

нейропротекторных свойств иммунофана.

**Ключевые слова:** головной мозг, сенсibilизация, ишемия, Iba-1, микроглия, иммунофан.

Стаття надійшла 3.01.18 р.

properties of immunophane.

**Key words:** brain, sensitization, ischemia, Iba-1, microglia, immunophane.

Рецензент Срошенко Г.А.

DOI 10.26724/2079-8334-2018-3-65-210-214

УДК 615.224-06:612.015.11:616.61-06:616-005.6]-092.9

О.З. Яремчук, К.А. Посохова, М.І. Кулицька  
ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського  
МОЗ України», Тернопіль

## ВПЛИВ L-АРГІНІНУ ТА АМІНОГУАНІДИНУ НА ПОКАЗНИКИ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСНЕННЯ У НИРКАХ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ АНТИФОСФОЛІПІДНОМУ СИНДРОМІ

E-mail: yaremchuk@tdmu.edu.ua

Метою роботи було дослідити вплив L-аргініну та аміногуанідину на стан окремих показників прооксидантно-антиоксидантної системи та тканинного дихання у нирках при експериментальному антифосфоліпідному синдромі та на тлі вагітності у тварин з цією патологією. Антифосфоліпідний синдром (АФС) моделювали на мишах лінії BALB/c за допомогою кардіоліпіну за методикою Зайченко Г.В. та співавт. (2011). Введення L-аргініну при АФС та на тлі вагітності у тварин з АФС супроводжується зменшенням проявів оксидативного стресу, зокрема зниженням рівня пероксидного окиснення ліпідів, відновленням активності та вмісту компонентів антиоксидантної системи та ферментів електронно-транспортного ланцюга у нирках. Застосування аміногуанідину у нирках тварин з АФС та на тлі вагітності у тварин з цією патологією проявляється дискоординацією в системі прооксиданти-антиоксиданти.

**Ключові слова:** експериментальний антифосфоліпідний синдром, нирки, оксидативний стрес, антиоксидантна система.

*Робота є фрагментом комплексної НДР «Біохімічні механізми порушень метаболізму за умов надходження до організму токсикантів різного генезу», № державної реєстрації 0116U003353.*

Антифосфоліпідний синдром (АФС) – автоімунне захворювання, яке характеризується рецидивуючими артеріальними або венозними тромбозами різної локалізації, акушерською патологією, тромбоцитопенією, наявністю в крові антитіл до негативно заряджених фосфоліпідів мембран та зв'язаних з ними глікопротеїнів [7, 9, 2, 4, 13]. У загальній популяції АФС частіше спостерігається в жінок, ніж у чоловіків, при первинному АФС це співвідношення складає 4:1, при вторинному АФС – сягає 7:1. При катастрофічному АФС, який може розвиватися за умов як первинного так і вторинного АФС, без своєчасного лікування смертність сягає 60% [1, 8, 2, 13].

Високий ризик інвалідації, порушення репродуктивної функції у жінок надає цій проблемі соціального значення. Серед пацієнток із невиношуванням вагітності АФС виявляють у 27-42 % випадків, водночас в 90-95 % жінок без адекватного лікування ембріон гине [3].

Патогенетичними механізмами розвитку АФС є вазоспазм, гіперкоагуляція у плазмовій ланці гемостазу, що призводить до виникнення тромбозів у мікроциркуляторному руслі [9, 11, 13]. Відомо, що оксидативний стрес є важливим моментом патогенезу АФС, в тому числі при системному червоному вовчаку і виникаючій на цьому ґрунті нирковій недостатності [10, 12]. Більше того, вираженість оксидативного стресу є показником високої активності процесу при АФС [10, 2, 5]. Доведено також, що при акушерському АФС в ендотелії порушуються синтез та біодоступність оксиду азоту (NO), який бере участь в регуляції судинного тонуусу і коагуляційних властивостей крові [7]. Частота ураження нирок, одним із проявів якого є пошкодження мікроциркуляторного русла, при АФС становить 25-68 % [7, 1]. Разом з тим, відсутня єдина точка зору щодо ролі оксидативного стресу та системи оксиду азоту у механізмах ураження нирок за умов АФС [7, 9, 10]. Зазначене вище свідчить про актуальність пошуку серед модуляторів синтезу NO ефективних засобів корекції ураження нирок, що виникає при АФС.

