зростання активності ЦХО на 26 % (див. табл. 7.19).

Таблиця 7.20

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

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. 7.18). 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 мітохондрійних

СДГ на 16 % і ЦХО на 13 % відповідно, порівняно з показниками тварин з АФС (див. табл. 7.19). 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.

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 (див. табл. 7.17).

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. 7.20). Про активацію системи антиоксидантного захисту в 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. 7.19). 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 електронотранспортного ланцюга мітохондрій.

### *7.4.3. Гістологічні зміни нирки мишей за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому та при застосуванні L-аргініну та аміногуанідину*

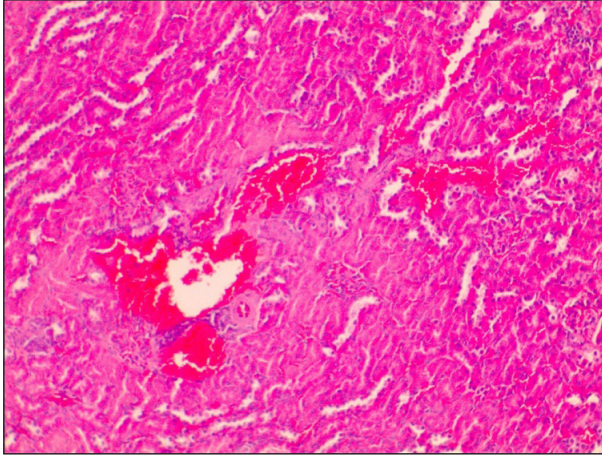
Для гістологічних досліджень зразки тканини нирок піддослідних тварин фіксували в 10 % розчині формаліну, дегідрували у спиртах зростаючої концентрації та заливали у парафінові блоки за загальноприйнятими методиками. Виготовлені зрізи, завтовшки 5–6 мкм, фарбували гематоксиліном та еозином [391]. Огляд мікропрепаратів проводили за допомогою світлового мікроскопа MIKROmed SEO SCAN та фотодокументували за допомогою відеокамери Vision CCD Camera з системою виведення зображення гістологічних препаратів.

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, сладжування еритроцитів, стази. Стінки судин стоншені, деструктивно змінені, наявні кровивиливи. набряк строми помірний, наявна лейкоцитарна інфільтрація (рис. 7.27).

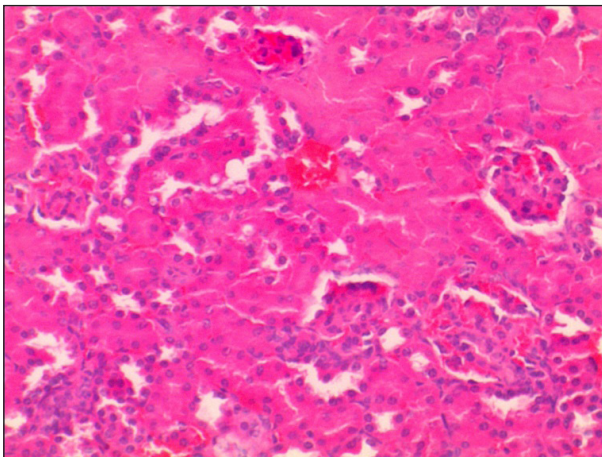
Більшість ниркових тілець гіпертрофовані, в них виявляється кровонаповнення судинних клубочків, за рахунок чого значно звужуються просвіти двостінної капсули Шумлянського – Боумена. Також спостерігаються ниркові тільця зміненої форми або зменшені в розмірах, що свідчить про їх деструкцію та гіпотрофію.

Зміни визначаються також в епітеліоцитах канальців 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 канальця. В частини епітеліоцитів цитоплазма зерниста або вакуолізована, дистрофічно змінена, їх ядра гіперхромні, пікнотично змінені. Дистальні канальці помірно розширені, епітелій набряклий (рис. 7.28).



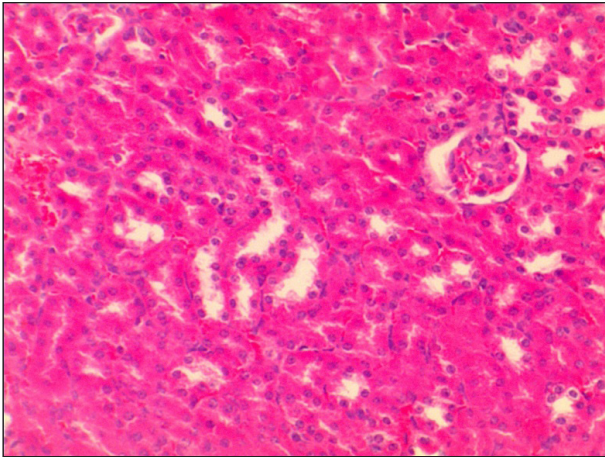
*Рис. 7.27.* Мікроскопічні зміни нирки миші лінії BALB/с за умов АФС. Розширені, кровонаповнені просвіти судин, звуження просвіту окремих канальців та дистрофічні зміни епітелію звивистих канальців. Забарвлення гематоксиліном та еозином.  $\times 100$ .



*Рис. 7.28.* Мікроскопічні зміни нирки миші лінії BALB/с за умов АФС. Дистрофічно змінений нефротелій канальців нефрона, деформовані гіпер- та атрофічно змінені ниркові тільця, кровонаповнені судини. Забарвлення гематоксиліном та еозином.  $\times 200$ .



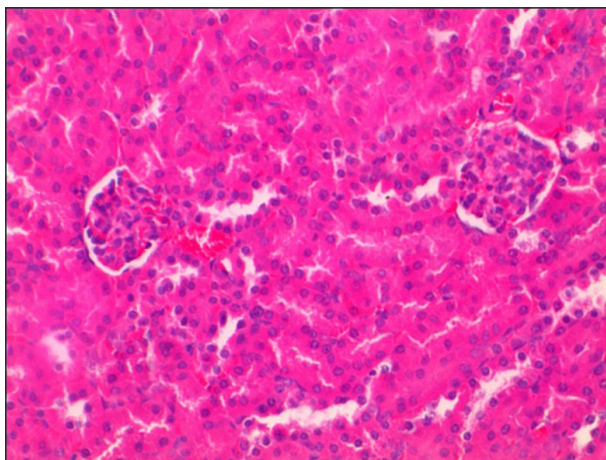
Гістологічні зміни нирок тварин із експериментальним АФС, яким вводили L-аргінін, проявлялися зменшенням кровонаповнення судин органа із збереженням цілісності судинної стінки. Формені елементи крові виявляються переважно у венозному руслі строми та помірно подекуди в артеріолах і гемокапілярах судинних клубочків. За умов застосування L-аргінину 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. 7.29). 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. 7.29.* Мікроскопічний стан кіркової речовини нирки миші лінії BALB/с за умов АФС та корекції L-аргініном. Ниркові тільця з помірно кровонаповненими судинними клубочками, малозмінені канальці нефрона. Забарвлення гематоксиліном та еозином.  $\times 200$ .

Мікроскопічні зміни нирок тварин із модельованим АФС, яким вводили аміногуанідин, проявляються розширенням і кровонаповненням багатьох судин, переважно дрібних артерій кіркової речо-

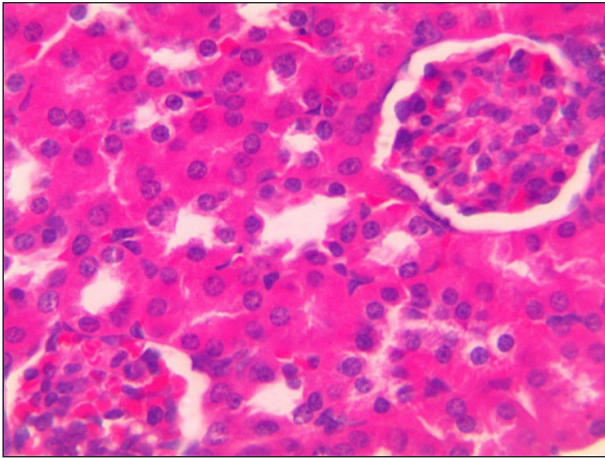
вини органа. Визначаються помірно і подекуди значно кровонаповнені капіляри перитубулярної сітки та деяких кровоносних капілярів судинних клубочків. Наявні деформовані, зміненої форми ниркові тільця, однак меншою мірою, порівняно із нирками групи тварин з АФС. Відмічаються також нечисленні збільшені в розмірах гіпертрофовані та атрофовані ниркові тільця. Реорганізація проксимальних та дистальних канальців проявляється помірним розширенням просвітів, незначним набряком цитоплазми епітеліоцитів, подекуди із її вакуолізацією. Більшість ядер клітин помірно базофільні, еухроматинові (рис. 7.30).



*Рис. 7.30.* Гістологічні зміни нирки миші лінії BALB/c за умов АФС та корекції аміногуанідином. Помірно кровонаповнені дрібні судини, змінені ниркові тільця і канальці нефронів. Забарвлення гематоксиліном 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 плазмолемі, містить округлі слабо базофільні еухроматинові ядра. Просвіти канальців, особливо

дистальних, чіткі, не розширені. Структурна організація збірних канальців і трубочок також без видимих змін (рис. 7.31).



*Рис. 7.31.* Мікроскопічний стан кіркової речовини нирки миші лінії BALB/c за умов АФС та корекції L-аргініном і аміногуанідином. Ниркові тільця та звивисті канальці нефронів без ознак пошкодження. Забарвлення гематоксиліном та еозином.  $\times 400$ .

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.

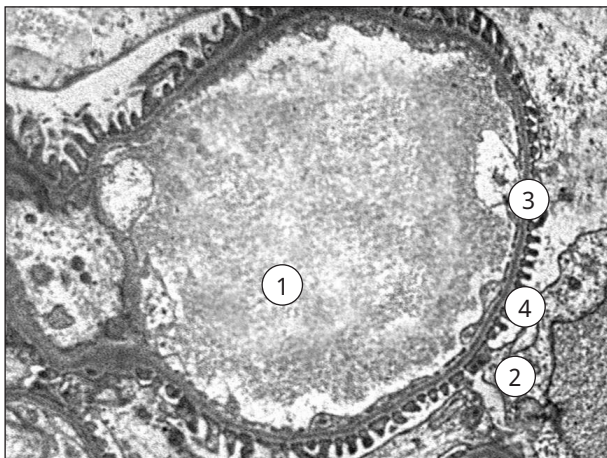
L-аргінін та аміногуанідин, особливо за умов їх комбінованого введення, зменшують патологічні зміни компонентів нефрона, порівняно з групою тварин із АФС, що проявляється відновленням мікроциркуляції в органі, покращенням структури ниркових тілець та епітеліоцитів канальців нефрона, що свідчить про відносну нормалізацію фаз процесу сечоутворення у нирках експериментальних тварин.

#### *7.4.4. Електронномікроскопічні дослідження нирки за умов антифосфоліпідного синдрому та при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину*

Для електронномікроскопічних досліджень маленькі шматочки нирки фіксували в 2,5 % розчині глютаральдегіду, 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 [391]. Ультратонкі зрізи, виготовлені на ультрамікротомі LKB-3 (Швеція), контрастували уранілацетатом та цитратом свинцю за методом Рейнольдса і вивчали за допомогою електронного мікроскопа ПЕМ-125К.

Субмікроскопічне вивчення нирок тварин інтактної 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 гемокapілярами. Кровоносні капіляри судинного клубочка, вистелені ендотелійними клітинами, які мають тонкі, периферичні, цитоплазматичні частини клітин, що має отвори – фенестри (рис. 7.32). Базальна мембрана особливої будови, вона тришарова, середній шар – електроннощільний, зовнішні – електроннопрозорі, вона є спільною для подоцитів внутрішнього шару капсули Шумлянського – Боумена та ендотеліоцитів капілярів судинного клубочка, всі разом структури формують фільтраційний бар'єр.

Епітеліоцити проксимальних каналців нефрона також розташовані на базальній мембрані, містять округло-овальні ядра, а на апікальній частині клітин – значну кількість мікробориснок, що утворюють щітчкову облямівку. Цитоплазма клітин містить каналці ендоплазматичної сітки, рибосоми, в апікальній частині – лізосоми. Базальна частина клітин містить складки плазмолемми, між якими розміщуються видовжені паличкоподібні мітохондрії, вони мають відносно електроннощільний матрикс, чіткі кристи.

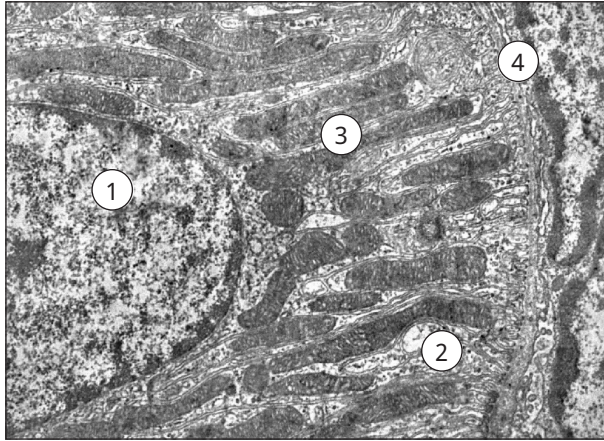


*Рис. 7.32.* Ультраструктурна організація компонентів судинного клубочка нирки миші лінії BALB/c інтактної групи. Просвіт гемокapіляра з еритроцитом (1), цитотрабекула (2), базальна мембрана (3), цитоподії (4). × 12 000.

Між канальцями нефрона розміщені гемокapіляри перитубулярної кровоносної сітки. Ендотеліоцити в їх складі видовжені, ядра їх округлі, або витягнуті, мають чітко виражені мембрани каріолеми, каріоплазма насичена переважно еухроматином, наявні ядерця. Цитоплазма містить помірно розвинені органи загалого призначення, а в периферійних зонах, так званих вуалях, мікропіноцитозні міхурці та кавеоли, наявні отвори – фенестри.

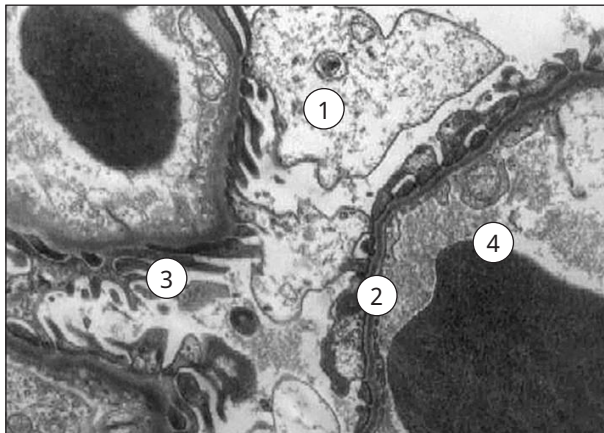
В епітеліоцитах дистального відділу нефрона наявні центральні розміщені овальні ядра, електронно світла цитоплазма. В базальній частині клітин визначається базальна посмугованість, що утворена протяжними складками плазмолемми та розміщеними між ними великими видовженими мітохондріями (рис. 7.33).

Ультраструктурні дослідження нирок тварин при експериментальному АФС встановили значні порушення структурної організації компонентів органа. Гемокapіляри судинних клубочків розширені, кровонаповнені, в них виявляються стази, складжі еритроцитів. В ендотеліоцитах 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.



*Рис. 7.33.* Ультраструктурна організація епітеліюцита дистального відділу нефрона нирки миші лінії BALB/c інтактної групи. Ядро (1), цитоплазма (2), мітохондрії між складками плазмолеми (3), базальна мембрана (4).  $\times 15\ 000$ .

