

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД
«ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО»**

СІРМАН ВІКТОР МІРЧОВИЧ

УДК 616-097:612.084)-08:612.018.2

**ВПЛИВ ПРОГЕНІТОРНИХ КЛІТИН ЕМБРІОНА ЩУРА НА ПАТОФІЗІОЛОГІЧНІ
МЕХАНІЗМИ УРАЖЕННЯ НИРОК ПРИ АД'ЮВАНТНОМУ АРТРИТІ ПІРСОНА
(експериментальне дослідження)**

14.03.04 – патологічна фізіологія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Тернопіль – 2010

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Координаційному центрі трансплантації органів і тканин МОЗ України.

Науковий керівник: заслужений діяч науки і техніки України, доктор медичних наук, професор **Гоженко Анатолій Іванович**, Одеський державний медичний університет МОЗ України, завідувач кафедри загальної і клінічної патологічної фізіології.

Офіційні опоненти:

доктор медичних наук, професор **Корда Михайло Михайлович**, державний вищий навчальний заклад «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського» МОЗ України, завідувач кафедри медичної біохімії та клініко-лабораторної діагностики;

доктор медичних наук, професор **Кришталь Микола Васильович**, Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України, завідувач кафедри патологічної фізіології.

Захист відбудеться 3 вересня 2010 року о 13 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 58.601.01 у державному вищому навчальному закладі «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського» МОЗ України (46001, м. Тернопіль, майдан Волі, 1).

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці державного вищого навчального закладу «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського» МОЗ України (46001, м. Тернопіль, вул. Січових Стрільців, 8).

Автореферат розісланий 20 липня 2010 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради

доктор медичних наук, професор

Я.Я. Боднар

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Фундаментальні дослідження останніх років довели здатність трансплантації стовбурових клітин суттєво впливати на перебіг багатьох патологічних процесів, що вказує на перспективу застосування даного методу для лікування хвороб людини (Цымбалюк В.И. и др., 2001; Малайцев В.В. и др., 2002; Augello A. et al., 2007; Bianco P. et al., 2008; Noth U. et al., 2008). Проте, як і всі нові методи терапії, лікування за допомогою пересадки стовбурових клітин потребує ретельного доклінічного вивчення і патофізіологічного обґрунтування. Одним з тяжких захворювань є ревматоїдний артрит – хронічний імуноопосередкований системний патологічний процес з прогресуючим ураженням суглобів за типом симетричного прогресуючого ерозивного поліартриту з деструкцією хрящової і кісткової тканини та розвитком позасуглобових (вісцеральних) проявів, зокрема, ураженням нирок. Лікування ревматоїдного артрити залишається однією з найбільш складних проблем сучасної ревматології (Коваленко В.Н., Каминский А.Г., 2000).

Відомо, що одним з важких ускладнень ревматоїдного артрити є хронічний гломерулонефрит, прогресуючий характер розвитку якого закономірно призводить до загибелі нефронів, формування хронічної хвороби нирок з вислідом у хронічну ниркову недостатність (Гоженко А.І., 1987-2009, Кухарчук А.Л., 1996; Пішак О.В., 2002).

Не зважаючи на досить тривалу історію пошуку методів лікування хворих з гломерулонефритом, вони залишаються в основному симптоматичними та малоефективними. Безумовно, це, в першу чергу, пов'язано з обмеженістю знань імунних механізмів патогенезу. Водночас необхідно звернути увагу на те, що у нирках при імунокомплексному нефриті відбувається типовий імунний процес, від розвитку якого залежить перебіг захворювання. Причому, основним патогенетичним ланцюгом його можемо вважати співвідношення між процесами альтерації (особливо вторинної) та регенерації (проліферації), тому модуляція цього співвідношення може бути одним із головних напрямків патогенетичної терапії гломерулонефриту. Можливості такого впливу значно зросли у зв'язку з клінічним використанням стовбурових клітин. Проте патогенетичного обґрунтування використання стовбурових клітин при хронічному аутоімунному гломерулонефриті не має.

Таким чином, основні патогенетичні механізми ураження суглобів і тканин інших органів при ревматоїдному артриті є досить чітко окресленими. В експерименті у тварин з різними моделями ревматоїдного артрити з'ясовано вплив лікарських засобів на імунну систему, цитокіни, процеси протеолізу і ліпопероксидації, згортання крові та фібринолізу. Лімфо-моноцитарна інфільтрація визначена як морфологічний субстрат хронізації ревматоїдного запалення. Водночас вплив трансплантації стовбурових клітин на зазначені механізми розвитку і хронізації імунного запалення при ревматоїдному артриті, у тому числі нирках, залишається практично не з'ясованим.

З точки зору перспективи застосування трансплантації стовбурових клітин у клініці, надзвичайно важливим є з'ясування механізмів терапевтичної дії пересаджених клітин. Серед таких

варто звернути особливу увагу на зміни цитокинової регуляції імунної відповіді, протеолізу і фібринолізу, пероксидного окислення ліпідів і клітинної інфільтрації в нирках, оскільки останні при ревматоїдному артриті зазнають ураження найчастіше.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація є фрагментом науково-дослідної роботи Координаційного центру трансплантації органів, тканин і клітин МОЗ України “В експерименті та клініці визначити ефективність трансплантації стовбурових клітин, тканин ембріофетального і позафетального походження та тканинної терапії за Філатовим при імунно- і онкопатологічних процесах, панкрео- і колоногенних перитонітах, старінні та порушенні функції репродуктивної системи” (номер державної реєстрації 0107U01175). Автор є співвиконавцем зазначеної НДР. Тема дисертації затверджена Проблемною комісією МОЗ і АМН України „Патологічна фізіологія та імунологія” (протокол № 68 від 11.12.2008 р.).

Мета роботи. З'ясувати механізми впливу трансплантації ембріональних прогеніторних клітин на перебіг хронічного запального процесу в нирках у щурів з експериментальним ад'ювантним артритом Пірсона.

Завдання дослідження:

1. Визначити динаміку змін екскреторної функції нирок і ниркового транспорту іонів натрію і калію у щурів з артритом Пірсона.
2. Дослідити динаміку змін функціонального стану нирок у щурів з артритом Пірсона після трансплантації ембріональних прогеніторних клітин.
3. З'ясувати вплив трансплантації ембріональних прогеніторних клітин на динаміку змін інтенсивності протеолізу і фібринолізу та морфологію тканини нирок у щурів з експериментальним артритом Пірсона.
4. Дослідити вплив трансплантації ембріональних прогеніторних клітин на динаміку змін інтенсивності пероксидного окислення ліпідів у тканині нирок у щурів з експериментальним артритом Пірсона.
5. Визначити динаміку змін вмісту цитокінів в тканині нирок у щурів з експериментальним артритом Пірсона після трансплантації ембріональних прогеніторних клітин.
6. Патогенетично обґрунтувати можливість застосування трансплантації ембріональних прогеніторних клітин у лікуванні ревматоїдного артриту з метою попередження ниркових уражень.

Об'єкт дослідження: саногенетичні механізми трансплантації ембріональних прогеніторних клітин при експериментальному артриті Пірсона.

Предмет дослідження: протеоліз, фібриноліз, пероксидне окислення ліпідів, цитокіни, функція нирок.

Методи дослідження: патофізіологічні, фізіологічні, біохімічні, морфологічні та статисти-

чні.

Наукова новизна одержаних результатів. Показано, що у щурів при експериментальному ад'ювантному артриті Пірсона виникають порушення екскреторної та іонорегулюючої функції нирок з подальшим прогресування та максимумом патологічних змін через 12 місяців спостереження.

Уперше встановлено, що трансплантація ембріональних прогеніторних клітин у щурів з артритом Пірсона значно покращує екскреторну функцію нирок і каналцевий транспорт іонів натрію, різко зменшує інтенсивність у кірковій речовині нирок протеолізу і неферментативного фібринолізу, підсилює ферментативний фібриноліз, знижує вміст дієнових кон'югатів і малонового діальдегіду, що відбувається на тлі значного зниження рівня інтерлейкіну-2, інтерлейкіну-12, інтерферону- γ і фактора некрозу пухлин α та підвищення вмісту інтерлейкіну-4, інтерлейкіну-10 і трансформувального фактора росту β_1 .

Вперше з'ясовано, що трансплантація ембріональних прогеніторних клітин запобігає хронізації патологічного процесу в нирках щурів з артритом Пірсона за рахунок імунного відхилення (значного зменшення індексу співвідношення цитокінів Th1/Th2-типів), що реалізується через протизапальні та імуносупресивні ефекти інтерлейкіну-4, інтерлейкіну-10 і трансформувального фактора росту β_1 .

Практичне значення одержаних результатів. Експериментальні результати дисертаційного дослідження дозволили науково обґрунтувати причинно-наслідковий зв'язок між трансплантацією ембріональних прогеніторних клітин та зниженням інтенсивності механізмів імунного запалення у щурів з артритом Пірсона, які призводять до уражень структур і порушень функціонального стану нирок. У дисертації наведено теоретичне узагальнення та нове вирішення наукової проблеми попередження хронізації імунного ревматоїдного запалення шляхом трансплантації ембріональних прогеніторних клітин з обґрунтуванням способу корекції порушень функції нирок на експериментальній моделі ревматоїдного артриту.

