

Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему, випадок з практики, короткі повідомлення
УДК 577.152.36:616.36-06:616-005.6:547.495.9]-092.9

DOI 10.11603/1811-2471.2019.v.i4.10697

ДОСЛІДЖЕННЯ ВМІСТУ КАСПАЗИ-3 У ТКАНИНІ ПЕЧІНКИ ЗА УМОВ АНТИФОСФОЛІПІДНОГО СИНДРОМУ ТА ПРИ ЗАСТОСУВАННІ МОДУЛЯТОРІВ СИНТЕЗУ ОКСИДУ АЗОТУ

©О. З. Яремчук, К. А. Посохова, Н. Я. Летняк

Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України

РЕЗЮМЕ. Антифосфоліпідний синдром (АФС) – це аутоімунне захворювання, яке характеризується наявністю в крові антитіл до негативно заряджених фосфоліпідів мембран. Поширеність АФС становить близько 40–50 випадків на 100 000 осіб.

Мета – встановити вплив L-аргініну та аміногуанідину при їх окремому та комбінованому введенні на вміст каспази-3, нітрит-аніонів (NO_2^-) та нітрат-аніонів (NO_3^-) у тканині печінки за умов експериментального АФС.

Матеріал і методи. Дослідження виконано на мишах-самках лінії BALB/c, в яких моделювали АФС. Для корекції використовували прекурсор синтезу NO L-аргінін (25 мг/кг) та селективний блокатор індукційної NO-синтази аміногуанідин (10 мг/кг). Визначення вмісту каспази-3 у тканині печінки проводили методом Вестерн-блот аналізу. Про вміст NO у гомогенатах печінки тварин з АФС робили висновок за кількістю його стабільних метаболітів NO_2^- та NO_3^- .

Результати й обговорення. Встановлено зростання вмісту активної форми каспази-3 на 48 %, зменшення вмісту NO_2^- та зростання вмісту NO_3^- в печінці мишей BALB/c з АФС, відносно контролю. На фоні застосування L-аргініну виявлено зниження вмісту каспази-3 на 16 %, зростання вмісту NO_2^- та NO_3^- у печінці, порівняно із показниками групи тварин з АФС. На фоні введення аміногуанідину вміст каспази-3 та NO_2^- у печінці достовірно не змінювався, а вміст NO_3^- зростав, порівняно із показниками групи тварин з АФС. На фоні комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину встановлено зниження вмісту каспази-3 на 22 %, водночас спостерігалась нормалізація вмісту NO_2^- та NO_3^- у печінці

Висновки. Застосування попередника синтезу NO L-аргініну окремо та в комбінації із селективним інгібітором iNOS аміногуанідином приводить до зниження вмісту каспази-3 та нормалізації рівня стабільних метаболітів оксиду азоту NO_2^- та NO_3^- у печінці мишей BALB/c за умов АФС.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: антифосфоліпідний синдром; печінка; оксид азоту; каспаза-3.

Вступ. Вивчення антифосфоліпідного синдрому (АФС) є пріоритетним напрямком сучасної медицини. АФС – системне аутоімунне захворювання, що характеризується рецидивними тромбозами, невиношуванням вагітності за наявності стійкого підвищення антифосфоліпідних антитіл (аФЛ), включаючи антитіла до β_2 -глікопротеїну I (β_2 GPI), вовчаковий антикоагулянт, антитіла класів IgG/IgM до кардіоліпіну (аКЛ) [1, 2]. аФЛ є гетерогенною групою аутоантитіл, які реагують з фосфоліпідами, фосфоліпідозв'язувальними білками і комплексами фосфоліпідів з білками. Більшість аФЛ можуть зв'язуватися з різними білками, які беруть участь у каскаді згортання крові, викликають зміни в системі коагуляції та впливають на активність клітин, що призводить до тромбоемболічних станів [3]. Поширеність АФС складає близько 40–50 випадків на 100 000 осіб [4].

Одним із важливих компонентів патогенезу АФС, що сприяє дисфункції імунокомпетентних клітин і синтезу аутоантитіл, є оксидативний стрес, розвиток якого безпосередньо пов'язаний з активацією програмованої клітинної загибелі – апоптозом [5]. Високі концентрації NO, пероксинітрит індують загибель клітин шляхом апоптозу або некрозу. Сигнальні шляхи активації апоптозу і нек-

розу залежать від різних факторів. Фактори, що визначають специфічну чутливість клітин до NO-опосередкованого апоптозу, можуть бути пов'язані з енергетичним станом клітин, активацією каскаду каспаз, вивільненням мітохондріального цитохрому C, регуляцією експресії генів [6].

Апоптоз – основний механізм запрограмованої загибелі клітин, що має фундаментальне значення для регуляції росту, диференціювання тканин, підтримки гомеостазу та імунологічної толерантності [5, 7]. Відомо, що функціональна активація каспаз відіграє вирішальну роль у процесі апоптозу клітин. Механізми апоптозу пов'язані з функціонуванням консервативних цистеїн-аспарагінових протеїназ – каспаз, які здійснюють протеоліз білків, що відіграють важливу роль в ініціації апоптозу [8, 9]. Активація каспаз є ключовим етапом у проміжних і термінальних стадіях програмованої клітинної смерті. Вони порушують структуру, реплікацію і репарацію ДНК, переривають сплайсинг, розривають ядерні структури. Ключовою ланкою каскадних апоптичних процесів, як правило, є каспаза-3 [9]. Порушення функціональної здатності мітохондрій є ключовою ланкою індукції та реалізації апоптозу. Клітинний білок *bax* бере участь в утворенні пор у мітохонд-

Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему, випадок з практики, короткі повідомлення

ріальній мембрані, внаслідок чого знижується її мембранний потенціал і відкриваються пори у внутрішній мембрані. Через ці пори з мітохондрій у цитоплазму надходять апоптозіндукуючий фактор (AIF) і цитохром С, які в комплексі із цитоплазматичними білками Араф 2 здійснюють активацію системи каспаз (інтерлейкіноконвертуючих протеаз), зокрема каспази-3 [10]. Каспаза-3 – це ключовий фермент, який здійснює деградацію клітинної ДНК-полімерази С, білкового компонента рибонуклеопротейну U1, а також структурних білків мембран та цитоскелета, внаслідок чого ядро фрагментується, клітина набуває округлої форми і втрачає зв'язки із мікрооточенням [11].

