the reserves of absolute accommodation were carried out according to the Dashevsky method. For patients of both groups, the provision for distance accommodation (RA) and the positive part of relative accommodation (PCVA) were determined.

The results are showed that analysis of these indicators allows to establish the fact of a probable difference in the sizes of hypermetropic eyes with different accommodation. Hypermetropic eyes, which had weaker accommodation, were larger in size than eyes that had better accommodation (p<0.05). This fact indicates the extension of the capsule of the eyeball. However, the increase in axial length of the eye was not reflected in the degree of hypermetropia. Because the extension of the eye was accompanied by an increase in the radius of curvature of the anterior surface of the cornea and the weakening of its refractive force. The results of the study showed that under conditions of artificially elevated intraocular pressure, the use of a method and device for assessing corneal rigidity reveals the presence of biomechanical disorders of the cornea of patients with hypermetropia and different accommodative capacity compared with control emetropic. The corneal stiffness factor in all the studied cases showed statistically significant results that were consistent with the clinical course of the process in these eyes.

Conclusion. The accommodation function is related to the anatomical-optical and biomechanical features of the hypermetropic eyes and correlates with the size of their fibrous capsule and the corneal stiffness factor. It is established that in the hypermetropic eyes, which are characterized by an increase in the curvature of their refractive media, a significant decrease in the axial size, a low coefficient of rigidity of the cornea, a normal accommodation function takes place. With the increase of the size of the eye, especially in its anterior part, the increase of the corneal stiffness coefficient, the refraction of its refractive media decreases, which is accompanied by a decrease in accommodation capacity.

Key words: cornea, accommodation, biomechanical properties, rigidity, the coefficient of corneal rigidity, eyes tunica fibrosa, hypermetropia.

Рецензент – проф. Безкоровайна І. М.
Стаття надійшла 24.02.2020 року

DOI 10.29254/2077-4214-2020-1-155-215-218
УДК 547.495.9:546.172.6-06:616.36-002.43:618.3:616-005.6]-092.9

Яремчук О. З.

ВПЛИВ L-АРГІНІНУ ТА АМІНОГУАНІДИНУ НА ВМІСТ КАСПАЗИ-3 ТА β-АКТИНУ ПРИ АКУШЕРСЬКОМУ АНТИФОСФОЛІПІДНОМУ СИНДРОМІ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Тернопільський національний медичний університет ім. І. Я. Горбачевського (м. Тернопіль)
yaremchuk@tdmu.edu.ua

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Дана робота є фрагментом НДР «Біохімічні механізми порушень метаболізму за умов надходження до організму токсикантів різного генезу» (№ державної реєстрації 0116U003353).

Вступ. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, частота невиношування вагітності у світі складає 15-25 % [1]. Однією з автоімунних причин звичного невиношування вагітності є антифосфоліпідний синдром (АФС) [2]. При взаємодії антифосфоліпідних антитіл (aPL) з фосфоліпідами мембран розвивається дисбаланс компонентів цитокінових і кінінових каскадів, реалізуються процеси апоптозу та некрозу [3].

Одним із регуляторів апоптозу та молекулярним посередником між двома типами загибелі клітин є NO. Як вторинний месенджер він включається в численні функції в фізіологічних умовах та при патології: імунну регуляцію, клітинну диференціацію, тканинний морфогенез, цитотоксичність, клітинну загибель, релаксацію гладенької мускулатури, нейротрансмісію [4]. При АФС порушується синтез і біодоступність NO [5]. NO-опосередкований апоптоз залежить від енергетичного стану клітин, активації каскаду каспаз, вивільнення мітохондріального цитохрому с, регуляції експресії генів [6]. Активація каспаз відіграє важливу роль в процесі апоптозу, впливає на реплікацію ДНК, сплайсинг, репарацію ДНК. Оцінка активності каспази-3, яка є ключовою ланкою каскадних апоптичних процесів, вважається одним із основних методів визначення рівня апоптозу [7].

