ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД
“ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені І. Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО” МОЗ УКРАЇНИ

САДЛЯК ОКСАНА ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 616-056.3-039.54-036.12: 616.155 32]-085.274-

ЛІМФОЦИТОПОСЕРЕДКОВАНІ МЕХАНІЗМИ ЗА УМОВ ХРОНІЧНОЇ ГІПЕРІМУНОКОМПЛЕКСЕМІЇ ТА ВПЛИВ НА НИХ КОРВІТИНУ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

14.03.04 – патологічна фізіологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Тернопіль – 2008

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у Львівському національному медичному університеті імені Данила Галицького МОЗ України

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор **Чоп'як Валентина Володимирівна,** Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького МОЗ України, завідувач кафедри клінічної імунології та алергології

Офіційні опоненти:

доктор медичних наук, професор **Мисула Ігор Романович,** Державний Вищий навчальний заклад "Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського" МОЗ України завідувач кафедри медичної реабілітації та спортивної медицини

доктор медичних наук **Нещерет Олександр Павлович,** Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка АМН України, провідний науковий співробітник лабораторії епідеміології і цукрового діабету

Захист відбудеться 26 травня 2008 р. о 14 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 ознайомитись 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 23 квітня 2008 р.

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради
доктор медичних наук, професор Я.Я. Боднар

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. У структурі алергічних захворювань імунокомплексне ушкодження тканин розцінюється як провідна патогенетична ланка розвитку багатьох патологій (Langford C.A., 2003; Fernandes N., 2004). Відомо, що гіперімунокомплексемія у клінічній практиці супроводжує ряд інфекційних, запальних, онкологічних та системних захворювань, що є підґрунтям для формування імунодефіцитних та автоімунних синдромів (Ройт А., 2000*;* Haruta K. et al., 2001; Sullivan K.E., 2003; Амосова К.М. 2007). Патогенетичні механізми розвитку цих захворювань, крім ушкодження судин та внутрішніх органів, також супроводжуються продукцією структурно-неповноцінних антитіл, послабленням функцій системи фагоцитів та зниженою активністю дезорієнтованих імунними комплексами лімфоцитів (Чоп'як В.В., 1998; Лєбєдєв К.А., 2005). Проведені наукові дослідження останнього часу засвідчують, що процеси утворення та відкладання імунних комплексів, а відтак і формування гіперімунокомплексного захворювання, залежать від рівня оксиду азоту (NO) в організмі та індукції активних форм кисню (Forstermann U., 2006). Патогенетичну основу токсичної дії оксиду азоту, за цих умов, складає його спряжена реакція із супероксид-аніон радикалом, результатом якої є утворення пероксинітриту, а посилення некомпенсованої генерації вільних радикалів призводить до руйнування клітинних компонентів, розвитку метаболічно-імунної дизадаптації та формування тяжких системних патологій (Коцюруба А.В., 2000; Lum H., Roebuck K.A., 2001; Мисула І.Р., 2007). Тому імунорегуляторна роль оксиду азоту в імунокомплексних процесах та її вплив на міжклітинну кооперацію ефекторних і мішеневих клітин, за цих умов, стала об'єктом більш ґрунтовного вивчення участі NO-залежних механізмів у розвитку лімфоцитарно-ендотеліальних взаємодій за умов хронічної гіперімунокомплексемії (Tesfamariam B., DeFelice A.F., 2007). Проте слід відзначити, що оксид азоту, субстратом для якого є амінокислота – L-аргінін, не обмежений лише синтазним шляхом метаболізму. Обмін L-аргініну здійснюється, як мінімум, двома шляхами: окисним – (NO-синтазним) і неокисним (аргіназним), що значно розширює розуміння ролі цієї амінокислоти в організмі (Сагач В.Ф., 2001; Горпинченко І.І., 2002; Чалісова Н.І., 2007). Зміни в метаболізмі L-аргініну, особливо при інгібуванні його NO-синтазного шляху, можуть зумовити суттєві порушення у генетично обумовлених функціях імунокомпетентних та ендотеліальних клітин (Zhang C. et al., 2001; Граник В.В., 2003; Kitamoto S. et al., 2005; Нещерет О.П., 2006).

Отже, на сьогоднішній день простої і однозначної картини впливу метаболізму L-аргініну на імунну систему немає. Тому розуміння та оцінка ролі цих механізмів взаємозв`язку за умов хронічної гіперімунокомплексемії матиме важливе значення у вивченні пошкодження не тільки в судинній стінці, але і захворювань, пов'язаних з порушенням імунітету, що в подальшому сприятиме пошуку вирішення проблем патогенетичної імунокорекції та профілактики

імунокомплексних захворювань. Експериментальні та клінічні дослідження останніх років спонукають до активного пошуку і вивчення нових середників, які, володіючи властивостями антиоксидантів та мембранопротекторів, здатні проявляти і селективну дію на популяції та субпопуляції імунокомпетентних клітин, що є особливо актуальним за умов даної патології. У плані корекції імунокомплексних захворювань перспективним є застосування біофлавоноїдів (Kanashiro A. Et al. 2004). Особливе зацікавлення науковців викликає природний флавоноїд – кверцетин, а саме – його водорозчинна форма – корвітин. Біологічні ефекти цього препарату зумовлені його здатністю до блокування вільнорадикальної ліпопероксидації клітинних мембран, впливом на експресію мРНК індуцибельної NO-синтази, збереженням рівня оксиду азоту та модулюючою дією на його активні метаболіти (Ковалев В.Б., 1999; Pietta P.G. 2000; Chen Y.C., 2001; Wadsworth T., 2001 Мойбенко А.А., 2003; Jeong Y.M. et al., 2005). Таким чином, з'ясування особливостей NO-синтазного та аргіназного шляхів метаболізму L-аргініну у лімфоцитах і ендотеліоцитах, за умов застосування корвітину, дозволить краще зрозуміти основні клініко-патогенетичні закономірності розвитку імунокомплексного процесу, можливості його попередження та адекватної фармакологічної корекції.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є фрагментом планової наукової міжкафедральної теми "Імуно-нейтрофільно-ендотеліально-епітеліально залежні механізми в розвитку гіперімунокомплексного синдрому в експерименті і клініці", яка виконувалась на кафедрах патологічної фізіології, клінічної імунології та алергології, ендоскопії і малоінвазивної хірургії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (№ державної реєстрації 0101U00933). У рамках даної тематики автором проведено дослідженя стосовно експериментального моделювання хронічної гіперімунокомплексемії та її корекції корвітином. Тема дисертації затверджена Проблемною комісією "Патологічна фізіологія та імунологія" 26 січня 2006 року (протокол № 50).

Мета дослідження. З'ясування особливостей NO синтазного та аргіназного шляхів метаболізму L-аргініну у лімфоцитах та ендотеліоцитах за умов хронічної гіперімунокомплексемії та вивчення впливу на ці процеси корвітину.

Завдання дослідження:

1. Дослідити особливості NO-синтазного і аргіназного шляхів метаболізму L-аргініну в лімфоцитах і ендотеліоцитах при їх сумісній інкубації in vitro, в нормі та за умов хронічної гіперімунокомплексемії.
2. Дослідити NO-синтазний та аргіназний шляхи метаболізму L-аргініну в лімфоцитах і ендотеліоцитах в нормі та при хронічній гіперімунокомплексемії за умов in vivo.
3. Дослідити вміст стабільних метаболітів оксиду азоту – нітрит-аніону, нітрат-аніону і нітрозоглутатіону у лімфоцитах та ендотеліоцитах в нормі та при хронічній

гіперімунокомплексемії.