**Метою** роботи було дослідити особливості впливу попередника синтезу оксиду азоту L-аргініну та інгібітора індукцибельної NO-синтази аміногуанідину на стан окремих показників прооксидантно-антиоксидантної системи та тканинного дихання у нирках при експериментальному антифосфоліпідному синдромі та на тлі вагітності у тварин з цією патологією.

**Матеріал та методи дослідження.** Дослідження проводили на 80 мишах лінії BALB/c (самках), яких утримували на стандартному раціоні віварію. Експерименти здійснювали з дотриманням принципів біоетики відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на

тваринах» (Київ, 2000) узгоджених з положеннями «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986) та Директиви Європейського Союзу 2010/10/63 EU щодо експериментів на тваринах.

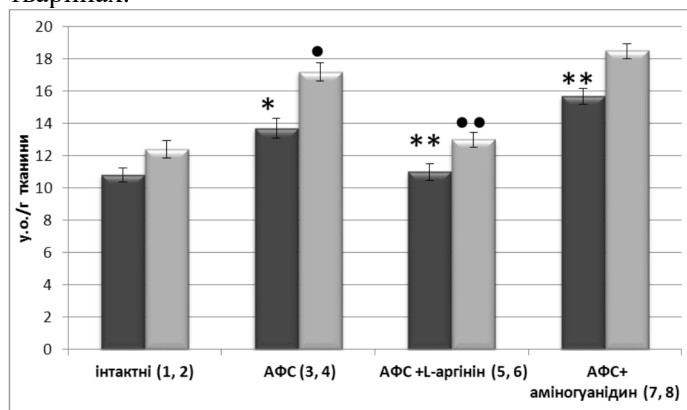


Рис. 1. Вміст гідропероксидів ліпідів у тканині нирок мишей BALB/c за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому та при застосуванні L-аргініну та аміногуанідину ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ). Примітки (тут і надалі): 1.\* – достовірно відмінне від відповідних значень в контрольній групі  $P < 0,05$ . 2.\*\* – достовірно відмінне від відповідних значень в групі тварин з АФС  $P < 0,05$ . 3. • – достовірно відмінне від відповідних значень в групі інтактних тварин на 18 д. вагітності  $P < 0,05$ . 4. •• – достовірно відмінне від відповідних значень в групі тварин з АФС на 18 д. вагітності  $P < 0,05$ .

Через 10 діб з моменту підтвердження АФС тварин 1-ї, 3-ї, 5-ї та 7-ї груп виводили з експерименту в умовах тіопентал-натрієвого наркозу. Проводили злучку самок 2-ї, 4-ї, 6-ї та 8-ї груп з самцями та виводили з експерименту на 18-й день вагітності.

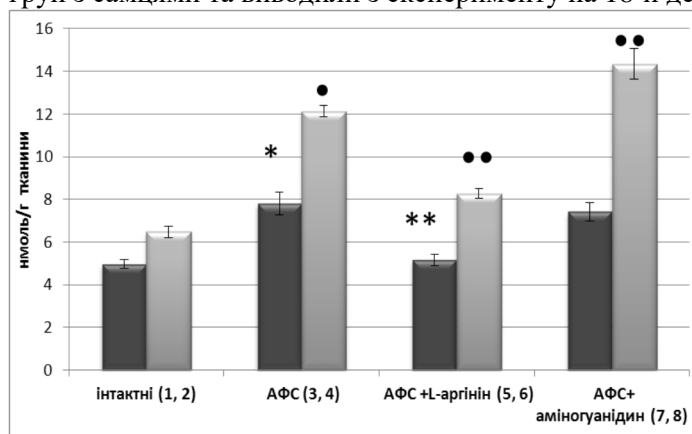


Рис. 2. Концентрація ТБК-активних продуктів у тканині нирок мишей BALB/c за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому та при застосуванні L-аргініну та аміногуанідину ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )

Для підтвердження розвитку АФС проводили реакцію мікропреципітації з кардіоліпіновим антигеном, з використанням тест-системи «Антиген кардіоліпіновий, для реакції мікропреципітації» («Біолік», Україна) [6]. Концентрацію розчинних білків у гомогенаті вимірювали за методом Лоурі [Lowry].

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

**Результати дослідження та їх обговорення.** При визначенні наявності антикардіоліпінових антитіл у групах тварин інтактного контролю (1 та 2 групи) за допомогою реакції мікропреципітації встановлено, що у всіх випадках вона була негативною.

У мишей із АФС (3-8 групи) реакція мікропреципітації була позитивною, що підтверджувало розвиток АФС.