При взаємодії аФЛ з фосфоліпідами мембран гепатоцитів розвивається дисбаланс компонентів коагуляційно-фібринолітичних цитокинових і кінінових каскадів [12]. Ураження печінки при АФС супроводжується в основному непрохідністю печінкових вен або нижньої порожнистої вени, вузловою регенеративною гіперплазією, яка асоціюється з наявністю аФЛ [13]. При ушкодженні гепатоцитів, поряд із проявами некрозу, також реалізуються процеси апоптозу внаслідок гранзим-В-порфіринозалежного шляху індукції каспази-3. Виділений цитотоксичними Т лімфоцитами та НК клітинами гранзим В проникає в цитоплазму гепатоцитів через пори у плазмолемі, утворені порфірином, і безпосередньо активує каспазу 3. Індукція послідовного каскаду протеолітичних реакцій призводить до розщеплення білків ядерного матриксу, дестабілізації структури хроматину, фрагментації ДНК, втрати реплікативної здатності гепатоцита [14]. Визначення каспази-3 відкриває додаткові діагностичні можливості як маркер раннього пошкодження тканин печінки при її хронічних захворюваннях [15].

Закономірності процесів апоптозу за умов антифосфоліпідного синдрому на сьогодні вивчені недостатньо.

Мета – дослідити вплив L-аргініну та аміногуанідину на вміст каспази-3, нітрит-аніонів (NO_2^-) та нітрат-аніонів (NO_3^-) у тканині печінки за умов антифосфоліпідного синдрому.

Матеріал і методи дослідження. Дослідження проводили на мишах-самках лінії BALB/c, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Експерименти здійснювали з дотриманням принципів біоетики відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених на Першому Національному конгресі з біоетики (Київ, 2001) та 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.

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) [16]. 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 поділили на 5 груп: 1 (контроль) – інтактні тварини; 2 – тварини з експериментальним АФС, 3 – тварини з АФС, яким вводили L-аргініну гідрохлорид (L-аргінін) («Sigma», USA, 25 мг/кг), 4 – тварини з АФС, яким вводили аміногуанідин («Хімлабораторреактив», Україна, 10 мг/кг), 5 – тварини з АФС, яким вводили L-аргінін у комбінації з аміногуанідином. L-аргінін та аміногуанідин вводили внутрішньоочеревинно один раз на день, повторно, упродовж 10 діб після формування АФС. Тварини контрольної групи отримували внутрішньоочеревинно ідентичні об'єми розчинника. Для підтвердження розвитку АФС проводили реакцію мікропреципітації з кардіоліпіновим антигеном, з використанням тест-системи «Антиген кардіоліпіновий, для реакції мікропреципітації» («Біолік», Україна) [16]. Через 10 діб з моменту підтвердження АФС тварин виводили з експерименту в умовах тіопентал-натрієвого наркозу (внутрішньоочеревинне введення 1 % розчину з розрахунку 50 мг/кг маси тварини).

Визначення вмісту каспази-3 та β -актину у тканині печінки проводили методом Вестерн-блот аналізу [17]. Вміст загального протеїну лізатів визначали методом М. М. Bradford [18]. 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 методикою UK. Laemmli [19]. Електрофоретично розділені протеїни з ПААГ переносили на нітроцелюлозну мембрану. Для детектування каспази-3 мембрану інкубували з первинними моноклональними анти-Caspase-3 антитілами (sc-373730, Santa Cruz Biotechnology, USA) у розведенні 1:300. Як вторинні антитіла використовували anti-mouse антитіла (A9917, Sigma, USA), кон'юговані з пероксидазою хрому (HRP). Для контролю однакового вмісту протеїнів у пробах мембрану інкубували з моноклональними анти- β -актин антитілами у розведенні 1:40 000. Імунореактивні сигнали на мембрані виявляли за допомогою інкубації мембрани з реактивами для посиленої хемілюмінесценції. Мембрану експонували на рентгенівську плівку,

Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему, випадок з практики, короткі повідомлення яку проявляли й фіксували стандартними фотопроявником та фіксажем. Інтенсивність сигналів на рентгенівських плівках обраховували за допомогою програми GELPRO32.

Про вміст NO у сироватці крові та гомогенатах печінки робили висновок за кількістю його стабільного метаболіту нітрит-аніону (NO_2^-) та нітрат-аніонів (NO_3^-). Тканину печінки охолоджували у середовищі виділення, яке містило 0,25 М сахарози, 1 мМ ЕДТА та 10 мМ трис-HCl-буфера (pH 7,4) [20]. Вміст NO_2^- визначали високоспецифічним спектрофотометричним методом Green L. C. et al. за даними кольорової реакції з реактивом Гріса [21]. Відновлення нітратів до нітритів здійснювали металічним цинком в оцтовокислому розчині, іони NO_2^- виявляли діазореакцією з реактивом Гріса, з наступним колориметричним визначенням [22].

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 й обговорення. Як показали результати проведених нами досліджень, при визначенні наявності аКЛ за допомогою реакції мікропреципітації встановлено, що у тварин контрольної групи реакція мікропреципітації була негативною. Встановлено, що у тварин 2–5 груп, в яких моделювали АФС, спостерігалась преципітація, що підтверджувало розвиток АФС у експериментальних мишей BALB/c [16].

Одним із важливих патогенетичних механізмів формування аутоімунних процесів при АФС є зв'язування специфічного кофактора – глікопротеїну $\beta_2\text{GPI}$ з негативно зарядженими ділянками апоптичних клітин. Епітоп, що утворюється при цьому, піддається розпізнаванню антифосфоліпідними антитілами [23, 24]. Більше того, процес програмованої клітинної загибелі залучений до утворення аФС [25].

Доведено, що за умов АФС в ендотелії порушуються синтез та біодоступність оксиду азоту (NO) [26, 27]. Також доведений зв'язок між апоптичними змінами і системою оксиду азоту (NO). Зокрема, встановлено, що дисбаланс між рівнями NO і активних форм кисню (зменшення утворення першого і зростання кількості останніх) призводить до апоптозу ендотеліальних клітин [28]. З іншого боку, показано, що надлишкове утворення NO відіграє негативну роль, викликаючи порушення стану ендоплазматичного ретикулуму та ініціацію апоптозу [29].