4. Вивчити електронномікроскопічні зміни ультраструктури лімфоцитів і ендотеліоцитів в нормі та при хронічній гіперімунокомплексемії.
5. Оцінити вплив корвітину на окисний та неокисний шляхи метаболізму L-аргініну у лімфоцитах і ендотеліоцитах в нормі та при хронічній гіперімунокомплексемії (в умовах in vitro та in vivo).
6. З'ясувати можливість корекції виявлених морфологічних порушень корвітином.

Об'єкт дослідження – хронічний гіперімунокомплексний процес, відтворений на білих лабораторних щурах-самцях із використанням моделі хронічної сироваткової хвороби.

Предмет дослідження – показники метаболізму системи L-аргініну в лімфоцитах та ендотеліоцитах інтактних тварин, тварин з хронічним гіперімунокомплексним процесом та за умов введення цим тваринам корвітину, а також ультраструктура лімфоцитів і ендотеліоцитів щурів до та після корекції корвітином.

Методи дослідження: з метою вивчення особливостей функціонально-структурних змін лімфоцитів та ендотеліоцитів за умов хронічної гіперімунокомплексної патології в експерименті були застосовані такі методи: виділення клітин (виділення лімфоцитів – на градієнті щільності фекол-верографіну, виділення ендотеліальних клітин – метод ферментативного диспергування); імунологічні (визначення вмісту ЦІК методом преципітації в ПЕГ, визначення активності системи комлементу); біохімічні (визначення ферментативної активності NO-синтаз – iNOS та cNOS, рівня стабільних метаболітів оксиду азоту – NO_2^- і NO_3^-, вмісту нітрозоглутатіону – GSNO та активності аргінази і сечовини); морфологічні (дослідження ультратонкої структури лімфоцитів та ендотеліоцитів методом електронної мікроскопії); математичні (статистичне опрацювання одержаних результатів).

Наукова новизна одержаних результатів: Уперше встановлено порушення процесів синтезу оксиду азоту, зокрема його NO-синтазного шляху метаболізму в лімфоцитах та ендотеліоцитах за умов хронічної гіперімунокомплексемії. Уперше показано, що розвиток хронічної гіперімунокомплексемії супроводжується активацією аргіназного шляху метаболізму NO. Виявлено, що за умов хронічної гіперімунокомплексної патології, корвітин виступає як інгібітор неокисного метаболізму L-аргініну за аргіназним шляхом, внаслідок чого нормалізується окисний метаболізм L-аргініну за NO-синтазним шляхом. Встановлено коригуючий ефект корвітину на морфологічний стан лімфоцитів та ендотеліальних клітин при хронічній гіперімунокомплексемії.

Практичне значення одержаних результатів. Результати проведених досліджень розкривають раніше невідомі механізми патофізіологічних змін у лімфоцитах і ендотеліоцитах за умов хронічної гіперімунокомплексемії та доповнюють відомості про патогенез імунокомплексної

патології. Отримані дані дозволяють оцінити участь в цих процесах двох шляхів метаболізму L-аргініну та обгрунтовують доцільність застосування корвітину, як імуномодулятора та ендотеліопротектора в терапії імунокомплексних захворювань.

Теоретичні та практичні узагальнення роботи викладені у деклараційному патенті на корисну модель (№13287) та актах впровадження, які використовуються в навчальному процесі кафедр патологічної фізіології, патологічної анатомії і фармакології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, кафедрі загальної і клінічної патофізіології Одеського державного медичного університету, кафедрах патологічної фізіології, патологічної анатомії, фармакології з клінічними фармакологією та фармакотерапією, внутрішньої медицини з клінічною імунологією та алергологією Тернопільського державного медичного університету імені І.Я. Горбачевського, на кафедрах патофізіології та ендокринології, клінічної імунології і алергології Донецького державного медичного університету імені О.М. Горького, кафедрі клінічної імунології та алергології Київського національного медичного університету імені О.О. Бого-мольця.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійним науковим дослідженням. На основі проведеного патентно-інформаційного пошуку та літературного огляду автором, спільно з науковим керівником, сформульовано мету і завдання дослідження, вибрано і відпрацьовано адекватні моделі і методики. Під час виконання експериментальної частини здобувачем самостійно проведено моделювання хронічної гіперімунокомплексемії та її корекція, опанована і проведена методика виділення ендотеліальних клітин. Під час виконання експериментальної частини здобувач брала участь у проведенні імунологічних методів дослідження та підготовці зразків для електронної мікроскопії. Біохімічні дослідження – визначення активності ферментів NO-синтаз, вмісту нітрит – і нітрат аніонів, нітрозоглутатіону та рівнів аргінази і сечовини виконано в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна. За сприяння у виконанні біохімічних досліджень автором висловлюється щира подяка ст.н.сп., к.б.н. – Коцюрубі А.В. Електронно-мікроскопічні дослідження проводились у лабораторії електронної мікроскопії ЛНМУ ім Данила Галицького, за консультативної допомоги к.б.н – В.І. Ковалишина, за що йому, автором, висловлюється щира подяка. Автором самостійно проведено статистичну обробку результатів дослідження, аналіз і узагальнення отриманих даних, написання всіх розділів дисертації та підготовку публікацій до друку. Висновки і практичні рекомендації сформульовано разом з науковим керівником. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, а також актах впровадження, що стосуються науково-практичної новизни, викладено дані, отримані автором у процесі виконання дисертаційної роботи.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації оприлюднені на науково-практичних конференціях: ”Стан і перспективи розвитку медичної генетики, алергології та клінічної імунології“ (Львів-Трускавець, 2005), ”Сучасні методи діагностики та лікування алергіч-

них захворювань“ (Київ, 2006), ”IV чтение им. В.В. Подвысоцкого“ (Одеса, 2007), ”Здобутки клінічної і експериментальної медицини“ (Тернопіль, 2007), “Роль месенжерних систем у патогенезі патологічних процесів різної етіології“ (Тернопіль 2007), а також на Міжнародній науковій конференції “Імунодіагностика та імунотерапія ревматологічних хворих” (Львів, 2006) та ІІІ міжнародній науковій конференції ”Гомеостаз: фізіологія, патологія, фармакологія і клініка“ (Одеса, 2007).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 15 робіт, з яких 8 – у фахових наукових журналах, 6 тез доповідей у матеріалах наукових з’їздів, конференцій та конгресів, 1 деклараційний патент на корисну модель.

Структура дисертації. Дисертація викладена на 176 сторінках друкованого тексту і складається із вступу, 6 розділів, висновків, списку використаних джерел (всього 268) і додатків. Текст дисертації ілюстрований 26 рисунками та 19 таблицями. Бібліографічний опис джерел літератури та додатки викладені на 40 сторінках.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи дослідження. Експериментальні дослідження виконані на статевозрілих білих щурах-самцях масою 200-250 г., в осінньо-зимовий період. Експериментальні втручання та евтаназія тварин проводилась із дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних наукових досліджень (Страсбург, 1985), ухвали Першого національного конгресу з біоетики (Київ, 2000). Комісією з питань біоетики Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького (протокол № 15 від 12 грудня 2005 р.) порушень морально-етичних норм при виконанні науково-дослідної роботи не виявлено. У процесі дослідження використано 200 тварин, яких розподіляли на групи: перша – інтактні тварини, які отримували плацебо і служили контролем; друга – тварини із змодельованою і верифікованою лабораторними дослідженнями хронічною гіперімунокомплексемією; третя – інтактні тварини, які отримували корвітин; четверта – тварини із змодельованою і верифікованою лабораторними дослідженнями хронічною гіперімунокомплексемією, які отримували корвітин.