Результати роботи можуть бути використані в навчальному процесі при викладанні нормальної і патологічної фізіології, біології, імунології і терапії, в роботі науково-дослідних лабораторій з відповідним напрямком наукових досліджень, при написанні підручників та монографій із зазначених галузей теоретичної медицини.

Відповідно до наказу МОЗ України № 630 від 10.10.2007 року, зареєстрованому в Міністерстві юстиції України 25.10.2006 року за № 1206/14473 "Про затвердження Порядку проведення клінічних випробувань тканинних і клітинних трансплантатів та експертизи матеріалів клінічних випробувань й унесення змін до Порядку проведення клінічних випробувань лікарських засобів та експертизи матеріалів клінічних випробувань, затвердженого наказом Міністерства охорони здоров'я України від 13.02.2006 № 66, зареєстрованого в Міністерстві юстиції України 10.03.2006 за

№ 252/12126" результати дослідження можуть бути використаними у якості доклінічних досліджень з метою обґрунтування доцільності проведення клінічних випробувань з оцінки ефективності трансплантації ембріональних прогеніторних клітин в лікуванні ревматоїдного артриту.

Результати досліджень впроваджено у навчальний процес кафедри нормальної і кафедри патологічної фізіології Івано-Франківського національного медичного університету, кафедри патологічної фізіології і кафедри клінічної імунології та алергології Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця, кафедри загальної та клінічної патофізіології ім. В.В. Підвисоцького та кафедри клінічної імунології, генетики та медичної біології Одеського державного медичного університету, кафедри патологічної фізіології ДВНЗ "Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського", кафедри патологічної фізіології Буковинського державного медичного університету.

Особистий внесок здобувача. Автором особисто здійснено розробку основних теоретичних і практичних положень роботи, проведено аналіз літературних джерел, усі патофізіологічні дослідження. Самостійно виконано набір і обробку фактичного матеріалу, написано усі розділи дисертації, сформульовано висновки і практичні рекомендації. У наукових працях, опублікованих зі співавторами, та актах впровадження, що стосується науково-практичної новизни, використано експериментальний і клінічний матеріал та статистичні дані, отримані автором у процесі виконання дисертаційного дослідження.

Апробація результатів дисертації. Основні наукові положення і висновки дисертації оприлюднені на Першому Міжнародному Конгресі-крузі "Медицина третього тисячоліття" (Одеса – Київ, 2003), II Міжнародній науково-практичній конференції "Динаміка наукових досліджень '2003'" (Дніпропетровськ – Луганськ – Чернівці, 2003), Міжнародній науково-практичній конференції "Україна наукова '2003'" (Дніпропетровськ – Харків, 2003), I Всеросійській конференції "Фізіологія імунної системи" (Сочі, 2003), VII конгресі Міжнародної асоціації ксенотрансплантації (Глазго, 2003), IV національному конгресі патофізіологів України з міжнародною участю (Чернівці, 2004), III Міжнародній науково-практичній конференції "Динаміка наукових досліджень '2004'" (Дніпропетровськ, 2004), 38-у Міжнародному конгресі з імуносупресії (Сан-Дієго, 2005), II Світовому конгресі з регенеративної медицини (Мілан – Бемингхам – Осака, 2005), VIII читаннях ім. В.В. Підвисоцького (Одеса, 2009).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 21 наукова праця, з них 8 – у фахових виданнях, рекомендованих ВАК України, 3 патенти України на винахід.

Структура й обсяг роботи. Дисертація викладена на 254 сторінках машинописного тексту (основний обсяг становить 155 сторінок) і складається зі вступу, семи розділів, висновків, списку використаних джерел літератури (всього 429 найменувань) та додатків. Робота ілюстрована 15 таблицями та 115 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Дослідження виконані в Координаційному центрі трансплантації органів, тканин і клітин МОЗ України на лабораторній базі Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. Для вирішення поставлених задач проведені серії експериментів *in vivo*. У роботі використано 189 самців білих щурів з середньою масою тіла $0,193 \pm 0,018$ кг. Для виділення ембріональних прогеніторних клітин використано 18 вагітних самиць. Дослідження проводили через 2, 4, 6 і 12 міс. після індукції ад'ювантного артриту Пірсона. Для моделювання артриту використовували введення повного ад'юванта Фрейнда в апоневроз правої задньої кінцівки щурів під ефірним наркозом (Копьева Т.Н., 1980; Imai Shinji, Tokunaga Yoshimitsu, Kontinen Yrjo T., 1997). Через 3 тижні, тобто в період проліферативної фази запального процесу в суглобах, коли сформований панус охоплює суглобову поверхню, інвазує і руйнує хрящ, субхондральну кістку і кістковий мозок (Копьева Т.Н., 1992), щурам дослідної групи під нембуталовим наркозом (40 мг на кг маси тіла) в яремну вену вводили суспензію ембріональних прогеніторних клітин у середовищі RPMI або розчині Хенкса (Кухарчук О.Л., Радченко В.В., Сірман В.М., 2002). Тваринам групи порівняння вводили відповідний об'єм середовища RPMI або розчину Хенкса. Контрольну групу склали 11 щурів, яким замість повного ад'юванта Фрейнда в апоневроз правої задньої кінцівки вводили 0,1 мл вазелінового масла. Усі тварини сертифіковані та отримані з розплідника Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України.

Для виділення ембріональних прогеніторних клітин вагітних самок вводили в наркоз (натрію етамінал – 40 мг на кг маси тіла) на 11-13 стадіях розвитку ембріонів за Астауровим. Після асептичної обробки операційного поля (96° етиловий спирт, йод) виконували серединну лапаротомію по *linea alba*. Обидва роги матки виводили в операційну рану і розрізали стерильними ножицями поперек (біля ембріонів). Останні вилущували в стерильну чашку Петрі з охолодженням до 4°C середовищем Хенкса з гентаміцином (кінцева концентрація – 0,001 %). Після потрійної промивки з ембріонів виділяли ембріональні прогеніторні клітини за розробленою нами методикою (Сірман В.М., Кухарчук О.Л., Радченко В.В., 2005). Суспензію ембріональних прогеніторних клітин профільтровували через капроновий фільтр (200 мкм). Контроль життєздатності клітин здійснювали шляхом світлової мікроскопії при забарвленні клітин трипановим синім. Щурам з артритом дослідної групи ембріональні прогеніторні клітини вводили у яремну вену (венесекція під нембуталовим наркозом: натрію етамінал, 40 мг на 1 кг маси тіла) у дозі $3,5 \times 10^7$ /мл на 0,1 кг маси тіла. Декапітацію щурів здійснювали під нембуталовим наркозом (натрію етамінал, 40 мг на 1 кг маси тіла). Виділяли кортикальну тканину нирок, яку відразу заморожували у рідкому азоті для біохімічних досліджень. Визначення досліджуваних біохімічних параметрів проводили в гомогенатах кортикальної тканини нирок з перерахунком отриманих показників на одиницю маси вологої тканини або білка за Лоурі. Для оцінки процесів пероксидного окислення ліпідів досліджували вміст

дієнових кон'югатів (ДК) (Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И., 1983) і малонового діальдегіду (МДА) (Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г., 1977). Інтенсивність протеолітичної деструкції низько-, високомолекулярних білків і колагену оцінювали за лізисом азосполук з використанням азоальбуміну, азоказеїну і азоколу фірми "SIMKO LTD" (Україна) з реєстрацією екстинцій на спектрофотометрі "СФ-46" і фотокolorиметрі "КФК-3" (Росія).

Визначення сумарного, ферментативного і неферментативного фібринолізу в кортикальній тканині нирок проводили з використання азофібрину ("Simko Ltd.", Україна) (Боднар Б.М., Кухарчук О.Л. та ін., 2000). За аналогічним методом визначали протеолітичну активність кортикальної тканини нирок, використовуючи колорогенні сполуки: азоальбумін (лізис низькомолекулярних білків), азоказеїн (лізис великомолекулярних білків) та азокол (лізис колагену) (Simko Ltd., Україна). Визначення вмісту цитокінів у кірковій речовині нирок щурів з артритом Пірсона проводили імуноферментним методом за допомогою реактивів "Rat IL-4 ELISA kit", "Rat IFN γ ELISA kit", "Rat TNF α ELISA kit" (DiaClone, Франція), "Rat IL-6", "Rat IL-12", "Rat IL-10", "Rat IL-2" (BioSource Int., США), "R&D Systems. QuantikineTM - TGF β ₁" (США). Екстракцію цитокінів проводили на мікроколонках C₂ AmprepTM (Велика Британія) з реєстрацією показників світлопоглинання на рідері "Уніплан-М" (Росія).

Функцію нирок вивчали в умовах індукованого водного діурезу. Швидкість клубочкової фільтрації (GFR) розраховували за кліренсом ендogenous креатиніну: $GFR = (V \times U_{cr}) : P_{cr}$, де V – об'єм сечі, U_{cr} – концентрація креатиніну в сечі, P_{cr} – в плазмі крові. Здатність нирок концентрувати та розводити сечу оцінювали за концентраційним індексом ендogenous креатиніну (U_{cr}/P_{cr}) і концентраційним індексом іонів натрію (UNa⁺/PNa⁺), де UNa⁺ – концентрація іонів натрію в сечі, PNa⁺ – концентрація іонів натрію в плазмі крові. Для інтегральної оцінки транспорту іонів натрію в нирках використовували показники екскреції (ENa⁺ = UNa⁺ × V) і кліренсу іонів натрію (CNa⁺ = ENa⁺ : PNa⁺). Реабсорбцію води визначали за формулою: $RH_2O = [(GFR - V) : GFR] \times 100\%$. Показники функції нирок стандартизували шляхом перерахунку їх абсолютних величин на одиницю маси тіла тварини або об'єму клубочкового фільтрату. Статистичну обробку отриманих результатів виконували за програмою "БіоСтат" з визначенням t-критерію Ст'юдента.