Незважаючи на існування низки наукових досліджень, присвячених патобіохімічним механізмам розвитку АФС при вагітності, недостатньо з'ясованими залишаються питання впливу змін активності системи NO на механізми активації апоптозу у печінці при цій патології.

Мета дослідження – оцінити вплив L-аргініну та аміногуанідину на вміст каспази-3 і β-актину у печінці вагітних мишей BALB/c при антифосфоліпідному синдромі.

Об'єкт і методи досліджень. Дослідження проводили на мишах-самках лінії BALB/c, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Роботу виконували 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).

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). Для підвищення ефективності імунної відповіді кардіоліпін емульгували в 75 мкл повного ад'юванту Фрейнда («Difco Laboratories», США) (перша ін'єкція), наступні ін'єкції проводили з неповним ад'ювантом Фрейнда [8]. Під-

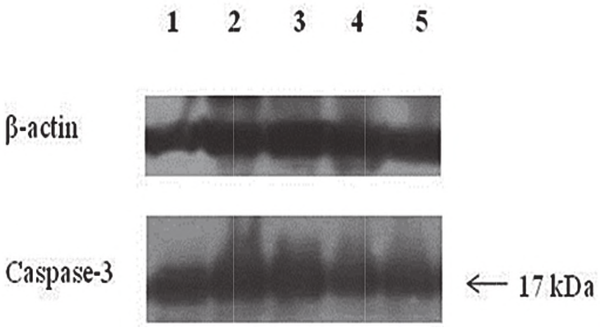

Рисунок 1 – Вестерн-блот аналіз вмісту активної форми каспази-3 та β-актину в печінці контрольних та експериментальних мишей лінії BALB/c на 18-й день вагітності за умов АФС (блотограма).

Примітки. Умовні позначення: 1 – Контроль; 2 – Антифосфоліпідний синдромом (АФС); 3 – АФС + L-аргінін; 4 – АФС + аміногуанідин; 5 – АФС + L-аргінін + аміногуанідин.

дослідних тварин розділили на 5 груп: 1-ша – тварини без АФС (контроль); 2-га – тварини з експериментальним АФС, 3-тя – тварини з АФС, яким вводили L-аргініну гідрохлорид (L-аргінін) («Sigma», USA, 25 мг/кг), 4-та – тварини з АФС, яким вводили аміногуанідин («Химлабораторреактив», Україна, 10 мг/кг), 5-та – тварини з АФС, яким вводили L-аргінін в комбінації з аміногуанідином. L-аргінін та аміногуанідин вводили внутрішньоочеревинно один раз на день, щоденно, протягом 10-ти діб до запліднення і 17-ти діб вагітності. Через 10 діб після початку введення L-аргініну та аміногуанідину проводили спарювання самок всіх груп з самцями та виводили з експерименту на 18-й день вагітності в умовах тіопентал-натрієвого наркозу (50 мг/кг маси тварини).

Визначення вмісту каспази-3 та β-актину в тканині печінки проводили методом Вестерн-блот аналізу [9]. Вміст загального протеїну лізатів визначали методом Bradford [10]. 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 Laemmli [11]. Електрофоретично розділені протеїни з ПААГ переносили на нітроцелюлозну мембрану протягом 1 год при 350 мА у буфері, що містив: 25 мМ трис, 192 мМ гліцин, pH 8,3, 0,1% додецилсульфату натрію, 20% метанолу. Вільні центри зв'язування блокували протягом 1 год 5%-им знежиреним сухим молоком в PBS – буфері з 0,05% твіну-20. Після кожного етапу інкубації мембрану тричі по 5 хв відмивали PBST – буфером (PBS з 0,1%-им твіном-20). Для детектування каспази 3 мембрану інкубували ніч при +4^{o}С 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 хрону (HRP), у розведенні 1:40 000, з якими мембрану інкубували протягом 1 год при кімнатній температурі. Для контролю однакового вмісту протеїнів у пробах мембрану інкубували з моноклональними анти-β-актин антитілами у розведенні 1:40 000. Імунореактивні сигнали на мембрані виявляли за допомогою інкубації 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.