Хронічну гіперімунокомплексемію відтворювали за допомогою класичного методу за Cohrane C. і Kofler D. (1973) з посиланням на праці Williams R. (1980) та досліджень Чоп’як В.В. (1998). Для цього у хвостову вену кожні 7 днів упродовж 12 тижнів вводили бичачий сироватковий альбумін (НВФ “Simko Lpd”, Україна) із розрахунку 100 мг/кг. Розчин корвітину (виробництва ЗАТ НВЦ “Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод”, Україна) вводили внутрішньоочеревинно в дозі 40 мг/кг раз на добу впродовж 10 днів. Евтаназію тварин здійснювали шляхом декапітації.

Отримання клітин лімфоцитів проводили на подвійному градієнті щільності розчинів

фікол-урографіну: фікол (Ficoll-400 – “Pharmacia Fine Hemical”, Швеція) урографін (Urografin – “Shering”, Німеччина) із густинами, що відповідали (ρ_1 =1,095 г/см^3 та ρ_2 = 1,077 г/см^3) (Boyum A., 1987). Ендотеліальні клітини виділяли із черевної аорти щура методом ферментативного диспергування з використанням 0,1% розчину колагенази (“Fluka Chemic A.G.“, Німеччина) (Коваленко Т.М., 1999).

Інкубацію ізольованих лімфоцитів та ендотеліальних клітин проводили у середовищі 199 (РАМН Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов, Москва) з 20% вмістом телячої ембріональної сироватки (НВП “Сангва”, Україна) в 24 лункових пластикових планшетах (“Sigma“, США). Для запобігання змішуванню лімфоцитів та ендотеліоцитів клітини розділяли напівпроникними мембранами з діаметром пор 3μм (“Sigma“, США), виділені клітини вносились в лунку планшети у співвідношенні 1:1. Клітини інкубували в термостаті при 37^0 С в атмосфері із 5% CO_2 впродовж 1 год (Мойбенко О.О., Сагач В.Ф., 2000). Розчин корвітину, в дозі 1•10^{-4} г/л, в умовах in vitro вносили в лунку планшети. Дозу застосування корвітину визначали на підставі літературних даних (Мойбенко О.О., 2000; Караванская И.Л., 2002).

Розвиток і верифікацію хронічної гіперімунокомплексемії оцінювали у сироватці крові за рівнем циркулюючих імунних комплексів (ЦІК), визначення яких проводили за допомогою методу преципітації в поліетиленгліколі – 600, та загальною комплементарною активністю сироватки крові, яку визначали за методом 50% гемолізу еритроцитів (Осипов С. Г., Логинский В.Е., 1983).

Дослідження активності ферментів NO-синтаз (cNOS та iNOS) проводили калориметричним методом (Selter M., 1991). Вміст нітрит-аніонів визначали за допомогою методу Гріна в модифікації Коцюруби А.В. (Green L. S., 1982; Коцюруба А. В., 2000), нітрат аніонів методом (Bank N.R. 1993). Визначення вмісту нітрозоглутатіону (GSNO) проводили за методом (Gerdel D., 1996). Аргіназну активність визначали з допомогою спектрофотометрії (СФ-40) за методом (Gardanta C. L., 1982). Вміст сечовини в інкубаційній суміші та безбілкових зразках проб визначали калориметричним методом за допомогою добірки реактивів (BIO-LA-TEST, MOKOVINA, “Lachema”, Чехія) та реактивів фірми (“Філіст-Діагностика“, Україна).

Дослідження ультратонкої структури лімфоцитів та ендотеліальних клітин проводили методом трансмісійної електронної мікроскопії за допомогою електронного мікроскопа ПЕМ-100.

Статистичне опрацювання результатів дослідження проводили із застосуванням статистичного пакету прикладних програм Statistica 6.0 for Windovs.

Основні результати досліджень та їх обговорення.

Для реалізації поставленої мети, першим етапом нашої роботи було дослідження процесів NO-синтазної та аргіназної активності в ізольованих лімфоцитах та ендотеліальних клітинах при їх інкубації за умов норми і хронічної гіперімунокомплексемії.

Результати, отримані в умовах in vitro, встановили, що присутність в інкубаційному

середовищі ендотеліальних клітин за умов норми здатна незначно впливати на процеси синтезу оксиду азоту в лімфоцитах. Зменшення активності iNOS (P<0,05) компенсовано майже рівнозначним підвищенням активності cNOS (P<0,05). Сумарна активність NOS у лімфоцитах за умов їх інкубації з ендотеліоцитами має лише тенденцію до зростання. Зміни вмісту стабільних метаболітів NO та нітрозоглутатіону (GSNO) за цих умов були недостовірними. Паралельно з цим відзначено пониження активності аргінази в 1,4 раза (P<0,05) та зменшення вмісту сечовини у 2,9 раза (P<0,05). У ендотеліоцитах за умов їх інкубації з лімфоцитами спостерігається зростання активності iNOS і cNOS у 2,1 раза (P<0,001), проте дана активність ферментів не забезпечила достовірних змін у рівні нітрит - та нітрат - аніонів. У вмісті нітрозоглутатіону достовірних змін також не встановлено.

Отримані результати підтверджують той факт, що ендотеліальні клітини володіють сильною системою захисту від ушкоджувального впливу агресивних факторів, що і проявилося значним збільшенням потенціалу NOS (P<0,001). Стосовно активності аргінази, то в умовах сумісної інкубації клітин, в ендотеліоцитах виявлено зменшення її активності у 2,5 раза (P<0,05). Одночасно відзначено падіння рівня сечовини в клітинах ендотелію, проте воно було недостовірним.

Аналіз кооперативної взаємодії лімфоцитів та клітин ендотелію у тварин із змодельованою хронічною гіперімунокомплексемією виявив дещо інші особливості у процесах метаболізму оксиду азоту. Так, інкубація лімфоцитів в присутності ендотеліоцитів по відношенні до контролю показала істотне підвищення в 3,6 раза iNOS (P<0,001) та зменшення в 2,2 раза cNOS (P<0,001). Досить цікавим за цих умов є зниження вмісту NO_2^-- аніону у порівнянні з клітинами контролю (P<0,001), показник рівня NO_3^- – аніону є також понижений (P<0,001). Паралельно у досліджуваних тест-об’єктах зменшується і вміст GSNO (P<0,001). Показник сумарної активності NOS за цих умов також вірогідно знижений (P<0,05). Активність аргінази у цих клітинах зростає в 1,5 раза (P<0,05), а вміст сечовини в 5,6 раза (P<0,05). Інкубація ендотеліоцитів з лімфоцитами дослідних тварин показала зростання iNOS (P<0,05) по відношенні до контролю, активність NOS, cNOS, рівень стабільних метаболітів та вміст GSNO за даних умов є пониженим. Зміни, виявлені за цих умов у показниках аргінази і сечовини, є наступними: підвищена аргіназна активність (P<0,05) та значно (на 53%) зростає вміст сечовини (P<0,05), що в даній ситуації може бути свідченням розвитку оксидантного стресу в ендотеліальних клітинах.

Отже, отримані результати дозволяють припустити, що при хронічному гіперімунокомплексному процесі пониження синтезу оксиду азоту в активованих лімфоцитах прямо або опосередковано призводить до зміни в процесах його синтезу у ендотеліальних клітинах, що в подальшому може призвести до порушення функціональної здатності ендотелію та ушкодження судин. Гальмування фізіологічної регуляторної функції оксиду азоту при хронічній гіперімунокомплексемії створює умови для інгібування NO-синтазного шляху і веде до активації

аргіназного шляху метаболізму L-аргініну.