При NO-індукованому апоптозі відбуваються зменшення мітохондріального трансмембранного потенціалу, вивільнення цитохрому С з міто-

хондрій, активація каспаз, конденсація хроматину, фрагментація ДНК, збільшення експресії білка p53, активація експресії проапоптичних генів, таких як *bax* і p21-інгібітор кіназ, зниження експресії антиапоптичних генів. Накопичення p53 у клітинах може відігравати роль як у регуляції апоптозу, так і в пригніченні синтезу надмірних кількостей NO, знижуючи експресію індукбельної ізоформи ферменту NO-синтази (iNOS) та ендотеліальної NO-синтази (eNOS) [6].

Ключова роль у розвитку апоптозу належить ферменту родини протеаз – каспазі-3 [25]. Каспази розглядають як ефекторні молекули програмованої смерті клітин, каспаза-3 відіграє важливу роль у реалізації як мітохондріального, так і рецепторного шляху запуску апоптозу [8]. Саме оцінка активності каспаз-3 вважається одним з основних методів визначення рівня апоптозу [9].

У результаті проведених досліджень встановлено зростання вмісту активної форми каспази-3 (p17) на 48 % в печінці мишей лінії BALB/c за умов АФС (рис. 1, 2). Підвищення вмісту каспази-3, ймовірно, зумовлено активацією мітохондріального шляху апоптозу, який пов'язаний з надходженням проапоптогенних сигналів, до яких належать активні форми кисню [8]. У попередніх наших дослідженнях показано активацію процесів вільнорадикального окиснення у печінці мишей BALB/c за умов АФС [30].

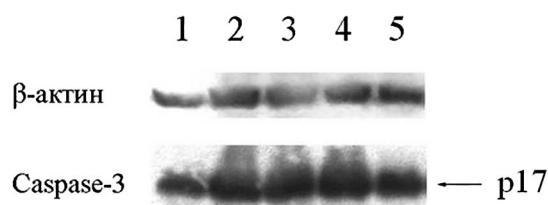


Рис. 1. Вестерн-блот аналіз вмісту активної форми каспази-3 у печінці контрольних та експериментальних мишей лінії BALB/c за умов антифосфоліпідного синдрому (блотограма). Умовні позначення: 1 – Контроль; 2 – Антифосфоліпідний синдром (АФС); 3 – АФС + L-аргінін; 4 – АФС + аміногуанідин; 5 – АФС + L-аргінін + аміногуанідин.

У результаті проведених нами досліджень встановлено зменшення вмісту стабільного метаболіту оксиду азоту NO_2^- у печінці на 13 %, проте рівень NO_3^- у печінці тварин з АФС зростав на 20 % відносно контролю (рис. 3, 4).

Отримані нами результати щодо зниження концентрації NO_2^- можна пояснити тим, що аФЛ можуть інгібувати ендотеліальну NO-синтазу, що супроводжується зменшенням синтезу NO [26,

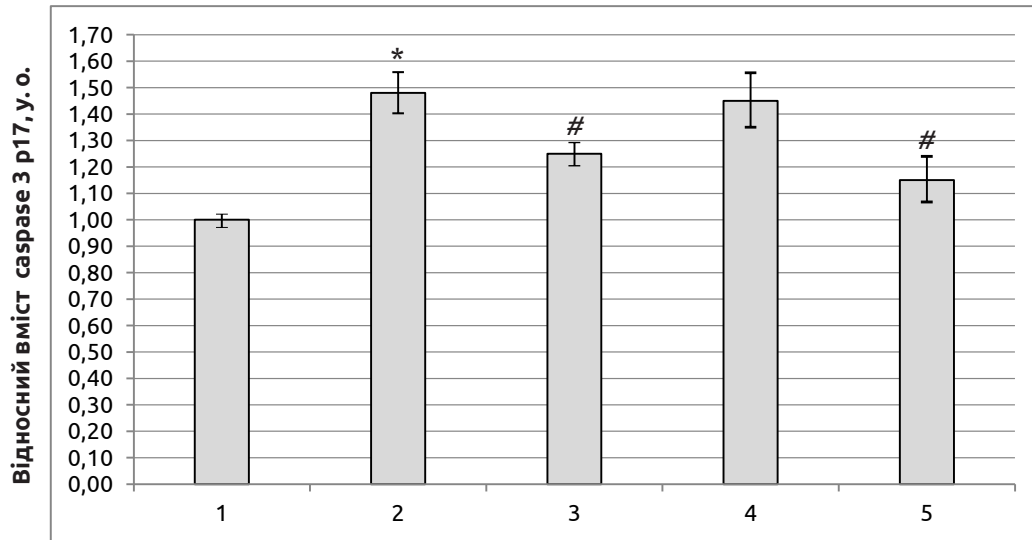


Рис. 2. Вестерн-блот аналіз вмісту активної форми каспази-3 у печінці контрольних та експериментальних мишей лінії BALB/c за умов антифосфоліпідного синдрому (результати денситометрії). Умовні позначення: 1–Контроль; 2 – Антифосфоліпідний синдром (АФС); 3 – АФС + L-аргінін; 4 – АФС + аміногуанідин; 5 – 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, $P < 0,05$.

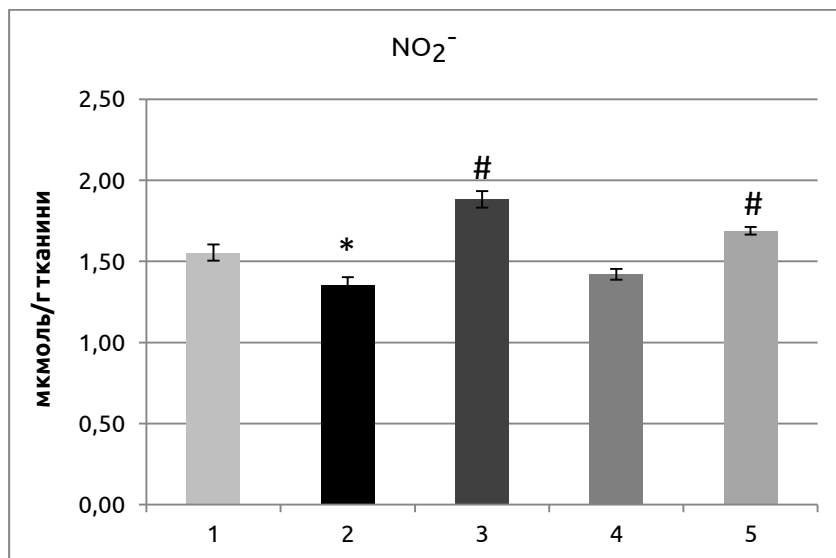


Рис. 3. Вміст NO_2^- у печінці мишей BALB/c за умов антифосфоліпідного синдрому та при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину ($M \pm m$, $n=10$).

