

О. З. ЯРЕМЧУК, К. А. ПОСОХОВА, О. С. ТОКАРСЬКИЙ

Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського

Майдан Волі, 1, Тернопіль, 46001

e-mail: yaremchuk@tdmu.edu.ua

## **ВПЛИВ L-АРГІНІНУ НА РІВЕНЬ СИНТЕЗУ ОКСИДУ АЗОТУ ТА ВМІСТ ГЛІАЛЬНОГО ФІБРИЛЯРНОГО КИСЛОГО ПРОТЕЇНУ У ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ АНТИФОСФОЛІПІДНОМУ СИНДРОМІ**

Досліджено вплив L-аргініну на вміст нітрит-аніонів ( $\text{NO}_2^-$ ), нітрат-аніонів ( $\text{NO}_3^-$ ) та гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP) у мозочку та великих півкулях головного мозку мишей лінії BALB/c з антифосфоліпідним синдромом (АФС).

Встановлено, що за умов АФС у мишей відбувається зростання вмісту GFAP та стабільних метаболітів оксиду азоту  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  у мозочку та великих півкулях головного мозку відносно контролю. На фоні введення попередника синтезу NO L-аргініну (25 мг/кг) у тварин з АФС відбувається подальше достовірне зростання вмісту  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  у мозочку та великих півкулях головного мозку. Введення L-аргініну не викликає достовірних змін показників загального вмісту GFAP у зразках великих півкуль головного мозку, а вміст ізоформи GFAP (49-37 kDa) знижується. У мозочку встановлено зростання загального вмісту GFAP та GFAP (49-37 kDa) порівняно із показниками тварин з АФС.

Отже, зростання вмісту GFAP у мозочку та великих півкулях головного мозку мишей BALB/c за умов АФС вказує на розвиток реактивного астрогліозу. Наслідки введення попередника синтезу NO L-аргініну за умов АФС, опосередковано підтверджують роль NO у регулюванні експресії GFAP в астроцитах при АФС.

*Ключові слова:* антифосфоліпідний синдром, оксид азоту, гліальний фібрилярний кислий протеїн, мозочок, великі півкулі головного мозку, L-аргінін.

Антифосфоліпідний синдром (АФС) – аутоімунне захворювання, яке характеризується судинними тромбозами, патологією вагітності, наявністю в крові антифосфоліпідних антитіл до негативно заряджених фосфоліпідів мембран клітин [12, 19]. Патогенетичними механізмами розвитку АФС є вазоспазм, гіперкоагуляція у плазмовій ланці гемостазу, що призводить до виникнення тромбозів у мікроциркуляторному руслі [14]. Артеріальні тромбози у хворих з антитілами до фосфоліпідів розвиваються в різних органах, найчастіше в артеріях головного мозку, що призводить до виникнення ішемічного інсульту [19, 11, 15].

Однією із ланок, що відіграють роль у механізмах розвитку АФС, є система оксиду азоту (NO) [12, 18]. За нормальних умов NO постійно утворюється в головному мозку [4]. Джерелом NO в ЦНС є нейрони, нейрогліальні клітини (астроцити), клітини мікроглії та ендотелій кровеносних судин. Відомо, що утворення NO в мозку відбувається з амінокислоти L-аргініну за участю трьох ізоформ NO-синтази: нейрональної (nNOS), ендотеліальної (eNOS) і індукцйбельної (iNOS) [1, 5]. NO контролює осциляторну активність нейронів і модулює міжнейрональні комунікації, синаптичну пластичність, стан рецепторів, внутрішньоклітинну передачу сигналу, вивільнення нейротрансмітерів [4]. Доведено, що при АФС порушується синтез і біодоступність NO [18]. За даними інших дослідників [7] збільшення концентрації нітрат-аніонів у пацієнтів з АФС свідчить про порушення функції ендотелію.

Вищезазначене та відсутність єдиної точки зору щодо участі системи NO у механізмах розвитку АФС є підґрунтям для здійснення досліджень у даному напрямку та встановлення можливостей корекції ускладнень АФС за допомогою модуляторів синтезу NO.

Мета роботи – дослідити вплив L-аргініну на вміст нітрит-аніонів ( $\text{NO}_2^-$ ) і нітрат-аніонів ( $\text{NO}_3^-$ ) та вміст гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP) у мозочку та великих півкулях головного мозку мишей BALB/c з антифосфоліпідним синдромом.