Для з'ясування особливостей дії корвітину на два шляхи метаболізму NO в умовах in vitro дослідження проведено, як у контрольній групі тварин, так і у тварин із змодельованим хронічним гіперімунокомплексним процесом.

Присутність корвітину в інкубаційному середовищі інкубованих лімфоцитів та ендотеліоцитів інтактних тварин призвела до пониження у лімфоцитах рівня iNOS ($P<0,05$), NO_2^- ($P<0,05$) та вмісту GSNO ($P<0,05$). За даних умов прослідковується тенденція до зростання показників: NOS ($P<0,05$), cNOS ($P<0,05$) та NO_3^- ($P<0,05$). Присутність корвітину інгібувала активність аргінази у лімфоцитах в 2,4 раза ($P<0,05$), вміст сечовини за цих умов не змінився. Аналогічні дослідження, проведені в ендотеліоцитах інтактних тварин, не виявили вірогідних змін у показниках метаболізму L-аргініну.

Додавання корвітину до інкубаційної суміші клітин за умов хронічної гіперімунокомплексемії виявило його коригуючий вплив на процеси синтезу оксиду азоту.

Так, наявність корвітину призвела до зниження активності iNOS ($P<0,05$), активація якої спостерігалась за умов інкубації лімфоцитів з ендотеліоцитами при хронічній гіперімунокомплексемії. Паралельно підвищився вміст cNOS та рівень стабільних метаболітів у лімфоцитах ($P<0,05$), інгібована активність аргінази ($P<0,05$) та вміст сечовини ($P<0,05$). Виявлено також виражений нормалізуючий ефект корвітину на функціональну активність ендотеліоцитів, що проявилося зниженням активності індуцибельної NO-синтази ($P<0,05$), пониженням рівнів NO_2^- ($P<0,05$) і NO_3^- ($P<0,05$) та вмісту GSNO ($P<0,05$). Активність аргінази за даних умов понизилась у 2 рази ($P<0,05$), що навіть перевищує показник контролю в 1,6 раза ($P<0,05$), вміст сечовини також зменшився у 3,4 раза ($P<0,05$).

Отже, отримані експериментальні дані свідчать, що в умовах in vitro протекторні особливості водорозчинної форми корвітину пов'язані, перш за все, із його здатністю специфічно пригнічувати активність індуцибельної NO-синтази, без інгібування активності її конститутивної ізоформи в лімфоцитах і, особливо, в ендотеліальних клітинах за умов хронічної гіперімунокомплексної патології. Ця селективна властивість корвітину, за умов даного захворювання, проявляється також інгібуванням аргіназної активності і позитивною зміною неокисного шляху метаболізму L-аргініну на окисний.

Результати, отримані в умовах in vitro, стали основою для подальшого дослідження in vivo.

Розвиток хронічної гіперімунокомплексемії в цих умовах супроводжується значними змінами імунологічних показників. У всіх дослідних тварин встановлено вірогідне зростання рівня ЦІК ($P<0,01$) різної молекулярної маси. Високий рівень ЦІК можна пояснити виснаженням захоплювальної здатності фагоцитів впродовж 12 тижнів досліду. Підтримання хронічної персистенції ЦІК у судинному руслі може також бути результатом недостатньої активності

рецепторів мембран еритроцитів, які є основними їх носіями до “кліренсних” органів (Stokol T. et al., 2004). За участю цього механізму вони елімінуються фагоцитарною системою (Дрюк Н.Н., 2002; Якобісяк М., 2004). При надмірному утворенні ЦІК ця система може не спрацьовувати, і вони починають проявляти патогенну дію по відношенню до клітин-мішеней. Підтвердженням порушення функцій мембран цих клітин свідчать роботи (Чоп’як В.В., 1998; Соловьев А.И., 2003; Jancar S., 2005). Крім того, це комплексоутворення є комплементзалежним ($P<0,05$), оскільки в умовах довготривалої імунної відповіді склад імунних комплексів поповнюється новими антитілами, що створює умови для їх фіксації та активації системи комплементу. Активація системи комплементу також корелює із гіперпродукцією оксиду азоту, наслідком чого, можливо, є збільшення на поверхні ендотеліоцитів генів, які кодують хемокіни – ІЛ-8, MCP-1, RANTES (Sen C.K., 1996; Чоп’як В.В., 2004).

Зменшення показника гемолітичної активності сироватки крові при хронічній гіперімунокомплексемії може свідчити про посилене використання компонентів системи комплементу для зв’язування ЦІК з клітинами. За цих умов особливо страждає кілінгова функція фагоцитів, сприяючи накопиченню ЦІК на клітинах-мішенях, а також їх преципітації в судинному мікроциркуляторному руслі (Malinski T., 2004).

Перед тим, як застосувати корвітин для корекції порушень імунологічних показників у тварин із хронічним гіперімунокомплексним процесом, ми поставили за мету дослідити його вплив на інтактний організм. Таке дослідження дозволяє виявити вплив препарату на імунологічну та неспецифічну реактивність організму, чутливість окремих ланок імунної системи до його дії, а також виключити можливий дисрегуляторний ефект на механізм імунної відповіді.

Як свідчать результати проведених досліджень, показники ЦІК у сироватці крові інтактних тварин після введення корвітину достовірно знижуються ($P<0,001$). За цих умов рівні ЦІК – великих, середніх та малих розмірів – зменшуються. Вивчення впливу корвітину на імунологічні показники інтактних тварин виявило, що даний препарат знижує рівні ЦІК усіх розмірів та показник гемолітичної активності сироватки крові, що може свідчити про підвищення елімінації ЦІК з кровоплину фагоцитуючими клітинами.

Результат оцінки впливу препарату на визначення вмісту ЦІК у сироватці крові щурів за умов імунокомплексної патології показав пониження рівня великих ($P<0,05$), середніх ($P<0,05$) і малих ($P<0,05$) ЦІК та нормалізацію активності системи комплементу ($P<0,05$), що свідчить про посилення механізмів фагоцитозу.

Відомо, що імунокомплексне ураження тканин прямо чи опосередковано пов’язано із змінами в метаболізмі оксиду азоту (Uesugi M., 1998). Отримані експериментальні дані показали, що розвиток хронічної гіперімунокомплексемії супроводжується експресією індуцибельної NO-синтази, активність якої в лімфоцитах зросла у 4,7 раза ($P<0,001$), а в клітинах ендотелію у 2 рази

(P<0,01). Потенціал конститутивної NO-синтази за цих умов зазнає інгібування – на 61,6% (P<0,001) в лімфоцитах (рис.1) та на 36,9% (P<0,05) у ендотеліоцитах (рис.2).

Зміна показників ферментативної активності NOS супроводжуються підвищенням метаболізму аргіназного шляху NO: активність аргінази в лімфоцитах (рис.1) зросла у 5,1 раза (P<0,001), вміст сечовини – 3,9 раза (P<0,001); в ендотеліоцитах (рис.2) зміни в синтезі оксиду азоту є менш значними – активність аргінази зросла в 1,6 раза (P<0,001), вміст сечовини – 1,9 раза (P<0,001). Можливо, підвищення рівня сечовини у клітинах, при зміні утилізації аргініну на неокисний шлях метаболізму, має компенсаторне значення, враховуючи її відому антиоксидантну роль (Коцюруба А.В., 2000; Aoyagi K., 2003).