Комісією з біоетики Координаційного центру трансплантації органів і тканин МОЗ України порушень морально-етичних норм у процесі виконання досліджень не виявлено (протокол № 2/1 від 22.12.2009 р.).

Результати дослідження та їх обговорення. Встановлено, що у щурів з артритом Пірсона рівень індукованого водного діурезу різко зменшується через 2 міс. спостереження, через 4 міс. зазнає підвищення відносно попереднього періоду досліду на 60 %, через 6 міс. знижується на 33 % та через 12 міс. зменшується ще на 21 % (табл. 1). Швидкість клубочкової фільтрації впродовж 6 міс. досліду залишається на низькому рівні та наприкінці експерименту відбувається її додаткове

зменшення на 17 %. Уміст креатиніну в плазмі крові суттєво збільшується через 2 міс., через 4 міс. зменшується порівняно з показниками попереднього періоду дослідження на 21 %, проте через 6 міс. підвищується на 21 %, а через 12 міс. зростає ще на 39 %. Концентрація білка в сечі впродовж 6 міс. експерименту залишається стало високою та зазнає додаткового збільшення на 35 % наприкінці спостереження. Екскреція білка, яка суттєво збільшується через 2 міс., через 4 міс. підвищується відносно показників попереднього періоду досліду ще на 60 %, зменшується на 27 % через 6 міс. і надалі не змінюється. Екскреція білка, стандартизована за одиницею швидкості клубочкової фільтрації, значно зростає через 2 міс., додатково підвищується на 38 % через 4 міс., залишається без змін через 6 міс. та через 12 міс. збільшується ще на 34 %.

У щурів з ад'ювантним артритом виявляється певна циклічність змін ниркового транспорту іонів натрію і калію (табл. 2). Концентрація в сечі іонів натрію, яка різко зростає через 2 міс., через 4 міс. зменшується відносно показників попереднього періоду дослідження майже втричі, через 6 міс. знову підвищується у 2,3 рази та через 12 міс. збільшується ще на 54 %. Екскреція іонів натрію, котра також значно перевищує контроль через 2 міс. спостереження, через 4 міс. зменшується на 42 % і досягає контрольних величин, однак надалі, через 6 міс., збільшується на 60 %, а через 12 міс. набуває максимальних величин, перевищуючи показники попереднього періоду експерименту на 21 %. Концентрація в сечі іонів калію відповідає контролю через 2 міс., через 4 міс. досліду зменшується у 2,3 рази відносно такої у попередній період спостереження, через 6 міс. зростає на 84 % та через 12 міс. збільшується ще на 47 % і знову досягає контрольного рівня. Екскреція іонів калію зменшується через 2 міс. та надалі достовірних змін не зазнає і залишається низькою аж до кінця дослідження. Коефіцієнт співвідношення концентрацій іонів натрію і калію в сечі різко зростає на початку спостереження та залишається таким через 4, 6 і 12 міс. Концентрація іонів калію в плазмі крові не має достовірних коливань впродовж всього експерименту. Плазмовий вміст іонів натрію, який через 2 міс. є меншим за контроль, через 4 міс. підвищується на 2,6 %, через 6 міс. – знижується на 5,3% та через 12 міс. зазнає додаткового зменшення на 2,8 %, набуваючи при цьому мінімальних величин. Динаміка змін відносної реабсорбції іонів натрію характеризується зменшенням через 2 міс., деяким підвищенням через 4 і 6 міс. та суттєвим зниженням наприкінці спостереження.

Концентраційний індекс іонів натрію значно підвищується через 2 міс., через 4 міс. відбувається його зменшення у 2,8 рази, що через 6 і 12 міс. змінюється повторним збільшенням відносно показників попередніх періодів дослідження відповідно у 2,4 і 1,6 рази. Кліренс іонів натрію суттєво збільшується через 2 міс., через 4 міс. зазнає зменшення на 43 %, через 6 міс. зростає на 68 % і залишається підвищеним наприкінці спостереження. Кліренс безнатрієвої води через 2 міс. різко зменшується, через 4 міс. підвищується на 81 %, через 6 міс. знову знижується на 39% та через 12 міс. зазнає додаткового зменшення на 30 %. Екскреція іонів натрію, стандартизована за

одиноцею швидкості клубочкової фільтрації, значно збільшується через 2 міс., зменшується вдвічі через 4 міс., на 79 % зростає через 6 міс. та через 12 міс. підвищується відносно показників попереднього періоду досліду ще на 52 %. Фільтраційний заряд іонів натрію через 2 міс. є суттєво зниженим, через 4 міс. збільшується на 19 %, через 6 міс. зменшується на 18% та через 12 міс. зазнає додаткового зниження на 23 %. Екскретуєма фракція іонів натрію, яка на початку експерименту зростає майже вдвічі, через 4 міс. зменшується на 41 %, через 6 міс. перевищує показники попереднього періоду спостереження в 1,6 разу та наприкінці досліду збільшується ще на 21 %. Абсолютна реабсорбція іонів натрію різко зменшується через 2 міс., підвищується на 22 % через 4 міс. і надалі знову знижується: на 19 % через 6 міс. та на 23% через 12 міс. Проксимальна реабсорбція іонів натрію залишається стало низькою впродовж всього періоду спостереження. Дистальний транспорт іонів натрію, який на початку дослідження знижується майже втричі, через 4 міс. зростає на 85 %, зменшується на 43% через 6 міс. та через 12 міс. знижується відносно показників попереднього періоду експерименту ще на 32%. Стандартизована за одиницею швидкості клубочкової фільтрації проксимальна реабсорбція іонів натрію суттєво зменшується через 2 міс. і надалі залишається стало низькою протягом 4, 6 і 12 міс. спостереження. Дистальний транспорт іонів натрію, стандартизований за об'ємом клубочкового фільтрату, на початку спостереження не відрізняється від контрольних показників, через 4 міс. підвищується на 67 %, через 6 міс. зазнає зменшення на 37 % та через 12 міс. знову відповідає контрольним величинам.

У щурів з артритом Пірсона динаміка змін протеолітичної деструкції низькомолекулярних білків у кортикальній тканині нирок характеризується синусоїдальним коливанням: лізис азоальбуміну на початку досліду суттєво перевищує контрольні показники, через 4 міс. зменшується на 45 %, через 6 міс. збільшується на 66 %, через 12 міс. зазнає додаткового підвищення у 2 рази та набуває максимальних величин. Подібні зміни спостерігаються з боку інтенсивності розпаду високомолекулярних білків: через 2 міс. експерименту лізис азоказеїну є значно вищим за контроль, через 4 міс. знижується відносно показників попереднього періоду досліду на 47 % та знову зростає: на 67 % – через 6 міс. та у 2,2 разу – через 12 міс. Водночас лізис азоколу, який через 2 міс. є суттєво вищим за контрольні величини, через 4 міс. зменшується на 40 %, через 6 міс. знижується у 12,1 разу та зменшується ще на 48 % наприкінці експерименту, коли інтенсивність колагенолізу набувала мінімальних величин.

Сумарна фібринолітична активність кортикальної тканини нирок щурів з артритом Пірсона впродовж всього періоду досліду залишається підвищеною і достовірних коливань не зазнає. Неферментативна фібринолітична активність є високою через 2 міс., через 4 міс. зменшується на 37 %, через 6 міс. зростає порівняно з показниками попереднього періоду експерименту на 63 % та через 12 міс. підвищується і досягає найбільшого рівня. Інтенсивність ферментативного фібринолізу на початку спостереження знижується, підвищується на 58 % через 4 міс., зменшується на 41% через 6 міс. та знижується ще на 22 % наприкінці досліду, набуваючи при цьому найменших

величин.

Рівень ДК у кірковій речовині нирок тварин з ад'ювантним артритом, який значно збільшується через 2 міс. експерименту, через 4 міс. зазнає зменшення у 2,4 разу, проте надалі, через 6 міс., знову зростає у 2,3 разу відносно даних попереднього періоду дослідження та через 12 міс. досягає максимальних величин. Уміст МДА в кортикальній тканині нирок щурів з артритом Пірсона на початку експерименту значно перевищує контрольні показники, через 4 міс. зменшується на 47 %, через 6 міс. зазнає повторного підвищення – у 2,0 рази відносно результатів попереднього періоду дослідження, через 12 міс. додатково збільшується на 15 % і досягає максимального рівня.