**Матеріал і методи досліджень**

Дослідження проводили на 30 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, 2000) 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 ЕУ 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) [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. Для підтвердження розвитку АФС проводили реакцію мікропреципітації з кардіоліпіновим антигеном, з використанням тест-системи «Антиген кардіоліпіновий, для реакції мікропреципітації» («Біолік», Україна) [6].

Піддослідних тварин поділили на 3 групи: 1 (контроль) – інтактні тварини; 2 – тварини з експериментальним АФС, 3 – тварини з АФС, яким вводили L-аргініну гідрохлорид («Sigma», США 25 мг/кг) внутрішньоочеревинно один раз на день, повторно – упродовж 10 діб після формування АФС [8]. Тварини контрольної групи отримували внутрішньоочеревинно ідентичні об'єми розчинника. Через 10 діб після початку терапії тварин виводили з експерименту в умовах тіопентал-натрієвого наркозу (внутрішньоочеревинне введення 1% розчину з розрахунку 50 мг/кг маси тварини). Для дослідження використовували гомогенати мозочку, великих півкуль головного мозку та сироватку крові.

Електрофорез у поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію (SDS-РАAG-електрофорез) проводили за загальноприйнятою методикою [17] у mini-gel камері виробництва BioRad. Для визначення молекулярної маси протеїнів паралельно наносили забарвлені протеїни-маркери виробництва Fermentas (# SM0671).

Імуноблотинг GFAP проводили за загальноприйнятою методикою [20]. 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. Після переносу місця неспецифічного зв'язування антитіл на мембранах блокували у 5%-му розчині знежиреного сухого молока («Carnation», США) протягом 120 хв. при 37°C. Після блокування мембрани обробляли антитілами проти ГФКП (anti-GFAP, Santa Cruz Biotechnology, sc-9065) у відношенні розчину 1:2500 при 4°C протягом ночі. Після інкубації з первинними антитілами мембрани відмивали у 5 змінах забуференого фізіологічного розчину, що містив 0,1% Tween-20 (PBS-T) та обробляли відповідними вторинними антитілами проти імуноглобуліну G, кон'югованими з пероксидазою хрому (Sigma Aldrich, США, A0545), узятими у відношенні 1:5000, протягом 90 хв. при температурі 37 °C.

Візуалізацію комплексу антиген-антитіло (головна поліпептидна зона 49 кДа) проводили з використанням субстрату пероксидази (0,02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) та хромогену (0,01% діамінобензидину). Денситометричний аналіз імунореактивних зон проводили із застосуванням програми TotalLab TL120 (Nonlinear Inc, США). Вміст GFAP виражали в умовних одиницях.

Про вміст NO в мозочку та великих півкулях головного мозку 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 нітрит-аніонів визначали високоспецифічним спектрофотометричним методом Гріна за даними кольорової реакції з реактивом Гріса [16]. 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 [2]. Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою програми STATISTICA 10. Порівняння отриманих величин проводили з використанням U-критерію Манна-Уїтні. Зміни вважали достовірними при p≤0,05.

**Результати досліджень та їх обговорення**

При визначенні наявності антикардіоліпінових антитіл (аКЛ) за допомогою реакції мікропреципітації встановлено, що у тварин 1-ї групи (контроль) реакція мікропреципітації була негативною, а в експериментальних мишей 2-ї і 3-ї груп позитивною, що підтверджувало розвиток АФС [6].

Встановлено, що у мишей з АФС відбувається зростання вмісту стабільних метаболітів оксиду азоту  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  у мозочку на 46% та 41%, а також у великих півкулях головного мозку на 28% та 20% відповідно, порівняно із показниками інтактних тварин (таблиця 1). На фоні введення попередника синтезу NO L-аргініну у тварин з АФС встановлено подальше зростання вмісту  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  у мозочку на 24% та 14%, відносно показників 2-ї групи – мишей з АФС. При введенні L-аргініну вміст  $\text{NO}_2^-$  у великих півкулях головного мозку достовірно не змінювався, а вміст  $\text{NO}_3^-$  збільшувався на 13% порівняно з показниками тварин контрольної патології (див. таблицю 1).