Інгібування ферментативної активності NOS може бути зумовлено пониженням біодоступності запасів L-аргініну (Зенков Н.К., 2000; Корж А.Н., 2003), що в подальшому може призвести до порушення рівноваги між двома шляхами – окисним (NO-синтазним) і неокисним (аргіназним). Окрім цього, виявлені зміни в активності NO-синтаз, очевидно, можуть бути пов’язані із тим, що активовані імунними комплексами фагоцити індукують продукування прозапальних цитокінів, які є промоторами iNOS в імунокомпетентних клітинах (Li H., Forstermann U., 2000; Nishimura M., 2004; Nangaku M., 2005). Стійка активація прозапальних цитокінів може створювати сприятливі умови для розвитку автоімуноагресії та подальшого підтримання гіперімунокомплексемії (Чоп’як В.В. 1998; Setiady Y., 2004; Norman M., 2005).

Відомо також, що запальні цитокіни можуть діяти як тригери, що переключають синтез NO з конститутивної ізоформи на індуцибельну (Cattaruzza M. et al., 2003).

Введення корвітину інтактним тваринам показало, що його вплив на процеси синтезу оксиду азоту у лімфоцитах та ендотеліальних клітинах характеризується недостовірним підвищенням ферментативної активності NOS, cNOS та рівнів нітрит - і нітрат - аніонів. Вміст GSNO за цих умов зростає як у лімфоцитах (P<0,001), так і в ендотеліальних клітинах (P<0,05). Активність індуцибельної ізоформи NOS в лімфоцитах інгібована (P<0,001), а у ендотеліоцитах зростання її показника є недостовірним. Дослідження впливу корвітину на активність аргінази і рівень сечовини у лімфоцитах та ендотеліальних клітинах інтактних тварин виявило незначне пониження їх вмісту лише у лімфоцитах (P<0,01).

Дія корвітину на показники NO-синтазної активності за умов експериментального гіперімунокомплексного процесу мала наступні особливості: введення корвітину супроводжується зростанням cNOS в 2,6 раза у лімфоцитах (P<0,001), де спостерігається відновлення активності цього ферменту до показників контролю та значним інгібуванням iNOS – на 60,08% (P<0,001), проте це зменшення не було достатнім для нормалізації активності даного ферменту відносно контролю (рис.1); ферментативну активність NO-синтаз в клітинах ендотелію (рис.2) за цих умов характеризує підвищення активності cNOS, величина якої збільшилася в 2,4 раза (P<0,001),

паралельно із цим відзначено зниження активності iNOS – на 28,6% (P>0,05). Дані величини NO-синтаз у ендотеліоцитах перевищили вихідний рівень контролю – cNOS у 1,5 раза (P<0,05) та iNOS в 1,6 раза (P<0,05).

Отримані експериментальні дані свідчать, що протекторні особливості водорозчинної форми кверцетину – корвітину, при даній патології пов'язані, перш за все, із його здатністю специфічно пригнічувати активність iNOS. На механізм впливу кверцетину щодо пониження активності ферменту індуцибельної NOS, як на транскрипційному, так і на посттрансляційному рівнях, шляхом інгібування експресії мРНК та пониження серії сигнальних інтрацелюлярних шляхів індуцибельної NOS вказували (Kim N.K. et al., 1999; Chen Y.C., Chakravorty M. et al., 2001).

Застосування корвітину на тлі імунокомплексної патології призвело до значних змін у показниках аргіназного шляху метаболізму NO: інгібування активності аргінази на 63,4% в лімфоцитах (P<0,001)), що перевищило у 1,9 раза (P<0,001) рівень контролю, та більш суттєвого, на 83,4%, пониження вмісту сечовини (P<0,001) (рис.1); помітно знизилась активність аргінази у ендотеліальних клітинах (рис.2), показник якої падає на 21,2%, що в 1,3 раза нижче вихідного рівня. Вміст сечовини у ендотеліоцитах за даних умов зменшився на 57,5% (P<0,001).

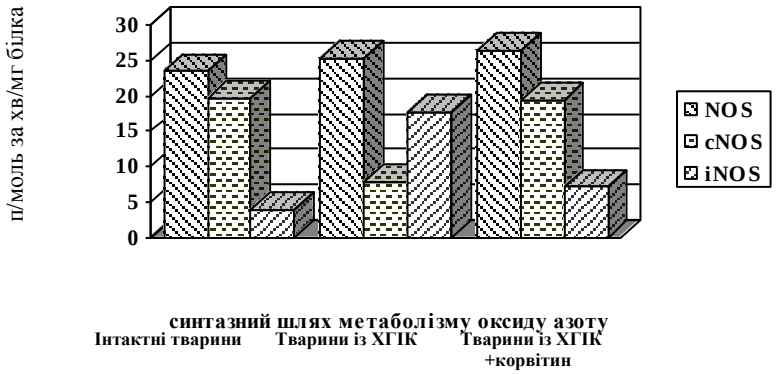


Рис. 1. Показники активності синтазного і аргіназного шляхів метаболізму L-аргініну в лімфоцитах щурів за умов норми, хронічної гіперімунокомплексемії (ХГІК) та корекції корвітином.

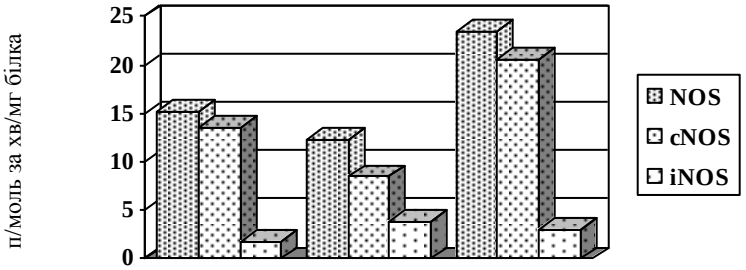
Отже, протекторні властивості корвітину є важливим фактором впливу на синтез оксиду

азоту. В умовах окисного стресу корвітин може виступати як інгібітор неокисного метаболізму L-аргініну за аргіназним шляхом, внаслідок чого нормалізується окисний метаболізм L-аргініну за NO-синтазним шляхом (Дрюк Н.Н., 2002).

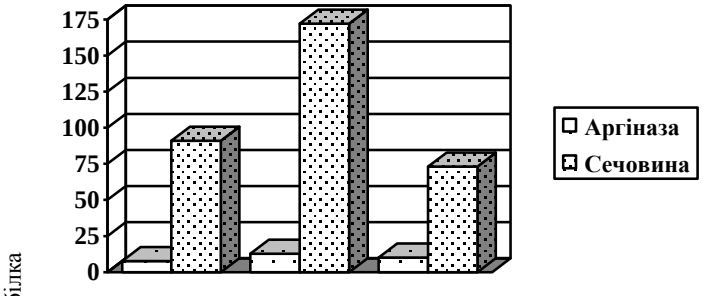
Зміни у вмісті метаболітів оксиду азоту – NO_2^- та NO_3^- значною мірою можуть залежати від ферментативної активності NO-синтаз. Так, з підвищенням ферментативної активності iNOS за умов розвитку хронічного гіперімунокомплексного процесу понижується рівень стабільних метаболітів оксиду азоту, як у лімфоцитах (P<0,001), так і в ендотеліальних клітинах (P<0,001). Вміст нітрозоглутатіону за цих умов також суттєво понижений – на 89% у лімфоцитах (P<0,001) та, на 91,2% в клітинах ендотелію (P<0,001). Як відомо, концентрація стабільних метаболітів оксиду азоту – NO_2^- і NO_3^- має залежність від ступеня активності патологічного процесу (Заячківська О.С., 2006), тому зниження їх рівнів в імунокомпетентних клітинах, можливо, пов'язано з інтенсифікацією при цій патології пошкоджувальної дії активних форм кисню (Коцюруба А.В., 2000). Зменшення у лімфоцитах та ендотеліоцитах рівня нітрозоглутатіону на тлі даної патології, може бути розцінено як зниження системи антиоксидантного захисту.