Гломерулярна базальна мембрана зонально потовщена або стоншена, втрачає тришарову будову, має вигляд гомогенної смужки. Подоцити містять деструктивно змінені органели, набряклі просвітлені ділянки цитоплазми (рис. 7.34).



*Рис. 7.34.* Субмікроскопічні зміни компонентів судинного клубочка ниркового тільця. Нирка миші лінії BALB/c при експериментальному АФС. Змінена цитоплазма подоцита (1), базальна мембрана (2), цитоподії (3), просвіт гемокapіляра (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 каріолеми (див. рис. 7.34).

Для гемокапілярів перитубулярної кровеносної 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. 7.35).

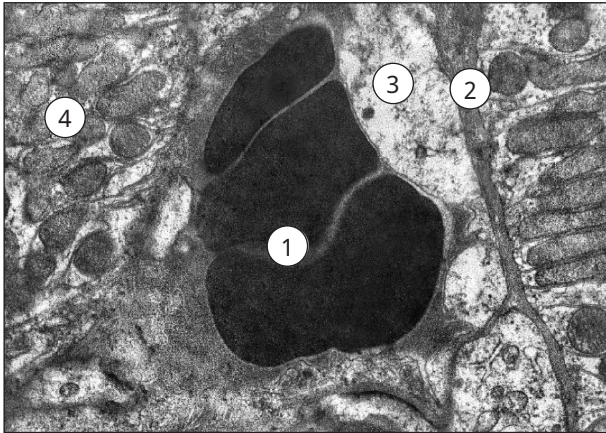


Рис. 7.35. Субмікроскопічні зміни епітеліоцита і гемокапіляра кіркової речовини нирки миші лінії BALB/с при експериментальному АФС. Кровонаповнений просвіт капіляра (1), базальна мембрана (2), набрякла цитоплазма ендотеліоцита (3), цитоплазма базальної частини епітеліоцита канальця (4).  $\times 12\ 000$ .

За умов АФС суттєві деструктивно-дегенеративні зміни виявляються у нефроцитах канальців нефронів, у клітинах проксимального відділу нефрона визначалися електронноосвітлі ділянки, позбавлені органел, або їх фрагменти. Порушується впорядковане паралельне розташування мітохондрій, вони мають гомогенний електроннощільний матрикс та редуковані кристи. Мікрроворсинки 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. 7.35).

Для нефроцитів дистальних відділів нефрона характерні значний набряк та просвітлення апікальних відділів клітин, ці зони позбавлені органел або містять їх окремі фрагменти (рис. 7.36).

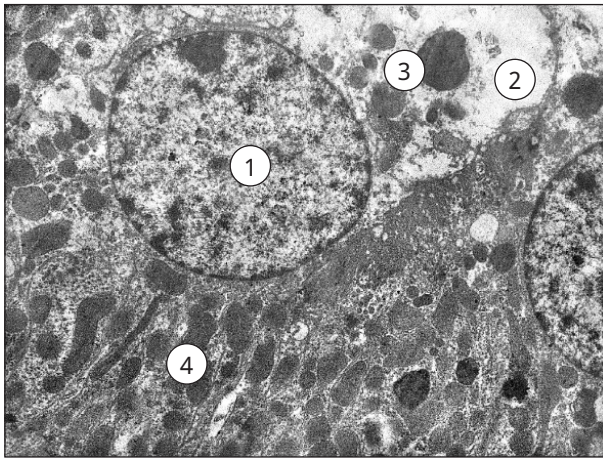


Рис. 7.36. Ультраструктурний стан епітеліоцита дистального відділу нефрона. Нирка миші лінії BALB/c за умов АФС. Ядро (1), просвітлена набрякла цитоплазма (2), осміофільна вакуолеподібна структура (3), осміофільні мітохондрії (4).  $\times 11\ 000$ .

Округлі ядра осміофільні, 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 осміофільні вакуолеподібні структури. Базальна мембрана вузька, на окремих ділянках нечітко контурована (див. рис. 7.36).

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 су-



динного клубочка ще наявне, проте не таке значне, як у попередній групі спостереження. Цитоплазма ендотелієвих 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. 7.37).

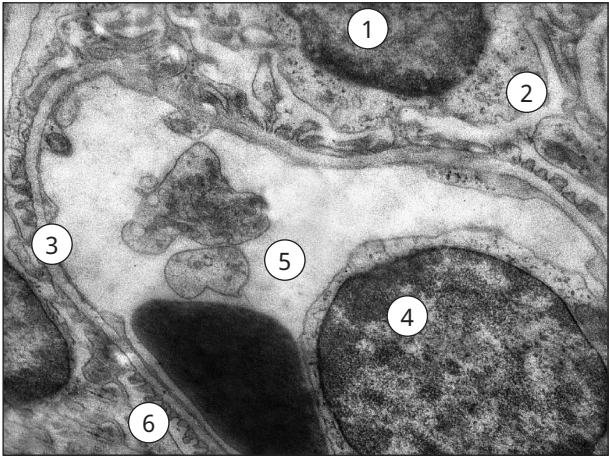


Рис. 7.37. Фрагмент гемокапіляра судинного клубочка ниркового тільця. Нирка миші лінії BALB/c за умов АФС та при застосуванні аміногуанідину. Ядро (1) і цитоплазма подоцита (2), базальна мембрана (3), ядро ендотеліюцита (4), просвіт капіляра (5), цитоподії (6).  $\times 13\ 000$ .

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 фрагмен-

товані, канальці ендоплазматичної сітки незначно розширені, наявні численні рибосоми. Складки плазмолемі виявляються, проте розташовані вони неупорядковано. Базальна мембрана на основному протязі чітка, незначно потовщена.

Мікрворсинки апікальної поверхні епітеліоцитів канальців нефрона частково фрагментовані, однак не так значно, як у групі тварин з АФС (рис. 7.38).

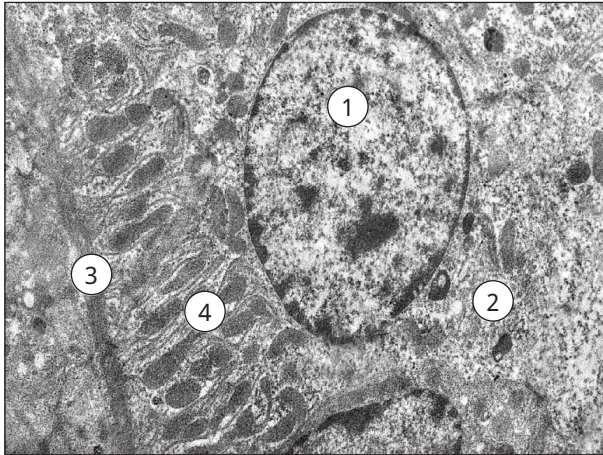


Рис. 7.38. Субмікроскопічні зміни епітеліоцита проксимального віділу нефрона. Нирка миші лінії BALB/c при АФС та застосуванні аміногуанідину. Базальна частина клітини. Ядро (1), цитоплазма епітеліоцита (2), базальна мембрана (3), базальна посмугованість (4).  $\times 12\ 000$ .

Базальна поверхня цитоплазми епітеліоцитів у дистальних відділах нефрона містить непротяжні мембранні складки, проте вони чітко контуровані. У базальних частинах цитоплазми епітеліоцитів дистальних звивистих канальців мембранні складки також непротяжні, а ті, що є, добре контуровані. Мітохондрії помірно набрякли, з просвітленим матриксом, розміщені впорядковано між складками плазмолемі, епітеліоцитів. Базальна мембрана потовщена, рівномірною (див. рис. 7.38).

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. Ци-

топлазма ендотелійних клітин незначно набрякла, ядра видовженої форми, з чіткими контурами ядерних мембран (рис. 7.39).

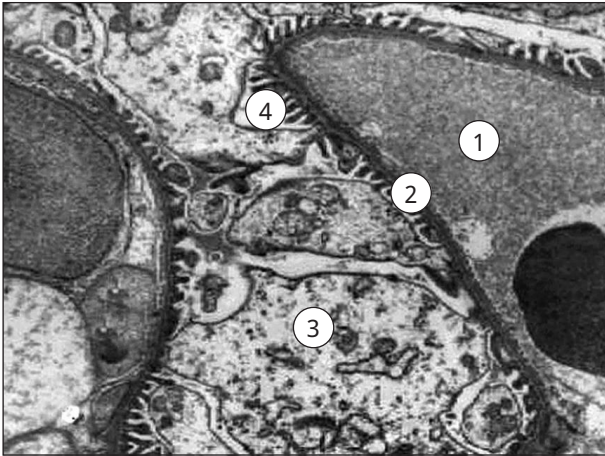


Рис. 7.39. Ультраструктура судинного клубочка ниркового тільця. Нирка миші лінії BALB/c за умов АФС та при застосуванні L-аргініну. Просвіт капіляра (1), базальна мембрана (2), цитотрабекула (3), цитоподії (5).  $\times 11\ 000$ .

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. 7.39).

Вивчення ультраструктурних змін канальців нефрона виявили відновлення структури епітеліоцитів, які вистеляють стінку канальців. Ядра клітин чітко контуровані, наявні численні ядерні пори. Каріоплазма клітин містить переважно еухроматин, виявляються великі ядерця, багато гранул рибосомного типу. Базальна мембрана чітка, не потовщена. Цитоплазма містить мітохондрії, кристи в яких добре контуровані. Відновлюються інші органи за загального призначення (рис. 7.40).

При вивченні субмікроскопічної організації складових структур нефрона при комбінованому застосуванні L-аргініну та аміно-

гуанідину встановлено найсуттєвіше покращення структурної організації компонентів клітин органа, порівняно з нирками тварин з АФС.

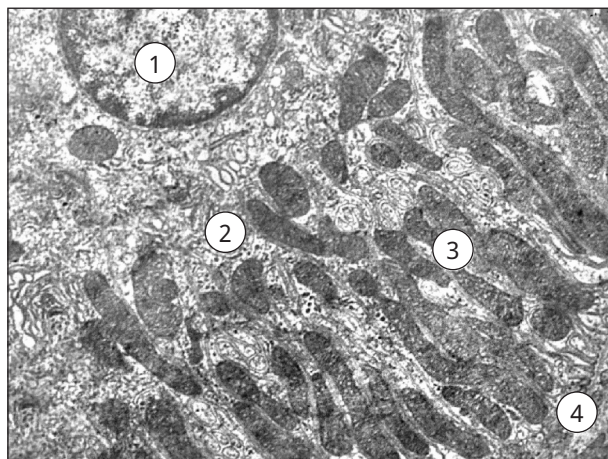


Рис. 7.40. Ультраструктура епітеліоцита дистального відділу нефрона. Нирка миші лінії BALB/c за умов АФС та при застосуванні L-аргініну. Ядро епітеліоцита (1), цитоплазма (2), мітохондрії (3), базальна мембрана (4).  $\times 13\ 000$ .

Кровоносні капіляри судинних клубочків з неширокими просвітами, в яких наявні поодинокі еритроцити, лейкоцити. Цитоплазма ендотеліальних клітин помірно осміюфільна, 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. 7.41).

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 рибосомні

гранули та наявні ядерця. Апікальна частина клітин містить довгі мікрворсинки, структура яких збережена.

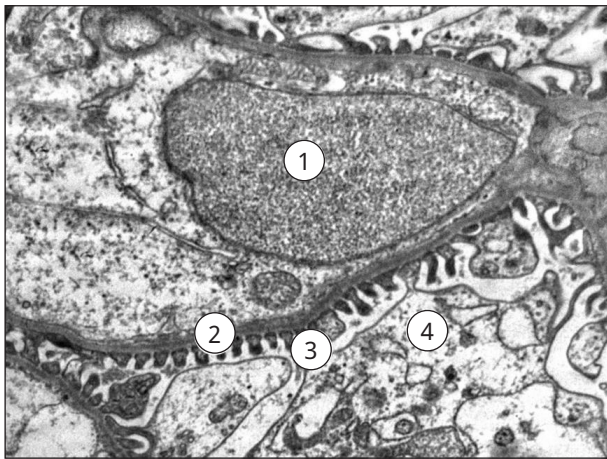
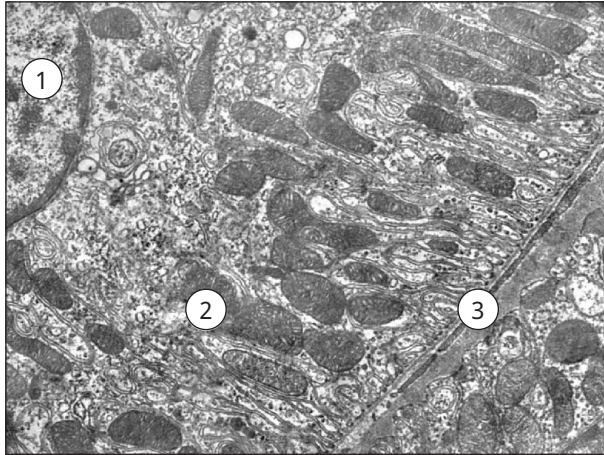


Рис. 7.41. Ультраструктура судинного клубочка ниркового тільця. Нирка миші лінії VALB/c за умов АФС та при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину. Ядро ендотеліоцита (1), базальна мембрана (2), цитотрабекула (3), цитоподії (4).  $\times 13\ 000$ .

Складки мембран плазмолемі базальної частини клітин чітко виражені та формують базальну посмугованість, між ними впорядковано розміщені митохондрії. Базальна мембрана збережена, чітка, не потовщена (рис. 7.42).

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 канальців. 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 канальців нефрона забезпечує відносну нормалізацію фаз сечоутворення у нирках піддослідних тварин.



*Рис. 7.42.* Ультраструктура епітеліоцита нефрона. Нирка миші лінії BALB/c за умов АФС та при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину. Ядро епітеліоцита (1), гіпертрофовані мітохондрії (2), базальна мембрана (3). × 12 000.

**МЕХАНІЗМИ ДІЇ МОДУЛЯТОРІВ СИСТЕМИ  
НІТРОГЕН ОКСИДУ (L-АРГІНІНУ  
ТА АМІНОГУАНІДИНУ) ЗА УМОВ  
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО  
АНТИФОСФОЛІПІДНОГО СИНДРОМУ**

АФС – аутоімунне захворювання, що характеризується наявністю в крові антитіл до негативно заряджених фосфоліпідів мембран [8, 9, 203]. Взаємодія антитіл із фосфоліпідами клітинних мембран призводить до порушення функцій клітин, процесів згортання крові [20]. Зв'язування аФЛ з  $\beta$ 2ГПІ в ендотелійних клітинах, моноцитах і тромбоцитах індукує передачу сигналів, здатних стимулювати прокоагулянтні та прозапальні зміни, експресію молекул адгезії і вивільнення тканинних факторів та інгібіторів фібринолізу [200].

АФС характеризується рецидивними венозними і артеріальними тромбозами, різними формами акушерської патології, тромбоцитопенією, різноманітними неврологічними, серцево-судинними, гематологічними та іншими порушеннями [35, 37, 107, 220, 307, 399].

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 [6]. 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 [6, 9, 123].

Одним із основних та найнебезпечніших проявів АФС є ендотелійна дисфункція, опосередкована аФЛ, що поєднується з рецидивним тромбозом [22, 23]. Відомо, що при АФС в ендотелії порушуються синтез та біодоступність нітроген оксиду (NO), який бере участь у регуляції судинного тонуусу і коагуляційних властивостей крові [25, 161]. Разом з тим, на моделі АФС, викликаного ліпополі-

сахаридами, 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 індуцибельною NO-синтазою, збільшує маткові скорочення і ризик невиношування вагітності [25, 135].