Динаміка змін рівня у кірковій речовині нирок інтерлейкіну-2 характеризується різким підвищенням через 2 міс. дослідження, зниженням практично до контрольних величин через 4 міс., повторним збільшенням у 2,9 разу відносно показників попереднього періоду спостереження через 6 міс. та зростанням ще на 19 % наприкінці дослідження. Подібна динаміка відмічається й з боку вмісту в кортикальній тканині нирок інтерлейкіну-12. Кількість у нирковій тканині інтерферону- γ зазнає майже чотирьохразового збільшення через 2 міс., зменшується і не відрізняється від такої у інтактних тварин через 4 міс., знову різко підвищується через 6 міс. і залишається на такому високому рівні до кінця дослідження. Рівень фактора некрозу пухлин α через 2 міс. суттєво перевищує контрольні величини, через 4 міс. зменшується вдвічі відносно попередніх показників, зазнає повторного збільшення через 6 міс. та через 12 міс. є значно більшим за такий у інтактних і контрольних тварин. Уміст інтерлейкіну-4 через 2 міс. не відрізняється від контролю, через 4 міс. збільшується на 85 %, через 6 міс. зазнає більш ніж двохразового зменшення, відповідаючи контрольним показникам через 12 міс. спостереження. Подібні зміни спостерігаються й з боку рівня у тканині нирок інтерлейкіну-6. Кількість інтерлейкіну-10 у кірковій речовині нирок щурів з артритом Пірсона через 2 міс. дорівнює контролю, через 4 міс. підвищується на 44 % та поступово зменшується до контрольних величин через 6 і 12 міс. експерименту. Уміст у тканині нирок трансформувального фактора росту β 1 на початку спостереження є суттєво більшим за контрольні показники, через 4 міс. зазнає додаткового підвищення на 47 % і залишається на такому рівні через 6 і 12 міс. дослідження.

У щурів з артритом, яким трансплантували ембріональні прогеніторні клітини, діурез впродовж всього періоду спостереження є суттєво більшим, аніж у псевдолікованих тварин: через 2 міс. – на 61 %, через 4 міс. – на 22 %, через 6 міс. – на 72 %, через 12 міс. – у 2,8 разу. Швидкість клубочкової фільтрації упродовж всього періоду спостереження також є вищою у щурів дослідної групи – відповідно строкам експерименту в 1,5, 2,1, 2,2 і 3,2 разу. Концентрація креатиніну в плазмі крові у тварин дослідної групи, навпаки, є меншою: через 2 міс. – на 21 %, через 4 міс. – на 28 %, через 6 міс. – на 24 %, через 12 міс. – у 2,1 разу. Концентрація білка в сечі є значно меншою у щурів з артритом, яким трансплантували ембріональні прогеніторні клітини: через 2 міс. – на 38 %, через 4 міс. – у 2,1 разу, через 6 міс. – у 2,0 рази, через 12 міс. – у 5,9 разу. Екскреція білка ви-

являється більшою у псевдолікованих щурів через 4 і 12 міс., проте не відрізняється від такої у тварин дослідної групи через 2 і 6 міс. Однак екскреція білка, стандартизована за об'ємом клубочкового фільтрату, протягом всього періоду спостереження є значно нижчою у щурів з артритом, яким вводили ембріональні прогеніторні клітини: через 2 міс. – на 33 %, через 4 міс. – у 3,5 разу, через 6 міс. – у 2,5 разу, через 12 міс. – у 7,7 раз. Тобто введення ембріональних клітин значно покращує показники екскреторної функції нирок протягом усього спостереження за динамікою хвороби (табл.1).

Таблиця 1

Порівняльний аналіз динаміки змін екскреторної функції нирок у досліджуваних групах щурів з ад'ювантним артритом Пірсона ($\bar{x} \pm Sx$)

Показник	Досліджувані групи	Термін від початку моделювання артриту Пірсона			
		2 місяці	4 місяці	6 місяців	12 місяців
Діурез, мл/100 г маси тіла за 2 год.	Артрит	1,62±0,11 n=11	2,59±0,12 n=11	1,73±0,13 n=25	1,36±0,10 n=25
	Артрит + ЕПК	2,61±0,11 n=15 p<0,001	3,15±0,19 n=11 p<0,05	2,98±0,13 n=30 p<0,001	3,39±0,10 n=30 p<0,001
Швидкість клубочкової фільтрації, мкл/хв.	Артрит	304,80±18,06 n=11	355,40±16,88 n=11	310,00±14,38 n=25	246,08±13,95 n=25
	Артрит + ЕПК	459,10±21,67 n=15 p<0,001	738,10±54,42 n=11 p<0,001	685,40±20,93 n=30 p<0,001	792,66±28,11 n=30 p<0,001
Екскреція білка, мг/2 год.	Артрит	0,0626±0,0033 n=11	0,1000±0,0070 n=11	0,0732±0,0036 n=25	0,0780±0,0041 n=25
	Артрит + ЕПК	0,0642±0,0025 n=15 p>0,6	0,0573±0,0057 n=11 p<0,001	0,0647±0,0027 n=30 p>0,05	0,0325±0,0019 n=30 p<0,001

Примітки: ЕПК – ембріональні прогеніторні клітини; p – ступінь достовірності різниць показників у досліджуваних групах тварин; n – кількість тварин у групі.

Поряд з цим значні зміни відбуваються з боку іонорегулюючої функції нирок. Концентрація іонів натрію в сечі через 2 міс. є у 2,1 разу меншою у тварин дослідної групи, через 4 міс. цей показник у досліджуваних групах практично не відрізняється, через 6 і 12 міс. є відповідно у 2,2 і 4,2 разу нижчою у щурів з артритом, яким вводили ембріональні прогеніторні клітини. Упродовж

першої половини експерименту екскреція іонів натрію у тварин досліджуваних груп є практично однаковою, проте через 6 і 8 міс. спостереження втрати іонів натрію з сечею є відповідно на 22 і 40 % меншими у щурів дослідної групи. Концентрація іонів калію в сечі через 4 і 12 міс. також є нижчою у тварин з артритом, які отримували ембріональні прогеніторні клітини – відповідно на 42 і 17%, хоча через 2 і 6 міс. суттєвих міжгрупових розбіжностей не виявляється. Екскреція іонів калію на початку досліду є вдвічі більшою у щурів дослідної групи, через 4 міс., навпаки, меншою на 26 %, та надалі, через 6 і 12 міс. знову перевищує таку у псевдолікованих тварин відповідно в 1,9 і 2,1 разу.

Коефіцієнт співвідношення концентрацій іонів натрію і калію в сечі через 2, 6 і 12 міс. дослідження є значно меншим у щурів з артритом, яким вводили ембріональні прогеніторні клітини. Плазмова концентрація іонів калію, навпаки, через 6 і 12 міс. виявляється більшою у щурів дослідної групи. Концентрація в плазмі крові іонів натрію через 2 і 4 міс. у досліджуваних групах тварин є практично однаковою, проте через 6 і 12 міс. виявляється на 5,5 і 8,9 % більшою у щурів, яким трансплантували ембріональні прогеніторні клітини. Відносна реабсорбція іонів натрію через 2, 4 і 12 міс. спостереження є вищою у тварин дослідної групи. Екскреція іонів натрію, стандартизована за об'ємом клубочкового фільтрату, у щурів з артритом Пірсона, яким вводили ембріональні прогеніторні клітини, є значно меншою, ніж у псевдолікованих тварин: через 2 міс. – у 2,0 рази, через 4 міс. – у 2,4 разу, через 6 міс. – у 2,8 разу, через 12 міс. – у 5,4 разу. Протилежні зміни спостерігаються з боку фільтраційного заряду іонів натрію, який виявляється більшим у тварин дослідної групи відповідно строкам експерименту в 1,5, 2,0, 2,3 і 3,5 разу. Екскретуєма фракція іонів натрію через 6 і 12 міс. є відповідно на 22 і 40 % меншою у щурів з ад'ювантним артритом, яким трансплантували ембріональні прогеніторні клітини. Абсолютна реабсорбція іонів натрію є суттєво більшою у тварин дослідної групи: через 2 міс. – на 48 %, через 4 міс. – у 2,1 разу, через 6 міс. – у 2,3 разу, через 12 міс. – у 3,5 разу. Відповідної динаміки зазнає й проксимальна реабсорбція іонів натрію, яка перевищує показники у псевдолікованих щурів в 1,5, 2,1, 2,4 і 3,5 разу. Дистальний транспорт іонів натрію також виявляється більшим у тварин з артритом, яким вводили ембріональні прогеніторні клітини: через 2 міс. – на 73 %, через 4 міс. – на 22 %, через 6 міс. – у 2,0 рази, через 12 міс. – у 3,4 разу. Проксимальна реабсорбція іонів натрію, стандартизована за об'ємом клубочкового фільтрату, через 6 і 12 міс. експерименту у щурів дослідної групи перевищує таку у псевдолікованих тварин з артритом відповідно на 6,7 і 10,2 %. Стандартизований дистальний транспорт іонів натрію в досліджуваних групах тварин відрізняється лише через 4 міс. спостереження, коли дистальна реабсорбція іонів натрію є на 40 % меншою у щурів з артритом, які отримували ембріональні прогеніторні клітини.

Таким чином, результати порівняльного аналізу свідчать, про позитивні зміни у стані іонорегулюючої функції, а також, що коридор розбіжностей показників функціонального стану нирок

у щурів з артритом, яким трансплантували ембріональні прогеніторні клітини, та у псевдолікованих тварин перманентно розширюється через 4 міс. від початку експерименту (табл. 2).