Таблиця 1

Вміст  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  у мозочку та великих півкулях головного мозку мишей BALB/c при антифосфоліпідному синдромі та застосуванні L-аргініну ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )

Група тварин	Показник			
	Мозочок		Великі півкулі	
	$\text{NO}_2^-$ , мкмоль/кг	$\text{NO}_3^-$ , мкмоль/кг	$\text{NO}_2^-$ , мкмоль/кг	$\text{NO}_3^-$ , мкмоль/кг
контроль	3,37±0,08	16,76±0,45	2,79±0,08	14,78±0,34
АФС	4,90±0,14 $p < 0,001$	23,71±0,83 $p < 0,001$	3,57±0,15 $p < 0,005$	17,69±0,52 $p < 0,005$
АФС+ L-аргінін	5,58±0,18 $p_1 < 0,05$	29,49±0,88 $p_1 < 0,005$	3,41±0,05 $p_1 > 0,05$	20,02±0,44 $p_1 < 0,05$

*Примітки:*

P – достовірно відмінне від відповідних значень в контрольній групі.

$P_1$  – достовірно відмінне від відповідних значень в групі тварин з АФС.

Ефекти NO в організмі реалізуються шляхом метаболізму в трьох основних реакціях: 1) із супероксидним радикалом; 2) з білками, що містять гемове і негемове залізо; 3) з тіолами і вторинними амінами [1, 4].

Активация eNOS спостерігається при підвищенні швидкості кровотоку. Збільшення eNOS-залежного синтезу NO в основному сприятливе для організму, захищає його від гіпертензії, тромбозів, спазмів судин, вільнорадикального пошкодження. Експресія iNOS призводить до гіперпродукування NO. Механізми ушкодження нейронів при гіперпродукуванні NO універсальні. Надлишкова кількість оксиду азоту пригнічує ферменти дихального ланцюга мітохондрій, циклу Кребса і синтез ДНК [4, 5].

Реутов В. П. і співавтори [1] запропонували нову концепцію регуляції мозкового кровообігу, згідно з якою NO виконує роль інтегруючого елемента в функціонуванні нервової системи. NO – ефективний регулятор нейронів, глії та судин, включаючи капіляри мозку, забезпечує нормальну роботу всіх систем модульної нейроархітектоніки мозку і їх структурно-функціональну єдність [1].

GFAP дуже швидко вивільняється в кров після пошкодження мозку і є інформативним показником перебігу широкого кола нейродегенеративних розладів. GFAP міститься в основному в протоплазматичних астроцитах у межах сірої речовини, фіброзних астроцитах білої речовини, радіальній глії мозочка та в астроцитах, що вистилають шлуночки мозочка [3, 10]

Блоотограми зразків великих півкуль головного мозку та мозочку (антитіла проти GFAP) мишей BALB/c представлено на рис. 1.

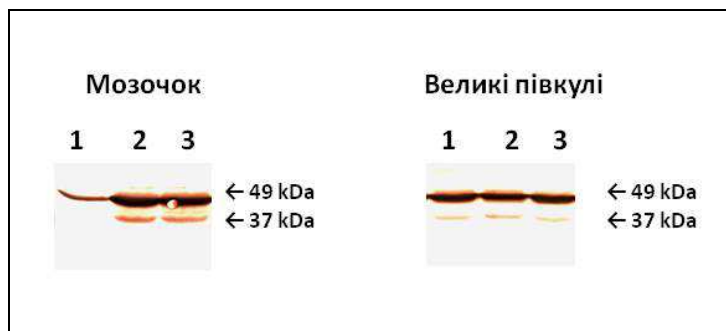


Рис. 1. Вестерн-блот аналіз зразків мозочку та великих півкуль головного мозку контрольних мишей BALB/c та експериментальних мишей з АФС (антитіла проти GFAP). Умовні позначення: 1 – Контроль; 2 – Антифосфоліпідний синдромом (АФС); 3 – АФС + L-аргінін.

У ході дослідження встановлено, що за умов експериментального АФС у зразках великих півкуль головного мозку зростає загальний вміст GFAP на 18% та ізоформи GFAP (49-37 kDa) на 55% порівняно з показниками контрольної групи (рис. 2 А). Встановлено зростання загального вмісту GFAP у мозочку мишей з АФС в 2,8 раза та GFAP (49–37 kDa) в 6,4 раза порівняно із показниками тварин 1-ї групи (рис. 2 В).