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 [23, 183].

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 індуцибельної 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 [149, 152, 400, 401]. Синтез NO є регульованим процесом і може гальмуватись інгібіторами NOS, зокрема аміногуанідином, який пригнічує індуцибельну ізоформу ензиму [152].

АФС відтворювали за допомогою кардіоліпіну [121] 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 допомо-



гою реакції мікропреципітації з кардіоліпіновим антигеном, що підтверджувало розвиток АФС [121].

Про стан системи гемостазу піддослідних тварин робили висновки за такими показниками: активований частковий тромбoplastиновий час, протромбіновий час, протромбіновий індекс, міжнародне нормалізоване відношення, концентрація фібриногену, кількість тромбоцитів; про стан судинного ендотелію – за кількістю циркулюючих ендотелійних клітин, електронномікроскопічними змінами; про стан системи NO – за вмістом eNOS та iNOS у сироватці крові та печінці, за вмістом стабільних метаболітів NO нітрит-аніона ( $\text{NO}_2^-$ ) та нітрат-аніона ( $\text{NO}_3^-$ ) 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  $\beta$ -актину в печінці; про показники цитокінового профілю – за концентрацією IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , 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 ендотелійної дисфункції у патобіохімічних механізмах розвитку АФС [17, 23, 183, 294] та пору-

шення синтезу і біодоступності NO в ендотелії [24, 25, 135, 402]. Одним із механізмів виникнення патологічних змін є інгібування eNOS під впливом аФЛ [137, 402]. 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 $\beta$ , IL-6 та TNF- $\alpha$  [146].

Отримані результати щодо зниження вмісту NO<sub>2</sub><sup>-</sup> та збільшення вмісту NO<sub>3</sub><sup>-</sup> у сироватці крові та печінці за умов АФС до вагітності та під час вагітності свідчать про дисрегуляцію синтезу NO та порушення функції ендотелію [24]. J. Delgado Alves et al. на мишачій моделі АФС показали, що утворення аФЛ супроводжується зниженням рівня NO у плазмі крові [134]. За даними [24], при АФС середній рівень NO<sub>2</sub><sup>-</sup> у плазмі крові знижується, тоді як середній вміст нітротирозину підвищується, а рівень нітратів плазми крові обернено пропорційний титрам аФЛ.

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<sub>2</sub><sup>-</sup> на 28 % та NO<sub>3</sub><sup>-</sup> на 20 %, порівняно з контролем. Проте у досліджуваних зразках півкуль великого мозку вагітних мишей BALB/c за умов АФС відбувається достовірно зниження вмісту NO<sub>2</sub><sup>-</sup> на 15 % та NO<sub>3</sub><sup>-</sup> на 19 %, порівняно з контролем. Отримані нами результати досліджень узгоджуються з даними літератури про те, що синтез і біодоступність NO порушуються при акушерському АФС [123]. 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 [26].

Установлено, що за умов АФС у нирках вміст NO<sub>2</sub><sup>-</sup> зростав у 1,9 раза, а NO<sub>3</sub><sup>-</sup> – у 2,2 раза, порівняно з контролем. У мишей з АФС на 18-й день вагітності у нирках відбувалося збільшення вмісту NO<sub>2</sub><sup>-</sup> у 1,9 раза та NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 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 па-

радоксальна 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 [193, 194], що підтверджується зниженням вмісту  $\text{NO}_2^-$  у печінці. Зростання рівня  $\text{NO}_3^-$  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 [137]. Індуковані аФЛ зміни ендотеліоцитів відіграють важливу роль в адгезії клітин до ендотелію [134, 163, 402]. 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 [129].

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 [21]. Антитіла до фосфатидилсерину, взаємодіючи з фосфоліпідами мембран тромбоцитів і ендотелійних клітин, викликають порушення, які провокують розвиток тромбозів та тромбоемболій [203]. Підвищення концентрації фібриногену є одним із основних факторів ризику виникнення серцево-судинних захворювань, зокрема, призводить до розвитку тромботичних ускладнень та інфаркту міокарда [403]. Є дані про зростання рівня фібриногену в крові хворих на СЧВ. Встановлено, що при СЧВ зростає позаклітинне фосфорилування фібриногену, що корелює із активацією тромбоцитів. Дослідження демонстру-

ють участь аФЛ у розвитку тромбозів при СЧВ, але досі залишається незрозумілим механізм дії цих антитіл [404].

Встановлено, що у невагітних та вагітних мишей з АФС відбувається вкорочення АЧТЧ на 19 % та на 46 %, що свідчить про підвищену здатність до тромбоутворення. За іншими даними [404], аФЛ можуть викликати збільшення активованого часткового тромбопластинового часу і протромбінового часу.

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 [123].

Система цитокінів представлена рядом протеїнів або глікопротеїнів, які виробляються переважно активованими лімфоцитами і моноцитарно-макрофагальною системою, а також, меншою мірою, фібробластами, ендотелійними, соматичними клітинами, клітинами ендометрія і трофобласта [4, 208, 228]. Одним із центральних прозапальних цитокінів при АФС є TNF- $\alpha$ , рівень якого відображає патологічні процеси в ендотелійних клітинах. аФЛ і TNF- $\alpha$  можуть активувати ендотелій та індукувати протромботичний фенотип ендотелійних клітин, що призводить до збільшення вироблення тромбіну. Активація ендотелійних клітин викликає підвищення регуляції TF, що було запропоновано як основний потенційний механізм тромбозу, пов'язаного з АФС [234]. Отримані нами результати про підвищення концентрації прозапальних цитокінів IL-1 $\beta$  у 3,2 раза, IL-6 у 2,3 раза, TNF- $\alpha$  в 4,5 раза у сироватці крові експериментальних тварин з АФС узгоджуються з даними інших авторів [247, 248, 405]. Не з'ясовано до кінця, чи аФЛ діють на ендотелійні клітини безпосередньо, чи через посередництво TNF- $\alpha$ . Незалежно від механізму, протромботичний стан, типовий для АФС, пов'язаний як із значно підвищеними рівнями аФЛ, так і з підвищеними концентраціями TNF- $\alpha$  [230]. Як свідчать результати дослідження R. R. Forastiero і співавт. [248], рівень IL-6 у пацієнтів з АФС та носіїв аФЛ був вищий, ніж у контрольній групі. Концентрація TNF- $\alpha$  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 [226].

Приєднання аФЛ до поверхні ендотелійних клітин, крім активації факторів тромбоутворення, пригнічує синтез ендотелієм протизапальних цитокінів [40, 227]. 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 [226], маркери ендотелійної 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 ендотелійної дисфункції, атеросклерозу, артеріальних та венозних тромбозів. За результатами дослідження [230], рівні цитозольних IL-10 і гамма-інтерферону (IFN- $\gamma$ ) 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 [226].

Порушення цитокінового балансу з переважанням прозапальних цитокінів може обумовлювати порушення нормального розвитку трофобласта, що зумовлює ризики переривання вагітності [4]. Антитіла проти  $\beta$ 2ГПІ активують продукцію цієї групи цитокінів під час вагітності, що може провокувати запалення і загибель клітин трофобласта [5, 208]. У вагітних мишей лінії BALB/c з АФС встановлено зростання концентрації прозапальних цитокінів IL-1 $\beta$  у 4,6 раза, IL-6 у 3,5 раза, TNF- $\alpha$  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 [229] було повідомлено про підвищення рівня TNF- $\alpha$  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- $\gamma$  і TNF- $\alpha$  були низькими. Отже, підвищення рівня цих цитокінів може бути предиктором викиднів [229].

При взаємодії аФЛ із фосфоліпідами мембран розвивається дисбаланс компонентів цитокінових і кінінових каскадів, реалізуються процеси апоптозу та некрозу [30, 220]. 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 [252].

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 [183, 406] 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 [272, 273].

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 [285, 286, 287]. 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 [407]. За даними J. Delgado Alves et al., на експериментальній моделі АФС показали, що утворення аФЛ супроводжується посиленням оксидативним стресом у плазмі крові [134]. Інші вчені у експериментах *in vitro* продемонстрували, що анти-β2ГПІ антитіла, залежно від дози, посилюють вироблення супероксид-

ного аніон-радикала та TF у моноцитах, що сприяє активації системи згортання крові [408].

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 [409]. Каспази розглядають як ефекторні молекули програмованої смерті клітин, зокрема каспаза-3 відіграє важливу роль у реалізації як мітохондрійного, так і рецепторного шляху запуску апоптозу. Саме оцінка активності каспаз-3 вважається одним з основних методів визначення рівня апоптозу [280]. 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  $\beta$ -актину, який бере участь у регуляції реалізації процесів апоптозу, стабілізуючи рецептори TNF- $\alpha$  [283].

Відомо, що при пошкодженні нервової тканини відбуваються інтенсивна проліферація та гіпертрофія астроцитів [371, 410, 411]. Не виключено, що тромботична оклюзія капілярів у поєднанні з легким запаленням може лежати в основі неврологічних дисфункцій, виявлених у мишей з АФС [412]. 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 [371, 411]. 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 [371, 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 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 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 [371, 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 [371].

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. MBP 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 [386].

Властивості MBP дозволяють пов'язати порушення його метаболізму з розвитком процесу демієлінізації [379, 413]. 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 хронічного стадії хвороби, при якій демієлінізація набуває незворотного характеру [379].

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 SH<sub>3</sub>-доменами, участь в опосередкованих Fyn-сигнальних шляхах та підтримку гомеостазу кальцію [414].

Отримані нами результати вказують на активацію процесів ремієлінізації у мишей з експериментальним АФС, що можна розглядати як компенсаторну відповідь на пошкодження. Підсилення деградації MBP 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 [381]. 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 [415].

При пошкодженні білої речовини мозку при АФС можуть мати значення нейроспецифічні антитіла (антитіла до основного протеїну мієліну, гліального фібрилярного кислого протеїну і нейроспецифічної енолази). Водночас визначення аутоантитіл у сироватці крові до протеїнів нервової тканини має важливе діагностичне значення у жінок під час вагітності [129, 416].

Підвищення вмісту аутоантитіл пов'язане з невиношуванням вагітності і хронічною плацентарною недостатністю та гестозами [129]. 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 [29, 134]. 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 [343, 346]. Вказані зміни супроводжувались порушенням тканинного дихання у мозочку та півкулях великого мозку, про що свідчило зменшення активності мітохондрійних СДГ та ЦХО, по-

рівняно 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 [29]. Відомо, що збільшення продукування супероксидного аніон-радикала на початкових етапах розвитку оксидативного стресу може індукувати зростання активності СОД [357]. 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.

Установлено, що в 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 [71]. 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 канальців. 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.

За даними [328], порушення функції нефроендотеліоцитів підсилює продукцію ренального фактора Віллебранда, молекул клітинної адгезії і тромбомодуліну. Ендотелійна 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 [328]. 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  $\beta$ 2ГПІ, яка спостерігається в ниркових ендотелійних клітинах пацієнтів із вовчаковим нефритом, відіграє важливу роль у розвитку АФС-нефропатії [38, 329, 332].

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  $O_2^{\cdot -}$ ; який швидко зв'язує і інактивує NO [25, 26, 146]. 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  $\text{NO}_3^-$  збільшувався, порівняно з показниками тварин з АФС. У півкулях великого мозку тварин з АФС на 18-й день вагітності, яким вводили L-аргінін, вміст  $\text{NO}_2^-$  збільшувався на 29 %, а вміст  $\text{NO}_3^-$  – на 36 %, порівняно з показниками вагітних мишей з АФС. Введення L-аргініну вагітним тваринам з АФС у мозочку не супроводжувалося змінами вмісту  $\text{NO}_2^-$ , а вміст  $\text{NO}_3^-$  зростав, у печінці – встановлено зростання вмісту  $\text{NO}_2^-$  на 92 % та  $\text{NO}_3^-$  на 19 %, у нирках – встановлено зростання вмісту  $\text{NO}_2^-$ , а вміст  $\text{NO}_3^-$  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 тромбоеутворення. Введення L-аргініну вагітним мишам з АФС супроводжувалося зниженням концентрації фібриногену, подовженням АЧТЧ у 2,1 раза, 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 вве-

денні попередника NO L-аргініну тваринам з АФС відбувається зниження вмісту IL-1 $\beta$  та IL-6, порівняно з показниками тварин з АФС.

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 прозапальних цитокінів IL-4, IL-10, IL-13 індукує експресію ензиму аргінази I. Аргіназа I регулює синтез NO шляхом зменшення доступності L-аргініну [190, 195, 400, 401]. NO може індукувати синтез білка теплового шоку Hsp 70, який захищає гепатоцити від дії TNF- $\alpha$  [289].

Апоптотичні клітини відіграють роль імуногенів для індукції аФЛ, водночас фосфоліпіди та білково-фосфоліпідні комплекси, що утворюються під час апоптозу, є мішенню для аФЛ [252, 253, 259, 269]. NO індукує апоптоз за допомогою модуляції численних рецепторів сигнальних шляхів, включаючи рецептор смерті та мітохондрійні шляхи [261, 417]. 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) [289].

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 мітохондрійні шляхи апоптозу [263]. Ключовим регуляторним білком мітохондрійного шляху апоптозу є Bcl-2, експресія якого регулюється посттрансляційними модифікаціями. Bcl-2 зазнає S-нітрозилування, у відповідь на численні апоптотичні медіатори, і ця модифікація інгібує убіквітин-протеасомну деградацію Bcl-2. Інгібування продукції NO ефективно інгібує S-нітрозилування Bcl-2 та сприяє загибелі апоптотичних клітин [418]. Показано, що під впливом донатора NO – нітропрусиду натрію – збільшується співвідношення Вах/ Bcl-2 [268].

В індукції активації лейкоцитів при АФС відіграють роль медіатори запалення [273]. Встановлено, що при введенні L-аргініну тваринам з АФС у крові відбувалося подальше зростання кількості гранулоцитів, кількість агранулоцитів знижувалася на 25 %, від-

носно 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 [173]. NO характеризується протективним ефектом на Fas-R-індукований апоптоз у гепатоцитах та в активованих Т-лімфоцитах [289]. Під впливом попередника NO L-аргініну у тканині печінки мишей з АФС встановлено зниження вмісту каспази-3 та  $\beta$ -актину, відносно групи тварин з АФС. У групі вагітних мишей з АФС введення L-аргініну також супроводжувалося зниженням вмісту каспази-3 на 44 % та  $\beta$ -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 [152]. NO може інгібувати мітохондрійний шлях апоптозу через блокування вивільнення проапоптотичних білків: цитохрому c, AIF, Omi/HtrA2, Diablo/Smac [289].

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 GFAP (37 kDa) на 71 %, порівняно із показниками групи вагітних мишей з АФС. Ймовірно, зниження вмісту GFAP (37 kDa) у вагітних мишей з АФС відбувається завдяки антиоксидантним властивостям L-аргініну [382].

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 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 MBP, з метою діагностики різних захворювань, що супроводжуються нейродеструктивними процесами [386].

Як показали результати досліджень, при застосуванні попередника NO L-аргініну в мозочку мишей лінії BALB/c з АФС до вагітності та при вагітності не відбувається достовірних змін вмісту олігомерних форм MBP у діапазоні молекулярних мас 95–110 kDa, порівняно із показниками групи тварин з АФС. Встановлено, що введення L-аргініну не впливало на вміст MBP (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 MBP (18,4 kDa) в 4,8 рази, 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 MBP (95–110 kDa) та субодиниці MBP (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 [26, 134]. NO відіграє важливу роль у функціонуванні головного мозку, він залучений як до вторинного пошкодження, так і до неврологічного відновлення [365].

