

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ТЕРНОПІЛЬСЬКА ДЕРЖАВНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ
ім. І. Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО**

НИКИТЮК ГАЛИНА ПЕТРІВНА

УДК: 616-092:612.017)-056.3-07:616.155.32/.24+611-018.74]-07-08

**НЕЙТРОФІЛЬНО-ЕНДОТЕЛІАЛЬНІ МЕХАНІЗМИ ПРИ ХРОНІЧНІЙ
ГІПЕРІМУНОКОМПЛЕКСНІЙ ПАТОЛОГІЇ ТА ДЕЯКІ ПІДХОДИ ДО ЇХ КОРЕКЦІЇ**

14.03.04 - патологічна фізіологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Тернопіль – 2004

Дисертацією є рукопис.

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

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор **Бідюк Мартин Миколайович**, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького МОЗ України, завідувач кафедри патологічної фізіології.

Офіційні опоненти:

Доктор медичних наук, професор Горбань Владислав Олександрович, Київський інститут Української асоціації народної медицини МОіН України, завідувач кафедри патологічної фізіології.

Доктор медичних наук, професор Клименко Микола Олексійович, Харківський державний медичний університет МОЗ України, завідувач кафедри патологічної фізіології.

Провідна установа:

Київський інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України

Захист відбудеться 26 жовтня 2004 р. о 12 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 58.601.01 у Тернопільській державній медичній академії ім. І.Я. Горбачевського МОЗ України (46000, Майдан Волі, 1)

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Тернопільської державної медичної академії ім. І.Я. Горбачевського МОЗ України (46000, вул. Руська, 12)

Автореферат розісланий 18 вересня 2004 р.

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради

доктор медичних наук, професор

Я.Я.Боднар

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. В роботах С. Wilson, F. Dixon висвітлено роль імунних комплексів і нейтрофілів у формуванні судинно-запальних процесів, їх участь у пошкодженні ендотеліальних клітин. Оскільки за такої патології найчастіше ушкоджується судинна стінка, ми досліджували кооперацію клітин, задіяних у судинно-запальних процесах. Однак механізми взаємодії нейтрофілів і ендотеліальних клітин при підвищеному рівні імунних комплексів у кровоплинні вивчені недостатньо.

Незадовільними залишаються результати терапії імунотоксичних захворювань, що пояснюється складністю та недостатньою вивченістю механізмів імунотоксичних процесів. Незважаючи на інтенсивні наукові розробки, які ведуться у цьому напрямку в різних країнах, проблема імунотоксичності та профілактики розвитку імунотоксичних захворювань ще є далекою від задовільного вирішення.

В цьому плані викликає інтерес плацентарний полібіолін, який запатентований і випускається бакпідприємством "БІОФАРМА". Продукція його сертифікована Європейською комісією. Встановлено, що в склад плацентарного полібіоліну входять α_2 -макроглобулін, α_2 -глікопротеїн та трофобластичний β_1 -глікопротеїн (Выговский В.П., Новосад А.В., Невзгода А.А., 1990; Чоп'як В.В., 1997; Надашкевич О.Н., 1999). Виявлено також, що він має імунотоксичну дію і протизапальний ефект як інгібітор лізосомальних протеаз та стимулятор фагоцитозу (Бесєдін О.В., Чоп'як В.В., 1999; Бідюк М.М., Чоп'як В.В., Качмарська М.О., 1999).

Цікавим є також препарат кверцетин – натуральний екстракт із класу біофлавоноїдів з: антигістамінною дією – блокує вироблення гістаміну, серотоніну та лейкотрієнів (Визир В.А., Березин А.Е., 1999; Калиман П.Л., Самохин А.А., Самохина Л.М., 2001); протизапальною та протинабряковою дією, стабілізує клітинні мембрани, знижує проникність капілярів (Азаров В.И., Грабовский Л.А., Мойбенко А.А., 1995; Калиман П.Л., Самохин А.А., Самохина Л.М., 2001); антиоксидантною дією: блокує вільні радикали як ендогенного так і екзогенного походження (Марков А.Г., Козачук И.Л., 1998; Иванов Д., Назаренко В., 2002). Ми використовували його парентеральну форму – „Корвітин”[®], що випускає Борщагівський хімфармзавод.

Таким чином, вивчення показників нейтрофільно-ендотеліальних асоціацій за умов хронічного імунотоксичного процесу і можливостей їх корекції плацентарним полібіоліном та корвітином є актуальним і заслуговує експериментальних і клінічних обґрунтувань.

Зв'язок роботи з програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є складовою частиною планової наукової міжкафедральної теми "Імуно-нейтрофільно-ендотеліально-епітеліально залежні механізми в розвитку гіперімунотоксичного синдрому в експерименті та клініці", яку виконують кафедри патологічної фізіології та клінічної імунології і алергології Львівського націо-

нального медичного університету ім. Данила Галицького (№ держреєстрації 0101U009233). Автор дослідила роль нейтрофільних механізмів і ендотеліоцитів у розвитку хронічного імунокомплексного процесу на моделі хронічної сироваткової хвороби, а також особливості динаміки показників прямих та опосередкованих механізмів фагоцитозу за дії корвітину і плацентарного полібіоліну. За цих умов вивчила фагоцитарні процеси *in vitro* під час інкубації нейтрофілів з ендотеліальними клітинами в інтактних тварин і під час хронічного імунокомплексного процесу, провела морфологічну кореляцію і довела можливість корекції цієї патології корвітином. Тема дисертації затверджена проблемною комісією “Патологічна фізіологія та імунологія” 13 червня 2002 р. (протокол № 18).

Мета роботи. Вивчити нейтрофільнозалежні механізми залучення фагоцитозу *in vivo* та *in vitro* у мікст-культурі нейтрофілів з ендотеліоцитами в розвиток хронічного імунокомплексного процесу та оцінити підходи до їх корекції плацентарним полібіоліном та корвітином.