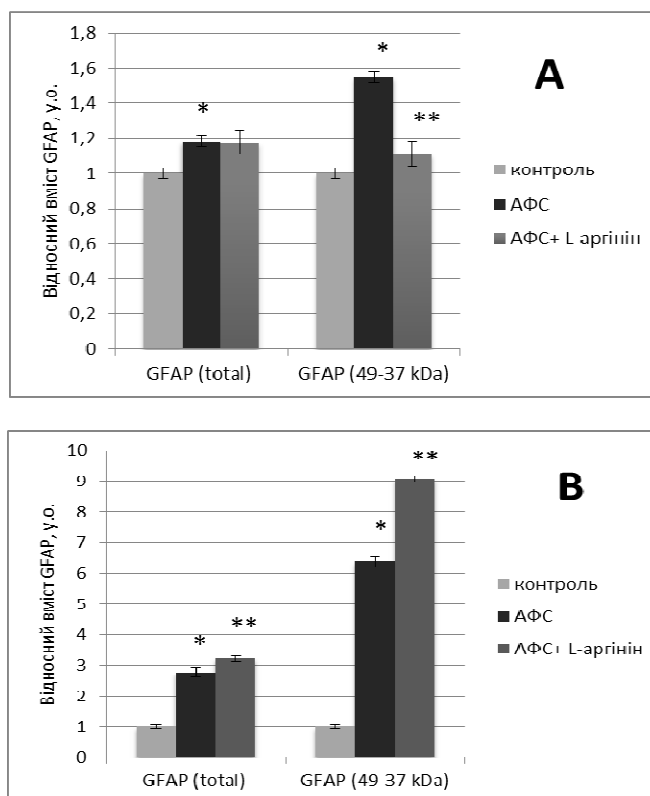


Рис. 2. Кількісні результати Вестерн-блот аналізу гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP) у зразках великих півкуль головного мозку (А) та мозочку (В) контрольних та експериментальних мишей BALB/c з АФС та при застосуванні L-аргініну: результати денситометрії, (M±m, n=10).

Примітки. \* – достовірно відмінне від відповідних значень в контрольній групі P<0,05;

\*\* – достовірно відмінне від відповідних значень в групі тварин з АФС P<0,05.

Як показали результати наших досліджень, введення мишам BALB/c з АФС попередника синтезу NO L-аргініну не викликало достовірних змін загального вмісту GFAP у зразках великих півкуль головного мозку, а вміст GFAP (49-37 kDa) знижувався на 28%, порівняно з аналогічними показниками у групі тварин з експериментальним АФС (див. рис. 2 А). При введенні L-аргініну мишам з АФС у мозочку встановлено зростання загального вмісту GFAP на 17% ( $p < 0,05$ ) та GFAP (49-37 kDa) на 42% ( $p < 0,05$ ) порівняно із показниками 2-ї групи тварин з АФС (див. рис. 2 В).

Зростання вмісту GFAP у мозочку та великих півкулях головного мозку мишей BALB/c за умов АФС порівняно з контрольними тваринами вказує на розвиток реактивного астрогліозу у відповідь на розвиток патології. Отримані нами результати узгоджуються з даними про те, що пошкодження нервової тканини індукує інтенсивну проліферацію та гіпертрофію астроцитів, які супроводжуються прискореним синтезом GFAP [10].

Наявність низькомолекулярного поліпептиду GFAP 37 kDa у зразках великих півкуль головного мозку та, більшою мірою, у тканині мозочка мишей BALB/c з експериментальним АФС є ознакою протеолітичної деградації цього протеїну, стабільного в нормі, що свідчить про перебудову проміжних філаментів цитоскелету астроцитів.

Нейрони, які синтезують NO, складають близько 1–2% від загальної кількості нервових клітин ЦНС і локалізуються в більшості відділів мозку. Відростки нейронів, що містять NOS, розгалужені так, що практично всі нейрони ЦНС розташовуються в межах декількох мікрометрів від джерела NO. Встановлено, що найбільшою мірою NO синтезується в мозочку і середньому мозку [4, 5]. Отримані нами результати узгоджуються з цими даними, оскільки виявлено чутливість саме мозочку до введення попередника синтезу NO L-аргініну, у якому відбувається подальше зростання вмісту GFAP при введенні L-аргініну тваринам з АФС порівняно з мишами з АФС.