Упродовж всього періоду дослідження у щурів з артритом Пірсона, яким трансплантували ембріональні прогеніторні клітини, інтенсивність лізису азоальбуміну і азоказеїну в кірковій речовині нирок є значно нижчою за таку у псевдолікованих тварин: через 2 міс. відповідно на 44 і 47 %, через 4 міс. – на 42 % й у 2,1 разу, через 6 міс. – у 2,4 і 3,0 рази, через 12 міс. – у 9,9 і 11,7 разу. Водночас тканинний лізис азоколу, який через 2 і 4 міс. також є меншим у щурів дослідної групи відповідно на 33 і 47 %, через 6 і 12 міс. виявляється у 7,0 і 5,0 разів більшим у тварин з артритом, яким вводили ембріональні прогеніторні клітини. У досліджуваних групах щурів з артритом Пірсона сумарна фібринолітична активність у кортикальній тканині нирок протягом експерименту практично не відрізняється, лише наприкінці досліду сумарна інтенсивність тканинного фібринолізу є на 46 % меншою у щурів дослідної групи. Неферментативна фібринолітична активність у кірковій речовині нирок впродовж всього спостереження у тварин дослідної групи є меншою за таку у псевдолікованих щурів: через 2 міс. – у 2,1 разу, через 4 міс. – на 43 %, через 6 міс. – у 2,4 разу, через 12 міс. – у 3,9 разу, тоді як ферментативна фібринолітична активність, навпаки, є більшою відповідно строкам дослідження у 2,3, 2,1, 4,2 і 3,0 рази.

Таблиця 2

Порівняльний аналіз динаміки деяких показників іонорегулюючої функції нирок досліджуваних груп щурів з ад'ювантним артритом Пірсона ($\bar{x} \pm S_x$)

Показник	Досліджувані групи	Термін від початку моделювання артриту Пірсона			
		2 місяці	4 місяці	6 місяців	12 місяців
Концентраційний індекс іонів натрію, од.	Артрит	0,178±0,028 n=11	0,063±0,007 n=11	0,153±0,009 n=25	0,243±0,015 n=25
	Артрит + ЕПК	0,087±0,005 n=15 p<0,01	0,045±0,006 n=11 p>0,06	0,066±0,004 n=30 p<0,001	0,054±0,003 n=30 p<0,001
Кліренс іонів натрію, мл за 2 год.	Артрит	0,277±0,041 n=11	0,158±0,013 n=11	0,265±0,036 n=25	0,330±0,018 n=25
	Артрит + ЕПК	0,228±0,010 n=15 p>0,1	0,139±0,017 n=11 p>0,3	0,197±0,011 n=30 p>0,05	0,182±0,008 n=30 p<0,001
Кліренс безнатрієвої води,	Артрит	1,35±0,11 n=11	2,44±0,12 n=11	1,48±0,07 n=25	1,03±0,08 n=25
	Артрит + ЕПК	2,38±0,10	3,01±0,19	2,78±0,13	3,21±0,09

мл за 2 год.	ЕПК	n=15 p<0,001	n=11 p<0,05	n=30 p<0,001	n=30 p<0,001
--------------	-----	-----------------	----------------	-----------------	-----------------

Примітки: ЕПК – ембріональні прогеніторні клітини; p – ступінь достовірності різниць показників у досліджуваних групах тварин; n – кількість тварин у групі

Уміст у кортикальній тканині нирок ДК і МДА протягом всього періоду спостереження є значно меншим у щурів з артритом, яким трансплантували ембріональні прогеніторні клітини: через 2 міс. – відповідно на 38 і 30 %, через 4 міс. – на 36 і 31 %, через 6 міс. – у 3,8 і 3,1 разу, через 12 міс. – у 5,1 і 4,7 рази. Рівень ІЛ-2 в кірковій речовині нирок щурів з артритом, яким вводили ембріональні прогеніторні клітини, через 2 і 4 міс. не відрізняється від показників у псевдолікованих тварин, проте через 6 і 12 міс. виявляється меншим за такі відповідно у 2,9 і 4,5 разу. Подібна динаміка спостерігається й з боку вмісту в кортикальній тканині нирок ІЛ-12 та ІNF- γ , який через 6 і 12 міс. є відповідно у 3,5 і 6,4 та 3,5 і 4,9 разу меншим у щурів дослідної групи. Кількість TNF- α у нирковій тканині щурів з артритом Пірсона, яким вводили ембріональні прогеніторні клітини, через 2 і 4 міс. відповідає такої у псевдолікованих тварин, однак через 6 і 12 міс. рівень TNF- α виявляється відповідно у 3,2 і 5,2 разу меншим у щурів дослідної групи. Уміст у кірковій речовині нирок ІЛ-4 у ті самі строки спостереження, навпаки, є відповідно у 2,5 і 2,4 разу більшим у щурів з артритом, які отримували ембріональні прогеніторні клітини. У останніх також відмічається більш високий рівень ІЛ-6, який через 2, 6 і 12 міс. перевищує відповідні показники у псевдолікованих тварин в 1,9, 4,1 і 4,9 разу. Кількість ІЛ-10 у кортикальній тканині нирок щурів досліджуваних груп не відрізняється через 2 і 4 міс. досліджу, проте надалі, через 6 і 12 міс. рівень цього цитокіну виявляється відповідно у 2,0 і 2,5 разу більшим у тварин, яким трансплантували ембріональні прогеніторні клітини. Через 2 міс. дослідження вміст TGF- β_1 у кірковій речовині нирок щурів дослідної групи відповідає такому у псевдолікованих тварин, через 4 міс. – є вдвічі більшим, через 6 міс. достовірних міжгрупових розбіжностей не спостерігається, через 12 міс. кількість TGF- β_1 є у 2,4 разу вищою у щурів з артритом, яким вводили ембріональні прогеніторні клітини. Результати порівняльного аналізу свідчать, що коридор розбіжностей показників інтенсивності внутрішньониркових процесів протеолізу, фібринолізу і ліпопероксидації, а також вмісту цитокінів у кортикальній тканині нирок у щурів з артритом, яким трансплантували ембріональні прогеніторні клітини, та у псевдолікованих тварин перманентно розширюється через 4 міс. від початку експерименту.

За даними гістологічного аналізу, через 4 міс. у нирках псевдолікованих щурів спостерігається виражена зерниста дистрофія епітелію звивистих каналців з некробіозом окремих епітеліоцитів і лізисом ядер у них. Через 12 міс. у просвіті окремих каналців виявляється рідина, що містить білок, еритроцити і циліндри. Відмічається повнокрів'я мікросудин з дрібновогнищевими крововили-

вами в паренхіму й окремі клубочки. Тканина нирки місцями є набряклою, окремі клубочки гіпотрофовані. Частина клубочків некротизовані. Спостерігаються крововиливи в порожнину капсули клубочків. У нирках щурів з артритом, яким трансплантували ембріональні прогеніторні клітини, через 4 міс., окрім дистрофії епітелію звивистих каналців і локусів некротичних змін, спостерігаються фібропластичні зміни в клубочках і стромі нирок: мікрозлуки капілярних петель клубочків, проліферація фібробластів у клубочках, дрібні вогнищеві лімфо-плазмоцитарні інфільтрати в стромі нирок. В окремих каналцях виявляються циліндри. Кількість і розміри клубочків зменшуються. Відмічається некроз окремих клубочків. Судини є розширеними, повнокровними. Спостерігається діapedез еритроцитів. Через 12 міс. дослідження у тварин дослідної групи гістологічна структура нирок наближається до нормальної.

Аналіз розвитку експериментальної ревматоїдної нефропатії в часі показав, що фазність динаміки патологічного процесу в нирках свідчать про наявність переломного періоду – 4 міс. від початку патологічного процесу (рис.1). На нашу думку, цей період є ключовим з точки зору подальшого розвитку патологічного процесу, оскільки у даний момент вирішується проблема подальшого розвитку захворювання – чи буде флогогенний агент елімінований фагоцитуючими клітинами або знищений у ланцюговій реакції антиген-антитіло-система комплементу, чи відбудеться підсилення автосенсибілізації, вторинна альтерація та перехід запалення у хронічну форму.

Якщо співставити динаміку змін перебігу патологічного процесу в нирках (рис. 1) з динамікою тканинного вмісту цитокінів (рис.2), то можна дійти висновку про те, що провідним фазовосинхронізуючим моментом у даному випадку є тканинний вміст прозапальних цитокінів, який є найменшим в період активації механізмів репаративної регенерації та значно зростає у період хронізації імунopatологічного процесу (макрофагально-моноцитарно-лімфоїдної інфільтрації). Навпаки, у період активації процесів репаративної регенерації збільшується тканинний вміст проти-запальних цитокінів (IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β_1), тоді як рівень інтерлейкіну-2, інтерлейкіну-12, інтерферону- γ і фактора некрозу пухлин α зменшується.

Тобто наші дані узгоджуються з гіпотезою, згідно якої РА є хронічним імунoпосередкованим захворюванням, при якому ініціація і підтримка патологічного процесу залежить від Т-клітин - CD4-хелперів і пов'язана з активацією моноцитів/макрофагів.

Таким чином, результати проведеного дослідження свідчать про те, що введення ембріональних прогеніторних клітин при експериментальному артриті Пірсона запобігає розвитку порушень екскреторної та іонорегулюючої функції нирок, що обумовлено зменшенням ступеню ушкодження нирок за участю протеолізу, пероксидного окислення ліпідів та дозволяють вважати цей засіб перспективним методом профілактики та лукування вторинних пошкоджень нирок при артриті та інших імунoзапальних процесах.