Завдання дослідження: відповідно до мети поставлені такі основні завдання:

1. На моделі хронічного імунокомплексного процесу дослідити показники захоплювальної та ферментативної активності нейтрофільних фагоцитів.
2. Вивчити захоплювальну та функціональну активність мікрофагів, інкубованих з ендотеліоцитами *in vitro* за умов хронічного імунокомплексного процесу.
3. Оцінити зміни ультраструктури нейтрофілів за умов хронічного імунокомплексного процесу.
4. Дослідити можливі підходи до корекції виявлених функціональних і морфологічних порушень за умов хронічного імунокомплексного процесу корвітином та плацентарним полібіоліном.
5. На основі отриманих результатів сформулювати наукові та практичні рекомендації.

Об'єкт дослідження – хронічний імунокомплексний процес, відтворений на моделі хронічної сироваткової хвороби у білих лабораторних щурів.

Предмет дослідження – показники фагоцитарної активності нейтрофільних гранулоцитів тварин з хронічним імунокомплексним процесом до та після введення їм плацентарного полібіоліну та корвітину.

Методи дослідження – підрахунок загальної кількості лейкоцитів; лейкоцитарної формули; фагоцитарного числа – відсоток фагоцитуючих клітин від загальної кількості фагоцитів, фагоцитарного індексу – середня кількість частинок, захоплених однією клітиною та коефіцієнту фагоцитозу, що характеризує швидкість цього процесу; показників окисно-відновних процесів у нейтрофілі – нітросиній тетразолієвий тест; резервних можливостей окисно-відновних систем – стимульований нітросиній тетразолієвий тест; кисневозалежних ферментативних процесів в лізосомах нейтрофілів – мілопероксидазний тест; кисневонезалежних бактерицидних можливостей мікрофагів – лізосомально-катіонний тест; визначення циркулюючих імунних комплексів різних розмі-

рів, так як останній відіграє важливе значення для патогенної дії на організм; гемолітичної активності комплементу.

Наукова новизна одержаних результатів: Вперше на сучасному методичному рівні вивчено динаміку показників захоплювальної та ферментативної активності нейтрофілів під час хронічного імунокомплексного процесу в організмі білих щурів. Вперше проведено інкубацію нейтрофілів з клітинами ендотелію в аналогічних умовах досліду і вивчено вплив ендотеліоцитів на показники захоплювальної та ферментативної активності нейтрофільних гранулоцитів. Вперше досліджена динаміка кисневозалежних та кисневонезалежних показників фагоцитозу нейтрофільних гранулоцитів під час хронічного імунокомплексного процесу і інкубації нейтрофілів з клітинами ендотелію. За цих умов вперше виявлено структурні зміни в нейтрофільних гранулоцитах, які свідчать про активацію згаданих клітин. Виявлені зміни корелюють з показниками кисневозалежної і кисневонезалежної ферментативної активності фагоцитів. Вперше вивчено вплив на ці процеси введення корвітину. Доказана виражена коригуюча дія корвітину на функціональні та структурні порушення, під час хронічного імунокомплексного процесу (знижується рівень циркулюючих імунних комплексів малих і середніх розмірів, стабілізуються нейтрофілозалежні процеси фагоцитозу і структурні зміни в нейтрофілах, що запобігає руйнівним процесам, які виникають під час перезбудження нейтрофільних гранулоцитів).

Практичне значення одержаних результатів. Результати виконаних досліджень розширюють існуючі уявлення про патогенез імунокомплексних уражень, а також роль у цих механізмах захоплювальної та ферментативної активності нейтрофільних гранулоцитів, кисневозалежних та кисневонезалежних показників фагоцитозу нейтрофільних гранулоцитів під час інкубації *in vitro* з клітинами ендотелію і вплив на ці процеси корвітину. Виражена стабілізуюча дія корвітину вказує на доцільність його подальшого вивчення з метою корекції порушень цих процесів за умов патології імунокомплексного генезу і розробки методичних рекомендацій. Результати дослідження впроваджені в навчальний процес на кафедрах патологічної фізіології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, Тернопільської державної медичної академії імені І.Я. Горбачевського та Буковинської державної медичної академії, клінічної імунології і алергології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, що підтверджено відповідними актами впровадження.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійним науковим дослідженням. Це знаходить своє віддзеркалення в оцінці автором актуальності та сучасного стану вивчення проблеми. На основі проведеного літературного огляду автор обґрунтувала мету і задачі дослідження, вибрала та опрацювала адекватні моделі і методики. Самостійно виконала всю експериментальну частину роботи, підготувала матеріал для морфологічних досліджень, статистично обробила, проаналізувала і узагальнила отримані результати. Висновки сформулювала сумісно з на-

уковим керівником. В опублікованих із співавторами наукових працях здобувачу належать основні ідеї, практичний матеріал та їх узагальнення. У тій частині впроваджень, що стосуються наукової новизни, викладено фактичні дані отримані дисертантом.

Апробація результатів дисертації: результати роботи були оприлюднені і обговорені на II Українській науково-практичній конференції "Актуальні проблеми клінічної імунології" (Львів, 1996); Пленумі Українського товариства патофізіологів України (Чернівці, 1998); III Національному конгресі патофізіологів України (Одеса, 2000); Пленумі патофізіологів України (Одеса, 2002); Міжнародній науково-практичній конференції присвяченій пам'яті професора І.В. Шостаківської (Львів, 2002), спільному засіданні Львівської обласної філії наукового медичного товариства патофізіологів і кафедр патологічної фізіології та клінічної імунології і алергології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (Львів, 2004). IV Національному конгресі патофізіологів України з міжнародною участю (Чернівці, 2004).

Публікації. Результати дисертації викладено у 9 друкованих працях, з них 3 – у наукових фахових виданнях та 6 – у матеріалах і збірниках конференцій та конгресів.