Статистичну обробку цифрових даних здійснювали за допомогою STATISTICA 10.0 (Statsoft, USA). Достовірність різниці значень між незалежними кількісними величинами визначали за допомогою критерію Манна-Уітні з врахуванням поправки Бонферроні при оцінці значень p. Зміни вважали статистично достовірними при $p<0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення. У результаті проведених досліджень встановлено, що у печінці вагітних мишей BALB/c за умов АФС вміст активної форми каспази-3 (p17) був вищим у 2,9 раза **(рис. 1, 2A)**, а β-актину в 1,8 раза **(рис. 1, 2B)**, ніж у печінці мишей контрольної групи. Підвищення вмісту активної форми каспази-3 (p17) у печінці вагітних мишей за умов АФС, ймовірно, зумовлено активацією мітохондріального шляху апоптозу, який пов'язаний із зростанням генерації активних форм кисню, які належать до проапоптогенних сигналів [12].

NO бере участь як у процесах апоптозу, так і некрозу залежно від редокс-форми оксиду азоту, від його вмісту (високі рівні NO запускають некроз, тоді як тривалий вплив низьких концентрацій – апоптоз) [4,6]. NO має протективний ефект 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 антиапоптичних Bcl-2, транслокацією цитохрому c, активацією каспаза-3-подібних протеаз [4].

Порушення біодоступності NO при АФС може бути пов'язано із зниженням концентрації субстрату – L-аргініну, також зі зростанням утворення супероксид-аніону, який швидко зв'язує і інактивує NO з утворенням токсичного пероксинітриту [13]. Під впливом L-аргініну у тканині печінки встановлено зниження вмісту каспази-3 на 44 % **(див. рис. 1, 2A),** та β-актину на 10 % **(див. рис. 1, 2B),**

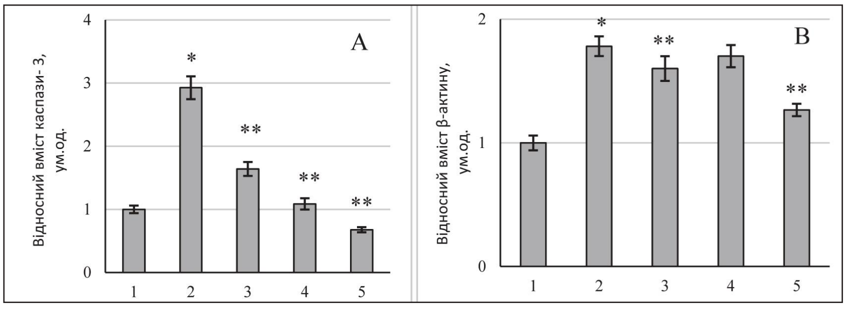

Рисунок 2 – Результати вестерн-блот аналізу вмісту активної форми каспази-3 (A) та β-актину (B) в печінці контрольних та експериментальних мишей лінії BALB/c на 18-й день вагітності за умов АФС (результати денситометрії).

Примітки. Умовні позначення: 1 – Контроль; 2 – Антифосфоліпідний синдромом (АФС); 3 – АФС + L-аргінін; 4 – АФС + аміногуанідин; 5 – АФС + L-аргінін + аміногуанідин. * – достовірно відмінне від відповідних значень в контрольній групі P<0,05; ** – достовірно відмінне від відповідних значень в групі тварин з АФС P<0,05.

відносно групи тварин з АФС. Ймовірно, що зниження вмісту каспази-3 у печінці тварин з АФС на фоні вагітності 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 [6]. NO може інгібувати мітохондріальний шлях апоптозу через блокування звільнення проапоптичних білків: цитохрому с, AIF, Omi/HtrA2, Diablo/Smac [4].