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 електронотранс-



портного 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 мітохондрійних 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  $\text{NO}_2^-$  достовірно не змінювався, а вміст  $\text{NO}_3^-$  зростав незначно.

Вплив NO може регулюватися його клітинною локалізацією та рівнем оксидативного стресу в тканині [365]. Реактивні астроцити мають ряд молекулярних механізмів захисту від пошкодження [370], 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 [266, 419, 420].

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 лі-

підів, 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 мітохондрійних 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 мітохондрійних 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 [352, 365].

При проведенні гістологічних досліджень печінки у тварин з АФС, яким вводили L-аргінін, зберігаються дисциркуляторні порушення. Разом з тим, міжчасточкові, центральні під- і навколо-часточкові 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 – центробулярних. При проведенні субмікроскопічних досліджень при застосуванні L-аргініну за умов АФС виявлено ознаки відновлення ультраструктури гепатоцитів, гемокапілярів часточок печінки та ендотелійних 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 [329]. 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 мітохондрійних 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 канальців, 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 рибосомних 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 ендотелійних клітин гемокапілярів нирок під впливом L-аргініну.

Аміногуанідин – це конкурентний інгібітор індукбельної ізоформи NOS [32, 196]. 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  $\text{NO}_2^-$  достовірно не відрізнявся, а вміст  $\text{NO}_3^-$  знижувався на 56 % та 50 %. У мозочку тварин з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності, яким вводили аміногуанідин, знижувався вміст  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$ . 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  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  достовірно не змінювався, порівняно із показниками вагітних мишей з АФС. У печінці вміст  $\text{NO}_2^-$  достовірно не змінювався до вагітності, а на 18-й день вагітності зростав. Вміст  $\text{NO}_3^-$  у печінці вагітних та невагітних мишей з АФС знижувався. Отримані результати можуть бути обумовлені порушенням нітритредуктазного балансу при блокуванні ферментативного синтезу  $\text{NO}$  [197]. У нирках тварин з АФС до вагітності та на 18-й день вагітності, яким вводили аміногуанідин, знижувався вміст  $\text{NO}_2^-$  (на 61 % та 44 %) та  $\text{NO}_3^-$  (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  $\text{TNF-}\alpha$  у вагітних та невагітних тварин з АФС й зростанням концентрації  $\text{IL-4}$  у вагітних самок з АФС [421].

При введенні інгібітора  $\text{iNOS}$  мишам з АФС встановлено зниження вмісту  $\text{AV-GFP}^+$  на 38 % та вмісту  $\text{PI}^+$  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  $\text{iNOS}$  [422]. 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 іNOS аміногуанідину не викликало достовірних змін вмісту каспази-3, а вміст  $\beta$ -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  $\beta$ -актину, порівняно із показниками мишей з АФС на 18-й день вагітності. За даними Dingman A. et al. [290], інгібування іNOS аміногуанідином пригнічує експресію каспази-3, що підтверджується результатами, отриманими у нашому дослідженні.

Регуляторний білок апоптозу мітохондрійного шляху Bcl-2 знає S-нітрозилювання у відповідь на численні апоптотичні медіатори [418]. Підвищене співвідношення Bax/Bcl-2, у свою чергу, призводить до підвищення мітохондрійної 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 мітохондрійну проникність, тоді як більш високі, ніж фізіологічні, концентрації прискорюють відкриття пор мітохондрій та вихід цитохрому c [423].

При АФС спостерігається підвищення активності індукцйбельної ізоформи NOS, яка може утворюватися в активованій мікроглії [290] та індукувати численні сигнальні шляхи і призводити до нейрозапалення [384]. При введенні інгібітора іNOS аміногуанідину невагітним та вагітним мишам лінії BALB/c з АФС у мозочку встановлено зниження загального вмісту GFAP на 30 % та 26 % та 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 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 загаль-

ного вмісту GFAP, водночас встановлено зростання вмісту 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 [32].

Як показали результати досліджень, при застосуванні аміногуанідину у мозочку мишей лінії BALB/c з АФС до вагітності не відбувається достовірних змін вмісту олігомерних форм MBP (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 MBP (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 субодиноці MBP (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 [368].

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 [368]. 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 [32, 369].

Отже, аміногуанідин за умов експериментального АФС проявляє антиоксидантні властивості, його дія спрямована на відновлення активності та вмісту компонентів АОС, ензимів електронотранспортного 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 ультраструк-

турної деструкції. Разом з тим, у потовщених, набряклих ділянках цитоплазми ендотеліоцитів розташовано небагато органел. Невеликих розмірів округлі мітохондрії цих клітин включають електронно-світлий матрикс, у якому мало крист. Простори Діссе нерівномірні, кількість мікрворсинок в них невелика. В складі стінки ендотелійних 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 гемокapілярів 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  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  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  $\text{NO}_2^-$  збільшувався на 25 % та 38 %, а вміст  $\text{NO}_3^-$  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  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$ . У півкулях великого мозку тварин з АФС знижувався вміст  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$ . 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  $\text{NO}_2^-$  збільшувався на 25 %, а вміст  $\text{NO}_3^-$  достовірно не змінювався, порівняно з показниками мишей з АФС. У печінці вагітних тварин з АФС, яким вводили L-аргінін у комбінації з аміногуанідином, вміст  $\text{NO}_2^-$  зростав на 186 %, а вміст  $\text{NO}_3^-$  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 індуцибельної 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 цитокинового балансу з переважанням прозапальних цитокінів може обумовлювати порушення нормального розвитку трофобласта, що зумовлює ризики переривання вагітності [4].

При застосуванні L-аргініну в комбінації з аміногуанідином встановлено достовірне зниження концентрації IL-1 $\beta$  на 30 %, IL-6 на 16 %, TNF- $\alpha$  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 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  та зростання концентрації IL-4 та IL-10, порівняно з показниками групи вагітних тварин з АФС. Отже, на фоні інгібування індукцйбельної NO-синтази аміногуанідином спостерігається збереження позитивного впливу L-аргініну на цитокиновий 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 $\beta$  активує синтез IL-6 та iNOS, викликаючи підвищений синтез NO. Прозапальні цитокіни TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2 також збільшують рівень iNOS [233, 400].

Одним з найважливіших маркерів запалення є TNF- $\alpha$  [229]. У дослідженні Aljameil N. et al. [229] встановлено підвищення рівня TNF- $\alpha$  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- $\gamma$  і TNF- $\alpha$  були низькими у вагітних жінок із нормальним перебігом вагітності. аФЛ викликають швидке підвищення децидуальних та системних рівнів

TNF- $\alpha$ . аФЛ збільшують TF в нейтрофілах, що посилює оксидативний вибух і, таким чином, активує механізми пошкодження трофобласта та втрати вагітності [201, 244]. Відомі різні механізми, через які TNF- $\alpha$  може спричиняти втрату вагітності. Зокрема, він підсилює синтез простагландинів, що призводить до скорочення матки [4]. Інший механізм – це участь TNF- $\alpha$  в процесах апоптозу. Підвищений рівень TNF- $\alpha$  негативно впливає на імплантацію ембріона і зменшує приплив крові до нього, що призводить до тромбозу в судинах. Підвищення рівня сироваткового TNF- $\alpha$  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- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , та збільшення концентрації протизапальних цитокінів, зокрема IL-10 [229].

За даними Венцківської І. Б. та ін. (2011) [40], 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 збереження вагітності і запобігання відторгненню плідного яйця, до яких належать посилення гуморального імунітету і продукції цитокінів Th2 (IL-4, IL-10) [4]. За даними Венцківської І. Б. та ін. (2011) [40], 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 iNOS та утворення АФО є критичними компонентами ефективної імунної відповіді [424].

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  $\beta$ -актину в тварин з АФС до вагітності та зниження вмісту  $\beta$ -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  $\beta$ -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-нітрозилювання пов'язане з пригніченням апоптозу [263, 291]. 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 [152].

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 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 GFAP (37 kDa) на 66 %. Проте, встановлено зростання вмісту 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 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 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 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 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 GFAP (37 kDa), порівняно із показниками вагітних тварин з АФС, яким вводили окремо L-аргінін та аміногуанідин.

NO через шлях GC-sGMP-PKG бере участь у регулюванні експресії GFAP в астроцитах. аФЛ здатні впливати на проліферацію астроцитів. Підвищена експресія GFAP характеризує активацію астроглії та гліоз під час нейродегенерації [385].

При комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину у мозочку вагітних мишей з АФС встановлено зниження вмісту олігомерних форм MBP (95–110 kDa), відносно тварин з АФС. Встановлено, що при комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину вагітним мишам з АФС у мозочку вміст MBP (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 субодиноці MBP (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 субодиноці MBP

(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 MBP (95–110 kDa) та зростанням вмісту субдиниці MBP (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 субдиниці MBP (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 MBP у тварин з АФС на фоні розвитку реактивного астрогліозу може бути одним із шляхів активної перестройки компонентів пошкоджених мієлінових оболонки.

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 мітохондрійних 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 гепа-

топротекторної 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 ендотелійних клітин включає невеликих розмірів добре структуровані органели. Помірно розширені короткі канальці гранулярної ендоплазматичної сітки та просвітлений матрикс окремих мітохондрій. Вузькі цитоплазматичні ділянки ендотеліоцитів мають багато піноцитозних пухирців, добре виражені перфорації. У просторах Діссе спостерігаються численні мікрворсинки, 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 електронотранспортного 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 канальців, особливо дистальних, чіткі, не розширені. Структурна організація збірних канальців 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 [166]. Важливу роль відіграє баланс між ендогенними факторами, які забезпечують вазоконстрикцію та вазодилатацію у функціонуванні ендотелію. Ендотелійна дисфункція розвивається за умов пригнічення здатності ендотелію синтезувати вазодилатори, тоді як вміст судинозвужуючих факторів зберігається або зростає. Основним проявом ендотелійної дисфункції є порушення біодоступності NO за рахунок дефіциту його субстрату L-аргініну, порушення експресії eNOS, пришвидшеного метаболізму NO [195].

Застосування попередників NO, збільшуючи кількість субстрату для його синтезу, стимулює утворення NO та зменшує прояви нітрооксидативного стресу [425]. Одним із механізмів дії L-аргініну є відновлення активності ендотелійної NO-синтази через постачання ензиму субстратом [195, 426]. Під час окиснювальної трансформації L-аргінін перетворюється на гідроксиаргінін, який є інгібітором ензиму аргінази, і який через цей механізм може підвищувати кількість внутрішньоклітинного NO. 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. Встановлено, що як попередник NO він приводить до позитивних змін у фетоплацентарному кровообігу в пацієнток з передчасними пологамі. Важливе значення в реалізації дії L-аргініну за умов АФС мають також

його антиоксидантні властивості, які описані при різних патологічних процесах [27, 427].

Застосування іншого попередника NO – S-нітрозо-N-ацетил-DL-пеніциламіну також запобігає інгібувальному впливу аФЛ на eNOS [137]. Відомо, що гідроксихлорохін [428, 429, 430] 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 [135]. 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 [25].

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 блокатормом NOS L-NAME у мишей, дослідниками застосовано прогестерон, який сприяє синтезу NO, активуючи iNOS у матці вагітних, та призводить до зменшення скоротливої активності матки [431].

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 [27].

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. 8.1).

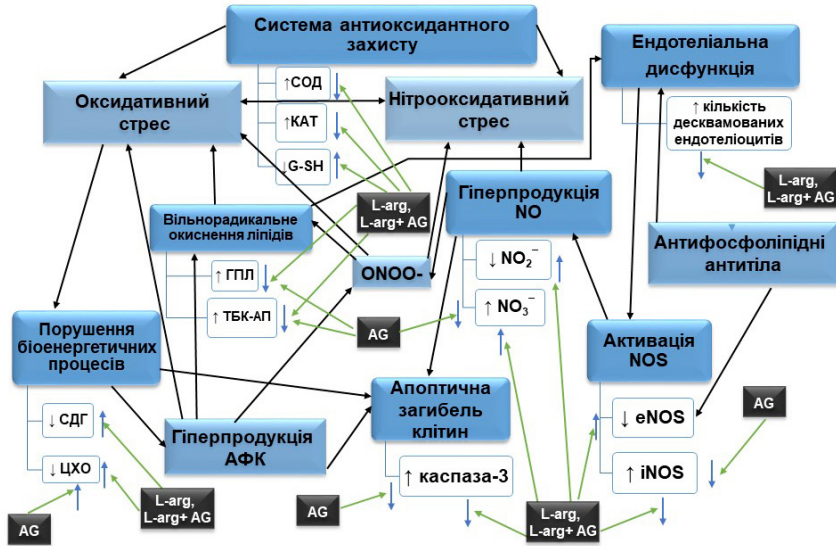


Рис. 8.1. Механізми реалізації дії L-аргініну та аміногуанідину при ураженні печінки мишей лінії BALB/c за умов антифосфоліпідного синдрому.

Таким чином, позитивний вплив L-аргініну, зареєстрований у досліджах 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.

Інгібітор індукційної 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. 8.2).

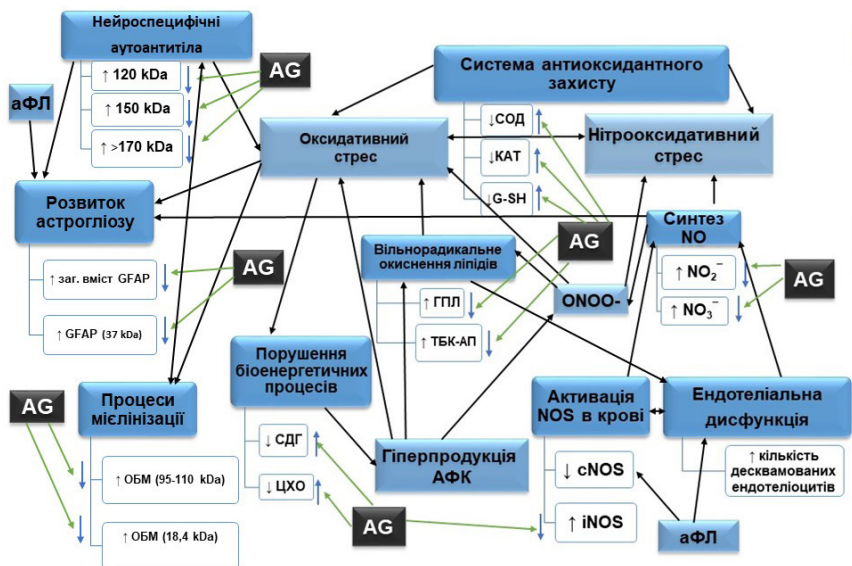


Рис. 8.2. Механізми реалізації дії аміногуанідину при ураженні головного мозку мишей лінії BALB/c за умов АФС.

Комбіноване застосування попередника NO L-аргініну й інгібітора індукційної NOS аміногуанідину переважає за своїм позитивним впливом на патобіохімічні зміни при АФС окреме їх введення. За умов комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину при АФС до вагітності та на її фоні нормалізується рівень синтезу NO, кількість циркулюючих десквамованих ендотеліоцитів, відмічено відновлення показників системи гемостазу і балансу про- та протизапальних цитокінів. Встановлено, позитивний вплив комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину мишам з АФС до вагітності та на її фоні на показники реалізації

апоптозу, що проявляється нормалізацією показників життєздатності лейкоцитів, вмісту АФО у гранулоцитах та агранулоцитах, вмісту каспази-3 і  $\beta$ -актину в печінці.