Структура дисертації. Дисертація складається зі вступу, 7 розділів, висновків, списку використаних джерел, додатків. Робота викладена на 151 сторінці машинописного тексту та ілюстрована 16 таблицями і 27 рисунками. Список літератури містить 278 джерел українською та російською мовами і 114 іноземних. Бібліографічний опис літературних джерел, ілюстрації та додатки викладені на 38 сторінках.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Досліди проводили на білих щурах-самцях лінії Вістар масою 180-200 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію, в осінню пору року і додержанням вимог Стразбурської Конвенції, щодо використання хребетних тварин в експерименті. Всі експериментальні тварини були поділені на шість груп:

I група – інтактні тварини, які отримували розчин плацебо і служили контролем (24 тварини).

II група – інтактні тварини, які отримували розчин плацентарного полібіоліну (10 тварини).

III група - інтактні тварини, які отримували розчин корвітину (14 тварин).

IV група – тварини з змодельованим хронічним імунокомплексним процесом, які отримували розчин плацебо (24 тварини).

V група – тварини з змодельованим хронічним імунокомплексним процесом, які отримували розчин плацентарного полібіоліну (10 тварини).

VI група – тварини з змодельованим хронічним імунокомплексним процесом, які отримували розчин корвітину (14 тварин).

Крім цього, аналогічні дослідження проводились в п'ятьох групах суспензії нейтрофілів з клітинами ендотелію:

I група – інкубовані без клітин ендотелію інтактних тварин (14 тварини).

II група – інкубовані з клітинами ендотелію інтактних тварин, що служили контролем (14 тварини).

III група – інкубованих з клітинами ендотелію інтактних тварин, що отримували розчин корвітину (14 тварини).

IV група – інкубовані з клітинами ендотелію тварин з змодельованим хронічним імунокомплексним процесом (14 тварини).

V група – інкубовані з клітинами ендотелію тварин з змодельованим хронічним імунокомплексним процесом, які отримували розчин корвітину (14 тварини).

Для відтворення моделі хронічної сироваткової хвороби, яка викликається введенням кожного сьомого дня протягом 12 тижнів в хвостову вену щура бичачого сироваткового альбуміну (БСА) в розрахунку 100 мг/кг маси, обрали модель запропоновану С.Г. Cochrane у модифікації С.В. Wilson et al. Оскільки тут характерним є збільшення рівня циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) у крові, за їх рівнем оцінювали ступінь розвитку хвороби.

Плацентарний полібіолін (ПП) вводили в разовій дозі 5 мг/100г, корвітин (К) – 4 мг/100г доочеревинно один раз на добу, протягом 10 днів.

Нейтрофіли (НФ) виділяли із крові центрифугуванням на градієнті щільності фікол-верографіну за методом И.В. Петровой, 1983. Нейтрофільні гранулоцити в суспензії складали – 98%. Клітини ендотелію (ЕК) виділяли з допомогою колагенази за методом Е.А. Jaffe, 1978 (217). Життєздатність клітин складала не менше ніж 95%, її оцінювали за забарвленням трипановим синім. Інкубували клітини при 37⁰ С 60 хв. у вологій камері з підвищеним вмістом вуглекислого газу.

Для вивчення процесів фагоцитозу обрали такі методи: підрахунок загальної кількості лейкоцитів за загальноприйнятою методикою; підрахунок лейкоцитарної формули; для оцінки захоплювальної здатності фагоцитів – латексний тест (ЛТ): з підрахунком фагоцитарного числа (ФЧ) – відсоток фагоцитуючих клітин від загальної кількості фагоцитів, фагоцитарного індексу (ФІ) – середня кількість частинок, захоплених однією клітиною та коефіцієнта фагоцитозу (КФ), що характеризує швидкість цього процесу (Е.Ф.Чернушенко, 1988; А.Н.Медведев, 1991); для оцінки функціонування оксидазних систем, що генерують супероксидні радикали і характеризують окисно-відновні процеси – нітросиній тетразолієвий тест (НСТсп) (J. Park, 1968); для оцінки резервних можливостей окисно-відновних систем – стимульований нітросиній тетразолієвий тест

(НСТст) (J. Park, 1968); для оцінки показників кисневозалежних ферментативних процесів у лізосомах нейтрофілів – мілопероксидазний тест (МПТ) (С. Grechman, цит. за И. Тодоровим., 1978), для оцінки киснево незалежних ферментативних процесів – лізосомально-катіонний тест (ЛКТ) (Шубіч М.В., 1975). Щоб оцінити опосередковані механізми фагоцитозу: визначали циркулюючі імунні комплекси різних розмірів, оскільки розмір має важливе значення для патогенної дії комплексу на організм (V.Naskova, 1977; С.Г. Осипов и соавт., 1983); визначення гемолітичної активності комплементу (М.М.Вавилова, 1984)

Статистичний аналіз отриманих результатів проводився за допомогою методу варіаційної статистики (С.Н.Лапич, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич, 2000) використовуючи t-критерій Стьюдента. Для розрахунків застосовували комп'ютерну програму Excel (Microsoft, США). Статистично вірогідними вважали результати, для яких вірогідність $P < 0,05$.

Основні результати досліджень. Вивчення особливостей розвитку хронічного імунокомплексного процесу (ХІКП) показало, що в цих умовах зростає загальна кількість лейкоцитів ($P < 0,001$) і серед них нейтрофілів ($P < 0,001$). Кількість фагоцитних клітин достовірно збільшилася через 120 хв, хоча кількість захоплених частинок латексу зменшилася порівняно з контролем через 120 хв. Відповідно швидкість фагоцитозу зменшилась. Це свідчить про те, що нейтрофіли (НФ) перші реагують на вторгнення чужорідних агентів, щоб знищити їх, а також сприяють переводу цих антигенів в імуногенну форму (Хаитов Р.М., Земсков В.М., 2000). Зниження захоплювальної здатності, що супроводжується значним збільшенням всіх показників ЦК, вказує на послаблення першої ланки імунологічного нагляду, що сприяє хронізації процесу, формуванню вторинного клітинного імунодефіцитного синдрому.