Введення корвітину групі тварин із хронічною гіперімунокомплексемією супроводжується підвищенням рівня метаболітів NO_2^-і NO_3^-, як в лімфоцитах (P<0,001), так і в ендотеліальних клітинах (P<0,001). Паралельно з цим відзначено зростання GSNO, особливо в ендотеліальних клітинах (P<0,001).

Отже, виявлені ефекти корвітину можуть свідчити про те, що цей препарат гальмує надмірне утворення оксиду азоту і, таким чином, запобігає глибоким метаболічним порушенням у досліджуваних клітинах.



синтазний шлях метаболізму оксиду азоту



аргіназний шлях метаболізму оксиду азоту

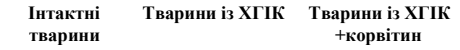


Рис. 2. Показники активності синтазного і аргіназного шляхів метаболізму L-аргініну в ендотеліоцитах щурів за умов норми, хронічної гіперімуно-комплексемії (ХГІК) та корекції корвітином.

Проведені дослідження виявили, що імунологічні та біохімічні порушення при хронічній гіперімунокомплексемії, супроводжуються морфологічними змінами в лімфоцитах та клітинах ендотелію. Електронно-мікроскопічні дослідження лімфоцитів тварин з хронічним імунокомплексним ураженням виявили виражену реакцію цих клітин на змодельований патологічний процес. Ця реакція характеризувалася переважанням деструктивних процесів: пошкодженням ультраструктури плазматичної мембрани і, навіть, її відсутністю в деяких місцях, безструктурним та неоднорідним цитоплазматичним матриксом, недиференційованими органелами, скупченням електроннощільного гранулярного матеріалу. Плазматична мембрана має множинні дефекти, а цитоплазматичній простір вільно сполучається з оточуючим інтерстицієм. Таким чином, проведені дослідження виявили, що хронічна гіперімунокомплексемія супроводжується деструктивними змінами із елементами початкового некрозу у ефекторних клітинах – лімфоцитах, що свідчить про їх безпосереднє залучення в розвиток патологічного процесу.

Введення корвітину тваринам із даною патологією супроводжувалось покращенням морфофункціонального стану цих клітин.

При дослідженні черевного відділу аорти тварин з хронічним гіперімунокомплексним процесом встановлено, що плазма крові насичена лапатими масами, гемолізованими еритроцитами, преципітатами та коагулятами. Виявлені зміни відображають порушення системи гемостазу (Мищенко В.П., 2003) та насичення при цьому плазми крові нетиповими тілами, які, можливо, мають імунокомплексну природу. Ендотеліальний шар аорти дослідних тварин у ряді місць був деендотелізований, на значних його ділянках представлений сплющеної форми дезорганізованими клітинами, плазматична мембрана яких була часто перерваною та вміщувала дрібні депозити. Отримані дані свідчать про глибокі пошкодження та вказують на значні альтеративні впливи, що ініційовані довготривалим введенням бичачого сироваткового альбуміну. Такі альтеруючі впливи на окремі ділянки внутрішньої оболонки призводять аж до некрозу та десквамації ендотеліальних клітин у просвіт артерії. На подібність морфологічних змін за умов довготривалого впливу на організм бичачого сироваткового альбуміну вказували (Lefkowith J.B., 1997). Електроннощільними депозитами був також насичений субендотеліальний шар та локальні ділянки базальної мембрани. Витягнутої форми депозити виявлялись по периферії внутрішньої

еластичної мембрани. Виявлена нами присутність депозитів у плазматичній мембрані пошкоджених ендотеліальних клітин може свідчити про патогенну дію імунних комплексів, які утворюються у великій кількості за умов довготривалого введення бичачого сироваткового альбуміну. Присутність значної кількості депозитів в субендотеліальному шарі, на поверхнях внутрішньої еластичної мембрани та фенестрованих еластичних мембран стінки аорти цих тварин свідчить про глибоке проникнення та відкладання при цьому електроннощільних структур, що мають імунокомплексну природу.

Введення корвітину дослідним тваринам призвело не тільки до усунення деструктивних явищ у ендотеліальних клітинах, але подекуди і до повного відновлення морфологічної структури клітини. Такі ультраструктурні зміни клітин судинної стінки, за умов застосування корвітину, є істотним підтвердженням його цитопротекторного та ендотелійстабілізуючого впливу.

Отже, отримані нами дані підтверджують позитивний ендотеліопротекторний ефект корвітину за умов хронічної гіперімунокомплексної патології. Даний препарат, володіючи високою афінністю до ендотелію, нейтралізуючи активні форми кисню, сприяє репарації ультраструктурних ушкоджень ендотелію і навіть відновлює до норми морфологічні зміни. Застосування корвітину дозволить удосконалити фармакологічну корекцію вільнорадикальних процесів, які інтенсивно розвиваються за умов гіперімунокомплексної патології і призводять, в першу чергу, до ушкодження судин мікроциркуляторного русла.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведені нові теоретичні узагальнення результатів дослідження особливостей метаболізму L-аргініну та його зв’язку з лімфоцитарно-ендотеліальними асоціаціями за умов норми та хронічної гіперімунокомплексної патології. Описані ультраструктурні особливості цих клітин і запропоновано нові підходи до корекції порушень, зумовлених хронічним гіперімунокомплексним процесом, за допомогою корвітину. В результаті вирішення наукового завдання зроблено наступні висновки:

1. Розвиток хронічної гіперімунокомплексемії підтверджується зростанням показників ЦІК різної молекулярної маси та зниженням показника гемолітичної активності комплементу.
2. Аналіз кооперативної взаємодії лімфоцитів та клітин ендотелію у тварин із хронічною гіперімунокомплексемією показав зниження активності cNOS в лімфоцитах – 2,2 раза і в ендотеліальних клітинах – 1,3 раза із одночасним наростанням активності iNOS у цих клітинах: в лімфоцитах – 4 рази та ендотеліоцитах – 1 раз. Паралельно виявлена активація аргінази і підвищення вмісту сечовини, що більше виражено у лімфоцитах.
3. Розвиток хронічної гіперімунокомплексемії супроводжують наступні зміни метаболізму

NO-синтазного шляху: зростання активності iNOS у лімфоцитах – 4,7 раза, в ендотеліоцитах в 2 рази та інгібування потенціалу cNOS у лімфоцитах-2,6 раза і в 1,6 раза в ендотеліоцитах.

4. Хронічний гіперімунокомплексний процес характеризується зростанням показників аргіназного шляху метаболізму L-аргініну: активність аргінази у лімфоцитах підвищується у 5,1 раза, в ендотеліоцитах в 1,6 раза; вміст сечовини у лімфоцитах збільшується у 3,9 раза, в ендотеліоцитах – 1,9 раза.
5. Розвиток хронічної гіперімунокомплексемії зумовив пониження рівнів нітрат- і нітрит – аніонів як в лімфоцитах, так і в клітинах ендотелію. Ці зміни (більш виражені у лімфоцитах) можна розцінити як розвиток нітрозактивного стресу в досліджуваних клітинах. Зменшення вмісту нітрозоглутатіону (також більш виражене в лімфоцитах) свідчить про пониження системи антиоксидантного захисту за цих умов.
6. Хронічний гіперімунокомплексний процес супроводжується порушенням морфофункціонального стану лімфоцитів та ендотеліоцитів. Зміни в лімфоцитах характеризуються переважанням деструктивних процесів із елементами початкового некрозу. Морфологічні дослідження стінки аорти білих щурів виявляють значні порушення ендотеліального шару судинної стінки внаслідок відкладання імунних комплексів.
7. Застосування корвітину, на тлі хронічної гіперімунокомплексемії, призвело до зниження концентрації ЦІК різної молекулярної маси та зростання показників комплементарної активності сироватки крові.
8. Корвітин в умовах in vitro, проявляючи інгібуючий вплив на активність iNOS та вміст аргінази і сечовини, як в лімфоцитах так і в ендотеліоцитах, не впливає при цьому на активність cNOS, що підтверджує його селективну дію за умов хронічної гіперімунокомплексемії.
9. Застосування корвітину зумовлює корекцію змін NO-синтазного шляху, що свідчить про його гальмуючий вплив на розвиток нітрозактивного стресу в клітинах, та, інгібуючи надмірний синтез аргінази, сприяє відновленню порушеного балансу в метаболізмі L-аргініну.
10. Застосування корвітину зумовлює нормалізацію морфологічних змін лімфоцитів та ендотеліоцитів, що підтверджує його цитопротекторну і мембраностабілізуючу дію за умов хронічної гіперімунокомплексемії.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ НА ТЕМУ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Вплив корвітину на ультраструктури синусоїдних гемокапілярів печінки білих щурів за умов хронічної гіперімунокомплексної патології /Качмарська М.О., Чоп’як В.,В., Любінець Л. А.,