β-актин – головний компонент цитоскелету, регулює апоптоз, стабілізуючи рецептори TNF-α [14]. У мітохондріях β-актин регулює транскрипцію mtDNA і підтримання їх мембранного потенціалу [15]. Відомо, що посттрансляційне з'єднання L-аргініну з білками необхідне для нормального функціонування еукаріотичних клітин. При цьому порушення з'єднання β-актину з L-аргініном у дослідах на тваринах, в яких відсутня аргінілтрансфераза, супроводжується гальмуванням полімеризації β-актину, і, відповідно, порушенням його функцій [16].

Встановлено, що введення селективного інгібітора индуцибельної ізоформи ферменту NO-синтази (iNOS) аміногуанідину супроводжувалось зниженням вмісту каспази-3 на 63 % у тканині печінки та не впливало на вміст β-актину, порівняно із показниками 2-ї групи тварин **(див. рис. 1, 2).** За даними Dingman et al. [17], інгібування iNOS аміногуанідином пригнічує експресію каспази-3, що підтверджується результатами, отриманими у нашому дослідженні.

На фоні комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину у сироватці крові мишей BALB/c з АФС на 18-й день вагітності встановлено зниження вмісту каспази-3 на 77 % та β-актину на 29 %, порівняно із показниками групи тварин з АФС **(див. рис. 1, 2).** Результати дослідження показали, що на фоні комбінованого введення L-аргініну та аміногуанідину вміст каспази-3 був нижчий на 59 %, а β-актину на 21 %, ніж у групі тварин з АФС яким вводили L-аргінін **(див. рис. 1, 2).** Встановлено також, що при комбінованому введенні L-аргініну та аміногуанідину вміст каспази-3 у печінці був нижчий на 38 %, а β-актину на 26 %, ніж в групі тварин з АФС яким вводили аміногуанідин **(див. рис. 1, 2).**

Таким чином, перехресний зв'язок між гепатотоксичними і захисними механізмами NO визначає його роль в 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. Отже, встановлено, що найефективнішим із досліджуваних трьох способів корекції, виникаючих при АФС порушень балансу проапоптичних середників, є комбіноване застосування попередника синтезу NO L-аргініну та інгібітора індуцибельної NOS аміногуанідину.

Перспективи подальших досліджень. Результати досліджень можуть бути використані для подальшого вивчення ролі системи оксиду азоту у патогенезі ураження печінки при експериментальному антифосфоліпідному синдромі та на тлі вагітності у тварин з АФС.