Дослідженням ферментативних процесів у нейтрофільних гранулоцитах виявлено збільшення показників мілопероксидазного тесту (МПТ) у відсотках і в абсолютних значеннях, що свідчить про активацію кисневозалежних ферментативних процесів. Метаболічна перебудова стимульованих НФ протікає миттєво – “респіраторний вибух”. В її основі – кисневозалежні реакції, в результаті яких утворюються активні форми кисню: супероксидний аніон, синглетний кисень, гідроксильний радикал, гіпохлорид. В ланцюгових метаболічних перетвореннях задіяні мілопероксидаза – фермент азурофільних гранул. При патологічних станах, через неспецифічність фагоцитарних реакцій, дія активованих НФ направлена і на чужорідні об'єкти, і на тканини власного організму (Белова Л.А., 1997).

Показники ЛКТ вірогідно зросли як у відносних так і в абсолютних значеннях. Також збільшилася активність всередині одного нейтрофіла. Показники окисно-відновної здатності лізосом НФ зросли у відсотках та абсолютних значеннях, а резервна можливість – в абсолютних.

Під час вивчення опосередкованих механізмів фагоцитозу за умов ХІКП всі показники ЦК зросли порівняно з контрольною групою тварин. Підвищилась також активність системи компле-

менту ($P < 0,05$) проти контрольних показників. В умовах довготривалої імунної відповіді імунні комплекси (ІК) поповнюються новими антитілами, що створює умови для фіксації та руйнівної активації всього каскаду системи комплементу. ІК приклеюються до циркулюючих клітин крові через рецептор С3b. З допомогою цього механізму комплекси модифікуються і елімінуються фагоцитарною системою (S. Edwards, F. Watson, L. Gasmi et al., 1997). Підвищений рівень ЦК у сироватці крові є характерною ознакою хронічного імунокомплексного процесу через постійну персистенцію антигену в крові.

Нами встановлено, що в умовах досліджу зростає рівень ЦК, які активують Fc- та С3b-рецептори на НФ, посилюючи ферментативні процеси в цих клітинах. Активація Fc- і, особливо, С3b-рецепторів НФ призводить до активації лізосомальних ферментів, котрі в свою чергу можуть розщеплювати компонент комплементу С3. Це призводить до генерації С3b, що забезпечує зчеплення НФ з ЦК. При цьому вивільняються лізосомальні ферменти, фібриноген, ендотелін, колаген, що спричиняє розвиток запального процесу в судинній стінці (Долгушин І.І., Зурочка А.В., Чукичев А.В., 1995; Edwards S., Watson F., Gasmi L. et al., 1997; Garcia J.G., Verin A.D., Heerenyova M., English D., 1998; Гарська Н.О., 2000.). Ці моменти підтверджують наші морфологічні дослідження (в цитоплазмі спостерігається велика кількість електронно-щільних азурофільних гранул, поодинокі специфічні гранули, множинні фаголізосоми з фагоцитованими фрагментами в порожнині, ділянки еухроматину в ядрі значно більші за об'ємом ніж у інтактних тварин).

Далі вивчали зміни прямих та опосередкованих механізмів фагоцитозу в інтактних тварин після введення їм ПП та К. Аналіз динаміки показників активності фагоцитарної ланки інтактного організму під дією ПП у цій групі тварин виявив збільшення загальної кількості лейкоцитів, абсолютної кількості НФ порівняно з інтактними тваринами. Після введення К кількість нейтрофільних гранулоцитів достовірно зменшилась в відсотках.

В НФ під впливом ПП активуються процеси захоплення, про що свідчить достовірне збільшення кількості фагоцитних клітин. Вплив К на захоплювальну функцію НФ проявився в активації – зростанні через 120 хв., кількості і активних фагоцитів, і поглинутих частинок латексу одним НФ.

Дослідженням ферментативних процесів у нейтрофільних гранулоцитах, після введення ПП виявлено активацію кисневозалежних ферментативних процесів: показники МПТ НФ вірогідно зросли порівняно з контрольними тваринами у відсотках і в абсолютних значеннях. Одночасно у тварин, які отримували ПП, також збільшилися показники окисно-відновної здатності лізосом НФ та їх резервна можливість порівняно з показниками контрольної групи в абсолютних значеннях.

Після введення К показники кисневозалежних ферментативних процесів лізосом НФ вірогідно збільшились у відсотковому значенні. Під впливом корвітину стали активніші кисневоне-

лежні ферментативні процеси у лізосомах кожного НФ. Показники окисно-відновних ферментативних процесів у НФ і у відсотках, і в абсолютних значеннях залишилися такими самими, а резервна можливість їх збільшилась.

Порівняння імуномодулюючого впливу ПП і К показало, що за своєю здатністю впливати на опосередковані механізми фагоцитозу ПП збільшує показники ЦК великих і малих розмірів, показники ЦК середніх розмірів вірогідно не змінилися. Це можна розцінювати як активацію гуморальної ланки імунної відповіді. Оскільки система імунітету перебуває в умовах постійного контакту з антигеном, такий ріст ЦК можна розглядати як фізіологічний процес, спрямований на елімінацію чужерідних частинок.

Рівень усіх ЦК у сироватці крові інтактних тварин після введення корвітину достовірно падає, знижуються також показники гемолітичної активності комплементу, що свідчить про активне використання компонентів системи комплементу, тобто активацію опосередкованих механізмів фагоцитозу.