Ковалишин В.І., Садляк О.В., Вальчук І.В. //Клінічна та експериментальна патологія. – 2004. – Т.3, №2. – С. 436-438. (Дисертант самостійно проводила моделювання хронічної гіперімунокомплексемії та її корекції, брала участь у статистичному опрацюванні результатів).

2. Ультраструктурні особливості лімфоцитів та ендотеліоцитів за умов хронічної гіперімунокомплексемії /Садляк О.В., Чоп'як В.В., Бідюк М.М., Любінець Л.А., Качмарська М.О. //Буковинський медичний вісник. – 2006. – №3. – С. 120-123. (Дисертант брала участь у підготовці зразків для дослідження, аналізі експериментальних даних, підготувала статтю до публікації).

3. Дослідження ультраструктури стінки аорти за умов хронічної гіперімунокомплексемії /Садляк О.В., Чоп'як В.В., Бідюк М.М., Любінець Л.А., Качмарська М.О. //Вісник наукових досліджень. – 2006. – №4. – С. 41-44. (Дисертант брала участь у підготовці зразків для дослідження, опрацюванні результатів експериментальних даних, підготувала статтю до публікації).

4. NO-залежні механізми взаємодії лімфоцитів і ендотеліоцитів білих щурів при їх інкубації in vitro за умов хронічної гіперімунокомплексемії та коригуючий вплив корвітину на ці процеси /Садляк О.В., Чоп'як В.В., Любінець Л.А., Качмарська М.О. //Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2007. – №1 (37). – С. 7-11. (Дисертант самостійно провела методику виділення ендотеліальних клітин, брала участь у проведенні досліджень, статистичному опрацюванні отриманих результатів, підготувала статтю до публікації).

5. Гіперімунокомплексний синдром в експерименті та клініці /Чоп'як В.В., Вальчук І.В., Гайдучок І. Г., Садляк О.В., Качмарська М.О., Никитюк Г.П. //Вісник наукових досліджень. – 2007. – №1. – С. 5-8. (Дисертант брала участь у проведенні досліджень).

6. Хронічний гіперімунокомплексний синдром: коригуючий вплив корвітину на метаболізм L-аргініну в лімфоцитарно-ендотеліальних взаємодіях in vitro /Садляк О.В., Чоп'як В.В., Вальчук І.В. Гайдучок І.Г. //Імунологія та алергологія. – 2007. – №1. – С. 63-66. (Дисертант проводила виконання досліджень та статистичну обробку резельтатів).

7. Садляк О.В. Ефекти NO та його стабільних метаболітів у лімфоцитах білих щурів при експериментальному хронічному гіперімунокомплексному синдромі в умовах in vivo //Медична хімія. – 2007. – Т.9, № 3.- С. 33-36.

8. Садляк О.В. Регуляторна і дисрегуляторна роль системи L-аргінін-оксид азоту в лімфоцитах білих щурів за умов хронічного гіперімунокомплексного синдрому //Здобутки клінічної та експериментальної медицини – 2007. № 2 (7). –
С. 143 – 146.

9. Деклараційний патент на корисну модель 13287, Україна МПК А61К 31/33. Застосування корвітину як ендотеліопротектора за умов гіперімунокомплексного синдрому: Пат.13287 МПК А61К 31/33 / Чоп'як В.В., Мойбенко О.О., Вальчук І.В., Качмарська М.О., Бідюк М.М., Любінець

Л.А., Садляк О.В., Павлович С.І. (Україна).- № u200509991; Заяв. 24.10.2005; Опубл.15.03.06. Бюл.№3. (Дисертант самостійно проводила моделювання хронічної гіперімунокомплексемії та її корекції, брала участь в опрацюванні, аналізі отриманих результатів і підготовці патенту до публікації).

10. Чоп'як В.В., І.В. Вальчук І.В., Садляк О.В. Вплив корвітину на рівень циклічних нуклеотидів у щурів за умов хронічної гіперімунокомплексемії. //Імунологія та алергологія. /Тези доп. VIII наук.-практ. звітно-виборчої конф. Українського товариства фахівців з імунології, алергології та імунореабілітації "Сучасні аспекти діагностики та лікування імуно – та алергопатології". – 2006. – №2 - С.-127 (Дисертант брала участь у статистичному опрацюванні результатів та аналізі експериментальних даних).

11. Садляк О.В. Коригуючий вплив корвітину на NO-синтазний шлях оксиду азоту в лімфоцитах білих щурів за умов хронічної гіперімунокомплексемії. //Тези доповідей наук.-прак. конф. "IV чтение им. В.В. Подвысоцкого". – Одеса, 2007. – С. 103 – 104.

12. Вплив корвітину на систему циклічних нуклеотидів у моноцитах білих щурів хронічного гіперімунокомплексного процесу /Качмарська М.О., Чоп'як В.В., Любінець Л.А., Садляк О.В. //Тези доп. наук.-прак. конф. "IV чтение им. В.В. Подвысоцкого". – Одеса, 2007. – С. 72 – 73. (Дисертант брала участь у статистичному опрацюванні результатів, провела пошук літератури у науковій бібліотеці та мережі Medline).

13. Садляк О.В. Вплив корвітину на показники системи оксиду азоту в ендотеліоцитах білих щурів за умов хронічної гіперімунокомплексемії //Тези доп. підсумкової наук.-прак. конф. "Здобутки клінічної і експериментальної медицини". – Тернопіль, 2007. – С. 149 – 150.

14. Садляк О. В. Характеристика окисного і неокисного шляху метаболізму L-аргініну в лімфоцитах білих щурів, за умов хронічного гіперімуно-комплексного синдрому і стабілізуючий вплив корвітину на ці процеси //Тези доп. III міжнародної наук. конф. "Гомеостаз: фізіологія, патологія, фармакологія і клініка". – Одеса, 2007. – С. 46 – 48.

15. Особливості синтазного та аргіназного шляхів метаболізму NO в ендотеліоцитах білих щурів за умов хронічного гіперімунокомплексного синдрому /О.В. Садляк, В.В. Чоп'як, Л.А. Любінець, М.О. Качмарська, І.В. Вальчук //Медична хімія. /Тези доповідей наук.-практ. конф. "Роль месенжерних систем у патогенезі патологічних процесів різної етіології". – 2007. – Т.9, № 4. – С. 69-70. (Дисертант самостійно проводила моделювання хронічної гіперімунокомплексемії, проаналізувала дані експериментальних досліджень та підготувала тези до друку).