У результаті проведених досліджень встановлено, що за умов АФС у нирках мишей лінії BALB/c активуються процеси переокиснення мембранних ліпідів.

Це проявлялось збільшенням вмісту ГПЛ на 27 % та ТБК-АП на 57 % відповідно, порівняно з контролем (рис. 1, 2).

АФС моделювали за допомогою кардіоліпіну (Sigma, США), який вводили внутрішньом'язово, чотири рази (30 мкг на 1 ін'єкцію, проміжки між ін'єкціями становили 14 діб) [6]. Для підвищення ефективності імунної відповіді кардіоліпін емульгували в 75 мкл повного ад'юванту Фрейнда (перша ін'єкція), наступні ін'єкції проводили з неповним ад'ювантом Фрейнда. АФС формувався через 2 тижні після останньої ін'єкції кардіоліпіну. Піддослідних тварин розділили на 8 груп: 1 та 2 – інтактні; 3 та 4 – миші з АФС; 5 та 6 – тварини з АФС, яким вводили L-аргінін (25 мг/кг, внутрішньоочеревинно), 7 та 8 – тварини з АФС, яким вводили аміногуанідин («Хімлаборреактив», Україна, 10 мг/кг).

Тканину нирок охолоджували у середовищі виділення, яке містило 0,25 М сахарози, 1 мМ ЕДТА та 10 мМ трис-НСІ-буфер (рН 7,4). У гомогенатах тканини нирок визначали: рівень продуктів вільнорадикального окиснення ліпідів за вмістом гідропероксидів ліпідів (ГПЛ), ТБК-активних продуктів (ТБК-АП), активність супероксиддисмутази (СОД, КФ 1.15.1.1), активність каталази (КАТ, КФ 1.11.1.6), вміст відновленого глутатіону (G-SH), активність сукцинатдегідрогенази (СДГ, КФ 1.3.99.1) та цитохромоксидази (ЦХО, КФ 1.9.3.1) за загальноприйнятими методами досліджень.

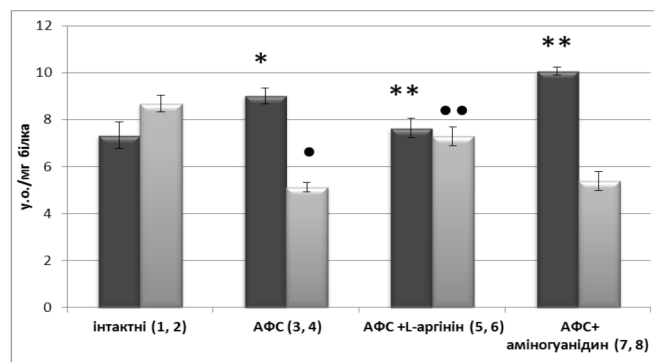


Рис. 3. Активність супероксиддисмутизи у тканині нирок мишей VALB/c за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому та при застосуванні L-аргініну та аміногуанідину ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )

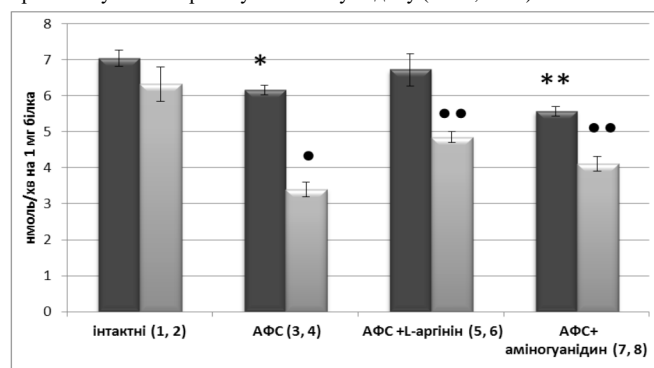


Рис. 4. Активність каталази у тканині нирок мишей VALB/c за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому та при застосуванні L-аргініну та аміногуанідину ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )

Активність СОД у нирках при АФС зростала на 23 %, порівняно із показниками інтактних тварин (рис.3). Отримані результати узгоджуються із даними С. Perez-Sanchez та співавт. [12]. На початкових етапах оксидативного стресу збільшення активних форм кисню, зокрема супероксидного аніон-радикалу, може індукувати зростання активності СОД [8]. В той же час у наших досліджах відбувалось зниження активності КАТ на 13 % та зменшення пулу G-SH на 14 % (рис. 4), порівняно із показниками тварин 1-ї групи.