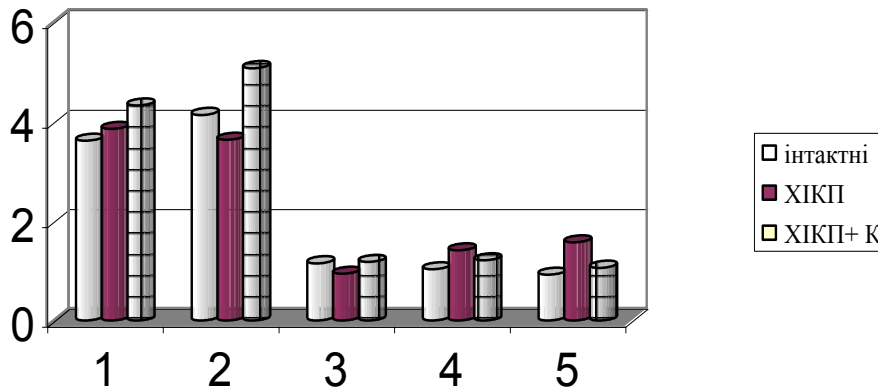
З одержаних результатів випливає, що до тривалого застосування ПП в умовах здорового організму слід підходити обережно, оскільки він може викликати небажану імунокомплексемію.

Зіставляючи результати дослідження дії ПП і К на інтактний організм, ми виявили відмінності в їх імуномодулюючих ефектах. Основна особливість природного препарату К – помірне стимулювання всіх ланок системи захисту організму, що не порушувало загальної рівноваги, необхідної для адекватного функціонування імунної системи, тоді як ПП інтенсивно стимулював фактори неспецифічної реактивності.

Вивчення особливостей розвитку ХІКП після введення ПП та К показало, що під впливом ПП зменшилася абсолютна кількість НФ, тоді як відсотковий вміст вірогідно не змінився. Аналіз динаміки нейтрофілозалежних показників фагоцитозу за умов ХІКП після введення К виявив достовірне зменшення загальної кількості лейкоцитів у порівнянні з ХІКП, а також зменшення абсолютних значень НФ.

ПП та К відновлюють захоплювальну здатність НФ, про що свідчать показники латексного тесту. Однак після введення ПП зросла кількість активних НФ, тоді як після введення К – також кількість захоплених частинок латексу одним НФ, відповідно збільшилась швидкість фагоцитозу (рис. 1).

Ферментативні процеси в НФ під впливом ПП та К також зазнали певних змін, що проявилось у зменшенні активності як кисневозалежних ферментативних процесів, так і окисно-відновних процесів у НФ. Ці препарати стабілізують також кисневонезалежні механізми фагоцитозу, про що свідчать показники лізосомально-катіонного тесту (рис. 1).



- 1 – ФІ через 20 хв. інкубації з частинками латексу;
 2 – ФІ через 120 хв. інкубації з частинками латексу;
 3 – коефіцієнт фагоцитозу;
 4 – цитохімічний індекс мілопероксидазного тесту;
 5 – цитохімічний індекс лізосомально-катіонного тесту.

Рис. 1. Показники захоплювальної та ферментативної активності НФ за умов ХІКП та після введення корвітину.

Аналізуючи проведені дослідження, можна зробити висновок, що обидва препарати – і плацентарний полібіолін і корвітин – мають стабілізуючий вплив на продукцію ЦІК. Хоча К зменшує продукцію власне патогенних імунних комплексів (середніх та малих розмірів) і ефективніше впливає на ферментативні процеси у НФ та захоплення чужорідних частинок.

Для вивчення взаємного впливу НФ та клітини ендотелію ми провели інкубацію цих клітин в умовах, наближених до природних.

Після інкубації НФ з ЕК процеси захоплення активуються через 20 хв. і через 120 хв. порівняно з показниками захоплювальної здатності НФ, інкубованих без ЕК. Однак швидкість фагоцитозу вірогідно не змінюється. Очевидно під час контакту з ендотеліальними клітинами на НФ активуються Fc- та C3b-рецептори (Edwards S., Watson F., Gasmi L. et al., 1997; Garcia J.G., Verin A.D., Neerenuova M., English D., 1998), що приводить до збільшення кількості активних клітин.

Кисневозалежні ферментативні процеси активуються порівняно з контролем, збільшується цитохімічний індекс. Зростає резервна можливість окисно-відновних процесів та активність кисневонезалежних ферментативних процесів всередині однієї клітини.

Отже після аналізу результатів даного дослідження можна зробити висновок, що клітини ендотелію під час безпосередньої взаємодії з НФ мають активуючий вплив на останні.

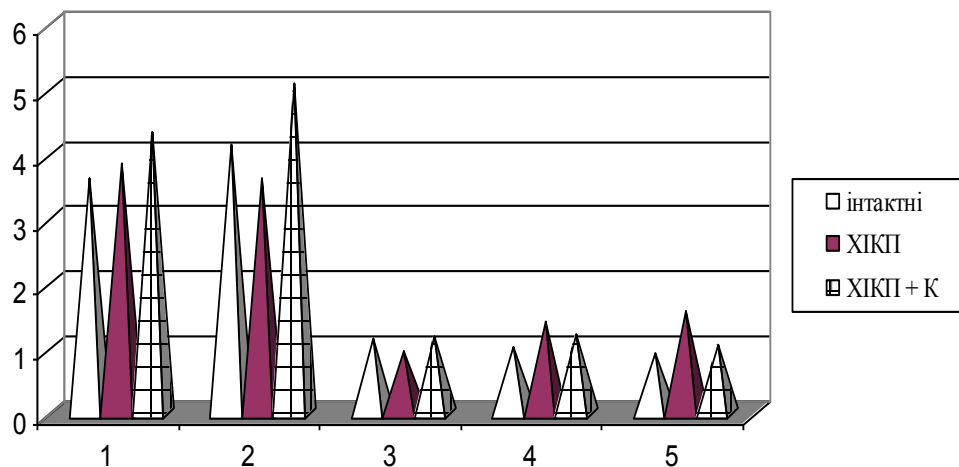
У інтактних тварин в умовах інкубації НФ з ЕК після введення К достовірно зростає кількість частинок латексу захоплених одним НФ після 20 хв. інкубації з частинками латексу, та через 120 хв., хоча швидкість фагоцитозу не змінюється, як і кількість активних НФ.