27]. Порушення біодоступності NO може бути пов'язано як зі зниженням концентрації субстрату – L-аргініну, так і з утворенням супероксиданіона, який швидко зв'язує та інактивує NO, утворюючи токсичний пероксинітрид [31].

Високий рівень NO_3^- у печінці мишей з АФС, ймовірно, зумовлений підвищеною експресією iNOS, що може бути спричинено зростанням продукції прозапальних цитокінів [32]. Ймовірно, підвищена концентрація NO в крові, що притікає, за механізмом зворотного зв'язку різко інгібує експресію eNOS в печінці. Таким чином, незважаючи

на гіперпродукцію NO, виникає відносна його недостатність на рівні внутрішньопечінкової мікроциркуляції [33, 34], що підтверджується зниженням вмісту NO_2^- у печінці, яке ми отримали у наших дослідженнях.

Під впливом попередника синтезу NO L-аргініну встановлено зниження вмісту каспази-3 у тканині печінки на 16 % відносно групи тварин з АФС (див. рис. 1, 2). На фоні застосування L-аргініну у тварин з АФС встановлено зростання вмісту NO_2^- на 39 % та NO_3^- на 45 % у печінці, порівняно з показниками мишей з АФС (див. рис. 3, 4).

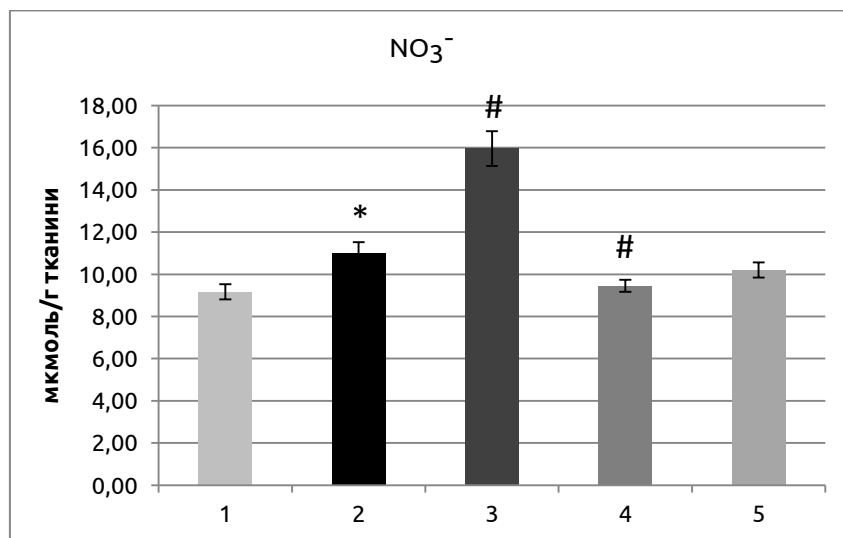


Рис. 4. Вміст NO₃⁻ у печінці мишей BALB/c за умов антифосфоліпідного синдрому та при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину (M±m, n=10).

Отримані нами результати можна пояснити тим, що NO активує розчинну гуанілатциклазу. Підвищення внутрішньоклітинного рівня цГМФ сприяє зменшенню концентрації кальцію й активує синтез білків – інгібіторів каспаз. Інші антиапоптичні механізми дії NO пов'язані з індукцією синтезу білків теплового шоку HSP32 і HSP70, які пригнічують активність каспаз і стабілізують мембрани мітохондрій, та активацією ферменту гемооксигенази [6]. NO проявляє інгібувальний вплив на активність протеаз типу каспаз-3, що здійснюється за тіолозалежним механізмом [35].

Як показали результати наших досліджень, введення мишам BALB/c з АФС селективного інгібітора iNOS аміногуанідину не викликало достовірних змін вмісту каспази-3 у тканині, порівняно із показниками тварин з АФС (див. рис. 1, 2). На фоні введення аміногуанідину концентрація NO₂⁻ у печінці достовірно не змінювалася, а вміст NO₃⁻ зростав на 14 % (див. рис. 3, 4).

Наступним завданням нашого дослідження було встановлення впливу L-аргініну та аміногуанідину при їх комбінованому застосуванні на вміст активної форми каспази-3 у печінці експериментальних мишей лінії BALB/c за умов АФС.

Як показали результати наших досліджень, на фоні комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину в тканині печінки встановлено зниження вмісту каспази-3 на 22 %, порівняно із показниками групи тварин із АФС (див. рис. 1, 2). При комбінованому введенні тваринам з АФС L-аргініну з аміногуанідином встановлено нормалізацію вмісту стабільних метаболітів оксиду азо-

ту NO₂⁻ та NO₃⁻ у печінці, порівняно із показниками 2-ї групи мишей BALB/c з АФС (див. рис. 3, 4).

Перехресний зв'язок між гепатотоксичними і захисними механізмами NO визначає його роль у пошкодженні клітин та механізмах розвитку апоптозу. Баланс між про- і антиапоптичними сигнальними механізмами, їх активація або пригнічення в результаті синтезу NO, супроводжується або збереженням структури тканини, або загибеллю клітин в результаті апоптозу [6].

Висновки. 1. У печінці мишей BALB/c із АФС відбувається зростання вмісту активної форми каспази-3 на 48 %, зменшення вмісту NO₂⁻ та зростання вмісту NO₃⁻, порівняно з контролем.

На фоні застосування L-аргініну відмічено зниження вмісту каспази-3 на 16 %, зростання вмісту NO₂⁻ та NO₃⁻ у печінці, порівняно із групою тварин з АФС.

Введення аміногуанідину при АФС не впливає на вміст каспази-3 та NO₂⁻ у печінці, але спричиняє зростання вмісту NO₃⁻, порівняно із показниками групи тварин з АФС.