Література

1. Shchuruk NV. Osoblyvosti balansu tsytokiniv u zhinok iz reproduktyvnymy vtratamy v anamnezi v dynamitsi uskladnenoi i neuskladnenoi vahitnosti. Akusherstvo ta hinekolohiia. 2018;1:132-6. [in Ukrainian].
2. Chighizola CB, Jesus GR. Antiphospholipid antibodies and infertility. Lupus. 2014;23:1232-8.
3. Tang KT, Hsieh TY, Chao YH, Li JP, Lan JL, Lin CC, Chen DY. Apoptosis in patients with primary antiphospholipid antibody syndrome. Int J Rheum Dis. 2019;22(4):677-85. DOI: 10.1111/1756-185X.13468
4. Ostapchenko LI, Synelnyk TB, Rybalchenko TV, Rybalchenko VK. Biokhimichni mekhanizmy apoptozu. Navchalnyi posibnyk. 2010. 314 s. [in Ukrainian].
5. Ames PRJ, Batuca JR, Ciampa A, Ccone LI, Alves JD. Clinical Relevance of Nitric Oxide Metabolites and Nitrative Stress in Thrombotic Primary Antiphospholipid Syndrome. The Journal of Rheumatology. 2010;37(12):2523-30. DOI: 10.3899/jrheum.100494C1
6. Kiseleva AV, Churliaev IuA, Grigorev EV. Rol oksida azota v povrezhdenii neironov pri kriticheskikh sostoianiiakh. Obshchaia reanimatologiia. 2019;5:80-4. DOI: 10.15360/1813-9779-2009-5-80 [in Russian].
7. Popov SS, Pashkov AN, Agarkov AA, Shulgin KK. Intensivnost protcessov apoptoza, aktivnost akonitatgidratazy i uroven tcitrata u patcientov s sakharnym diabetom 2 tipa, oslozhnennym steatogepatitom, pri primenenii epifamina na fone bazisnogo lecheniia. Biomeditcinskaia khimiia. 2015;61(3):400-6. DOI: 10.18097/PBMC20156103400 [in Russian].
8. Zaichenko HV, Lar'ianovska IuB, Deieva TV. Morfolohichnyi stan matky ta platsenty pry eksperymentalnomu modeliuvanni hestatsiinoho antyfosfolipidnoho syndromu na myshakh. Ukrainskyi medychnyi almanakh. 2011;14(4):136-41. [in Ukrainian].
9. 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):4350-4.
10. 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;72:248-54.
11. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227(5259):680-5.
12. Marushchak M, Krynytska I, Milevska L, Miz A, Mialiuk O. The changes of activity of effector caspase cascade components in case of alimentary obesity in rats. Bangladesh Journal of Medical Science. 2017;16(2):252-8.
13. Lopez-Pedrera Ch, Barbarroja N, Jimenez-Gomez Y. Oxidative stress in the pathogenesis of atherothrombosis associated with antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus: new therapeutic approaches. Rheumatology. 2016;55:2096-108.
14. Chen H, Leng Y, Li Z. Beta-actin in the signaling of transmembrane TNF-alfa-mediated cytotoxicity. Methods Mol Biol. 2014;1155:55-68.
15. Xie X, Venit T, Drou N, Percipalle P. In mitochondria actin regulates mtDNA transcription and is required for mitochondrial quality control. iScience. 2018;25(3):226-37.
16. Saha S, Mundia MM, Zhang F, Demers RW, Korobova F, Svitkina T, et al. Arginylation regulates intracellular actin polymer level by modulating actin properties and binding of capping and severing proteins. Molecular Biology of the Cell. 2010;21:1350-61.
17. 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;96:1467-79.

ВПЛИВ L-АРГІНІНУ ТА АМІНОГУАНІДИНУ НА ВМІСТ КАСПАЗИ-3 ТА β-АКТИНУ ПРИ АКУШЕРСЬКОМУ АНТИФОСФОЛІПІДНОМУ СИНДРОМІ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Яремчук О. З.

Резюме. Метою нашого дослідження було оцінити вплив L-аргініну (25 мг/кг) та аміногуанідину (10 мг/кг) на вміст каспази-3 та β-актину в печінці мишей лінії BALB/c на 18-й день вагітності за умов антифосфоліпідного синдрому (АФС). Результати наших досліджень показали, що розвиток АФС на фоні вагітності супроводжується зростанням вмісту каспази-3 та β-актину у печінці мишей. При введенні аміногуанідину встановлено зниження вмісту каспази-3. При застосуванні L-аргініну окремо та у комбінації з аміногуанідином встановлено зниження вмісту каспази-3 та β-актину у печінці, порівняно з показниками вагітних мишей з АФС. Таким чином, комбіноване введення L-аргініну та аміногуанідину вагітним мишам з АФС більшою мірою, ніж їх окреме застосування, сприяє нормалізації вмісту каспази-3 і β-актину у печінці.

Ключові слова: антифосфоліпідний синдром, вагітність, оксид азоту, апоптоз.

ВЛИЯНИЕ L-АРГИНИНА И АМИНОГУАНИДИНА НА СОДЕРЖАНИЕ КАСПАЗЫ-3 И β-АКТИНА ПРИ АКУШЕРСКОМ АНТИФОСФОЛИПИДНОМ СИНДРОМЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Яремчук О. З.