АНОТАЦІЯ

Садляк О. В. Лімфоцитопосередковані механізми за умов хронічної гіперімунокомплексемії та вплив на них корвітину в експерименті. – 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. Горба-чевського” МОЗ України. Тернопіль, 2008

Дисертаційна робота присвячена вивченню особливостей NO-синтазного та аргіназного шляхів метаболізму L-аргініну в лімфоцитах і ендотеліоцитах за умов експериментальної хронічної гіперімунокомплексемії та проблемі пошуку фармакологічної корекції даної патології.

Встановлено, що розвиток хронічної гіперімунокомплексемії у тварин, яка спричинила імунологічні, біохімічні і морфологічні зміни в лімфоцитах та ендотеліальних клітинах, зумовлений значним порушенням процесів синтезу оксиду азоту. Зміни в метаболізмі оксиду азоту за цих умов проявляються наростанням NO-залежних індуцибельних процесів, пригніченням активності конститутивної NO-синтази та розвитком нітрозактивного стресу в клітинах. Проведені дослідження виявили активацію синтезу аргінази за умов гіперімунокомплексної патології, що зумовлює послаблення NO-синтазного шляху (за рахунок виснаження аргіназою фонду загального L-аргініну), понижує вивільнення NO і призводить до зміщення метаболізму в сторону неокисного перетворення аргініну. Застосування корвітину при хронічній гіперімунокомплексемії виявило його коригуючий вплив на показники системи оксиду азоту у лімфоцитах і ендотеліоцитах тварин в умовах in vitro та in vivo. Нормалізуючий ефект корвітину проявляється також покращенням ультраструктури досліджуваних клітин.

Ключові слова: хронічна гіперімунокомплексемія, лімфоцити, ендотеліоцити, корвітин, оксид азоту.

АННОТАЦИЯ

Садляк О. В. Лимфоцитопосредованные механизмы в условиях хронической гипериммунокомплексемии и влияние на них корвитина в эксперименте – 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” МОЗ Украины. Тернополь, 2008.

Диссертационная работа посвящена изучению особенностей NO-синтазного и аргиназного путей метаболизма L-аргинина в лимфоцитах и эндотелиоцитах в условиях хронической гипериммунокомплексемии и проблеме поиска фармакологической коррекции данной патологии.

В результате проведенных исследований установлено, что развитие хронического гипериммунокомплексного процесса в животных, повлекшее иммунологические, биохимические и морфологические изменения в лимфоцитах и эндотелиальных клетках, является следствием

значительных нарушений процессов синтеза оксида азота. Изменения метаболизма оксида азота в этих условиях характеризуется повышением NO-зависимых индуцибельных процессов, угнетением ферментативной активности его конститутивной NO-синтазны и развитием нитрозактивного стресса в клетках. Проведенные исследования обнаружили активацию синтеза аргиназы в условиях хронической гипериммунокомплексной патологии, что привело к ослаблению NO-синтазного пути (за счет истощения аргиназой фонда общего L-аргинина), понижению либеризации NO, а также смещению метаболизма в сторону некислородного превращения аргинина.

Исследования свойств корвитина на показатели синтеза NO в лимфоцитах и эндотелиоцах животных с хронической гипериммунокомплексемией в условиях in vitro показали его селективное ингибирующее воздействие на активность иNOS в этих клетках. Наличие корвитина в инкубационной смеси клеток в данных условиях способствовало также повышению активности cNOS и нормализации уровня стабильных метаболитов оксида азота.

Парентеральное введение корвитина в условиях экспериментальной иммунокомплексной патологии привело к снижению, практически до нормы, уровней циркулирующих иммунных комплексов разной моллекулярной массы и повышению комплементарной активности сыворотки крови.

Проведенные исследования с применением корвитина в условиях in vivo при хроническом гипериммунокомплексном процессе также указывают на его коррегирующее действие на метаболизм L-аргинина в лимфоцитах и эндотелиальных клетках крыс. Так, установлено ингибирующее влияние корвитина на активность индуцибельной NO-синтазы и активацию конститутивной NO-синтазы в лимфоцитах и эндотелиоцитах крыс с иммунокомплексной патологией. Под действием этого препарата отмечается восстановление их уровней как в лимфоцитах, так и в эндотелиальных клетках. Влияние корвитина на синтез аргиназы и мочевины в лимфоцитах и эндотелиоцитах крыс с хронической гипериммунокомплексемией проявляется понижением процессов их синтеза, и, как следствие, – восстановлением нарушенного баланса между NO-синтазным и аргиназным путями метаболизма оксида азота.

Електронно-микроскопические исследования лимфоцитов и эндотелиоцитов крыс с иммунокомплексным повреждением обнаружили выраженную реакцию этих клеток на смоделированную патологию, проявляющуюся значительными морфологическими изменениями с преобладанием деструктивных процессов. Развитие хронической гипериммунокомплексемии сопровождалось альтеративними изменениями в лимфоцитах, множественными дефектами мембраны и начальной стадией некроза.

Морфологические исследования стенки брюшного отдела аорты животных с иммуно-комплексной патологией показали нарушение целостности эндотелиальной мембраны и наличие

значительного количества депозитов в плазматической мембране эндотелиоцитов. Присутствие большого количества депозитов свидетельствует о патогенном действии циркулирующих иммунных комплексов в условиях длительной их персистенции в сосудистом русле.

Применение корвитина ведет к нормализации ультраструктуры лимфоцитов и эндотелиоцитов.

Таким образом, экспериментальные исследования показали, что в условиях хронической гипериммунокомплексемии корвитин проявляет цитопротекторный и эндотелийстабилизирующий эффект, а применение этого препарата при иммунокомплексных заболеваниях позволит улучшить их фармакокорекцию.

Ключевые слова: хроническая гипериммунокомплексемия, лимфоциты, эндотелиоциты, корвитин, оксид азота.

SUMMARY

Sadliak O.V. Lymphocyte mediated mechanisms –in conditions of chronic hyperimmunocomplexemia and Korvitin influence upon them, in the experiment. – Manuscript.

The dissertation for obtaining a scientific degree of candidate of medical sciences on speciality 14.03.04 Pathological physiology. The State Higher educational establishment "Ternopil State Medical University, named after I. Ya. Gorbachevsky" MHP of Ukraine Ternopil, 2008.

The dissertation work is devoted to study of peculiarities of flow of NO-syntase and arginase ways of L-arginin system metabolism – in lymphocytes and in endotheliocytes, in conditions of chronic experimental hyperimmunocomplexemia, and in case of search problem of this pathology correction.

It was estimated, that the development of chronic hyperimmunocomplex in animals, which caused immunological, biochemical and morphological changes in lymphocytes and in endothelial cells, – is stipulated by considerable violation of processes of nitric oxide synthesis. The changes in nitric oxide metabolism in these conditions – are manifested by growth of NO dependent inducible processes, oppression of its constitutive NO syntase activity, and the development of nitrose-active stress in cells. The received data testify to arginase synthesis activation, in hyperimmunocomplex pathology conditions, what causes the weakening of NO-syntase way (in result of exhaustion by arginase – of the fund of general L-arginine), and it loweres the NO release, and leads to shift of metabolism in the direction of non-oxide transformation of arginin. The Corvitin application is manifested by intensive corregating action in nitric oxide system, and by functional activity of lymphocytes and endotheliocytes in animals with chronic hyperimmunocomplexemia, in vitro and in vivo conditions. The normalising effect of Korvitin is manifested also by improvement of the ultrastructure of the investigated cells.

Key words: chronic hyperimmunocomplexemia, lymphocytes, endotheliocytes, Korvitin, nitric oxide.