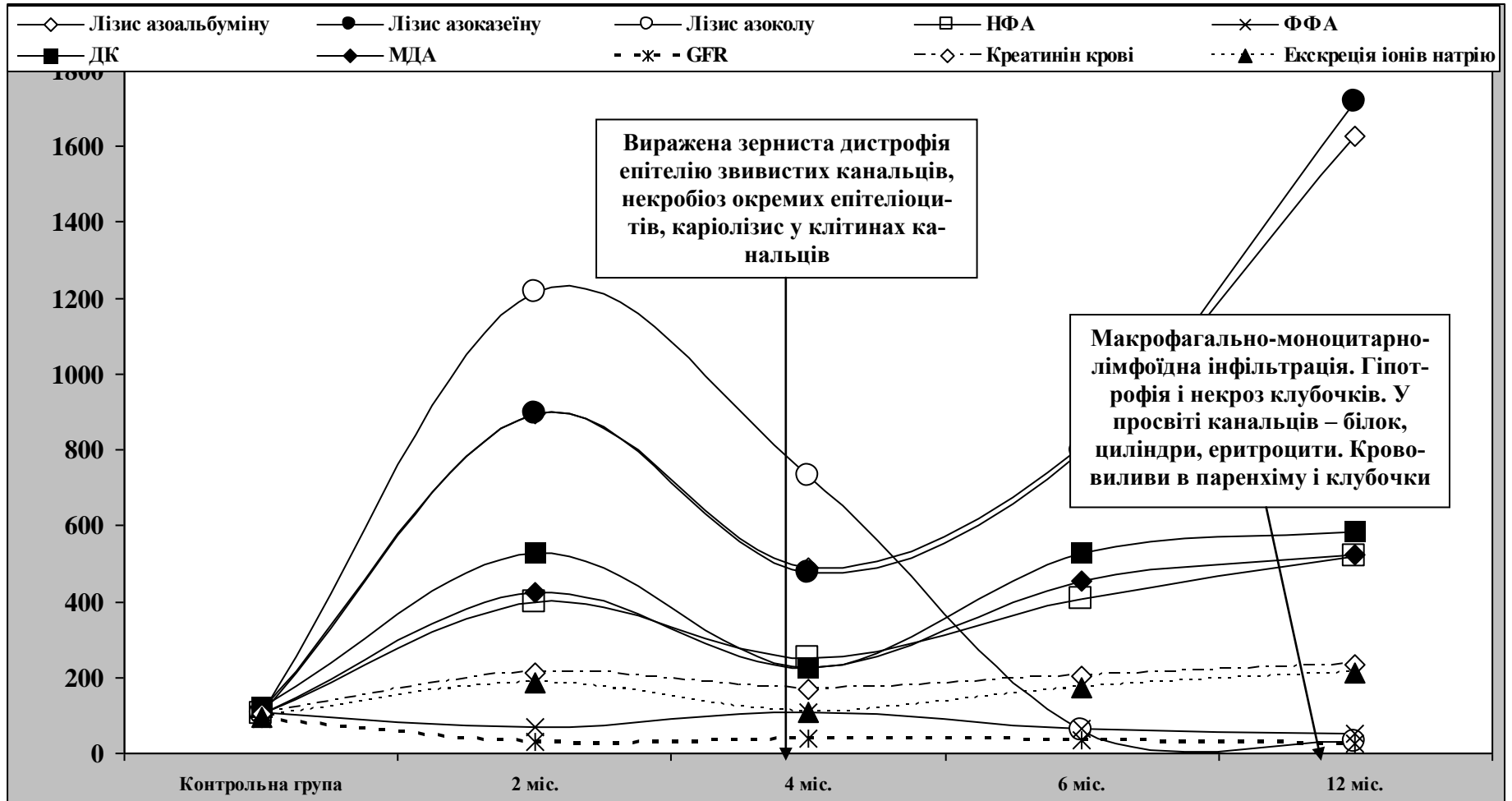


Рис. 1. Функціональні, морфологічні і біохімічні зміни в нирках у динаміці артриту Пірсона. Псевдоліковані щури. *Примітки:* GFR – швидкість клубочкової фільтрації, НФА – неферментативна фібринолітична активність, ФФА – ферментативна фібринолітична активність, ДК – дієнові кон'югати, МДА – малоновий діальдегід. Дані наведені у відсотках від відповідних показників у інтактних щурів.

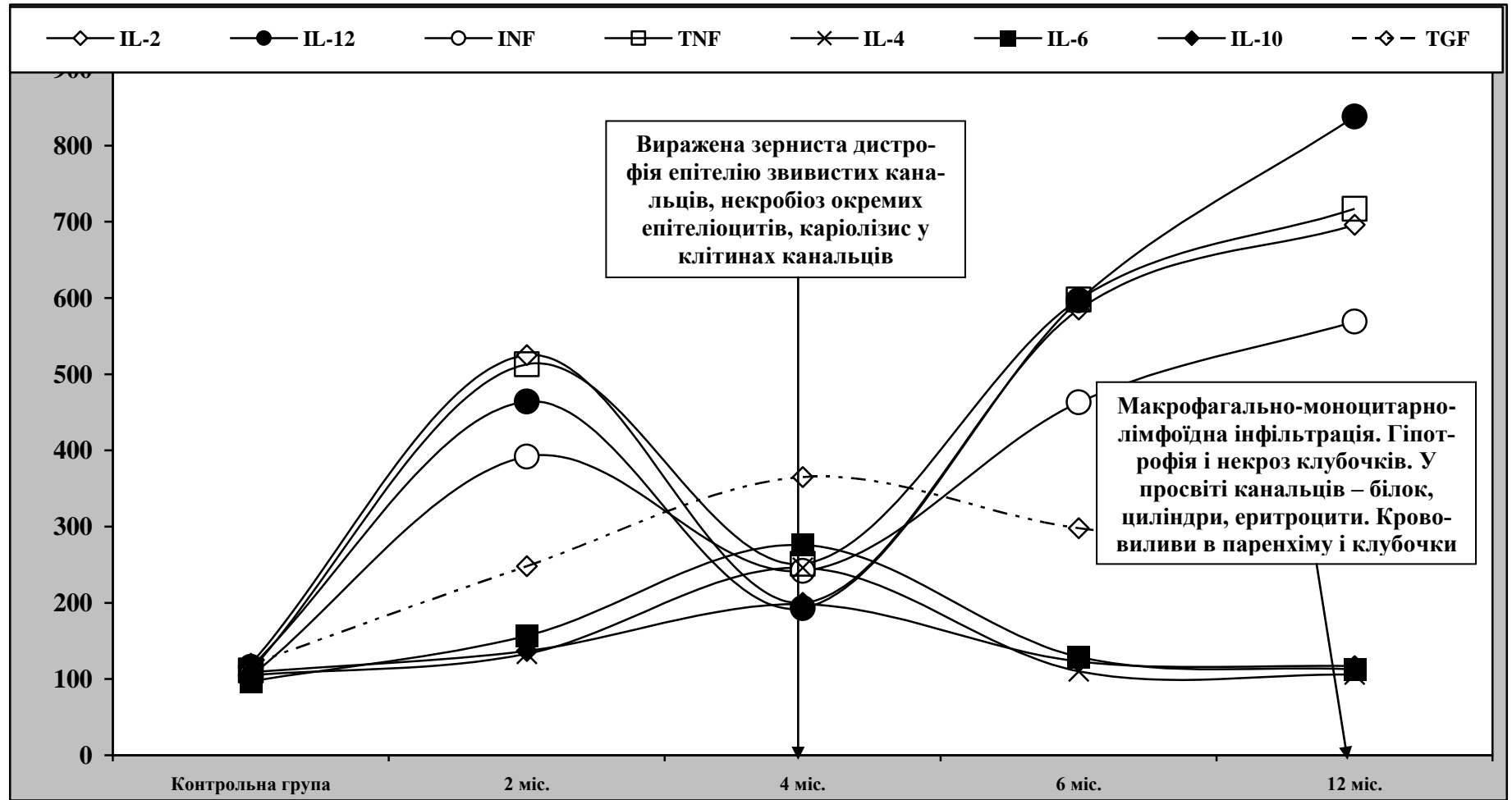


Рис. 2. Динаміка змін вмісту цитокінів у кортикальній тканині нирок псевдолікованих щурів з артритом Пірсона. *Примітка:* дані наведені у відсотках від відповідних показників у інтактних щурів.

ВИСНОВКИ

У дисертації представлені теоретичне узагальнення і нове рішення наукової задачі – обґрунтування ефективності трансплантації ембріональних прогеніторних клітин при експериментальному ад'ювантному артриті на основі з'ясування впливу ембріональних прогеніторних клітин на основні патогенетичні механізми ураження нирок.

1. Введення щурам повного ад'юванта Фрейнда а апоневроз правої задньої кінцівки викликає розвиток функціонально-біохімічних ознак uszkodження нирок, що виявляються через 2 місяці, дещо зменшуються через 4 та досягають максимального розвитку на 12 місяць розвитку експериментального артрити Пірсона.

2. У щурів з експериментальним артритом в нирках пошкоджуються клубочки (гіпотрофія та некроз), що обумовлює зменшення швидкості клубочкової фільтрації одночасно із канальцями (зерниста дистрофія з некробіозом епітеліоцитів і лізосом ядер), в яких зменшується реабсорбція води та натрію. Зростання протеїнурії (загальної та стандартизованої) підтверджує пошкодження клубочків і канальців.