Встановлено нейропротекторний вплив при комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину за умов АФС, про що свідчить зниження загального вмісту гліального фібрилярного кислого протеїну 49 kDa та його продукту обмеженого протеолізу поліпептиду 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 індучибельної 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 каналців 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.

## КОРОТКИЙ ПІДСУМОК

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

При антифосфоліпідному синдромі у мишей лінії BALB/c встановлено відносну недостатність нітроген оксиду, який утворюється під впливом ендотелійної 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 ендотелійної ізоформи синтази нітроген оксиду у сироватці крові (в 1,4 і 2,2 раза) та печінці (у 2,4 і 4,1 раза) з одночасним зниженням вмісту індукцйбельної ізоформи синтази нітроген оксиду у сироватці крові (в 3,2 і 3,8 раза) та печінці (у 2,3 і 3,3 раза) та нормалізацією вмісту нітрит- та нітрат-аніонів у сироватці крові, печінці, нирках, мозочку, півкулях великого мозку.

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

У крові самок з антифосфоліпідним синдромом зростає концентрація фібриногену, вкорочується 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 згортання 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.

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

Установлено, що в крові невагітних і вагітних мишей за антифосфоліпідного синдрому збільшується кількість гранулоцитів і спостерігається дефіцит продукування активних форм кисню в гранулоцитах та агранулоцитах, а у печінці зростає вміст каспази-3 відповідно в 1,5 і 2,9 рази. 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 нормалі-

зують вміст активних форм кисисену в гранулоцитах та агранулоцитах. Під впливом L-аргініну вміст каспази-3 в печінці вагітних та невагітних тварин із антифосфоліпідним синдромом знизуюється на 16 % та 44 %. Введення аміногуанідину невагітним мишам з антифосфоліпідним синдромом не викликає достовірних змін вмісту каспази-3, а у групі вагітних тварин супроводжується знизенням вмісту каспази-3 на 63 %. При комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину вміст каспази-3 в печінці мишей з антифосфоліпідним синдромом нормалізується.

Установлено зростання загального вмісту гліального фібрилярного кислого протеїну в мозочку невагітних та вагітних мишей з антифосфоліпідним синдромом у 2,8 й 1,9 раза та його продукту обмеженого протеолізу поліпептиду 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 продукту обмеженого протеолізу поліпептиду 37 kDa – в 1,6 та 1,4 раза. Введення L-аргініну невагітним мишам з антифосфоліпідним синдромом підвищує загальний вміст гліального фібрилярного кислого протеїну та поліпептиду 37 kDa в мозочку, та знизує їх рівень у вагітних мишей. Аміногуанідин сприяє зменшенню загального вмісту гліального фібрилярного кислого протеїну і продукту щеплення інтактного поліпептиду (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 знизуюється загальний вміст гліального фібрилярного кислого протеїну і поліпептиду 37 kDa, у півкулях великого мозку даний ефект відмічено тільки у вагітних тварин із антифосфоліпідним синдромом.

У мозочку невагітних та вагітних мишей лінії BALB/c за антифосфоліпідного синдрому збільшується вміст олігомерних форм основного протеїну мієліну (95–110 kDa) у 5,3 та 5,7 раза, порівняно із показниками контролем. У мозочку вагітних тварин з антифосфоліпідним синдромом при окремому введенні аміногуанідину встановлено знизення 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.



Установлено 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.

За антифосфоліпідного синдрому в 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.

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 електронотранспортного ланцюга мітохондрій (сукцинатдегідрогенази, цитохромоксидази). Уведення 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 антифосфо-

ліпідним 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 про-оксиданти – антиоксиданти та активність ферментів тканинного дихання.

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 канальців нефрона, дестабілізацією і деструкцією їх плазматичних та цитоплазматичних мембран. Установлено 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 канальців нефрона нирки, зменшує ушкодження мембранних органел, мембран ендотеліоцитів, гепатоцитів та нефроцитів.

Комбіноване введення L-аргініну та аміногуанідину вагітним та невагітним мишам з антифосфоліпідним синдромом нормалізує рівень нітроген оксиду в 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 процеси реалізації апоптозу та некрозу у лейкоцитах крові та гепатоцитах. L-аргінін та аміногуанідин при комбінованому застосуванні за антифосфоліпідного синдрому 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 електротранспортного ланцюга мітохондрій у печінці, нирках, мозочку та півкулях великого мозку.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Bunn HF, Bruce F. Overview of Hemostasis. *Pathophysiology of Blood Disorders* Eds. Bunn HF, and Aster JC. McGraw Hill, 2011, <https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1191&sectionid=66616762>.
2. 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.000000000000062.
3. Willis R, Gonzalez EB. Pathogenetic mechanisms of antiphospholipid antibody production in antiphospholipid syndrome. *World J Rheumatol*. 2015; 5(2):59-68.
4. 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
5. 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.
6. Таран ОІ. Нефропатії при антифосфоліпідному синдромі. *Почки*. 2014;4(10):74-78.
7. Яремчук ОЗ. Дослідження деяких показників гемостазу при експериментальному антифосфоліпідному синдромі. *Медична та клінічна хімія*. 2015;17(3):76-79.
8. Collict 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.
9. Giannakopoulos B, Krilis SA. The Pathogenesis of the Antiphospholipid Syndrome. *The New England Journal of Medicine*. 2013;368(11):1033-1044. doi: 10.1056/NEJMr1112830.
10. Schreiber K, Hunt BJ. Pregnancy and Antiphospholipid Syndrome. *Semin Thromb Hemost*. 2016;42(7):780-788. doi: 10.1055/s-0036-1592336.
11. 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.
12. 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.
13. 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.

14. Яковенко ОК, Грифф СЛ, Яковенко ТЛ. Антифосфоліпідний синдром під маскою легеневої патології: клінічні спостереження пульмонолога Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія. 2019;7(120):14–23.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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
19. Mayer M, Cerovec M, Rados M. et al. Antiphospholipid syndrome and central nervous system. *Clin Neurol Neurosurg.* 2010;112(7):602–608.
20. Arachchillage DRJ, Laffan M. Pathogenesis and management of antiphospholipid syndrome. *British Journal of Haematology.* 2017;178:181–195.
21. Krone KA, Allen KL, McCrae KR. Impaired Fibrinolysis in the Antiphospholipid Syndrome. *Curr Rheumatol Rep.* 2010;12(1):53–57.
22. 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.
23. Wijetilleka S, Scoble T, Khamashta M. Novel insights into pathogenesis, diagnosis and treatment of antiphospholipid syndrome. *Curr Opin Rheumatol.* 2012;24(5):473–81.
24. Ames PR, Batuca JR, Ciampa A, Iannaccone L, Delgado Alves J. Clinical relevance of nitric oxide metabolites and nitrate stress in thrombotic primary antiphospholipid syndrome. *The Journal of rheumatology.* 2010;37(12):2523–2530.
25. 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.
26. Lopez-Pedreria 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.
27. 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.
28. Rahman A. Antiphospholipid syndrome in pregnancy. *Indian J Rheumatol* 2016;11:117–21.
29. 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.

30. 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.

31. Cervera R. Antiphospholipid syndrome *Thrombosis Research*. 2017; 151(1):43–47.

32. 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.

33. 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.

34. de Groot PG. Platelets as pivot in the antiphospholipid syndrome. *Blood*. 2014;124(4):475–476.

35. Forastiero R. Bleeding in the antiphospholipid syndrome. *Hematology*. 2012;1:153-155. doi: 10.1179/102453312X13336169156654.

36. Gris JC, Bouvier S. Antiphospholipid syndrome: looking for are focusing. *Thromb. Res*. 2013;131(1):28–31.

37. Головач ІЮ, Єгудіна ЄД. Кардіоваскулярні маніфестації у пацієнтів з антифосфоліпідним синдромом: питання діагностики та менеджменту. *Артеріальна гіпертензія*. 2019;5-6 (67-68):35–44.

38. Sciascia S, Baldovino S, Schreiber K, Solfiatti L, Roccatello D. Antiphospholipid Syndrome and the Kidney. *Semin Nephrol*. 2015;35(5):478–486. doi:10.1016/j.semnephrol.2015.08.009.

39. Sciascia S, Radin M, Bazzan M, et al. Antiphospholipid Antibodies and Infection: Non Nova Sed Nove. *Front Immunol*. 2021;12:687534. Published 2021 Jun 16. doi:10.3389/fimmu.2021.687534

40. Венцківська ІБ, Біла ВА, Загородня ОС. Роль прихованих тромбофілічних станів у патогенезі загрози передчасних пологів. *Здоров'я жінки*. 2011;2:173–176.

41. Khangura RK, Loza DO, Cooper S, Luo GY. Catastrophic Antiphospholipid Antibody Syndrome: Clinical Presentation, Management, and Guidance for Future Pregnancy. *Maternal-Fetal Medicine* 2019;1(1):53-58.

42. Zdrojewski Z. Systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome - diagnostic and therapeutic problems. *Wiad Lek*. 2018;71:40-46.

43. Kokosi M, Lams B, Agarwal S. Systemic Lupus Erythematosus and Antiphospholipid Antibody Syndrome. *Clin Chest Med*. 2019 Sep;40(3):519-529. doi: 10.1016/j.ccm.2019.06.001. PMID: 31376888.

44. Cárdenas Suri H, Jimomila Bening D. Catastrophic antiphospholipid antibody syndrome and multiple organ dysfunctions in critically ill patients with COVID-19. *Expert Rev Respir Med*. 2020 Nov;14(11):1071-1072. doi: 10.1080/17476348.2020.1801427. Epub 2020 Aug 11. PMID: 32746642.

45. Vreede AP, Bockenstedt PL, McCune WJ, Knight JS. Cryptic conspirators: a conversation about thrombocytopenia and antiphospholipid syndrome. *Curr Opin Rheumatol*. 2019 May;31(3):231-240. doi: 10.1097/BOR.0000000000000595. PMID: 30747734; PMCID: PMC6455093.

46. Pignatelli P, Ettorre E, Menichelli D, Pani A, Violi F, Pastori D. Seronegative antiphospholipid syndrome: refining the value of "non-criteria" antibodies for diagnosis and clinical management. *Haematologica*. 2020 Mar; 105(3):562-

572. doi: 10.3324/haematol.2019.221945. Epub 2020 Jan 30. PMID: 32001534; PMID: PMC7049333.

47. Knight JS, Kanthi Y. Mechanisms of immunothrombosis and vasculopathy in antiphospholipid syndrome. *Semin Immunopathol.* 2022 May; 44(3):347-362. doi: 10.1007/s00281-022-00916-w. Epub 2022 Feb 4. PMID: 35122116; PMID: PMC8816310.

48. 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.

49. 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.

50. Sciascia S, Amigo MC, Roccatello D, Khamashta M. Diagnosing antiphospholipid syndrome: 'extra-criteria' manifestations and technical advances. *Nat Rev Rheumatol.* 2017 Sep;13(9):548-560. doi: 10.1038/nrrheum.2017. 124. Epub 2017 Aug 3. PMID: 28769114.

51. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, Derksen RH, DE Groot PG, Koike T, Meroni PL, Reber G, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyiannopoulos PG, Krilis SA. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost.* 2006 Feb;4(2):295-306. doi: 10.1111/j.1538-7836.2006. 01753.x. PMID: 16420554.

52. 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.

53. Branch DW. What's new in obstetric antiphospholipid syndrome. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2019;2019(1):421-425.

54. Gardiner C, Hills J, Machin SJ, Cohen H. Diagnosis of antiphospholipid syndrome in routine clinical practice. *Lupus.* 2013; 22(1):18-25. doi: 10.1182/hematology.2019000043.

55. Yasuda S. Disseminated intravascular coagulation in the presence of antiphospholipid antibodies: the differential diagnosis from catastrophic or microangiopathic antiphospholipid syndrome. *Intern Med.* 2013;52(2):169-70. doi: 10.2169/internalmedicine.52.8970. Epub 2013 Jan 15. PMID: 23318844.

56. Park YH. Diagnosis and management of thrombocytopenia in pregnancy. *Blood Res.* 2022 Apr 30;57(S1):79-85. doi: 10.5045/br.2022.2022068. PMID: 35483931; PMID: PMC9057658.

57. Schreiber K, Hunt BJ. Managing antiphospholipid syndrome in pregnancy. *Thromb Res.* 2019 Sep;181 Suppl 1:S41-S46. doi: 10.1016/S0049-3848(19)30366-4. PMID: 31477227.

58. Alijotas-Reig J, Esteve-Valverde E, Anunciación-Llunell A, Marques-Soares J, Pardo-Gea J, Miró-Mur F. Pathogenesis, Diagnosis and Management of Obstetric Antiphospholipid Syndrome: A Comprehensive Review. *J Clin Med.* 2022 Jan 28;11(3):675. doi: 10.3390/jcm11030675. PMID: 35160128; PMID: PMC8836886.

59. Fischer-Betz R, Specker C. Pregnancy in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2017 Jun;31(3):397-414. doi: 10.1016/j.berh.2017.09.011. Epub 2017 Oct 11. PMID: 29224680.

60. 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.

61. Hamulyák EN, Scheres LJ, Marijnen MC, Goddijn M, Middeldorp S. Aspirin or heparin or both for improving pregnancy outcomes in women with persistent antiphospholipid antibodies and recurrent pregnancy loss. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020 May 2;5(5):CD012852. doi: 10.1002/14651858.CD012852.pub2. PMID: 32358837; PMCID: PMC7195627.

62. Piona A, La Rosa L, Tincani A, Faden D, Magro G, Grasso S, Nicoletti F, Balestrieri G, Meroni PL. Placental thrombosis and fetal loss after passive transfer of mouse lupus monoclonal or human polyclonal anti-cardiolipin antibodies in pregnant naive BALB/c mice. *Scand J Immunol*. 1995 May;41(5):427-32. doi: 10.1111/j.1365-3083.1995.tb03588.x. PMID: 7725061.

63. 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 Jan-Feb;21(1):97-118. doi: 10.1093/humupd/dmu049. Epub 2014 Sep 15. PMID: 25228006.

64. 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.

65. Ruiz-Irastorza G, Crowther M, Branch W, Khamashta MA. Antiphospholipid syndrome. *Lancet*. 2010;376:1498-1509.

66. Tebo AE. Antiphospholipid syndrome and the relevance of antibodies to negatively charged phospholipids in diagnostic evaluation. *Lupus*. 2014 Oct;23(12):1313-6. doi: 10.1177/0961203314544534. PMID: 25228736.

67. Sciascia S, Radin M, Cecchi I, Fenoglio R, De Marchi A, Besso L, Baldovino S, Rossi D, Miraglia P, Rubini E, Roccatello D. Anti-beta-2-glycoprotein I domain 1 identifies antiphospholipid antibodies-related injuries in patients with concomitant lupus nephritis. *J Nephrol*. 2020 Aug;33(4):757-762. doi: 10.1007/s40620-019-00698-9. Epub 2020 Jan 23. PMID: 31974856.

68. Murphy CH, Jin J, Zehnder JL. Antiphospholipid Antibodies in Patients With Lupus Anticoagulant Prozone Effect. *Am J Clin Pathol*. 2020 Jan 2;153(2):229-234. doi: 10.1093/ajcp/aqz151. PMID: 31598704.

69. Kelkar AH, Jacob KS, Yousif EB, Farrell JJ. Venous thromboembolism related to cytomegalovirus infection: A case report and literature review. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Dec;96(51):e9336. doi: 10.1097/MD.0000000000009336. PMID: 29390512; PMCID: PMC5758214.