Вказані зміни супроводжувались порушенням функціонування електронно-транспортного ланцюга мітохондрій у нирках, про що свідчило зменшення активності СДГ на 22 % та ЦХО на 33 %, порівняно з контролем (табл. 1). Встановлені зміни активності ензимів дихального ланцюга свідчать про пригнічення функції мітохондрій, що може супроводжуватись зниженням вмісту макроергічних сполук, та негативно позначається на перебігу біохімічних процесів у нирках при АФС [12, 5].

Таблиця 1

**Показники системи мітохондріального транспорту електронів у нирках мишей VALB/c за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому та при застосуванні L-аргініну та аміногуанідину ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )**

Група тварин	Показник	
	Активність сукцинатдегідрогенази, нмоль/хв·мг білка	Активність цитохромоксидази, мкмоль/хв·мг білка
Контроль	6,70±0,43	5,45±0,37
АФС	5,25±0,02 $p<0,05$	3,67±0,14 $p<0,005$
АФС+ L-аргінін	5,99±0,24 $p<0,05$	4,27±0,09 $p<0,01$
АФС + аміногуанідин	5,53±0,15 $p>0,05$	3,93±0,24 $p>0,05$

За умов експериментального АФС у тканині нирок мишей відбувається активація оксидативного стресу, порушення рівноваги у системі прооксиданти-антиоксиданти, що супроводжується накопиченням продуктів вільнорадикального окиснення, дискоординацією активності та вмісту компонентів антиоксидантного захисту та електронно-транспортного ланцюга мітохондрій. При проведенні досліджень на 18-й день вагітності у тварин з АФС спостерігалась активація вільнорадикальних процесів у нирках. Зокрема, вміст ГПЛ зростав на 38 %, а ТБК-АП – на 87 % (див. рис. 1, 2). Одночасно спостерігалось достовірне зниження активності ферментів антиоксидантного захисту, порівняно з контрольною групою вагітних мишей: СОД – на 41 % і КАТ – на 46 % та зменшення вмісту G-SH на 38 % (див. рис. 3, 4). Відомо, що при активації процесів переокиснення мембранних ліпідів, у тому числі, знижується енергозабезпечення клітин внаслідок пошкодження мітохондрій. У наших дослідях у 4-й групі тварин також виявлено порушення функціонування електронно-транспортного ланцюга мітохондрій у нирках, про що свідчило зменшення активності СДГ – на 41 % та ЦХО – на 53 % (табл. 2). При введенні L-аргініну мишам з АФС відмічено пригнічення активності процесів переокиснення мембранних ліпідів у нирках: зниження вмісту ГПЛ на 20 % і ТБК-АП на 34 %, порівняно з показниками тварин 3-ї групи (див. рис. 1, 2). Встановлено нормалізацію активності СОД (зниження на 15 %, порівняно з показниками тварин з АФС) (див. рис. 3). Спостерігалась тенденція до зростання активності КАТ, вміст G-SH підвищувався на 17 %, порівняно з показниками тварин з АФС (див. рис. 4). Встановлено зростання активності мітохондріальних СДГ на 14 % і ЦХО на 16 % відповідно, порівняно із показниками тварин 2-ї групи (див. табл. 1).

На тлі введення L-аргініну вагітним мишам 6 групи з АФС у гомогенатах тканини нирок відмічено послаблення активності процесів переокиснення мембранних ліпідів: кількість ГПЛ та ТБП зменшувалась відповідно на 24 % і 32 %. Про активацію системи антиоксидантного захисту у 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 із аналогічним показником у тварин 4 групи. Відновлення балансу у системі прооксиданти-антиоксиданти у нирках супроводжувалось зростанням активності мембранозв'язаних ферментів мітохондрій СДГ та ЦХО, відповідно – на 21 % та 42 %.