3. Пошкодження нирок призводить до порушення екскреторної функції з розвитком ретенційної азотемії та здатності регулювати іонний гомеостаз, що виявляється у гіпонатріємії та гіпокаліємії.

4. Важливими механізмами uszkodження нирок при експериментальному артриті є активація протеолізу низько- та високомолекулярних білків та неферментативного фібринолізу в тканині нирок через 2 і особливо 6, 12 місяців розвитку захворювання.

5. У патогенезі захворювання нирок приймають участь процеси перекисного окислення ліпідів, про що свідчить збільшення вмісту дієнових кон'югатів та малонового діальдегіду, максимально через 12 місяців спостереження.

6. У механізмах імунного пошкодження нирок важливу роль має збільшення у нирках прозапальних цитокінів (інтерлейкінів 2, 12, інтерферона γ та фактора некрозу α) і їх дисбаланс з протизапальними (інтерлейкіни 4, 6, 10 та фактор трансформуючого росту).

7. Введення щурам з експериментальним артритом Пірсона ембріональних прогеніторних клітин нормалізує функціональний стан нирок із відновленням швидкості клубочкової фільтрації та канальцевого транспорту води і натрію, нормалізацією екскреторної та іонорегулюючої функції.

8. Ембріональні прогеніторні клітини у щурів з експериментальним артритом в нирках нормалізують протеоліз низько- і високомолекулярних білків, колагеноліз, фібриноліз та пероксидне окислення ліпідів. Одночасно зменшується вміст вивчених прозапальних цитокінів та їх дисбаланс з протизапальними, відновлюється гістологічна структура нирок.

9. Результати дослідження є експериментальним патогенетичним обґрунтуванням використання ембріональних прогеніторних клітин у терапії гломерулонефриту при експериментальному артриті Пірсона.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Кухарчук О. Л. Ембріональні плюрипотентні прогеніторні клітини, молекули МНС, апоптоз та імунологічна толерантність / О. Л. Кухарчук, В. В. Радченко, В. М. Сірман // Трансплантологія. – 2003. – Т. 4, № 1. – С. 221–223. (Здобувач провів дослідження, аналіз і узагальнення результатів, підготував матеріали до публікації).

2. Кухарчук О.Л. Вплив алотрансплантації ембріональних плюрипотентних прогеніторних клітин на інтенсивність ліпопероксидації та протеолізу в суглобах щурів з ад'ювантним артритом Пірсона / О. Л. Кухарчук, В. В. Радченко, В. М. Сірман // Укр. ревматол. журн. – 2003. – №2(12). – С. 45–49. (Здобувач провів дослідження, аналіз і узагальнення результатів, підготував матеріали до публікації).

3. Сірман В. М. Вплив алотрансплантації ембріональних плюрипотентних прогеніторних клітин на іонорегулювальну функцію нирок у щурів з ад'ювантним артритом Пірсона / В. М. Сірман, О. Л. Кухарчук // Вісн. наук. досл. – 2003. – № 4. – С. 90–93. (Здобувач провів дослідження, аналіз і узагальнення результатів, підготував матеріали до публікації).

4. Сірман В. М. Характеристика змін функціонального стану нирок у динаміці експериментального ад'ювантного артриту Пірсона / В. М. Сірман, О. Л. Кухарчук // Бук. мед. вісник. – 2004. – Т. 8, № 4. – С. 109–115. (Здобувач провів дослідження, аналіз і узагальнення результатів, підготував матеріали до публікації).

5. Сірман В. М. Вплив алотрансплантації ембріональних плюрипотентних прогеніторних клітин на інтенсивність фібринолізу в суглобах щурів з ад'ювантним артритом Пірсона / В. М. Сірман, О. Л. Кухарчук // Медицина сьогодні и завтра. – 2004. – № 1. – С. 72–78. (Здобувач провів дослідження, аналіз і узагальнення результатів, підготував матеріали до публікації).

6. Кухарчук О. Л. Вплив тканинної терапії на нестимульовану генерацію IL-4, IL-6, IL10, IL2, INF- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-12, IL-1RA, Rantes лімфоцитами щурів з ад'ювантним артритом Пірсона / О.Л. Кухарчук, В. В. Радченко, В. М. Сірман // Клін. та експерим. патологія. – 2004. – Т. III, № 2 (ч. 2). – С. 371–372. (Здобувач провів дослідження, аналіз і узагальнення результатів, підготував матеріали до публікації).

7. Кухарчук А. Л. Регенеративная медицина: направления, достижения, проблемы и перспективы развития. Часть I: Принципы и методы / А. Л. Кухарчук, В. В. Радченко, В. М. Сирман // Укр. мед. часопис. – 2004. – № 2 (40). – С. 70–79. (Здобувач провів аналіз літературних джерел, підготував матеріал до публікації).

8. Кухарчук А. Л. Регенеративная медицина: направления, достижения, проблемы и перс-

пективы развития. Часть II: Стволовые пространства / А. Л. Кухарчук, В. В. Радченко, В. М. Сирман // Укр. мед. часопис. – 2004. – № 3(41). – С. 99–107. (Здобувач провів аналіз літературних джерел, підготував матеріал до публікації).

9. Пат. 72310 Україна, МПК⁷ А 12 К 38/18, G 12 N 5/06. Спосіб переінсталяції системи контролю антигенного гомеостазу організму ссавця за Кухарчуком-Радченком-Сірманом / Кухарчук О. Л., Радченко В. В., Сірман В. М. ; заявник і патентовласник ТОВ “КРС-медичні технології”. – № 20022097178 ; заявл. 03.09.02 ; опубл. 15.02.05, Бюл. № 2. (Здобувачу належить участь у проведенні патентного пошуку, розробці способу, аналізі результатів дослідження, оформленні заявки).

10. Пат. 72584 Україна, МПК⁷ А 61 К 38/18, G 12 N 5/06. Спосіб попередження відторгнення ало- та ксенотрансплантатів шкіри / Сірман В. М., Кухарчук О. Л., Радченко В. В. ; заявник і патентовласник ТОВ “КРС-медичні технології”. – № 20022097352 ; заявл. 10.09.02 ; опубл. 15.03.05, Бюл. № 3. (Здобувачу належить участь у проведенні патентного пошуку, розробці способу, аналізі результатів дослідження, оформленні заявки).

11. Пат. 72796 Україна, МПК⁷ С 12 N 5/06. Спосіб отримання життєздатних ембріональних плюрипотентних клітин за допомогою колагенази / Сірман В. М., Кухарчук О. Л., Радченко В. В. ; заявник і патентовласник ТОВ “КРС-медичні технології”. – № 20022097445 ; заявл. 13.09.02 ; опубл. 15.04.05, Бюл. № 4. (Здобувачу належить участь у проведенні патентного пошуку, розробці способу, аналізі результатів дослідження, оформленні заявки).

12. Кухарчук А. Л. Эмбриональные плюрипотентные прогениторные клетки, иммунологическая толерантность, аутоиммунные заболевания и старение организма / А. Л. Кухарчук, В. В. Радченко, В. М. Сирман // Трансплантологія. – 2003. – Т. 4, № 1. – С. 225–228. (Здобувач провів дослідження, аналіз і узагальнення результатів, підготував матеріали до публікації).

13. Сірман В. М. Вплив алотрансплантації ембріональних плюрипотентних прогеніторних клітин на пероксидне окислення ліпідів та інтенсивність тканинного фібринолізу в суглобах щурів з ад’ювантним артритом Пірсона / В. М. Сірман // Медицина третього тисячоліття : Перший Міжн. Конгрес-круз, 10-14 жовтня 2003 р. – Одеса-К., 2003. – С. 190–192.

14. Кухарчук О. Л. Переінсталяція системи контролю антигенного гомеостазу організму з точки зору імунологічної теорії старіння / О. Л. Кухарчук, В. В. Радченко, В. М. Сірман // Україна наукова’ 2003 : наук.-практ. конф., 16-20 червня 2003 р. : матеріали конф. – Дніпропетровськ-Харків, 2003. – Т. 13 (Біологія). – С. 41–43 (Здобувач аналіз і узагальнення літературних даних та результатів дослідження, підготував матеріали до публікації).

15. Kukharchuk A. Influence of Pluripotenr Progenetion Embrionik Cells on the Transplent Against the Host Reaction by Bone Marrow Xenotransplantation in the Experiment. Cells, Embrio, Nobe Marrov, Transplantation, Proteolisis / O. Kukharchuk, V. Radchenko, V. Sirman // Xenotransplantation :

Includes Abstracts of the VII Congr. of the IXA, Glasgow, UK, 30 sept.-4 oktob. 2003. – 2003. – Vol. 10, № 5. – P. 525. (Здобувач провів дослідження, аналіз і узагальнення результатів, підготував матеріали до публікації).

16. Кухарчук А. Л. Старение, стволовые пространства и иммунная система / А. Л. Кухарчук, В. В. Радченко, В. М. Сирман // Intern. J. on Immunorehabil. / Физиология иммунной системы : I Всерос. конф., 11-14 октября 2003 г. – 2003. – Т. 5, № 2. – С. 9. (Здобувач провів дослідження, аналіз і узагальнення результатів, підготував матеріали до публікації).