70. Keeling DM, Birley H, Machin SJ. Multiple transient ischaemic attacks and a mild thrombotic stroke in a HIV-positive patient with anticardiolipin antibodies. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1990 Aug;1(3):333-5. doi: 10.1097/00001721-199008000-00012. PMID: 2103318.

71. 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>.

72. Engeland M, van den Eijnde SM, Aken T, Vermeij-Keers C, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. Detection of apoptosis in ovarian cells in vitro and in vivo using the annexin v-affinity assay. *Methods Mol Med*. 2001;39:669-77. doi: 10.1385/1-59259-071-3:669. PMID: 21340828.

73. Zhang G, He C, Wu Q, Xu G, Kuang M, Wang T, Xu L, Zhou H, Yuan W. Impaired Autophagy Induced by oxLDL/ $\beta$ 2GPI/anti- $\beta$ 2GPI Complex through PI3K/AKT/mTOR and eNOS Signaling Pathways Contributes to Endothelial Cell Dysfunction. *Oxid Med Cell Longev*. 2021 Jun 14;2021:6662225. doi: 10.1155/2021/6662225. PMID: 34221236; PMCID: PMC8219424.
74. Capozzi A, Riitano G, Recalchi S, Manganelli V, Costi R, Saccoliti F, Pulcinelli F, Garofalo T, Misasi R, Longo A, Di Santo R, Sorice M. Effect of heparanase inhibitor on tissue factor overexpression in platelets and endothelial cells induced by anti- $\beta$ 2-GPI antibodies. *J Thromb Haemost*. 2021 Sep;19(9):2302-2313. doi: 10.1111/jth.15417. Epub 2021 Jul 4. PMID: 34107171; PMCID: PMC8456873.
75. Adams M. Novel considerations in the pathogenesis of the antiphospholipid syndrome: involvement of the tissue factor pathway of blood coagulation. *Semin Thromb Hemost*. 2008 Apr;34(3):251-5. doi: 10.1055/s-0028-1082268. PMID: 18720304.
76. Pennings MT, Derksen RH, Urbanus RT, Tekelenburg WL, Hemrika W, de Groot PG. Platelets express three different splice variants of ApoER2 that are all involved in signaling. *J Thromb Haemost*. 2007 Jul;5(7):1538-44. doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02605.x. Epub 2007 Apr 27. PMID: 17470198.
77. Kumano O, Ieko M, Naito S, Yoshida M, Takahashi N, Suzuki T, Aoki T. Verification of the guidelines for lupus anticoagulant detection: usefulness of index for circulating anticoagulant in APTT mixing test. *Thromb Res*. 2014 Aug;134(2):503-9. doi: 10.1016/j.thromres.2014.05.030. Epub 2014 May 29. PMID: 24935674.
78. Urbanus RT, de Laat B. Antiphospholipid antibodies and the protein C pathway. *Lupus*. 2010 Apr;19(4):394-9. doi: 10.1177/0961203309360841. PMID: 20353976.
79. Hillarp A, Strandberg K, Baghaei F, Fagerberg Blixter I, Gustafsson KM, Lindahl TL. Effects of the oral, direct factor Xa inhibitor edoxaban on routine coagulation assays, lupus anticoagulant and anti-Xa assays. *Scand J Clin Lab Invest*. 2018 Nov-Dec;78(7-8):575-583. doi: 10.1080/00365513.2018.1522664. Epub 2018 Oct 2. PMID: 30278787.
80. Amengual O, Atsumi T, Koike T. Antiprothrombin antibodies and the diagnosis of antiphospholipid syndrome. *Clin Immunol*. 2004 Aug;112(2):144-9. doi: 10.1016/j.clim.2004.02.013. PMID: 15240157.
81. Simmelink MJ, Horbach DA, Derksen RH, Meijers JC, Bevers EM, Willems GM, De Groot PG. Complexes of anti-prothrombin antibodies and prothrombin cause lupus anticoagulant activity by competing with the binding of clotting factors for catalytic phospholipid surfaces. *Br J Haematol*. 2001 Jun;113(3):621-9. doi: 10.1046/j.1365-2141.2001.02755.x. PMID: 11380447.
82. Bardin N, Alessi MC, Dignat-George F, Vague IJ, Sampol J, Harlé JR, Sanmarco M. Does the anti-prothrombin antibodies measurement provide additional information in patients with thrombosis? *Immunobiology*. 2007; 212(7):557-65. doi: 10.1016/j.imbio.2007.02.001. Epub 2007 Apr 2. PMID: 17678713.
83. Cohen H, Efthymiou M, Devreese KMJ. Monitoring of anticoagulation in thrombotic antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost*. 2021 Apr;19(4):892-908. doi: 10.1111/jth.15217. Epub 2021 Feb 20. PMID: 33325604.
84. Orozco-López G, Rubio-Jurado B, Nava-Zavala AH. Concepts of hemostasis, thrombophilia and antiphospholipid syndrome. *Residente*. 2015;10(3):142-153.
85. Khogeer H, Altahan S, Alrehaily A, Sheikh A, Awartani K, Al-Kaff M, Saleh S, Alzahrani H, Alfattani A, Owaidah T. The Diagnostic Value of New Additional



Antiphospholipid Antibodies in Antiphospholipid Syndrome. *Ann Clin Lab Sci.* 2021 Jul;51(4):552-556. PMID: 34452895.

86. Bogdanova N, Baleva M, Kremensky I, Markoff A. The annexin A5 protective shield model revisited: inherited carriage of the M2/ANXA5 haplotype in placenta as a predisposing factor for the development of obstetric antiphospholipid antibodies. *Lupus.* 2012 Jun;21(7):796-8. doi: 10.1177/0961203312438235. PMID: 22635237.

87. Iuliano A, Galeazzi M, Sebastiani GD. Antiphospholipid syndrome's genetic and epigenetic aspects. *Autoimmun Rev.* 2019 Sep;18(9):102352. doi: 10.1016/j.autrev.2019.102352. Epub 2019 Jul 16. PMID: 31323355.

88. Chaturvedi S, Brodsky RA, McCrae KR. Complement in the Pathophysiology of the Antiphospholipid Syndrome. *Front Immunol.* 2019 Mar 14;10:449. doi: 10.3389/fimmu.2019.00449. PMID: 30923524; PMCID: PMC6426753.

89. Carp HJ, Shoenfeld Y. Anti-phospholipid antibodies and infertility. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2007 Apr;32(2):159-61. doi: 10.1007/s12016-007-0010-2. PMID: 17916986.

90. Bruno V, Nuccetelli M, Ticconi C, Bruno A, Martelli F, Capogna MV, Bernardini S, Piccione E, Pietropoli A. Amniotic fluid antiphospholipid antibodies: potential role in antiphospholipid syndrome-independent aberrant implantation process. *Reprod Biol Endocrinol.* 2019 Oct 15;17(1):79. doi: 10.1186/s12958-019-0527-2. PMID: 31615575; PMCID: PMC6794730.

91. Mahdian S, Pirjani R, Favaedi R, Movahedi M, Moini A, Shahhoseini M. Platelet-activating factor and antiphospholipid antibodies in recurrent implantation failure. *J Reprod Immunol.* 2021 Feb;143:103251. doi: 10.1016/j.jri.2020.103251. Epub 2020 Nov 27. PMID: 33271420.

92. Ліщук-Якимович ХО. Антифосфоліпідний синдром у практиці лікаря-репродуктолога. *Акушерство. Гінекологія. Генетика.* 2016;1:80–82.

93. Vega-Ostertag M, Harris EN, Pierangeli SS. Intracellular events in platelet activation induced by antiphospholipid antibodies in the presence of low doses of thrombin. *Arthritis Rheum.* 2004 Sep;50(9):2911-9. doi: 10.1002/art.20434. PMID: 15457460.

94. Hewell SW, Hammer RH. Antiphospholipid antibodies: a threat throughout pregnancy. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs.* 1997 Mar-Apr;26(2):162-8. doi: 10.1111/j.1552-6909.1997.tb02129.x. PMID: 9087900.

95. Williams FM, Parmar K, Hughes GR, Hunt BJ. Systemic endothelial cell markers in primary antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost.* 2000 Nov;84(5):742-6. PMID: 11127848.

96. Castro-Gutierrez A, Young K, Bermas BL. Pregnancy and Management in Women with Rheumatoid Arthritis, Systemic Lupus Erythematosus, and Obstetric Antiphospholipid Syndrome. *Rheum Dis Clin North Am.* 2022 May;48(2):523-535. doi: 10.1016/j.rdc.2022.02.009. PMID: 35400376.

97. 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

98. 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.

99. Francis J, Rai R, Sebire NJ, El-Gaddal S, Fernandes MS, Jindal P, Lokugamage A, Regan L, Brosens JJ. Impaired expression of endometrial differentiation markers and

complement regulatory proteins in patients with recurrent pregnancy loss associated with antiphospholipid syndrome. *Mol Hum Reprod*. 2006 Jul;12(7):435-42. doi: 10.1093/molehr/gal048. Epub 2006 May 30. PMID: 16735457.

100. Tsakiris DA, Settas L, Makris PE, Marbet GA. Lupus anticoagulant--antiphospholipid antibodies and thrombophilia. Relation to protein C-protein S-thrombomodulin. *J Rheumatol*. 1990 Jun;17(6):785-9. PMID: 2167370.

101. Girardi G. Role of tissue factor in the maternal immunological attack of the embryo in the antiphospholipid syndrome. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2010 Dec;39(3):160-5. doi: 10.1007/s12016-009-8187-1. PMID: 19921475.

102. McIntyre JA. Antiphospholipid antibodies in implantation failures. *Am J Reprod Immunol*. 2003 Apr;49(4):221-9. doi: 10.1034/j.1600-0897.2003.01197.x. PMID: 12852496.

103. Mulla MJ, Weel IC, Potter JA, Gysler SM, Salmon JE, Peraçoli MTS, Rothlin CV, Chamley LW, Abrahams VM. Antiphospholipid Antibodies Inhibit Trophoblast Toll-Like Receptor and Inflammasome Negative Regulators. *Arthritis Rheumatol*. 2018 Jun;70(6):891-902. doi: 10.1002/art.40416. Epub 2018 Apr 25. PMID: 29342502; PMCID: PMC5984662.

104. Mulla MJ, Salmon JE, Chamley LW, Brosens JJ, Boeras CM, Kavathas PB, Abrahams VM. A role for uric acid and the Nalp3 inflammasome in antiphospholipid antibody-induced IL-1 $\beta$  production by human first trimester trophoblast. *PLoS One*. 2013 Jun 6;8(6):e65237. doi: 10.1371/journal.pone.0065237. PMID: 23762324; PMCID: PMC3675211.

105. Fishman P, Falach-Vaknin E, Sredni B, Meroni PL, Rudniki C, Shoenfeld Y. Aspirin modulates interleukin-3 production: additional explanation for the preventive effects of aspirin in antiphospholipid antibody syndrome. *J Rheumatol*. 1995 Jun;22(6):1086-90. PMID: 7674234.

106. Shoenfeld Y, Sherer Y, Fishman P. Interleukin-3 and pregnancy loss in antiphospholipid syndrome. *Scand J Rheumatol Suppl*. 1998;107:19-22. doi: 10.1080/03009742.1998.11720701. PMID: 9759126.

107. 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.

108. 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.

109. Arad A, Proulle V, Furie RA, Furie BC, Furie B.  $\beta_2$ -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.

110. 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

111. Koike T. Antiphospholipid syndrome: 30 years and our contribution. *Int J Rheum Dis*. 2015;18(2):233-41. doi: 10.1111/1756-185X.12438.

112. Ernest JM, Marshburn PB, Kutteh WH. Obstetric antiphospholipid syndrome: an update on pathophysiology and management. *Semin Reprod Med*. 2011 Nov;29(6):522-39. doi: 10.1055/s-0031-1293206. Epub 2011 Dec 8. PMID: 22161465.

113. Donohoe S, Kingdom JC, Mackie IJ, Burrell S, Quenby S, Jauniaux E, Machin SJ. Ontogeny of beta 2 glycoprotein I and annexin V in villous placenta of normal and antiphospholipid syndrome pregnancies. *Thromb Haemost.* 2000 Jul;84(1):32-8. PMID: 10928466.

114. Tong M, Tsai BW, Chamley LW. Antiphospholipid antibodies and extracellular vesicles in pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 2021 Feb;85(2):e13312. doi: 10.1111/aji.13312. Epub 2020 Aug 19. PMID: 32715546.

115. Aljotas-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.

116. 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.

117. 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.

118. 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.

119. Arreola-Diaz R, Majluf-Cruz A, Sanchez-Torres LE, Hernandez-Juarez J. The Pathophysiology of The Antiphospholipid Syndrome: A Perspective From The Blood Coagulation System. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2022 Jan-Dec;28:10760296221088576. doi: 10.1177/10760296221088576. PMID: 35317658; PMCID: PMC8950029.

120. Franchini M. Haemostasis and pregnancy. *Thromb Haemost.* 2006 Mar;95(3):401-13. doi: 10.1160/TH05-11-0753. PMID: 16525566.

121. Зайченко ГВ, Лар'яновська ЮБ, Деева 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.

122. Олещук ОМ. Вплив аміногуанідину на показники системи оксиду азоту при експериментальному цирозі печінки. *Світ медицини та біології.* 2014;3(45):133-137.

123. 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.

124. 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.

125. Кожем'якін ЮМ, Хромов ОС, Болдирева НЕ, Добреля НВ, Сайфетдінова ГА. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними: монографія. К.: Інтерсервіс, 2017. 182.

126. Poletaev AB, Morozov SG, Changes of maternal serum natural antibodies of IgG class to proteins MBP, S100, ACBP14/18 and MP65 and embryonic misdevelopments in humans. *Human Antibody.* 2000;9(4):216-222.

127. 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.

128. Ben-Hur H, Gurevich P, Elhayany A, Avinoach I, Schneider DF, Zusman I. Transport of maternal immunoglobulins through the human placental barrier in normal pregnancy and during inflammation. *Int J Mol Med*. 2005 Sep;16(3):401-7. PMID: 16077946.
129. Макаров ОГ. Динаміка змін показників системи зсідання крові протягом вагітності у жінок з тромбофілічними станами. *Світ медицини та біології*. 2016;2(56):40-42.
130. Wu SM, Arnold LL, Rone J, Trivadi M, Chan WY. Effect of pregnancy-specific beta 1-glycoprotein on the development of preimplantation embryo. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1999 Mar;220(3):169-77. doi: 10.1046/j.1525-1373.1999.d01-25.x. PMID: 10193445.
131. Opatrny L, David M, Kahn SR, Shrier I, Rey E. Association between antiphospholipid antibodies and recurrent fetal loss in women without autoimmune disease: a metaanalysis. *J Rheumatol*. 2006 Nov;33(11):2214-21. Epub 2006 Oct 1. PMID: 17014001.
132. 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.
133. Ohmura K, Oku K, Atsumi T. The pathogenesis, diagnosis and treatment of antiphospholipid syndrome. *Nihon. Rinsho*. 2014;72(7):1309-1313.
134. 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.
135. Javadi-Paydar M, Lesani A, Vakili-pour 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.
136. 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.
137. Ramesh S, Morrell CN, Tarango C, et al. Antiphospholipid antibodies promote leukocyte-endothelial cell adhesion and thrombosis in mice by antagonizing eNOS via  $\beta$ 2GPI and apoER2. *J Clin Invest*. 2011;121(1):120-131. doi:10.1172/JCI39828.
138. Lertkiatmongkol P, Liao D, Mei H, Hu Y, Newman PJ. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *Curr Opin Hematol*. 2016 May;23(3):253-9. doi: 10.1097/MOH.0000000000000239. PMID: 27055047; PMCID: PMC4986701.
139. Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA. Tissue factor in antiphospholipid syndrome: shifting the focus from coagulation to endothelium. *Rheumatology (Oxford)*. 2003 Sep;42(9):1029-31. doi: 10.1093/rheumatology/keg273. Epub 2003 Mar 31. PMID: 12730514.
140. Lindsey NJ, Henderson FI, Malia R, Milford-Ward MA, Greaves M, Hughes P. Inhibition of prostacyclin release by endothelial binding anticardiolipin antibodies in thrombosis-prone patients with systemic lupus erythematosus and the antiphospholipid syndrome. *Br J Rheumatol*. 1994 Jan;33(1):20-6. doi: 10.1093/rheumatology/33.1.20. PMID: 8162452.
141. Bleil L, Manger B, Winkler TH, Herrman M, Burmester GR, Krapf FE, Kalden JR. The role of antineutrophil cytoplasm antibodies, anticardiolipin antibodies, von

Willebrand factor antigen, and fibronectin for the diagnosis of systemic vasculitis. *J Rheumatol*. 1991 Aug;18(8):1199-206. PMID: 1941824.

