

**ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ  
ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО**

На правах рукопису

**САДЛЯК ОКСАНА ВОЛОДИМИРІВНА**

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

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

14.03.04 – патологічна фізіологія

Дисертація

на здобуття наукового ступеня  
кандидата медичних наук

Науковий керівник  
доктор медичних наук, професор  
Чоп'як Валентина Володимирівна

Львів – 2008

## ЗМІСТ

<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ.....</b>	<b>5</b>
<b>ВСТУП .....</b>	<b>8</b>
<b>РОЗДІЛ І. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....</b>	<b>15</b>
<b>НАУКОВІ ВІДОМОСТІ ПРО ОСНОВНІ ЛАНКИ ПАТОГЕНЕЗУ ХРОНІЧНОЇ ГІПЕРІМУНОКОМПЛЕКСЕМІЇ. РОЛЬ МЕТАБОЛІЗМУ L-АРГІНІНУ В ЛІМФОЦИТАРНО-ЕНДОТЕЛІАЛЬНИХ ВЗАЄМОДІЯХ</b>	
1.1. Хронічний гіперімунокомплексний процес: клітинні основи та механізми розвитку.....	15
1.2. Роль лімфоцитів в механізмі розвитку імунокомплексних реакцій .....	19
1.3. Фізіологічні та патологічні ефекти оксиду азоту в імунокомпетентних та ендотеліальних клітинах.....	24
1.3.1. Регуляторна і дисрегуляторна роль оксиду азоту в імунокомпетентних клітинах при імунних та запальних процесах .....	24
1.3.2. Ендотелій, як регулятор імунних та запальних процесів, опосередкованих системою L-аргініну .....	29
1.4. Фармакологічні ефекти біофлавоноїдів в імунних та запальних процесах .....	35
<b>РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....</b>	<b>40</b>
2.1. Об'єкти, етапи та умови проведення експерименту .....	40
2.2. Методи дослідження .....	43
2.2.1. Визначення циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові .....	43
2.2.2. Визначення комплементарної активності сироватки крові.....	44
2.2.3. Виділення лімфоцитів .....	45
2.2.4. Виділення ендотеліоцитів .....	45
2.2.5. Визначення активності NO-синтаз .....	45
2.2.6. Визначення активності сумарної конститутивної (Ca <sup>2+</sup> -залежної) NO-синтази (cNOS) .....	46

2.2.7. Визначення активності індукцибельної (Ca <sup>2+</sup> незалежної) NO-синтази (iNOS) .....	46
2.2.8. Визначення вмісту нітрит-аніону (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) .....	46
2.2.9. Визначення вмісту нітрат-аніону (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) .....	47
2.2.10. Визначення вмісту нітрозоглутатіону (GSNO) .....	47
2.2.11. Визначення активності аргінази .....	48
2.2.12. Визначення вмісту сечовини .....	48
2.2.13. Визначення вмісту білка за Бредфордом .....	49
2.3. Електронно-мікроскопічні дослідження .....	49
2.3.1. Забір аорти і проведення електронної мікроскопії .....	49
2.3.2. Забір лімфоцитів і проведення електронної мікроскопії .....	50
2.4. Характеристика ключових механізмів біологічної дії досліджуваного середника .....	50
2.5. Статистична обробка результатів .....	51

**РОЗДІЛ 3. ХРОНІЧНИЙ ГІПЕРІМУНОКОМПЛЕКСНИЙ ПРОЦЕС: ХАРАКТЕРИСТИКА ПОКАЗНИКІВ NO-СИНТАЗНОЇ І АРГІНАЗНОЇ АКТИВНОСТІ В ЛІМФОЦИТАХ ТА ЕНДОТЕЛІОЦИТАХ БІЛИХ ЩУРІВ, ВПЛИВ КОРВІТИНУ НА ЦІ ПОКАЗНИКИ В УМОВАХ IN VITRO .....**

3.1. Особливості NO-залежних процесів у лімфоцитах і ендотеліоцитах тварин за умов норми та хронічної гіперімунокомплексемії, вплив корвітину на ці показники в умовах in vitro .....	54
3.2. Особливості синтезу аргіназної активності оксиду азоту у лімфоцитах і ендотеліоцитах тварин за умов норми та ХГІК, вплив корвітину на ці показники в умовах in vitro .....	67

**РОЗДІЛ 4. ХАРАКТЕРИСТИКА ОСОБЛИВОСТЕЙ МЕТАБОЛІЗМУ L-АРГІНІНУ В ЛІМФОЦИТАХ, ЕНДОТЕЛІОЦИТАХ І СИРОВАТЦІ ТВАРИН ПРИ ХРОНІЧНОМУ ГІПЕРІМУНОКОМПЛЕКСНОМУ ПРОЦЕСІ ТА ВПЛИВ КОРВІТИНУ НА ЦІ ОСОБЛИВОСТІ В УМОВАХ IN VIVO. ....**