Великі півкулі мозку виявилися менш чутливими, ніж мозочок, до дії попередника синтезу NO L-аргініну, оскільки експресія GFAP під впливом L-аргініну у зразках великих півкуль мишей BALB/c з АФС статистично не відрізнялася від значення групи тварин з АФС ( $P > 0,05$ ). Можна припустити, що зареєстроване зниження вмісту GFAP (49-37 kDa) у тканині великих півкуль головного мозку при введенні L-аргініну відбувається у зв'язку з відомим антиоксидантним властивостям L-аргініну [9].

## Висновки

1. У мишей лінії BALB/c з АФС відбувається зростання вмісту стабільних метаболітів оксиду азоту  $NO_2^-$  та  $NO_3^-$  у мозочку та великих півкулях головного мозку відносно контролю.
2. На фоні введення попередника синтезу NO L-аргініну тваринам з АФС відбувається подальше зростання вмісту  $NO_2^-$  у мозочку та  $NO_3^-$  у мозочку та великих півкулях головного мозку порівняно з показниками тварин контрольної патології.
3. У зразках великих півкуль головного мозку та мозочку тварин з АФС зростає загальний вміст GFAP та GFAP (49-37 kDa) порівняно з показниками контрольної групи.
4. Попередник синтезу NO L-аргінін не викликає змін загального вмісту GFAP у зразках великих півкуль головного мозку мишей BALB/c з АФС, але сприяє зниженню вмісту GFAP (49-37 kDa). У мозочку L-аргінін за цих умов індукує зростання загального вмісту GFAP та GFAP (49-37 kDa) порівняно із показниками тварин з АФС.

1. Гемодинамика мозга: глутаматергическая система и цикл оксида азота в регуляции мозгового кровообращения. Новая концепция / В. П. Реутов и др. *Pacific Medical Journal*. 2017. № 3. Р. 37–45.
2. Кіселик І. О., Луцик М. Д., Шевченко Л. Ю. Особливості визначення нітратів та нітритів у крові хворих на вірусні гепатити та жовтяниці іншої етіології. *Лаб. діагностика*. 2001. № 3. С. 43–45.
3. Краснов В. Астроцитарные белки головного мозга: структура, функции, клиническое значение. *Неврологический журнал*. 2012. № 1. С. 37–42.
4. Куровська В. О., Пішак В. П., Ткачук С. С. Роль оксиду азоту в ішемічних і ішемічнореперфузійних ушкодженнях головного мозку. *Буковинськ. мед. вісн.* 2008. Т. 12, № 4. С. 143–149.
5. Максимович Н. Е. Понятие о нитроксидаергической системе мозга (роль нейрональных источников). *Журнал ГГМУ*. 2003. Vol. 4. Р. 7–10.