Корвітин стабілізує кисневонезалежні ферментативні процеси. Зокрема показники ЛК-тесту достовірно знижуються порівняно з НФ інтактних тварин після інкубації їх з клітинами ендотелію, а також порівняно з НФ інтактних тварин після інкубації без клітин ендотелію.

Отже корвітин введений інтактним тваринам в умовах інкубації НФ з ЕК, підвищує захоплювальну здатність НФ, а також стабілізує ферментативні процеси у лізосомах цих клітин.

Під час вивчення нейтрофілозалежних механізмів фагоцитозу при інкубації НФ з ЕК за умов ХІКП встановлено, що захоплювальна здатність НФ знижується (рис. 2). Через 120 хв. інкубації з частинками латексу зменшується процентний вміст НФ, здатних до фагоцитозу, порівняно з контрольними. Відповідно знижується швидкість фагоцитозу. Це свідчить про порушення міжклітинних взаємодій у відношенні притягання НФ у вогнище запалення (Кулинич А.В., 2002).

Під час ХІКП в умовах інкубації НФ з ЕК ферментативні процеси в лізосомах НФ активуються (рис. 2). Зокрема показники кисневонезалежних ферментативних процесів зросли як у відносних значеннях, так і всередині одного НФ порівняно з контрольними показниками. При стимуляції НФ активуються оксидази плазматичної мембрани, котрі запускають серію метаболічних реакцій, що характеризуються як “респіраторний вибух”. Цей термін відображує швидку зміну метаболізму НФ з активацією внутрішньоклітинної мієлопероксидази і генерацією активних форм кисню. Володіючи вираженою бактерицидною дією активні форми кисню виконують захисну функцію, але вони дуже токсичні також для мітохондрій ЕК і колагенових волокон (Dabrowski A., Konturek S., Konturek J. et al., 1999).



1 – ФІ через 20 хв. інкубації з частинками латексу;

2 – ФІ через 120 хв. інкубації з частинками латексу;

3 – коефіцієнт фагоцитарного числа;

4 – цитохімічний індекс мієлопероксидазного тесту;

5 – цитохімічний індекс лізосомально-катіонного тесту.

Рис. 2. Показники захоплювальної та ферментативної активності НФ за умов інкубації НФ з ЕК при ХІКП.

Зростають також показники кисневонезалежних ферментативних процесів та активність гранул в одному НФ. При дослідженні здатності НФ відновлювати нітросиній тетразолій спостерігаємо збільшення показників спонтанного НСТ-тесту. Водночас резервна можливість окисно-відновних процесів практично не змінюється.

Аналізуючи показники фагоцитарної активності нейтрофілів за умов інкубації НФ з ЕК при ХІКП можна зробити такий висновок. В цих умовах зменшується процентний вміст НФ, здатних до фагоцитозу, а також кількість захоплених частинок одним НФ, відповідно знижується швидкість фагоцитозу. Активуються кисневозалежні та кисневонезалежні ферментативні процеси в лізосомах нейтрофілів.

У дослідних тварин після введення корвітину достовірно зростає кількість фагоцитних НФ, особливо «пізнього» фагоцитарного числа. Збільшується також кількість захоплених частинок латексу одним НФ після 120 хв. інкубації з частинками латексу. Швидкість фагоцитозу достовірно зростає.

Стабілізуюче впливає К на кисневонезалежні ферментативні процеси. Зокрема показники ЛК-тесту достовірно знижуються порівняно з НФ дослідних тварин після інкубації їх з клітинами ендотелію. Також падає активність всередині кожного НФ, про що свідчить цитохімічний індекс у НФ після введення К порівняно з НФ дослідних тварин в умовах інкубації з ЕК. Показники кисневонезалежних ферментативних процесів після введення К достовірно нижчі від показників дослідних тварин. Значно знижується також цитохімічний індекс. На окисно-відновні властивості лізосом НФ введення корвітину позначилося тенденцією до зниження і наближенням до показників НСТ-тесту у інтактних тварин до інкубації з ЕК, збільшуючи одночасно їх резервну можливість.

Отже, після введення корвітину в умовах інкубації НФ з ЕК знижуються ферментативні процеси у лізосомах НФ, а також підвищуються захоплювальна здатність цих клітин.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі теоретично узагальнено і по новому вирішено наукове завдання, що віддзеркалено у встановленні нейтрофільно-ендотеліальних механізмів у розвитку хронічного імунокомплексного процесу. Описані механізми впливу циркулюючих імунних комплексів, ендотеліоцитів на нейтрофільні гранулоцити, морфологічні зміни в нейтрофілах за умов хронічного імунокомплексного процесу *in vivo* та *in vitro*.

Запропоновані нові підходи до корекції порушень, викликаних хронічним імунокомплексним процесом, за допомогою плацентарного полібіоліну та корвітину.

В результаті вирішення наукового завдання зроблено такі висновки:

1. За умов експериментального хронічного імунокомплексного процесу зростають показники циркулюючих імунних комплексів – великих розмірів від $70,50 \pm 3,69$ до $161,50 \pm 25,00$ ($P < 0,005$); середніх – від $103,00 \pm 2,13$ до $189,00 \pm 4,99$ ($P < 0,001$); малих – від $161,50 \pm 5,00$ ($P < 0,001$) та активність системи комплементу ($P < 0,05$). Нейтрофільний статус характеризується послабленням захоплювальної функції та активацією ферментативних процесів у лізосомах нейтрофілів, що сприяє розвитку запального процесу.
2. Під час інкубації нейтрофілів з клітинами ендотелію зменшується процентний вміст нейтрофілів, здатних до фагоцитозу з $89,30 \pm 2,83\%$ до $80,00 \pm 3,47\%$ ($P < 0,05$), і кількість захоплених частинок одним нейтрофілом, відповідно знижується швидкість фагоцитозу з $1,15 \pm 0,05$ до $0,94 \pm 0,03$ ($P < 0,005$). Одночасно активуються ферментативні процеси в лізосомах нейтрофільних гранулоцитах.
3. За умов хронічного імунокомплексного процесу методом електронної мікроскопії виявлені структурні зміни в ядрі та кількісного складу гранул нейтрофільних гранулоцитів, які корелюють з показниками ферментативної активності фагоцитів і свідчать про їх активацію.
4. Плацентарний полібіолін за умов хронічного імунокомплексного процесу знижує рівень показників циркулюючих імунних комплексів великих та середніх розмірів та посилює захоплювальну здатність нейтрофільних фагоцитів і стабілізує ферментативні процеси в них.
5. Корвітин виявляє виражений коригуючий вплив на встановлені функціонально-морфологічні порушення, які виникають під час хронічного імунокомплексного процесу та інкубації нейтрофілів з ендотеліальними клітинами. Зменшується рівень патогенних циркулюючих імунних комплексів (середніх та малих розмірів), стабілізуються нейтрофілозалежні процеси фагоцитозу і менш вираженішими є структурні зміни в нейтрофільних гранулоцитах.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Бідюк М.М., Чоп'як В.В., Любінець Л.А., Павлович С.І., Никитюк Г.П., Пороховська З.С. Участь нейтрофільних механізмів у патогенезі хронічної гіперімунокомплексемії // Фізіологічний журнал. – 1997. – Т. 43, № 3-4. – С. 11-18. (Автором самостійно проведено дослідження нейтрофільних механізмів при хронічній імунокомплексній патології у тварин, проаналізовано та узагальнено виявлені зміни).
2. Никитюк Г.П., Бідюк М.М. Вплив кверцетину на фагоцитарну активність нейтрофільних гранулоцитів при експериментальній імунокомплексній патології // Клінічна та експериментальна патологія. – 2003. – Т. II, № 1. – С. 47-50. (Автором самостійно проведено дослідження нейтрофільних механізмів фагоцитозу при хронічній імунокомплексній патології у тварин, проаналізовано та узагальнено виявлені зміни, написано статтю).
3. Никитюк Г.П., Бідюк М.М., Угрин О.М. Характеристика фагоцитарних процесів в умовах інкубації нейтрофілів з ендотеліоцитами у тварин з хронічним імунокомплексним процесом // Клінічна та експериментальна патологія. – 2004. – Т. III, № 2. – С.357-358. (Автором самостійно проведено дослідження нейтрофільних механізмів фагоцитозу при хронічній імунокомплексній патології у тварин в умовах інкубації нейтрофілів з клітинами ендотелію, проаналізовано та узагальнено виявлені зміни, написано статтю).
4. Никитюк Г.П. Функціональні та морфологічні особливості селезінки в імунній відповіді організму // Актуальні проблеми клінічної імунології та алергології. – 1998. – № 2. – С.118-122. (Автором самостійно здійснено аналіз літературних джерел, їх узагальнення та представлено власний погляд, написано статтю).
5. Угрин О.М., Никитюк Г.П. Церулоплазміновий статус та фагоцитоз за умов впливу хронічної гіперімунокомплексемії // Актуальні проблеми клінічної імунології та алергології. – 1996. – № 1. – С.150.
6. Бідюк М.М., Чоп'як В.В., Любінець Л.А., Угрин О.М., Вовк В.В., Никитюк Г.П., Пороховська З.С., Любінець М.О., Ямпольська С.О. Хронічна гіперімунокомплексемія. Вплив імуноотропних препаратів // Фізіологічний журнал. – 1998. – Т. 44, № 4. – С. 57-58. (Автором самостійно проведено дослідження механізмів при хронічній імунокомплексній патології у тварин, проаналізовано та узагальнено виявлені зміни).
7. Угрин О.М., Бідюк М.М., Казановська Н.Ф., Никитюк Г.П. Ферментативна активність, антиалергічний вплив препарату церулоплазміну при анафілактичному шоці // Фізіологічний журнал. – 1998. – Т. 44, № 4. – С. 120-121.
8. Бідюк М.М., Чоп'як В.В., Качмарська М.О., Любінець Л.А., Никитюк Г.П. Обмін L-аргініну за умов хронічної гіперімунокомплексемії // Фізіологічний журнал. – 2000. – Т. 46, № 2. – С. 50-51.

9. Никитюк Г.П., Бідюк М.М., Угрин О.М. Фагоцитарна активність нейтрофілів при експериментальній хронічній гіперімунокомплексній патології // Фізіологічний журнал. – 2002. – Т. 48, № 4. – С. 100.

АНОТАЦІЯ

Никитюк Г.П. Нейтрофільно-ендотеліальні механізми при хронічній гіперімунокомплексній патології та деякі підходи до їх корекції. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеню кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія. – Тернопільська державна медична академія ім. І.Я.Горбачевського, МОЗ України. – Тернопіль, 2004.

Робота присвячена вивченню нейтрофільнозалежних механізмів залучення фагоцитозу *in vivo* та *in vitro* у мікст-культури нейтрофілів з ендотеліоцитами в розвиток хронічного імунокомплексного процесу та їх корекції корвітином. Встановлено, що хронічний імунокомплексний процес у щурів характеризувався ростом всіх показників циркулюючих імунних комплексів, зниженням активності системи комплементу, захоплювальної функції нейтрофілів і активацією в них ферментативних процесів. Доведено, що корвітин приводить до зменшення рівня патогенних циркулюючих імунних комплексів і стабілізації нейтрофільозалежних процесів фагоцитозу у щурів з хронічним імунокомплексним процесом, а також нормалізує захоплюючу та ферментативну функції нейтрофілів при їх інкубації з ендотеліоцитами, виявляючи при цьому кращу ефективність ніж плацентарний полібіолін. Результати проведених досліджень розширюють існуючі уявлення про патогенез імунокомплексних уражень, роль в цих механізмах захоплювальної та ферментативної активності нейтрофілів, кисневозалежних та кисневонезалежних показників фагоцитозу нейтрофільних гранулоцитів при інкубації їх *in vitro* з клітинами ендотелію і вплив на ці процеси корвітину.