17. Кухарчук О. Л. Вплив алотрансплантації ембріональних плюрипотентних прогеніторних клітин на інтенсивність тканинного фібринолізу у внутрішніх органах щурів з ад'ювантним артритом Пірсона / О. Л. Кухарчук, В. М. Сирман // Динаміка наукових досліджень '2003 : II Міжнар. наук.-практ. конф., 20-27 жовтня 2003 р. : матеріали конф. – Дніпропетровськ-Луганськ-Чернівці. – 2003. – Т. 15 (Медицина). – С. 63–65. (Здобувач провів дослідження, аналіз і узагальнення результатів, підготував матеріали до публікації).

18. Оптимизация методики получения суспензии плюрипотентных прогениторных эмбриональных клеток / Н. В. Винарская, А. Л. Кухарчук, В. В. Радченко, В. М. Сирман // Динаміка наукових досліджень '2004 : III Міжнар. наук.-практ. конф., 21-30 червня 2004 р. : матеріали конф. – Дніпропетровськ : Наука і освіта, 2004. – Т. 58 (Клінічна медицина). – С. 5–7. (Здобувач провів дослідження, аналіз і узагальнення результатів).

19. Kukharchuk O. L. Intravenous administration of embryonic pluripotent progenitor cells, prior incubated with cells of transplanted organs, facilitates allografts engraftment in rats / O. L. Kukharchuk, V. V. Radchenko, V. M. Sirman // The 3RD Intern. Congr. on Immunosupres, December, 8-11, 2004 : scientific program abstracts. – San Diego, California, 2005. – P. 187 (Здобувач провів дослідження, підготував матеріали до публікації).

20. Kukharchuk O. Embryonic pluripotent progenitor cells (eppc) induce the central immunological tolerance in rats and mice / O. Kukharchuk, V. Radchenko, V. Sirman // The Intern. J. of Artificial Organs. – 2005. – № 4. – P. 316. (Здобувач провів дослідження, підготував матеріали до публікації).

21. Кухарчук О. Л. Вплив тканинної терапії за Філатовим на локальне імунне запалення у щурів з ревматоїдним артритом / О. Л. Кухарчук, В. М. Сирман, А. О. Кухарчук // Бюлетень VIII читань ім. В. В. Підвисоцького, 28-29 травня 2009 р. : матеріали конф. – Одеса, 2009. – С. 227. (Здобувач провів дослідження, аналіз і узагальнення результатів, підготував матеріали до публікації).

АНОТАЦІЯ

Сирман В.М. Вплив прогеніторних клітин ембріона щура на патофізіологічні механізми ураження нирок при ад'ювантному артриті Пірсона (експериментальне дослідження). – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія. – Державний вищий навчальний заклад "Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського" МОЗ України, Тернопіль, 2010.

Дисертація присвячена теоретичному узагальненню та обґрунтуванню ефективності трансплантації ембріональних прогеніторних клітин на основі з'ясування їх впливу на основні патологічні механізми ураження нирок при експериментальному артриті. Показано, що моделювання у щурів експериментального артриту Пірсона супроводжується комплексним прогресуючим порушенням функції нирок. Через 2 місяці від початку розвитку артриту виявляються чіткі ознаки порушення екскреторної (зменшення діурезу, зростання протеїнурії з появою гіперкреатинемії) та іонорегулюючої функції нирок (збільшення екскреції натрію з розвитком гіпонатріємії). Порушення функції нирок зумовлено збільшенням протизапальних цитокінів, активацією пероксидного окиснення ліпідів та тканинного протеолізу. Виявлені функціонально-біохімічні порушення нирок прогресують та досягають максимуму через 12 місяців спостереження і поєднуються з морфологічними ознаками пошкодження. Введення щурам ембріональних прогеніторних клітин у кількості $3,5 \times 10^7$ /мл на 0,1 кг маси тіла внутрішньовенно через 3 тижні моделювання артриту супроводжувалось виразною протективною дією щодо нирок. З 2 по 12 місяці експерименту значно відновлюється функціональний стан нирок.

Результати роботи є патогенетичним обґрунтуванням використання ембріональних прогеніторних клітин для профілактики та лікування порушень нирок при артритах.

Ключові слова: експериментальний артрит Пірсона, ембріональні прогеніторні клітини, екскреторна та іонорегулююча функції нирок, протеоліз, перекисне окислення ліпідів, цитокіни.

АННОТАЦІЯ

Сирман В.М. Влияние прогениторных клеток эмбриона крысы на патофизиологические механизмы поражения почек при адьювантном артрите Пирсона (экспериментальное исследование). – Рукопись.

Диссертация на соискание научной степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.04 – патологическая физиология. – Государственное высшее учебное заведение "Тернопольский государственный медицинский университет имени И.Я. Горбачевского" МЗ Украины, Тернополь, 2010.

Диссертация посвящена теоретическому обобщению и обоснованию эффективности трансплантации эмбриональных прогениторных клеток при экспериментальном адьювантном артрите на основании выяснения их влияния на основные патогенетические механизмы поражения почек.

Для решения поставленных задач проведены серии экспериментов *in vivo*. В работе использованы 189 самцов белых крыс со средней массой тела $0,1930,018 \pm$ кг. Экспериментальный артрит

моделирован введением полного адьюванта Фрейнда в апоневроз правой задней конечности крысы, контрольным животным вводили вазелиновое масло. Через 3 недели в яремную вену вводили суспензию прогениторных клеток в дозе $3,5 \cdot 10^7$ /мл на 0,1 кг массы тела, которые выделяли 11-13 стадиях развития эмбриона по Астаурову по разработанной нами методике, контрольным крысам вводили раствор Хенкса.

Показано, что моделирование у крыс экспериментального артрита Пирсона сопровождается комплексным прогрессирующим нарушением функции и одномоментными морфологическими изменениями почек. Уже через 2 месяца от начала развития артрита выявляются четкие признаки нарушения экскреторной (уменьшение диуреза, увеличение протеинурии с развитием гиперкреатинемии) и ионорегулирующей функции (повышение экскреции натрия с появлением гипонатриемии и гипокалиемии). Выявленные изменения обусловлены нарушениями основных почечных процессов: клубочковой фильтрации и канальцевой реабсорбции воды и натрия. Через 4 месяца наблюдения регистрируется некоторое улучшение состояния почечных процессов и функций, однако через 6 и особенно 12 месяцев степень нарушения прогрессивно возрастает. В возникновении нарушений почечных функций задействованы: увеличение провоспалительных цитокинов, активация перекисного окисления липидов и тканевого протеолиза в ткани почек. Биохимические нарушения прогрессируют параллельно функциональным, достигая максимума через 12 месяцев наблюдения в сочетании с морфологическими признаками повреждения почек.

Введение крысам эмбриональных прогениторных клеток сопровождается выраженными нефропротективными эффектами. Установлено, что с 2 до 12 месяцев наблюдения в значительной степени восстанавливается функциональное состояние почек с уменьшением степени нарушения экскреторной и ионорегулирующей функции почек, нормализацией гомеостаза, снижением активности протеолиза и перекисного окисления липидов в ткани почек, что коррелировало с уменьшением степени морфологических нарушений (клубочков и канальцев). Одновременно установлено уменьшение концентрации провоспалительных и увеличение противовоспалительных цитокинов с нормализацией их соотношения в почечной ткани.

Результаты работы можно рассматривать как патогенетическое обоснование использования эмбриональных прогениторных клеток для профилактики и лечения нарушений почек при артритах.

Ключевые слова: экспериментальный артрит Пирсона, эмбриональные прогениторные клетки, экскреторная и ионорегулирующая функции почек, протеолиз, перекисное окисление липидов, цитокины.

SUMMARY

Syrman V.M. Influence of an embryo's progenitor cells on pathophysiologic mechanisms of

kidneys at Peerson's adjuvant arthritis (experimental research). – The manuscript.

The thesis for the competition of the scientific degree of candidate of medicine, specialty 14.03.04 – pathological physiology. – The State Higher Educational Institution “I.Y. Horbachevsky Ternopil State Medical University” of Ministry of Public Health of Ukraine, Ternopil, 2010.

The thesis is devoted to the theoretical generalization and substantiation of an embryo's progenitor cells transplantation on the basis of pathological mechanisms of kidneys damage under experimental arthritis. It has been shown that modeling at rats Peerson's experimental arthritis is followed by complex progressing damage of renal function. In two months from the beginning of arthritis development they could find clear signs of excretory (decrease of diuresis, increase of proteinuria with occurrence of hypercreatinemia) and ion-regulating renal function (increase of natrium excretion and further development of hyponatriemeia). For the renal function damages are responsible: increase of anti-inflammatory cytokines, activation of lipid peroxidation and proteolysis of tissues. Biochemical and function damages revealed progress and achieve their maximum in 12 months of observation and combine with morphological signs of a damage. Intravenous infusion to the rats of embryonal progenitor cells at the amount of $3,5 \times 10^7$ /ml per a kg of a body mass in three weeks of arthritis modeling was followed by a promoted protective action as to the part of kidneys. From 2 to 12 months of experiment are largely restored the functional state of kidneys.

The results of the work presented are pathogenic substantiation to the use of embryonal progenitor cells for prophylaxis and treatment of kidneys damages at arthritis.

Key words: Peerson's experimental arthritis, embryonal progenitor cell, excretory and ion-regulating function of kidney, proteolysis, lipid peroxidation, cytokin.