142. Campello E, Spiezia L, Adamo A, Simioni P. Thrombophilia, risk factors and prevention. *Expert Rev Hematol*. 2019 Mar;12(3):147-158. doi: 10.1080/17474086.2019.1583555. Epub 2019 Feb 26. PMID: 30773075.

143. Hladovec J. *Physiol. Bohemoslov*. 1978;27:140-144.

144. Сивак 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.

145. Scioili 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.

146. 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.

147. 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.

148. Клекот ОО. Метаболізм нітрогену оксиду при СЧВ-асоційованій легеневій артеріальній гіпертензії. Український ревматологічний журнал. 2011;1(43):109-111.

149. 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.

150. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012;33(7):829-837d. doi:10.1093/eurheartj/ehr304.

151. 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.

152. 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>.

153. 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.

154. 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.

155. Kontogiorgis C, Hadjipavlou-Litina D. Nitric Oxide Synthases and Their Natural Inhibitors. *Current Enzyme Inhibition*. 2016;12:3. doi.org/10.2174/1573408012666151126185628.

156. Данилович ЮВ. Оксид азоту як регулятор внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу в міоцитах матки. *Укр. біохім. журн*. 2012; 84(3):5-25.

157. 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.

158. Michel T, Vanhoutte PM. Cellular signaling and NO production. *Pflugers Arch*. 2010;459(6):807-816. doi:10.1007/s00424-009-0765-9.

159. Лазарчук ОО, Орлова ОА, Анісімова НА, Брюховецька ОЮ. Динаміка вмісту метаболітів оксиду азоту та активності супероксиддисмутази в тка-

нинах щурів різного віку. Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. 2012;1:7 – 12.

160. Katusic ZS, Austin SA. Endothelial nitric oxide: protector of a healthy mind. *Eur Heart J*. 2014;35(14):888–94. doi: 10.1093/eurheartj/ehf544.

161. Moore C, Tymvios C, Emerson M. Functional regulation of vascular and platelet activity during thrombosis by nitric oxide and endothelial nitric oxide synthase. *Thromb Haemost*. 2010;104(2):342–349.

162. Napoli C, Ignarro LJ. Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases. *Arch Pharm Res*. 2009;32(8):1103–1108.

163. 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.

164. 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.

165. 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.

166. 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

167. 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.

168. 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>.

169. 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.

170. de Laat B, de Groot PG. Autoantibodies directed against domain I of beta2-glycoprotein I. *Curr Rheumatol Rep*. 2011;13:70–76.

171. Kimber-Trojnar Z, Leszczyńska-Gorzela B, Marciniak B, Bartosiewicz J, Oleszczuk J. Tocolytic therapy in threatened preterm labor. *Ginekol. Pol*. 2010;81(2):120–124.

172. 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.

173. 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.

174. 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.bbabi.2012.12.002.

175. Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandez MS, Xu Q, Griending KK. Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circ Res*. 2018;122(6):877–902. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.311401.

176. 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.

177. 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.
178. 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.
179. 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.
180. 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.
181. 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.
182. Preiser JC. Oxidative stress. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2012;36(2):147–54. doi: 10.1177/0148607111434963.
183. 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.
184. 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.
185. Green LC, Davie AW, Golawski J. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal. biochem.* 1982;126(1):131–138.
186. 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.
187. 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.
188. 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.
189. 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.
190. 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.
191. 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.
192. 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.
193. Олещук ОМ. Стан системи оксиду азоту при експериментальному цирозі печінки. *Вісник проблем біології і медицини.* 2014;2(111):198–202.

194. Wiest R, Groszmann RJ. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough. *Hepatology*. 2002;35(2):478–491.

195. Strohle A, von Bibra H, Hahn A. L-Arginine and vascular health. *Med Monatsschr Pharm*. 2016;39(12):515–20.

196. Wong V, Lerner E. Nitric oxide inhibition strategies. *Future Sci OA*. 2015;1(1):FSO35. doi: 10.4155/fso.15.35

197. 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

198. 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>.

199. Prouille 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.

200. 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.

201. 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.

202. 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.

203. Горницька ОВ. Антифосфоліпідний синдром. Експериментальна та клінічна фізіологія та біохімія. 2008;1(4):61–70.

204. Hu Y, Yan R, Zhang C, Zhou Z, Liu M, Wang C, Zhang H, Dong L, Zhou T, Wu Y, Dong N, Wu Q. High-Mobility Group Box 1 From Hypoxic Trophoblasts Promotes Endothelial Microparticle Production and Thrombophilia in Preeclampsia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018 Jun;38(6):1381–1391. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.310940. Epub 2018 Apr 12. PMID: 29650693; PMCID: PMC5970057.

205. Schjetlein R, Haugen G, Wisløff F. Markers of intravascular coagulation and fibrinolysis in preeclampsia: association with intrauterine growth retardation. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1997 Jul;76(6):541–6. doi: 10.3109/00016349709024580. PMID: 9246959.

206. Bellart J, Gilabert R, Fontcuberta J, Borrell M, Miralles RM, Cabero L. Fibrinolysis changes in normal pregnancy. *J Perinat Med*. 1997;25(4):368–72. doi: 10.1515/jpme.1997.25.4.368. PMID: 9350608.

207. Holmes VA, Wallace JM. Haemostasis in normal pregnancy: a balancing act? *Biochem Soc Trans*. 2005 Apr;33(Pt 2):428–32. doi: 10.1042/BST0330428. PMID: 15787621.

208. Мадей П, Пеха Д, Плута Д та ін. Імунологічні фактори в етіопатогенезі звичних викиднів. *Львівський медичний часопис*. 2015;3:89–95.

209. Ziganshina MM, Nikolaeva MA, Stepanova EO, Krechetova LV, Kan NE, Sokolov DI, Sel'kov SA, Sukhikh GT. Detection of Antibodies In Vitro Binding to



Endothelial Cells in the Sera from Women with Normal Pregnancy and Preeclampsia. *Bull Exp Biol Med.* 2015 Aug;159(4):475-8. doi: 10.1007/s10517-015-2996-4. Epub 2015 Sep 22. PMID: 26395635.

210. 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.

211. Check JH. A practical approach to the prevention of miscarriage: part 5--antiphospholipid syndrome as a cause of spontaneous abortion. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2011;38(1):5-9. PMID: 21485715.

212. Elchalal U, Gabbay E, Nadjari M, Varon D, Zelig O, Ben-Chetrit E. Catastrophic antiphospholipid syndrome in the second trimester of pregnancy. *Isr Med Assoc J.* 2006 Dec;8(12):856-7. PMID: 17214104.

213. Bats AS, Lejeune V, Cynober E, Safar E, Gonzales M, Milliez J, Carbonne B. Antiphospholipid syndrome and second- or third-trimester fetal death: follow-up in the next pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004 Jun 15;114(2):125-9. doi: 10.1016/j.ejogrb.2003.09.040. PMID: 15140503.

214. Green D. Pathophysiology of Antiphospholipid Syndrome. *Thromb Haemost.* 2022 Jul;122(7):1085-1095. doi: 10.1055/a-1701-2809. Epub 2021 Nov 18. PMID: 34794200; PMID: PMC9391091.

215. Kremers RMW, Zuily S, Kelchtermans H, Peters TC, Bloemen S, Regnault V, Hemker HC, de Groot PG, Wahl D, de Laat B. Prothrombin conversion is accelerated in the antiphospholipid syndrome and insensitive to thrombomodulin. *Blood Adv.* 2018 Jun 12;2(11):1315-1324. doi: 10.1182/bloodadvances.2018018036. PMID: 29895622; PMID: PMC5998936.

216. Friederich P, Putensen C, Stüber F. Prothrombin gene G20210A mutation and elevated anticardiolipin antibodies in a patient with combined portal-mesenteric vein thrombosis. *Intensive Care Med.* 2000 Oct;26(10):1571-4. doi: 10.1007/s001340000652. PMID: 11126275.

217. Шевчук СВ. Тромбоцитопенія – як маркер ураження серцево-судинної системи у хворих на системний червоний вовчак. *Вісник проблем біології і медицини.* 2014;6:186–190.

218. 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

219. 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

220. 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>

221. Ogletree ML. Overview of physiological and pathophysiological effects of thromboxane A2. *Fed Proc.* 1987 Jan;46(1):133-8. PMID: 2948837.

222. Cuadrado MJ, Mujic F, Muñoz E, et al. Thrombocytopenia in the antiphospholipid syndrome. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 1997;56:194–196.

223. Яремчук О. З. Дослідження деяких показників гемостазу при експери-

ментальному антифосфоліпідному синдрому. Медична та клінічна хімія. 2015. Т. 17. № 3. С. 76–79.

224. 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

225. 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.

226. 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.

227. Gomez-Puerta J A, Cervera R. Diagnosis and classification of the antiphospholipid syndrome. *Journal of Autoimmunity.* 2014;48–49:20–25.

228. Супрун ЕВ, Чекман ІС, Бєленічев ІФ та ін. Цитокинова терапія в комплексному лікуванні цереброваскулярних захворювань: стан, перспективи досліджень. *Раціональна фармакотерапія.* 2017;1(42):19–30.

229. 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.

230. 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.

231. Visvanathan S, McNeil HP. Cellular immunity to beta 2-glycoprotein-1 in patients with the antiphospholipid syndrome. *J Immunol.* 1999 Jun 1;162(11):6919-25. PMID: 10352314.

232. Karakantza M, Theodorou GL, Meimaris N, Mouzaki A, John E, Andonopoulos AP, Maniatis A. Type 1 and type 2 cytokine-producing CD4+ and CD8+ T cells in primary antiphospholipid syndrome. *Ann Hematol.* 2004 Nov;83(11):704-11. doi: 10.1007/s00277-004-0910-7. Epub 2004 Aug 5. PMID: 15300407.

233. 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.

234. Swadzba J, Iwaniec T, Musial J. Increased level of tumor necrosis factor- $\alpha$  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.

235. Ahmed K, Vianna JL, Khamashta MA, Hughes GR. IL-2, IL-6 and TNF levels in primary antiphospholipid syndrome. *Clin Exp Rheumatol.* 1992 Sep-Oct;10(5):503. PMID: 1458705.

236. 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.

237. Doss GP, Agoramoorthy G, Chakraborty C. TNF/TNFR: drug target for autoimmune diseases and immune-mediated inflammatory diseases. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2014 Jun 1;19(7):1028-40. doi: 10.2741/4265. PMID: 24896334.

238. Jang DI, Lee AH, Shin HY, Song HR, Park JH, Kang TB, Lee SR, Yang SH. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) in Autoimmune Disease and Current TNF- $\alpha$  Inhibitors in Therapeutics. *Int J Mol Sci.* 2021 Mar 8;22(5):2719. doi: 10.3390/ijms22052719. PMID: 33800290; PMCID: PMC7962638.

239. Nandi J, Saud B, Zinkievich JM, Yang ZJ, Levine RA. TNF-alpha modulates iNOS expression in an experimental rat model of indomethacin-induced jejunoileitis. *Mol Cell Biochem.* 2010 Mar;336(1-2):17-24. doi: 10.1007/s11010-009-0259-2. Epub 2009 Oct 3. PMID: 19802525.

240. Benhamou Y, Miranda S, Armengol G, Harouki N, Drouot L, Zahr N, Thuillez C, Boyer O, Levesque H, Joannides R, Richard V. Infliximab improves endothelial dysfunction in a mouse model of antiphospholipid syndrome: Role of reduced oxidative stress. *Vascul Pharmacol.* 2015 Aug;71:93-101. doi: 10.1016/j.vph.2015.03.014. Epub 2015 Apr 11. PMID: 25869505.

241. Aljotas-Reig J, Esteve-Valverde E, Ferrer-Oliveras R, Llorba E, Gris JM. Tumor Necrosis Factor-Alpha and Pregnancy: Focus on Biologics. An Updated and Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2017 Aug;53(1):40-53. doi: 10.1007/s12016-016-8596-x. PMID: 28054230.

242. 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.

243. 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.

244. 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.

245. 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.

246. 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

247. 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.

248. 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.

249. Sulagna D, Pallav S. Defining pregnancy phases with cytokine shift. *Journal of Pregnancy and Reproduction.* 2017;1(4):1-3.

250. Sokolova L, Pushkarev V, Tronko M. L-аргінін у нормі та патології. *Endokr.* 2019;24(4):373-85.

251. Губський ЮІ. Смерть клітини: вільні радикали, некроз, апоптоз: Монографія. Вінниця: Нова Книга, 2015:360.

252. 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.
253. Rauch J, Salem D, Subang R, Kuwana M, Levine JS.  $\beta$ 2-Glycoprotein I – Reactive T Cells in Autoimmune Disease. *Front Immunol.* 2018;9:2836. doi: 10.3389/fimmu.2018.02836.
254. 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.
255. 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>.
256. Rathnasamy G, V. Sivakumar, P. Rangarajan, WS. Foulds, EA. Ling and C. Kaur: NF- $\kappa$ B-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.
257. Gropp K, Weber N, Reuter M et al.  $\beta$ 2-glycoprotein I, the major target in antiphospholipid syndrome, is a special human complement regulator. *Blood.* 2011; 118:2774–2783.
258. 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.
259. 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
260. 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.
261. 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.
262. 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.
263. 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
264. 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.
265. 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.
266. Liu H, Li Q, Wang Y et al. Elevated nitric oxide levels associated with hepatic cell apoptosis during liver injury. *Hepato Res.* 2017;47(2):178–185.
267. Wang K. Autophagy and apoptosis in liver injury. *Cell Cycle.* 2015;14(11):1631–42. doi: 10.1080/15384101.2015.1038685.
268. 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.

269. Andreoli L, Fredi M, Nalli C et al. Antiphospholipid antibodies mediate autoimmunity against dying cells. *Autoimmunity*. 2013;46(5):302–6.

270. 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.

271. 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.

272. 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.

273. 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.

274. 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.

275. 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.

276. 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.

277. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680–685.

278. 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.

279. 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.

280. 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

281. Dugina V., Khromova N., Rybko V., Blizniukov O., Shagieva G., Chaponnier C., Kopnin B., Kopnin P. Tumor promotion by  $\gamma$  and suppression by  $\beta$  non-muscle actin isoforms. *Oncotarget*. 2015; 6: 14556–14571.