На фоні комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину відбувається зниження вмісту каспази-3 на 22 %, з одночасною нормалізацією вмісту NO₂⁻ та NO₃⁻ у печінці тварин з АФС.

Перспективи подальших досліджень. Отримані нами результати є підґрунтям для подальшого поглибленого вивчення можливостей застосування модуляторів синтезу оксиду азоту як засобів корекції ураження печінки при антифосфоліпідному синдромі.

ЛІТЕРАТУРА

1. Clark K. Antiphospholipid syndrome / K. Clark, I. Giles // *Medicine*. – 2018. – Vol. 46 (2). – P. 118–125.
2. Ліщук-Якимович Х. О. Антифосфоліпідний синдром у практиці лікаря-репродуктолога / Х. О. Ліщук-Якимович // *Акушерство. Гінекологія. Генетика*. – 2016. – № 1. – С. 1–3.
3. Favalaro E. J. Variability and diagnostic utility of antiphospholipid antibodies including lupus anticoagulants / E. J. Favalaro // *Int. Jnl. Lab. Hem.* – 2013. – No. 35. – P. 269–274.
4. Ambrosino P. Autoimmune liver diseases and antiphospholipid antibodies positivity: A meta-analysis of literature studies / P. Ambrosino, R. Lupoli, G. Spadarella [et al.] // *J. Gastrointest. Liver Dis.* – 2015. – Vol. 24, No. 1. – P. 25–34.
5. Механізми токсичної дії (некроз, апоптоз) хлоралканів на фракції ядерного хроматину клітин печінки / Ю. І. Губський, Є. Л. Левицький, Г. Г. Горюшко [та ін.] // *Тетрахлорметан. Современные проблемы токсикологии*. – 2008. – № 2. – С. 8–16.
6. Киселева А. В. Роль оксида азота в повреждении нейронов при критических состояниях / А. В. Киселева, Ю. А. Чурляев, Е. В. Григорьев // *Общая реаниматология*. – 2009. – Т. 5, № 5. – С. 80–84. DOI: 10.15360/1813-9779-2009-5-80
7. Аксененко М. Б. Экспрессия каспазы-3 в тканях экспериментальной меланомы и ее метастазов при ингибировании матриксной металлопротеиназы / М. Б. Аксененко, Л. А. Шестакова, Т. Г. Рукша // *Архив патологии*. – 2013. – № 1. – С. 19–23.
8. Марущак М. І. Каспазний механізм активації апоптозу в патогенезі hcl-індукованого гострого ураження легень в експерименті / М. І. Марущак, Л. А. Гришук, Н. І. Ярема // *Експериментальна і клінічна медицина*. – 2012. – № 2 (55). – С. 9–13.
9. Интенсивность процессов апоптоза, активность аконитатгидратазы и уровень цитрата у пациентов с сахарным диабетом 2 типа, осложненным стеатогепатитом, при применении эпифамина на фоне базисного лечения / С. С. Попов, А. Н. Пашков, А. А. Агарков [и др.] // *Биомедицинская химия*. – 2015. – Т. 61, вып. 3. – С. 400–406.
10. Guicciardi M. E. Apoptosis as a mechanism for liver disease progression / M. E. Guicciardi, G. J. Gores // *Semin. Liver Dis.* – 2010. – No. 30 (4). – P. 402–410.
11. Mechanism of Hepatocyte Apoptosis / Lei Cao, Xi-Bing Quan¹, Wen-Jiao Zeng [et al.] // *Journal of Cell Death*. – 2016. – No. 9. – P. 19–29.
12. Голубова О. А. Поражение печени при антифосфоліпідном синдроме / О. А. Голубова // *Мистецтво лікування: журнал сучасного лікаря*. – 2007. – № 3. – С. 35–41.
13. Tsutsumi M. Hepatic Manifestations of the Antiphospholipid Syndrome / M. Tsutsumi, M. D. Dand Takao Koike // *Internal Medicine*. – 2000. – Vol. 39, No. 1. – P. 5–7.
14. Volkmann X. Caspase activation is associated with spontaneous recovery from acute liver failure / X. Volkmann, M. Anstaett, J. Hadem [et al.] // *Hepatology*. – 2008. – No. 47 (5). – P. 1624–1633.
15. Иммуногистохимический анализ активности каспазы-3 в биопсиях печени пациентов при моно- и смешанных инфекциях / И. И. Токин, И. Б. Токин, Т. В. Сологуб [и др.] // *Клинист*. – 2014. – № 2. – С. 29–32.
16. Зайченко Г. В. Морфологічний стан матки та плаценти при експериментальному моделюванню гестаційного антифосфоліпідного синдрому на мишах / Г. В. Зайченко, Ю. Б. Лар'яновська, Т. В. Деєва // *Український медичний альманах*. – 2011. – № 14 (4). – С. 136–141.
17. Хоменко А. В. Гідроксилування холекальциферолу в гепатоцитах щурів за дії преднізолону / А. В. Хоменко // *Укр. біохім. журнал*. – 2013. – № 85, № 3. – С. 73–78.
18. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
19. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature*. – 1970. – Vol. 227, No. 5259. – P. 680–685.
20. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике / В. С. Камышников – М.: МЕДпресс-информ, 2004. – 920 с.
21. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids / L. C. Green, A. W. Davie, J. Golowski [et al.] // *Anal. Biochem.* – 1982. – Vol. 126 (1). – P. 131–138. DOI: 10.1016/0003-2697(82)90118-x
22. Кіселик І. О. Особливості визначення нітратів та нітритів у крові хворих на вірусні гепатити та жовтяниці іншої етіології / І. О. Кіселик, М. Д. Луцик, Л. Ю. Шевченко // *Лаб. діагностика*. – 2001. – № 3. – С. 43–45.
23. Apoptosis and the antiphospholipid syndrome / J. Rauch, R. Subang, P. D'Agillo [et al.] // *Autoimmun.* – 2000. – Vol. 15 (2). – P. 231–235.
24. Antiphospholipid antibodies mediate autoimmunity against dying cells / L. Andreoli, M. Fredi, C. Nalli [et al.] // *Autoimmunity*. – 2013. – Vol. 46 (5). – P. 302–306.
25. Caspase family proteases and apoptosis / T. J. Fan, L. H. Han, R. S. Cong [et al.] // *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. – 2005. – Vol. 37 (11). – P. 719–727.
26. Antiphospholipid antibodies promote leukocyte-endothelial cell adhesion and thrombosis in mice by antagonizing eNOS via beta2GPI and apoER2 / S. Ramesh, C. N. Morrell, C. Tarango [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2011. – No. 121 (1). – P. 120–131. DOI: 10.1172/JCI39828.
27. Clinical relevance of nitric oxide metabolites and nitrate stress in thrombotic primary antiphospholipid syndrome / P. R. Ames, J. R. Batuca, A. Ciampa [et al.] // *J. Rheumatol.* – 2010. – No. 37 (12). – P. 2523–2530. doi:10.3899/jrheum.100494C1.
28. sFRP4 signalling of apoptosis and angiostasis uses nitric oxide-cGMP-permeability axis of endothelium / U. Saran, K. P. Mani, U. M. Balaguru [et al.] // *Nitric Oxide*. – 2017. – Vol. 66. – P. 30–42. DOI: 10.1016/j.niox.2017.02.012.
29. Nitric oxide-mediated pathways and its role in the degenerative diseases / N. Zhang, Y. Diao, R. Hua [et al.] // *Front Biosci (Landmark Ed)*. – 2017. – Vol. 22. – P. 824–834.
30. Показники прооксидантно-антиоксидантної системи печінки при експериментальному антифосфоліпідному синдромі та застосуванні l-аргініну /

Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему, випадок з практики, короткі повідомлення

О. З. Яремчук, К. А. Посохова, А. Р. Брик [та ін.] // Медична та клінічна хімія. – 2017. – Т. 19, № 3. – С. 63–70.

31. Lopez-Pedrerera Ch. Oxidative stress in the pathogenesis of atherothrombosis associated with antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus: new therapeutic approaches / Ch. Lopez-Pedrerera, N. Barroja, Y. Jimenez-Gomez // *Rheumatology*. – 2016. – No. 55. – P. 2096–2108.

32. Svenungsson E. Increased levels of proinflammatory cytokines and nitric oxide metabolites in neuropsychiatric lupus erythematosus / E. Svenungsson, M. Andersson, L. Brundin [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 2001. – No. 60. – P. 372–379.

REFERENCES

1. Clark, K., & Giles, I. (2018). Antiphospholipid syndrome. *Medicine*, 46 (2), 118-125.

2. Lishchuk-Iakymovych, Kh.O. (2016). Antyfosfolipidnyi syndrom u praktytsi likaria-reproduktoloha [Antiphospholipid syndrome in the practice of a reproductive physician]. *Akusherstvo. Hinekolojiia. Henetyka – Obstetrics. Gynecology. Genetics*, 1, 1-3 [in Ukrainian].

3. Ambrosino, P., Lupoli, R., Spadarella, G., Tarantino, P., Minno, A. Di., & Tarantino, L. (2015). Autoimmune liver diseases and antiphospholipid antibodies positivity: A meta-analysis of literature studies. *J Gastrointest. Liver Dis. March*, 24, (1), 25-34.

4. Favalaro, E.J. (2013). Variability and diagnostic utility of antiphospholipid antibodies including lupus anticoagulants. *Int. Jnl. Lab. Hem.*, 35, 269-274.

5. Hubskeyi, Yu.I., Levytskyi, Ye.L., & Horiushko, H.H. (2008). Mekhanizmy toksychnoi dii (nekroz, apoptoz) khloralkaniv na fraktsii yadernoho khromatynu klityny pechinky [Mechanisms of toxic action (necrosis, apoptosis) of chloroalkanes on nuclear chromatin fractions of liver cells]. *Sovremennye problemy toksykologii – Current Problems of Toxicology*, 2, 8-16 [in Ukrainian].

6. Kiseleva, A.V., Churlyayev, Yu.A., & Grigorev, E.V. (2019). Rol oksida azota v povrezhdenii neyronov pri kriticheskikh sostoyaniakh [The role of nitric oxide in damage to neurons in critical conditions]. *Obshchaya reanimatologiya – General Resuscitation*, 5, 80-84. doi: 10.15360/1813-9779-2009-5-80 [in Russian].

7. Aksenenko, M.B., Shestakova, L.A., & Ruksha, T.G. (2013). Ekspresiya kaspazy-3 v tkanyakh eksperimentalnoy melanomy i ee metastazov pri ingibirovanii matriksnoi metalloproteinazy [Caspase-3 expression in the tissues of experimental melanoma and its metastases during matrix metalloproteinase inhibition]. *Arkhiv patologii – Pathology Archive*, 1, 19-23 [in Russian].

8. Marushchak, M.I., Hryshchuk, L.A., & Yarema N.I. (2012). Kaspaznyi mekhanizm aktyvatsii apoptozu v patogenezi hcl-indukovanoho hostroho urazhennia lehen v eksperymenty [Caspase mechanism of apoptosis activation in the pathogenesis of hcl-induced acute lung injury in experiment]. *Eksperymentalna i klinichna medytsyna – Experimental and Clinical Medicine*, 2 (55), 9-13 [in Ukrainian].

9. Popov, S.S., Pashkov, A.N., Agarkov, A.A., & Shulgina, K.K. (2015). Intensivnost protsessov apoptoza, aktiv-

33. Wiest R. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough / R. Wiest, R. J. Groszmann // *Hepatology*. – 2002. – Vol. 35, No. 2. – P. 478–491.

34. Олещук О. М. Стан системи оксиду азоту при експериментальному цирозі печінки / О. М. Олещук // Вісник проблем біології і медицини. – 2014 – Вип. 3, Т. 2 (111). – С. 198–202.

35. Аргинин в медичинській практиці (обзор літератури) / Ю. М. Степанов, І. Н. Кононов, А. І. Журбина [и др.] // Журнал АМН України. – 2004. – Т. 10, № 1. – С. 340–352.

nost akonitatgidratazy i uroven tsitrata u patsiyentov s sakharnym diabetom 2 tipa, oslozhnennym steatogepatitom, pri primeneni epifamina na fone bazisnogo lecheniya [The intensity of apoptosis processes, the activity of aconitate hydratase and the level of citrate in patients with type 2 diabetes mellitus complicated by steatohepatitis when using epifamine against the background of basic treatment]. *Biomeditsinskaia khimiya – Biomedical Chemistry*, 61, 3, 400-406. [in Russian].