Таблиця 2

**Показники системи мітохондріального транспорту електронів у нирках мишей BALB/c за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому на 18 добу вагітності та при застосуванні L-аргініну та аміногуанідину (M±m, n=10)**

Група тварин	Показник	
	Активність сукцинатдегідрогенази, нмоль/хв·мг білка	Активність цитохромоксидази, мкмоль/хв·мг білка
Контроль	7,61±0,30	7,90±0,28
АФС	4,51±0,06 p<0,001	3,72±0,31 p<0,001
АФС+ L-аргінін	5,47±0,06 p<0,001	5,28±0,36 p<0,05
АФС + аміногуанідин	4,72±0,08 p>0,05	4,70±0,14 p<0,05

Таким чином, введення L-аргініну при АФС та на тлі вагітності у тварин з АФС супроводжується зменшенням проявів оксидативного стресу у нирковій тканині, що проявляється зниженням активності процесів пероксидного окиснення ліпідів, підвищенням активності та вмісту компонентів антиоксидантної системи та ферментів електронно-транспортного ланцюга мітохондрій. Отримані результати узгоджуються з даними про те, що нормальне функціонування системи L-аргінін-оксид азоту відіграє важливу роль у забезпеченні нормального перебігу вагітності, вазодилатуючих та антитромботичних властивостей ендотелію при АФС [7, 3].

На фоні застосування аміногуанідину встановлено зростання вмісту ГПЛ на 15 % порівняно з показниками тварин з АФС (див. рис. 1). Активність КАТ знижувалась на 10 %, в той же час зростала активність СОД на 12 % та вміст G-SH на 12 %, порівняно із показниками тварин 2-ї групи (див. рис. 3, 4). При введенні аміногуанідину активність СДГ та ЦХО достовірно не змінювалась, порівняно із показниками тварин з АФС (див. табл. 1).

При введенні аміногуанідину мишам 8-ї групи з АФС на тлі вагітності у гомогенатах тканини нирок відмічено зростання вмісту ТБК-АП 18 %, з одночасним підвищенням активності КАТ на 21 % та вмісту G-SH – на 30 % (див. рис. 2, 4), порівняно із аналогічними показниками тварин 4-ї групи. Водночас встановлено зростання активності ЦХО на 26 %, порівняно із аналогічним показником у тварин 4 групи (див. табл. 2).

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

### Висновки

1. За умов експериментального антифосфоліпідного синдрому у тканині нирок мишей відбувається активація оксидативного стресу, порушення рівноваги у системі прооксиданти-антиоксиданти, що супроводжується накопиченням продуктів вільнорадикального окиснення, дискоординацією активності та вмісту компонентів антиоксидантного захисту та електронно-транспортного ланцюга мітохондрій.
2. L-аргінін, при антифосфоліпідному синдромі та на тлі вагітності у тварин з антифосфоліпідним синдромом, сприяє зменшенню проявів оксидативного стресу у нирках, зокрема зниженню рівня пероксидного окиснення ліпідів, відновленню активності та вмісту компонентів антиоксидантної системи, що супроводжується покращанням функціонального стану електронно-транспортного ланцюга мітохондрій.
3. Аміногуанідин при антифосфоліпідному синдромі та на тлі вагітності у тварин з антифосфоліпідним синдромом викликає подальшу інтенсифікацію процесів вільнорадикального окиснення у тканині нирок, що поєднується з неоднозначними змінами компонентів антиоксидантної системи та активності ферментів тканинного дихання.

*Перспективи подальшого дослідження: планується підтвердити роль зменшення рівня синтезу оксиду азоту у патогенезі ураження нирок при експериментальному антифосфоліпідному синдромі та на тлі вагітності у тварин з*

АФС та доцільність застосування попередника синтезу оксиду азоту L-аргініну при цій патології шляхом вивчення результатів його поєднаного введення з інгібітором індукційної NO синтази аміногуанідином.