6. Морфологічний стан матки та плаценти при експериментальному моделюванні гестаційного антифосфоліпідного синдрому на мишах / Зайченко Г. В. та ін. *Український медичний альманах*. 2011. Т. 14, № 4. С. 136–141.
7. Насонов Е. Л. Антифосфолипидный синдром. Москва: Литтерра, 2004. 440 с.
8. Посохова К. А., Сампара С. Р., Сак І. Ю. Вплив тівортину на перебіг вагітності, стан плодів та новонароджених при експериментальному антифосфоліпідному синдромі. *Медична хімія*. 2013. Т. 15, № 4. С. 26–29.
9. Проблема оксида азота в неврологии / Малахов В. А. и др. Сумы, 2009. 242 с.
10. Тихомиров А. О., Павлова О. С., Недзвєцький В. С. Гліальний фібрилярний кислий протеїн (ГФКП): до 45-річчя відкриття. *Neurophysiology*. 2016. Vol. 48, № 1. С. 58–75.
11. Ульянова О. В., Куташов В. А., Хабарова Т. Ю. Особенности неврологических проявлений у пациентов с антифосфолипидным синдромом. *Вестник КазНМУ*. 2016. № 2. С. 333–338.
12. Arachchillage D. R. J., Laffan M. Pathogenesis and management of antiphospholipid syndrome. *British Journal of Haematology*. 2017. Vol. 178. P. 181–195.
13. Clinical Relevance of Nitric Oxide Metabolites and Nitrate Stress in Thrombotic Primary Antiphospholipid Syndrome / PRJ Ames et al. *The Journal of Rheumatology*. 2010. Vol. 37, № 12. P. 2523–2530.
14. Giannakopoulos B, Krilis S. A. The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *The New England Journal of Medicine*. 2013. Vol. 368. P. 1033–1044.
15. Graf J. Central Nervous System Manifestations of Antiphospholipid Syndrome. *Rheum Dis Clin North Am*. 2017. Vol. 43, № 4. P. 547–560. doi: 10.1016/j.rdc.2017.06.004.
16. Green L. C., Davie A. W., Golawski J. Analysis of nitrate, nitrite and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids. *Anal. biochem.* 1982. Vol. 126, № 1. P. 131–138.
17. Laemmli U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970. Vol. 227. P. 680–685.
18. Mechanisms of Endothelial Dysfunction in Antiphospholipid Syndrome: Association With Clinical Manifestations / M. Velasquez et al. *Front. Physiol.* 2018. Vol. 21, № 9. P. 1840. doi: 10.3389/fphys.2018.01840 (2018).
19. Neurological manifestations in patients with antiphospholipid syndrome / M. Etemadifar et al. *Ir J neurol.* 2013. Vol. 12, № 4. P. 172–175.
20. 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. Vol. 76, № 9. P. 4350–4354.

## References

1. Gemodinamika mozga: glutamatergicheskaja sistema i tsikl oksida azota v regulatsii mozgovogo krovoobrashcheniia. Novaia kontsepsiia / V. P. Reutov i dr. *Pacific Medical Journal*. 2017. № 3. P. 37–45 (in Russian).
  2. Kiselyk I. O., Lutsyk M. D., Shevchenko L. Yu. Osoblyvosti vyznachennia nitrativ ta nitrytiv u krovii khvorykh na virusni hepatyty ta zhovtianytsi inshoi etiologii. *Lab. diahnozyka*. 2001. № 3. С. 43–45 (in Ukrainian).
  3. Krasnov V. Astrotsitarnye belki golovnoho mozga: struktura, funktsii, klinicheskoe znachenie. *Nevrologicheskii zhurnal*. 2012. № 1. С. 37–42 (in Russian).
  4. Kurovs'ka V. O., Pishak V. P., Tkachuk S. S. Rol' oksydu azotu v ishemichnykh i ishemichnoreperfuzyynykh uskodzhenniakh holovnoho mozku. *Bukovyns'k. med. visn.* 2008. Т. 12, № 4. С. 143–149 (in Ukrainian).
  5. Maksimovich N. E. Poniatie o nitroksidergicheskoy sisteme mozga (rol' neyronal'nykh istochnikov). *Zhurnal GGMU*. 2003. Vol. 4. P. 7–10 (in Russian).
  6. Morfolohichnyy stan matky ta platsenty pry eksperymental'nomu modeliuvanni hestatsiynoho antyfosfolipidnoho syndromu na myshakh / Zaychenko H. V. ta in. *Ukrains'kyi medychnyy al'manakh*. 2011. Т. 14, № 4. С. 136–141 (in Ukrainian).
  7. Nasonov E. L. Antifosfolipidnyy sindrom. Moskva: Litterra, 2004. 440 с (in Russian).
  8. Posokhova K. A., Sampara S. R., Sak I. Yu. Vplyv tivortinu na perebih vahitnosti, stan plodiv ta novonarozhzenykh pry eksperymental'nomu antyfosfolipidnomu syndromi. *Medychna khimiia*. 2013. Т. 15, № 4. С. 26–29 (in Ukrainian).
  9. Problema oksida azota v nevrologii / Malakhov V. A. i dr. Sумы, 2009. 242 с (in Russian).
  10. Tykhomyrov A. O., Pavlova O. S., Nedzvets'kyi V. S. Hliial'nyy fibryliarnyy kyslyy protein (HFКP): do 45-rihchia vidkryttia. *Neurophysiology*. 2016. Vol. 48, № 1. С. 58–75 (in Ukrainian).
- 44 ISSN 2078-2357. Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біол., 2019, № 3 (77)