10. Guicciardi, M.E., & Gores, G.J. (2010). Apoptosis as a mechanism for liver disease progression. *Semin. Liver Dis.*, 30 (4), 402-410.

11. Lei Cao, Xi-Bing Quan, Wen-Jiao Zeng, Xiao-Ou Yang and Ming-Jie Wang (2016). Mechanism of hepatocyte apoptosis. *Journal of Cell Death*, 9, 19- 29.

12. Golubova, O.A. (2007). Porazhenie pecheni pri antifosfolipidnom sindrome [Liver damage in antiphospholipid syndrome]. *Mystetstvo likuvannia: zhurnal suchasnoho likaria – The Art of Healing: The Journal of the Modern Doctor*, 3, 35-41 [in Ukrainian].

13. Tsutsumi, M., Dand Takao Koike, M.D. (2000). Hepatic Manifestations of the antiphospholipid syndrome. *Internal Medicine*, 39, (1), 5-7.

14. Volkmann, X., Anstaett, M., & Hadem, J. (2008). Caspase activation is associated with spontaneous recovery from acute liver failure. *Hepatology*, 47 (5), 1624-1633.

15. Tokin, I. I., Tokin, I.B., Sologub, T.V., Filimonova, G.F., Khussar, P. (2014). Immunogistokhimicheskiy analiz aktivnosti kaspazy-3 v biopsiyakh pecheni patsiyentov pri mono- i smeshannykh infektsiyakh [Immunohistochemical analysis of caspase-3 activity in liver biopsies of patients with mono- and mixed infections]. *Klinitsist – The Clinician*, 2, 29-32 [in Russian].

16. Zaichenko, H.V., Larianovska, Iu.B., & Deieva, T.V. (2011). Morfolohichniy stan matky ta platsenty pry eksperymentalnomu modeliuvanii hestatsiynoho antyfosfolipidnogo syndromu na myshakh [Morphological state of the uterus and placenta in experimental modeling of gestational antiphospholipid syndrome in mice]. *Ukrainskyi medychnyi almanakh – Ukrainian Medical Almanac*, 14 (4), 136-141 [in Ukrainian].

17. Khomenko, A.V. (2013). Hidroksyliuvannia kholekaltsyferolu v hepatotsytakh shchuriv za dii prednizolonu [Hydroxylation of cholecalciferol in rat hepatocytes by the

- Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему, випадок з практики, короткі повідомлення
action of prednisolone]. *Ukrainskyi biokhimichnyi zhurnal – Ukrainian Biochemical Journal*, 85, 3, 73-78 [in Ukrainian].
18. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, 72, 248-254.
 19. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 5259, 680-685.
 20. Kamyshnikov, V.S. (2004). Spravochnik po kliniko-biokhimicheskim issledovaniyam i laboratornoy diagnostike [Manual on clinical biochemical research and laboratory diagnostics]. Moscow: MEDpress-inform [in Russian].
 21. Green, L.C., David, A.W., Golawski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., & Tannenbaum, S.R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.*, 126 (1), 131-138. doi: 10.1016/0003-2697(82)90118-x
 22. Kiselyk, I.O., Lutsyk, M.D., & Shevchenko, L.Yu. (2001). Osoblyvosti vyznachennia nitrativ ta nitrytiv u krovii khvorykh na virusni hepatyty ta zhovtianytsi inshoi etiologii [Features of determination of nitrates and nitrites in blood of patients with viral hepatitis and jaundice of other etiology]. *Lab. diahnozyka – Lab. Diagnostics*, 3, 43-45 [in Ukrainian].
 23. Rauch, J., Subang, R., D'Agnillo, P., Koh, J. S., Levine, J. S. J. (2000). Apoptosis and the antiphospholipid syndrome. *Autoimmun.*, 15 (2), 231-235.
 24. Andreoli, L., Fredi, M., Nalli, C., Franceschini, F., Meroni P. L., & Tincani, A. (2013). Antiphospholipid antibodies mediate autoimmunity against dying cells. *Autoimmunity*, 46 (5), 302-306.
 25. Fan, T.J., Han, L.H., Cong, R.S., & Liang, J. (2005) Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 37 (11), 719-727.
 26. Ramesh, S., Morrell, C.N., Tarango, C., Thomas, G.D., Yuhanna, I.S., Girardi G., & Mineo, Ch. (2011). Antiphospholipid antibodies promote leukocyte-endothelial cell adhesion and thrombosis in mice by antagonizing eNOS via beta2GPI and apoER2. *J. Clin. Invest.*, 121 (1), 120-131. doi: 10.1172/JCI39828.
 27. Ames, P.R.J., Batuca, J.R., Ciampa, A., Cone, L.I., & Alves, J.D. (2010). Clinical relevance of nitric oxide metabolites and nitrate stress in thrombotic primary antiphospholipid syndrome. *The Journal of Rheumatology*, 37 (12), 2523-2530. doi:10.3899/jrheum.100494C1.
 28. Saran, U., Mani, K.P., Balaguru, U.M., Swaminathan, A., Nagarajan, S., Dharmarajan, A.M., & Chatterjee, S. (2017). sFRP4 signalling of apoptosis and angiostasis uses nitric oxide-cGMP-permeability axis of endothelium. *Nitric Oxide*, 66, 30-42. doi: 10.1016/j.niox.2017.02.012. Epub 2017 Mar 4.
 29. Zhang, N., Diao, Y., Hua, R., Wang, J., Han, S., Li, J., & Yin, Y. (2017). Nitric oxide-mediated pathways and its role in the degenerative diseases. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 22, 824-834.
 30. Yaremchuk, O.Z., Posokhova, K.A., Bryk, A.R., Kulitska, M.I., Kuzmak, I.P., & Mehno, N.Ya. (2017). Pokaznyky prooksydantno-antyoksydantnoi systemy pechinky pry eksperymentalnomu antyfosfolipidnomu syndromi ta zastosuvanni L-argininu [Parameters of liver prooxidative-antioxidant system in cases of experimental antiphospholipid syndrome and L-arginin administration]. *Medychna ta klinichna khimii – Medical and Clinical Chemistry*, 19 (3), 63-70 [in Ukrainian].
 31. Lopez-Pedraza, Ch., Barbarroja, N., & Jimenez-Gomez, Y. (2016). Oxidative stress in the pathogenesis of atherothrombosis associated with antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus: new therapeutic approaches. *Rheumatology*, 55, 2096-2108.
 32. Wiest, R., & Groszmann, R.J. (2002). The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough. *Hepatology*, 35 (2), 478-491.
 33. Svenungsson, E., Andersson, M., Brundin, L., Vollehoven, R., Khademi, M., Tarkowski, A., Greitz, D., Dahlström, M., Lundberg, I., & Klareskog, L. (2001). Increased levels of proinflammatory cytokines and nitric oxide metabolites in neuropsychiatric lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis*, 60, 372-379.
 34. Oleshchuk, O.M. (2014). Stan systemy oksydu azotu pry eksperymentalnomu tsyrozi pechinky [The state of the system of nitric oxide in experimental cirrhosis of the liver]. *Visnyk problem biologii i medytsyny – Bulletin of Problems of Biology and Medicine*, 3, 2 (111), 198-202 [in Ukrainian].
 35. Stepanov, Iu.M., Kononov, I.N., Zhurbina, A.I., & Filippova, A.Iu. (2004). Arginin v meditsynskoy praktike [Arginine in medical practice]. *Zhurnal AMN Ukrainy – Journal of the Academy of Medical Sciences of Ukraine*, 10, (1), 340-352 [in Ukrainian].

ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КАСПАЗЫ-3 В ТКАНИ ПЕЧЕНИ В УСЛОВИЯХ АНТИФОСФОЛИПИДНОГО СИНДРОМА И ПРИ ПРИМЕНЕНИИ МОДУЛЯТОРОВ СИНТЕЗА ОКСИДА АЗОТА

©О. З. Яремчук, Е. А. Посохова, Н. Я. Летняк

Тернопольский национальный медицинский университет имени И. Я. Горбачевского МЗ Украины

РЕЗЮМЕ. Антифосфолипидный синдром (АФС) – это аутоиммунное заболевание, характеризующееся наличием в крови антител к отрицательно заряженным фосфолипидам мембран. Распространенность АФС составляет около 40–50 случаев на 100 000 человек.

Цель – установить влияние L-аргинина и аминоксидина на содержание каспазы-3, нитрит-анионов (NO₂⁻) и нитрат-анионов (NO₃⁻) в ткани печени при экспериментальном АФС.

Материал и методы. Исследование выполнено на мышцах-самках линии BALB/c, у которых моделировали АФС. Для коррекции использовали прекурсор синтеза NO L-аргинин (25 мг/кг) и селективный блокатор индуги-

Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему, випадок з практики, короткі повідомлення
бельной NO-синтазы амингуанидин (10 мг/кг). Определение содержания каспазы-3 в ткани печени проводили методом Вестерн-блот анализа. О содержании NO в гомогенатах печени животных с АФС делали вывод по количеству его стабильных метаболитов NO_2^- и NO_3^- .

Результаты. Установлено увеличение содержания активной формы каспазы-3 на 48 %, уменьшение содержания NO_2^- и рост содержания NO_3^- в печени мышей BALB/c с АФС, по сравнению с группой контроля. На фоне применения L-аргинина установлено снижение содержания каспазы-3 на 16 %, рост содержания NO_2^- и NO_3^- в печени, по сравнению с группой животных с АФС. На фоне введения амингуанидина содержание каспазы-3 и NO_2^- в печени достоверно не менялось, а содержание NO_3^- увеличилось, по сравнению с показателями группы животных с АФС. На фоне комбинированного применения L-аргинина и амингуанидина установлено снижение содержания каспазы-3 на 22 %, в то же время наблюдалась нормализация содержания NO_2^- и NO_3^- в печени.

Выводы. Применение предшественника синтеза NO L-аргинина отдельно и в комбинации с селективным ингибитором iNOS амингуанидином приводит к снижению содержания каспазы-3 и нормализации уровня стабильных метаболитов синтеза оксида азота NO_2^- и NO_3^- в печени мышей BALB/c в условиях АФС.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: антифосфолипидный синдром; печень; оксид азота; каспаза-3.

CASPASE-3 CONTENT IN THE LIVER TISSUE IN ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME AND USE OF NITRIC OXIDE SYNTHESIS MODULATORS

©O. Z. Yaremchuk, K. A. Posokhova, N. Ya. Letniak

I. Horbachevsky Ternopil National Medical University

SUMMARY. Antiphospholipid syndrome (APS) is an autoimmune disease characterized by the presence of antibodies to negatively charged membrane phospholipids in the blood. The prevalence of APS is around 40–50 cases per 100,000 persons.

The aim of the research is to investigate the effect of L-arginine and aminoguanidine on the content of caspase-3, nitrite anions (NO_2^-) and nitrate anions (NO_3^-) in the liver tissue in APS.

Material and Methods. The study was performed on BALB/c female mice which were simulated with APS. L-arginine (25 mg/kg) and aminoguanidine (10 mg/kg) were used for correction. The content of caspase-3 in the liver tissue was assessed by Western blot analysis. The content of NO in the liver homogenates of the animals with APS was determined by the number of its stable metabolites NO_2^- and NO_3^- .

Results. An increase in the content of the active form of caspase-3 by 48 %, a decrease in the content of NO_2^- and an increase in the content of NO_3^- in the liver of the BALB/c mice with APS were established compare to control group. L-arginine caused a decrease in the content of caspase-3 by 16 %, an increase in the content of NO_2^- and NO_3^- in the liver compare to those in the group of animals with APS. Regarding introduction of aminoguanidine, the content of caspase-3 and NO_2^- in the liver did not change significantly, and the content of NO_3^- increased compare to the group of animals with APS. In the case of combined use of L-arginine and aminoguanidine, a decrease in the content of caspase-3 by 22 % was evidenced, as well as a normal content of NO_2^- and NO_3^- in the liver.

Conclusions. The use of NO L-arginine synthesis precursor alone and in combination with aminoguanidine, a selective iNOS inhibitor, leads to decreased caspase-3 content and to normalizing the levels of stable metabolites of nitric oxide NO_2^- and NO_3^- in the liver of BALB/c mice with APS.

KEY WORDS: antiphospholipid syndrome; liver; nitric oxide; caspase-3.

Отримано 19.12.2019