Резюме. Целью нашего исследования было оценить влияние L-аргинина (25 мг/кг) и аминогуанидина (10 мг/кг) на содержание каспазы-3 и β-актина в печени мышей линии BALB/c на 18-й день беременности в условиях антифосфолипидного синдрома (АФС). Результаты наших исследований показали, что развитие АФС на фоне беременности сопровождается ростом содержания каспазы-3 и β-актина в печени мышей. При введении аминогуанидина установлено снижение содержания каспазы-3. При применении L-аргинина отдельно и в комбинации с аминогуанидином установлено снижение содержания каспазы-3 и β-актина в печени по сравнению с показателями беременных животных с АФС. Таким образом, комбинированное введение L-аргинина и аминогуанидина беременным мышам с АФС в большей степени, чем их отдельное введение, способствует нормализации содержания каспазы-3 и β-актина в печени.

Ключевые слова: антифосфолипидный синдром, беременность, оксид азота, апоптоз.

INFLUENCE OF L-ARGININE AND AMINOGUANIDINE ON THE CASPASE-3 AND β-ACTIN CONTENT IN EXPERIMENTAL PREGNANT MOUSE MODEL WITH ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME

Yaremchuk O. Z.

Abstract. *Research purpose.* Antiphospholipid syndrome (APS) is an autoimmune disease that is characterized by arterial or venous thrombosis, miscarriage, thrombocytopenia. APS is one of the autoimmune causes of pregnancy miscarriage. The purpose of our study was to evaluate the effect of L-arginine and aminoguanidine on caspase-3 and β-actin content in the liver of BALB/c mice on day 18 of pregnancy under APS.

Object and research methods. The experimental animals were divided into 5 groups: the 1st – control; the 2nd – animals with experimental APS, the 3rd – animals with APS and administration of L-arginine hydrochloride (L-arginine) (25 mg/kg), the 4th – animals with APS and administration of aminoguanidine (10 mg/kg), the 5th – animals with APS administered L-arginine together with aminoguanidine. L-arginine and aminoguanidine were administered intraperitoneally once a day, on a daily basis for 10 days before fertilization and for 17 days during pregnancy. After APS confirmation (day 10), the females of all groups were mated with the males. The animals were removed from the experiment on the 18th day of pregnancy. The content of caspase-3 and β-actin in liver tissue was determined by Western blot analysis.

Research results and their discussion. Caspase-3 content in the liver increased 2.9-fold, while β-actin increased 1.8-fold, compared to control. One of the regulators of apoptosis and a molecular mediator between the two types of cell death is nitric oxide (NO). Violation of the NO bioavailability during APS can be associated with a decrease in the concentration of substrate (L-arginine), as well as with the increase in the formation of superoxide-anion, which quickly binds and inactivates NO with the formation of toxic peroxynitrite. L-arginine supplementation decreased caspase-3 content by 44%, β-actin content by 10%, comparing with the values obtained from pregnant mice with APS. The introduction of aminoguanidine was not accompanied by changes in β-actin content, compared with the group of animals with APS. However, there was a 63% reduction in caspase-3 content in aminoguanidine group comparing to the APS animal group. Combined administration of L-arginine and aminoguanidine in the liver revealed a decrease in caspase-3 content by 77% and β-actin by 29%, compared to the values from animals with APS. Additionally, combined supplementation with L-arginine and aminoguanidine caused a more profound decrease in the content of caspase-3 and β-actin in the liver relatively to the indices of groups of animals that were administered L-arginine and aminoguanidine separately.

Conclusion. Thus, the combined administration of L-arginine, the precursor for the synthesis of NO, and an inhibitor of inducible NOS, aminoguanidine, in pregnant APS mice had more profound effect than their individual use, as related to restoration of caspase-3 and β-actin content in the liver.

Key words: antiphospholipid syndrome, pregnancy, nitric oxide, apoptosis.

Рецензент – проф. Тарасенко К. В.

Стаття надійшла 24.02.2020 року