### Список літератури

1. Bitsadze VO, Khizroyeva DKh, Idrisova LE, Abramyan RR, Andreyeva MD, Makatsariya AD. Katastroficheskiy antifosfolipidnyy sindrom. voprosy patogeneza. Akusherstvo, ginekologiya i reproduksiya. 2015;2:32-53. [in Russian]
2. Makarenko YeV. Antifosfolipidnyy sindrom. Problemy zdorovya i ekologii. 2017;4(54):4-11. [in Russian]
3. Posokhova KA, Sak IYu, Sampara SR. Akusherskiy antyfosfolipidnyy sindrom i systema oksydu azotu (ohlyad literatury i rezultaty vlasnykh doslidzhen). Medychna khimiya. 2014; 16(1):73-80. [in Ukrainian]
4. Reshetnyak TM. Novyye vozmozhnosti v lechenii antifosfolipidnogo sindroma. Tromboz, gemostaz i reologiya. 2012;2:33-41. [in Russian]
5. Yaremchuk OZ. Patobiokhimichni mekhanizmy urazhennya nyrok pry eksperymentalnomu antyfosfolipidnomu syndromi. Visnyk problem biolohiyi i medytsyny. 2015;1(124):167-170. [in Ukrainian]
6. Zaychenko HV, Laryanovska YuB, Deyeva TV. Morfolohichnyy stan matky ta platsenty pry eksperymentalnomu modelyuvanni hestatsiynoho antyfosfolipidnogo syndromu na myshakh. Ukrayinskiy medychnyi almanakh. 2011;14(4):136-141. [in Ukrainian]
7. Ames PRJ, Batuca JR, Ciampa A, Ccone LI, Alves JD. Clinical Relevance of Nitric Oxide Metabolites and Nitrate Stress in Thrombotic Primary Antiphospholipid Syndrome. The Journal of Rheumatology. 2010;37(12):2523-2530.
8. Chou AK, Hsieh SC, Su YN. Neonatal and pregnancy outcome in primary antiphospholipid syndrome: a 10-year experience in one medical center. Pediatr Neonatol. 2009;50(4):143-146.
9. Giannakopoulos B, Krilis SA. The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. The New England Journal of Medicine. 2013;368:1033-1044.
10. Lopez-Pedraza Ch, Barbarroja N, Jimenez-Gomez Y, Collantes-Estevez E, Aguirre MA, Cuadrado MJ. Oxidative stress in the pathogenesis of atherothrombosis associated with antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus: new therapeutic approaches Rheumatology. 2016;55:2096-2108.
11. 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.
12. Perez-Sanchez C, Ruiz-Limon P, Aguirre MA. Mitochondrial dysfunction in antiphospholipid syndrome: implications in the pathogenesis of the disease and effects of coenzyme Q10 treatment. Blood. 2012;119(24):5859-5870.
13. Wahl D, Membre A, Perret-Guillaume C. Mechanisms of antiphospholipid-induced thrombosis: Effects on the protein C system. Current Rheumatology Reports. 2009;11(1):77-81.

### Реферати

#### ВЛИЯНИЕ L-АРГИНИНА И АМИНОГУАНИДИНА НА ПОКАЗАТЕЛИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ В ПОЧКАХ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АНТИФОСФОЛИПИДНОМ СИНДРОМЕ

Яремчук О. З., Посохова Е. А., Кулицкая М. И.

Целью работы было исследовать влияние L-аргинина и амингуанидина на состояние отдельных показателей прооксидантно-антиоксидантной системы и тканевого дыхания в почках при экспериментальном антифосфолипидном синдроме и на фоне беременности у животных с этой патологией. Антифосфолипидный синдром (АФС) моделировали на мышах линии BALB/c с помощью кардиолипина по методике Зайченко А.В. и соавт. (2011). Введение L-аргинина при АФС и на фоне беременности у животных с АФС сопровождается уменьшением проявлений оксидативного стресса, в частности снижением уровня пероксидного окисления липидов, восстановлением активности и содержания компонентов антиоксидантной системы и ферментов электронно-транспортной цепи в почках. Применение амингуанидина при АФС и на фоне беременности у животных с этой патологией проявляется дискоординацией в системе прооксиданты-антиоксиданты в почках животных.

**Ключевые слова:** экспериментальный антифосфолипидный синдром, почки, оксидативный стресс, антиоксидантная система.

#### INFLUENCE OF L-ARGININ AND AMINOGUANIDINE ON RENAL FREE-RADICAL OXIDATION RATES IN CASES OF EXPERIMENTAL ANTIPHOSPOLIPID SYNDROME

Yaremchuk O.Z., Posokhova K.A., Kulitska M.I.

The aim of the work was to study the influence of L-arginine and aminoguanidine on the state of specific parameters of prooxidant-antioxidant system and renal tissue respiration in cases of experimental antiphospholipid syndrome and against the background of pregnancy in animals with this pathology. Antiphospholipid syndrome (APS) was modeled using BALB/c mice by means of cardiolipin according to the technique by Zaichenko H.V., et al (2011). The administration of L-arginine in cases of APS with underlying pregnancy in the animals with APS was followed by the decrease of oxidative stress manifestations, specifically the decrease in lipid peroxidation level, reactivation and restitution of content of antioxidant system components and electron transport chain enzymes in kidneys. The aminoguanidine management in kidneys of animals with APS with underlying pregnancy was manifested by incoordination in prooxidant-antioxidant system in the animals with this pathology.

**Key words:** experimental antiphospholipid syndrome, kidneys, oxidative stress, antioxidant system.

Стаття надійшла 19.02.18р.

Рецензент Костенко В.О.