11. Ul'ianova O. V., Kutashov V. A., Khabarova T. Iu. Osobennosti nevrologicheskikh proiavleniy u patsientov s antifosfolipidnym sindromom. *Vestnik KazNMU*. 2016. № 2. С. 333–338 (in Russian).
12. Arachchillage D. R. J., Laffan M. Pathogenesis and management of antiphospholipid syndrome. *British Journal of Haematology*. 2017. Vol. 178. P. 181–195.
13. Clinical Relevance of Nitric Oxide Metabolites and Nitrate Stress in Thrombotic Primary Antiphospholipid Syndrome / PRJ Ames et al. *The Journal of Rheumatology*. 2010. Vol. 37, № 12. P. 2523–2530.
14. Giannakopoulos B, Krilis S. A. The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *The New England Journal of Medicine*. 2013. Vol. 368. P. 1033–1044.
15. Graf J. Central Nervous System Manifestations of Antiphospholipid Syndrome. *Rheum Dis Clin North Am*. 2017. Vol. 43, № 4. P. 547–560. doi: 10.1016/j.rdc.2017.06.004.
16. Green L. C., Davie A. W., Golawski J. Analysis of nitrate, nitrite and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids. *Anal. biochem.* 1982. Vol. 126, № 1. P. 131–138.
17. Laemmli U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970. Vol. 227. P. 680–685.
18. Mechanisms of Endothelial Dysfunction in Antiphospholipid Syndrome: Association With Clinical Manifestations / M. Velasquez et al. *Front. Physiol.* 2018. Vol. 21, № 9. P. 1840. doi: 10.3389/fphys.2018.01840 (2018).
19. Neurological manifestations in patients with antiphospholipid syndrome / M. Etemadifar et al. *Ir J neurol.* 2013. Vol. 12, № 4. P. 172–175.
20. 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. Vol. 76, № 9. P. 4350–4354.

*O. Z. Yaremchuk, K. A. Posokhova, O. S. Tokarskyi*

I. Horbachevsky Ternopil National Medical University, Ukraine

#### THE INFLUENCE OF L-ARGININE ON THE LEVEL OF SYNTHESIS OF NITRIC OXIDE AND THE CONTENT OF GLIAL FIBRILLARY ACIDIC PROTEIN IN BRAIN DURING EXPERIMENTAL ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME

The study aims to investigate the influence of L-arginine on the content of nitrite anions (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) and nitrate anions (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) and the content of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the cerebellum and cerebral hemispheres of BALB/c mice with antiphospholipid syndrome.

The studies were performed on 30 female BALB/c mice. The experimental animals were divided into 3 groups: 1 – control (intact) animals; 2 – animals with experimental antiphospholipid syndrome (APS), 3 – animals with APS, which were injected with L-arginine at a dose of 25 mg/kg, intraperitoneally once a day, for 10 consecutive days after the development of APS.

The increase in glial fibrillary acidic protein and stable metabolites of nitric oxide NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in the cerebellum and cerebral hemispheres, relative to the control, was observed in APS-developed BALB/c mice. In case of injection of the precursor of NO synthesis, L-arginine, animals with APS were found to have a further significant increase in the content of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in the cerebellum and the cerebral hemispheres. The introduction of L-arginine did not cause significant changes in GFAP (total) in cerebral hemispheres. However, GFAP content (49-37 kDa) was decreasing. The cerebellum showed an increase in GFAP (total) and GFAP (49-37 kDa) content, compared to the performance of animals with APS.

Therefore, the increase in the content of GFAP in the cerebellum and the cerebral hemispheres of BALB/c mice under APS indicates the development of reactive astrogliosis. The introduction of the precursor of NO synthesis, L-arginine, is accompanied by an increase in the content of stable metabolites of nitric oxide (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) and GFAP in the cerebellum of BALB/c mice, which can indirectly confirm the role of NO in regulating of GFAP expression in astrocytes under APS.

*Key words: antiphospholipid syndrome, nitric oxide, glial fibrillary acidic protein (GFAP), cerebellum, cerebral hemispheres, L-arginine.*

Надійшла 20.08.2019.