282. Falahzadeh Kh, Banaei-Esfahani A, Shahhoseini M. The potential roles of actin in the nucleus. *Cell J.* 2015;17(1):7–14.

283. Chen H, Leng Y, Li Z. Beta-actin in the signaling of transmembrane TNF- $\alpha$ -mediated cytotoxicity. *Methods Mol Biol.* 2014;1155:55–68.

284. 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.

285. 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.
286. 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>.
287. 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>
288. Eruslanov E, Kusmartsev S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flowcytometry. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 2010;594:57–72.
289. Остапченко ЛІ, Синельник ТБ, Рибальченко ТВ, Рибальченко ВК. Біохімічні механізми апоптозу. Київ. Київський університет. 2010:312.
290. 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.
291. 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.
292. Ricarte IF, Dutra LA, Abrantes FF, et al. Neurologic manifestations of antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2018;27(9):1404–1414. doi:10.1177/0961203318776110.
293. 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
294. Raschi E, Testoni C, Bosisio D. Role of the MyD88 transduction signaling pathway in endothelial activation by antiphospholipid antibodies. *Blood*. 2003;101:3495–500.
295. 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.
296. 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.
297. 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.
298. 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
299. 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.
300. Muscal E, Brey RL. Antiphospholipid syndrome and the brain in pediatric and adult patients. *Lupus*. 2010;19(4):406–411.

301. Graf J. Central Nervous System Manifestations of Antiphospholipid Syndrome. *Rheum Dis Clin North Am.* 2017;43(4):547-560.

302. 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.

303. Berkman SA, Song SS. Ischemic Stroke in the Young. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2021 Jan-Dec;27:10760296211002274. doi: 10.1177/ 10760296211002274. PMID: 33870763; PMCID: PMC8718160.

304. Bala MM, Celinska-Lowenhoff M, Szot W, Padjas A, Kaczmarczyk M, Swierz MJ, Undas A. Antiplatelet and anticoagulant agents for secondary prevention of stroke and other thromboembolic events in people with antiphospholipid syndrome. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020 Oct 12;10(10):CD012169. doi: 10.1002/14651858.CD012169.pub3. PMID: 33045766; PMCID: PMC8094585.

305. Levine SR, Brey RL, Sawaya KL, Salowich-Palm L, Kokkinos J, Kostrzema B, Perry M, Havstad S, Carey J. Recurrent stroke and thrombo-occlusive events in the antiphospholipid syndrome. *Ann Neurol.* 1995 Jul;38(1):119-24. doi: 10.1002/ana.410380119. PMID: 7611714.

306. Veres K, Lakos G, Kerényi A, Szekanez Z, Szegedi G, Shoenfeld Y, Soltész P. Antiphospholipid antibodies in acute coronary syndrome. *Lupus.* 2004;13(6):423-7. doi: 10.1191/0961203304lu10110a. PMID: 15303568.

307. 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.

308. 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.

309. Uthman I, Noureldine MH, Berjawi A, Skaf M, Haydar AA, Merashli M, Hughes GR. Hughes syndrome and multiple sclerosis. *Lupus.* 2015 Feb;24(2):115-21. doi: 10.1177/0961203314555539. Epub 2014 Oct 17. PMID: 25326228.

310. Noureldine MH, Harifi G, Berjawi A, Haydar AA, Nader M, Elnawar R, Sweid A, Al Saleh J, Khamashta MA, Uthman I. Hughes syndrome and epilepsy: when to test for antiphospholipid antibodies? *Lupus.* 2016 Nov;25(13):1397-1411. doi: 10.1177/0961203316651747. Epub 2016 Jul 11. PMID: 27225212.

311. Ferreira S, D'Cruz DP, Hughes GR. Multiple sclerosis, neuropsychiatric lupus and antiphospholipid syndrome: where do we stand? *Rheumatology (Oxford).* 2005 Apr;44(4):434-42. doi: 10.1093/rheumatology/keh532. Epub 2005 Jan 11. PMID: 15644391.

312. Ricarte IF, Dutra LA, Abrantes FF, Toso FF, Barsottini OGP, Silva GS, de Souza AWS, Andrade D. Neurologic manifestations of antiphospholipid syndrome. *Lupus.* 2018 Aug;27(9):1404-1414. doi: 10.1177/0961203318776110. Epub 2018 May 17. PMID: 29768970.

313. Якубовська ІО, Генік СІ. Антифосфоліпідний синдром (синдром Х'юза) в лікарській практиці. Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія. 2008;4:31-36.

314. 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.

315. 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.
316. 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.
317. 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.
318. 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.
319. 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.
320. 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.
321. Edwards L, Wanless IR. Mechanisms of liver involvement in systemic disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.* 2013;27:471-483.
322. Alchi B, Griffiths M, Jayne D. What nephrologists need to know about antiphospholipid syndrome. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25:3147-3154.
323. 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.
324. 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.
325. Tektonidou MG. Antiphospholipid Syndrome Nephropathy: From Pathogenesis to Treatment. *Front Immunol.* 2018;9:1181-1187.
326. Tektonidou MG. Antiphospholipid syndrome-associated nephropathy in systemic lupus erythematosus. *Int J Clin Rheumatol.* 2012;7(2):31-134.
327. Turrent-Carriles A, Herrera-Félix JP, Amigo MC. Renal Involvement in Antiphospholipid Syndrome. *Front Immunol.* 2018;9:1008. doi: 10.3389/fimmu.2018.01008.
328. 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
329. 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



330. Morales JM, Serrano M, Martínez-Flores JA, Perez D, Serrano A. Antiphospholipid Syndrome and Renal Allograft Thrombosis. *Transplantation*. 2019;103(3):481-486. doi:10.1097/TP.0000000000002510.
331. 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.
332. Willis R, Gonzalez EB. Antiphospholipid Antibodies and APS Nephropathy. *The Open Urology & Nephrology Journal*. 2015;8:10-17.
333. Miranda-Díaz AG, Cardona-Muñoz EG, Pacheco-Moisés FP. The Role of Cardioliplipin and Mitochondrial Damage in Kidney Transplant. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:3836186. doi:10.1155/2019/3836186.
334. Serrano M, Martínez-Flores JA, Pérez D, García F, Cabrera-Marante O, Ple-guezuelo D, et al.  $\beta$ 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.
335. 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.
336. Girardi G, Fraser J, Lennen R, Vontell R, Jansen M, Hutchison G. Imaging of activated complement using ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles (USPIO)--conjugated vectors: an in vivo in utero non-invasive method to predict placental insufficiency and abnormal fetal brain development. *Mol Psychiatry*. 2015 Aug;20(8):1017-26. doi: 10.1038/mp.2014.110. Epub 2014 Sep 23. PMID: 25245499; PMCID: PMC4288949.
337. Гаврилов ВБ, Мишкорудная МИ. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови. *Лаб. дело*. 1983;3:33-35.
338. Андреева ЛИ, Кожемякин ЛА, Кишкун АА. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой. *Лаб. дело*. 1988;11:41-43.
339. Яремчук ОЗ. Нейропротекторна роль аміногуанідину у механізмах ураження головного мозку вагітних мишей BALB/c з антифосфоліпідним синдромом. *Sciences of Europe*. 2020;47:14-18.
340. 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;48:20-24.
341. 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>.
342. 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.
343. 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.
344. 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.

345. Lushchak, V. I. Classification of oxidative stress based on its intensity. *EXCLI Journal*. 2014. Vol. 13. C. 922–937.
346. 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.
347. 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.
348. Chouchani ET, Methner C, Nadochiy 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.
349. 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.
350. 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.
351. Корольюк МА, Иванова ЛИ, Майорова ИГ, та ін. Метод определения активности каталазы. *Лаб. дело*. 1988;1:16–19.
352. 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.
353. 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.
354. 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
355. Ribas V, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC. Glutathione and mitochondria. *Front Pharmacol*. 2014;5:151. doi:10.3389/fphar.2014.00151
356. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys*. – 1959;82: 70–77.
357. Мецишен ІФ. Глутатионова система організму за умов норми та патології. *Чернівці: Медакадемія*; 1999. 26. с.
358. 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.
359. 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.
360. 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.
361. Ещенко НД, Вольский ГГ. Определение количества янтарной кислоты и активности сукцинатдегидрогеназы. *Методы биохимических исследований*. Л.: Изд-во Ленинградского университета; 1982. с. 207–210.
362. Кривченкова РС. Определение активности цитохромоксидазы в суспензии митохондрий. *Современные методы в биохимии*. Под ред. Ореховича ВН. М.: Медицина, 1977; 47-49.

363. 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=354
364. 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.
365. Bayir 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.
366. 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.
367. Cobb CA, Cole MP. Oxidative and nitrate stress in neurodegeneration. *Neurobiol Dis.* 2015;84:4–21. doi: 10.1016/j.nbd.2015.04.020.
368. 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.
369. 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.
370. 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.
371. Тихомиров АО, Павлова ОС, Недзвецкий ВС. Гліальний фібрилярний кислий протеїн (ГФКП): до 45-річчя відкриття, Нейрофізіологія. 2016;48(1):58–75.
372. 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.
373. 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.
374. 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.
375. 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.
376. 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.
377. Middeldorp J, Hol EM. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol.* 2011;93(3):421–43. doi: 10.1016/j.pneurobio.2011.01.005.
378. 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.

379. 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.
380. 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.
381. Kuipers HF, Yoon J, Horssen J, et al. Phosphorylation of  $\alpha$ B-crystallin supports reactive astrogliosis in demyelination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017;114(9):1745–1754.
382. 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.
383. 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.
384. Song Y, Zhang F, Ying C, Kumar KA, Zhou X. Inhibition of NF- $\kappa$ B activity by aminoguanidine alleviates neuroinflammation induced by hyperglycemia. *Metab Brain Dis*. 2017;32(5):1627–37. doi: 10.1007/s11011-017-0013-5.
385. 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.
386. 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.
387. Praticò D, Iuliano L, Mauriello A, Spagnoli L, Lawson JA, Rokach J, MacLouf J, Violi F, FitzGerald GA. Localization of distinct F2-isoprostanes in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*. 1997 Oct 15;100(8):2028–34. doi: 10.1172/JCI119735. Erratum in: *J Clin Invest* 1997 Nov 15;100(10):2637. PMID: 9329967; PMCID: PMC508393.
388. Vaz CO, Mazetto BM, Vasconcelos PENS, Bastos LB, Cursino MA, Quintanilha JCF, Mesquita GLTV, Santos APR, Jacintho BC, Oliveira JD, Annichino-Bizzachi J, Orsi FA. Association between plasmatic oxidative stress and thrombosis in primary anti-phospholipid syndrome. *J Thromb Thrombolysis*. 2021 Oct;52(3):730–737. doi: 10.1007/s11239-021-02509-0. Epub 2021 Jul 5. PMID: 34224066; PMCID: PMC8568865.
389. 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;19(3):63–70.
390. 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.
391. Горальський ЛП, Хомич ВТ, Кононьський ОІ. Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології. *Житомир: Полісся*; 2011. 288.
392. Turrent-Carriles A, Herrera-Félix JP, Amigo MC. Renal Involvement in Antiphospholipid Syndrome. *Front Immunol*. 2018 May 17;9:1008. doi: 10.3389/fimmu.2018.01008. PMID: 29867982; PMCID: PMC5966534.
393. Stanescu C, Andronesi AG, Jurcut C, Gherghiceanu M, Vornicu A, Burcea FA, Andronesi TD, Lupusoru GE, Iliuta L, Sorohan BM, Obrisca B, Ismail G. Successful

Treatment of Catastrophic Antiphospholipid Syndrome Using Rituximab: Case Report and Review of the Literature. *Medicina* (Kaunas). 2021 Aug 31;57(9):912. doi: 10.3390/medicina57090912. PMID: 34577835; PMCID: PMC8470109.

394. 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.

395. Яремчук ОЗ. Патобіохімічні механізми ураження нирок при експериментальному антифосфоліпідному синдромі. *Вісник проблем біології і медицини*. 2015;4(124):167-170.

396. 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.

397. Яремчук ОЗ. Стан прооксидантно-антиоксидантної системи нирок при експериментальному антифосфоліпідному синдромі та за дії модуляторів синтезу оксиду азоту. *Медична та клінічна хімія*. 2019; 21(3):85-91.

398. 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) № u201911363; заявлено 22.11.2019; опубліковано 12.05.2020; Бюл. № 9.

399. 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.

400. 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.

401. Boger RH. The pharmacodynamics of L-arginine. *Altern Ther Health Med*. 2014;20(3):48-54.

402. Sada PR, Cohen H, Isenberg D. The Pathophysiology of Antiphospholipid Syndrome. *The Open Urology & Nephrology Journal*. 2015;8:2-9.

403. Кондратюк АС, Гриненко ТВ. Кількісне визначення фібриногену в плазмі крові турбідиметричним методом з використанням анциструну. *Фізика живого*. 2010;18(1):160-163.

404. 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.

405. 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.

406. 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

407. Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol*. 2011; 194:7-15. doi: 10.1083/jcb.201102095.

408. 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.

409. 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.

410. 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.

411. Lee KM, MacLean AG. New advances on glial activation in health and disease. *World J Virol.* 2015;4(2):42–55.

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. 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.

414. 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.

415. Kiray H, Lindsay LS, Hosseinzadeh S, et al. The multifaceted role of astrocytes in regulating myelination. *Exp. Neurol.* 2016;283:541–549.

416. Giordano N, Lucani B, Geraci S, Santacroce C, Sabatini L, Gennari C. Serum neurone-specific enolase in the primary antiphospholipid syndrome: a new biochemical marker for cerebral vascular involvement? *Clin Exp Rheumatol.* 2001 Jan-Feb;19(1):110–1. PMID: 11247315.

417. 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.

418. 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.

419. Chen Y, Vartiainen NE, Ying W, et al. Astrocytes protect neurons from nitric oxide toxicity by a glutathionedependent mechanism. *J. Neurochem.* 2001;77:1601–1610.

420. 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.

421. 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(1):136–139.

422. 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.

423. 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

424. Salim T, Sershen CL, May EE. Investigating the role of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  activation on the dynamics of iNOS gene expression in LPS stimulated macrophages. *PLoS One*. 2016;11(6), e0153289.
425. 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.
426. 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.
427. Gornik HL, Creager MA. Arginine and endothelial and vascular health. *J. Nutr*. 2004;134(10):2880S-2887S.
428. 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.
429. 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
430. 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.
431. 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.

*Наукове видання*

**Яремчук Ольга Зеновіївна,  
Посохова Катерина Андріївна,  
Кліщ Іван Миколайович,  
Корда Михайло Михайлович**

## **АНТИФОСФОЛІПІДНИЙ СИНДРОМ**

Монографія

Редагування і коректура	<i>Леся Капкаєва</i>
Технічний редактор	<i>Світлана Демчишин</i>
Оформлення обкладинки	<i>Павло Кушик</i>
Комп'ютерна верстка	<i>Світлана Левченко</i>

Підп. до друку 28.12.2022. Формат 60×84/16. Папір офсет.

Гарн. Noto Sans. Друк офсет.

Ум. друк. арк. 13,95. Обл. вид. арк. 16,80.

Тираж 300 пр. Зам. № 181.

Видавець і виготовлювач  
Тернопільський національний медичний університет  
імені І. Я. Горбачевського МОЗ України.  
Майдан Волі, 1, м. Тернопіль, 46001, Україна.

Свідоцтво про внесення до державного реєстру суб'єктів видавничої справи  
ДК № 7242 від 02.02.2021 р.