Ключові слова: нейтрофіли, фагоцитоз, хронічний імунокомплексний процес, клітини ендотелію, інкубація, корекція.

АННОТАЦИЯ

Никитюк Г.П. Нейтрофильно-эндотелиальные механизмы при хронической гипериммунокомплексной патологии и некоторые подходы к их коррекции. – Рукопись.

Диссертация на соискание научной степени кандидата медицинских наук за специальностью 14.03.04 – патологическая физиология. – Тернопольская государственная медицинская академия им. И.Я. Горбачевского, МЗ Украины, Тернополь, 2004.

Работа посвящена изучению нейтрофилозависимых механизмов фагоцитоза *in vivo* и *in vitro* в микст-культуре нейтрофилов с эндотелиоцитами в развитии хронического гипериммунокомплексного процесса и их коррекции корвитинном.

Опыты проводились на белых крысах-самцах линии Вистар, массой 180 – 200 г, которых содержали на стандартном рационе вивария, осенью. Все экспериментальные животные были разделены на 6 групп. I группа – интактные животные, получавшие раствор плацебо. II группа – интактные животные, получавшие раствор плацентарного полибиолина. III группа – интактные животные, получавшие раствор корвитина. IV группа – животные с вызванным ХИКП, получавшие раствор плацебо. V группа – животные с вызванным ХИКП, получавшие раствор плацентарного полибиолина. VI группа – животные с вызванным ХИКП, получавшие раствор корвитина.

Кроме того, отдельно проводились аналогичные исследования (5 групп) в взвесах клеток. I группа – суспензия нейтрофилов инкубированных без эндотелиальных клеток интактных животных; II группа – суспензия нейтрофилов инкубированных с эндотелиальными клетками интактных животных; III группа – суспензия нейтрофилов инкубированных с эндотелиальными клетками интактных животных, получавших раствор корвитина; IV группа – суспензия нейтрофилов инкубированных с эндотелиальными клетками животных с вызванным ХИКП; V группа – суспензия нейтрофилов инкубированных с эндотелиальными клетками животных с вызванным ХИКП, получавшие раствор корвитина. В эксперименте использовано 156 животных. Проведен сравнительный анализ изменений вызванных ХИКП, а также при инкубации нейтрофилов с клетками эндотелия при введении К.

Установлено, что в условиях ХИКП увеличивается общее число лейкоцитов и среди них нейтрофилов. Увеличиваются все показатели ЦИК и активность системы комплемента. Характерным для нейтрофильного статуса является снижение захватывающей функции и активация ферментативных процессов в лизосомах нейтрофилов, что способствует развитию воспалительного процесса. Снижение захватывающей способности нейтрофилов, что сопровождается увеличением всех показателей ЦИК, указывают на снижение первого звена иммунологического надзора.

Введение ПП животным на фоне ХИКП снижает уровень показателей ЦИК только больших и средних размеров, усиливает захватывающую способность нейтрофильных фагоцитов и стабилизирует ферментативные процессы в них. Под действием К в условиях ХИКП снижается уровень патогенных ЦИК (средних, малых размеров) и стабилизируются нейтрофилозависимые процессы фагоцитоза.

При инкубации нейтрофилов с клетками эндотелия активизируется захватывающая и ферментативная функция нейтрофильных гранулоцитов. Корвитин стабилизирующе влияет на нарушение фагоцитоза в животных с ХИКП.

Результаты проведенных исследований расширяют существующее представление о патогенезе иммунокомплексных поражений. Роль в этих механизмах захватывающей активности нейтрофилов, кислород зависимых и кислород независимых показателей фагоцитоза нейтрофильных грану-

лоцитов при инкубации их *in vitro* с клетками эндотелия и влияние на эти процессы корвитина. Выраженный корригирующий эффект корвитина на эти процессы указывает на необходимость его дальнейшего изучения с целью коррекции нарушений, возникающих в условиях патологии иммунокомплексного происхождения и разработки методических рекомендаций возможности апробации корвитина в комплексной терапии иммунокомплексных болезней.

Ключевые слова: нейтрофилы, фагоцитоз, хронический иммунокомплексный процесс, клетки эндотелия, инкубация, коррекция.

ANNOTATION

Nykytiuk G. P. Neutrophile-endothelial mechanisms in chronic hyperimmunocomplex pathology and some aspects of their correction. – Manuscript.

Thesis for a candidate's degree of medical sciences in speciality 14.03.04 – pathological physiology. – I. Ya. Horbachevsky Ternopil State Medical Academy of Ministry of Public Health of Ukraine, Ternopil, 2004.

The dissertation is devoted to the studies of neutrophil dependent mechanisms of phagocytosis involvement to the development of chronic immunocomplex process *in vivo* and *in vitro* in mixed cultures of neutrophils with endotheliocytes and their correction by quercetin. It was shown that chronic immunocomplex disease in rats characterizes by growing of all indices of circulating immune complexes, lowering of complement system activity, capturing function of neutrophils and activation of enzymatic processes in them. It was revealed that quercetin causes reduction of pathogenic circulating immune complexes and stabilization of neutrophilic phagocytosis in rats with chronic immunocomplex disease and improves capturing and enzymatic function of neutrophils, incubated with endothelial cells *in vitro*, more effective than placental polybiolin. Obtained results make more clear our notion about pathogenesis of immunocomplex disorders, role of capturing and enzymatic activity of neutrophils, oxygen-dependent and oxygen-independent indices of neutrophilic phagocytosis under their incubation *in vitro* with endotheliocytes in mechanisms of their development, and effect of quercetin on them.

Key words: neutrophils, phagocytosis, chronic immunocomplex process, endothelial cells, incubation, correction.

Висловлюємо щирю подяку завідувачу відділу експериментальної кардіології інституту фізіології імені О.О.Богомольця НАН України, академіку
Мойбенко О.О. за надання препарату „Корвітин” для
експериментальних досліджень.