4.1. Характеристика імунного статусу інтактних тварин та тварин із змодельованою хронічною гіперімунокомплексемією на тлі введення їм корвітину	76
4.2. Дослідження показників синтазного шляху метаболізму оксиду азоту в лімфоцитах і ендотеліоцитах білих щурів за умов норми, хронічної гіперімунокомплексемії та корекції корвітином	81
4.3. Дослідження показників аргіназного шляху метаболізму оксиду азоту в лімфоцитах і ендотеліоцитах білих щурів за умов норми, хронічної гіперімунокомплексемії та корекції корвітином ...	88
<b>РОЗДІЛ 5. УЛЬТРАСТРУКТУРНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЛІМФОЦИТІВ І ЕНДОТЕЛІОЦИТІВ ЧЕРЕВНОЇ АОРТИ БІЛИХ ЩУРІВ В НОРМІ, ПРИ ХРОНІЧНІЙ ГІПЕРІМУНОКОМПЛЕКСЕМІЇ ТА ЗА УМОВ ЗАСТОСУВАННЯ КОРВІТИНУ</b>	<b>94</b>
5.1. Ультроструктурна характеристика лімфоцитів білих щурів у нормі, при хронічній гіперімунокомплексемії та за умов застосування корвітину	94
5.2. Ультроструктурна характеристика ендотеліоцитів черевного відділу аорти білих щурів в нормі, при хронічній гіперімунокомплексемії та за умов застосування корвітину	100
<b>РОЗДІЛ 6. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ</b>	<b>116</b>
<b>ВИСНОВКИ</b>	<b>135</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ</b>	<b>137</b>
<b>ДОДАТКИ</b>	<b>166</b>

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

АГ – антиген

АТ – антитіло

АФК – активні форми кисню

ІД – імунодефіцит

ІК – імунні комплекси

ІХС – ішемічна хвороба серця

ЛПС – ліпополісахарид

ЛПНЩ – ліпопротеїди низької щільності

НК – натуральні кіллери

ПМЯЛ – поліморфоядерні лейкоцити

ПОЛ – перекисне окислення ліпідів

Th – Т-хелпери (помічники) лімфоцити

T<sub>4</sub> – Т-цитотоксичні лімфоцити

ХГК – хронічна гіперімунокомплексемія

цАМФ – циклічний аденінмонофосфат

цГМФ – циклічний гуанінмонофосфат

ЦК – циркулюючі імунні комплекси

В – бурсозалежні лімфоцити

CD – кластер диференціації

CD40 – трансмембранний білок

CD40sL – вивільнений розчинний ліганд трансмембранного білка

CH50 – комплементарна активність за 50% гемолізом

C5a – фрагмент C5 компонента комплементу

C3b – фрагмент C3b компонента комплементу

CR1 – рецептор до комплементу типу 1

ELAM – 1 (endothelial leukocyte adhesion molecule) - ендотеліально-лейкоцитарна адгезивна молекула

DR – другий клас локусу HLA - системи

FNT $\alpha$  – фактор некрозу пухлин  $\alpha$

Fas – (CD95) – мембранний клітинний рецептор

Fab – антитілобудуючий фрагмент Ig

Fc – (fragment crystalline) – фрагмент молекули імуноглобуліну

Fc $\gamma$ RI (CD64) – рецептор для IgG

Fc $\gamma$ RII (CD32) – рецептор для IgG

Fc $\gamma$ RIII (CD16) – рецептор для IgG

GSNO – нітрозоглутатіон

HLA – людська лейкоцитарна система антигенів

HSP60 – білок теплового шоку 60

IL – інтерлейкіни

INF – інтерферон

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – пероксид водню

Ig – імуноглобулін

ICAM – (intracellular adhesion molecule) - молекула міжклітинної адгезії

LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen) - антиген, пов'язаний із функцією лімфоцитів

NF- $\kappa$ B – нуклеотидний фактор- $\kappa$ B

NK – натуральні кілери

NO<sub>2</sub><sup>-</sup> нітрит аніон

NO<sub>3</sub><sup>-</sup> нітрат аніон

cNOS - конститутивна NO-синтаза

eNOS – ендотеліальна NO-синтаза

iNOS – індукцибельна NO-синтаза

nNOS – нейрональна NO-синтаза

NO – оксид азоту

O<sub>2</sub><sup>-</sup> – супероксид аніон-радикал

OH – гідроксил-радикал

PAR- 2 – (proteinase-activated receptor-2) – рецептор, активований протеїназами

PKC – протеїнкіназа С

PLD – фосфоліпаза D

RANTES (regulation on activation normal T-cell expressed and secreted) - регуляція активації, експресії і секреції нормальних Т-клітин

VCAM – (vascular cell adhesion molecule) – адгезивна молекула судинних клітин

## ВСТУП

**Актуальність теми.** У структурі алергічних захворювань, імунокомплексне ушкодження тканин розцінюється як провідна патогенетична ланка розвитку багатьох захворювань [199, 220]. Відомо, що гіперімунокомплексемія у клінічній практиці супроводжує ряд інфекційних, запальних, онкологічних та системних захворювань і може бути підґрунтям для формування імунодефіцитних та аутоімунних синдромів [119, 136, 207, 253]. Патогенетичні механізми розвитку цієї патології, крім ушкодження судин та внутрішніх органів, також супроводжуються продукцією структурно-неповноцінних антитіл, послабленням функцій системи фагоцитів та зниженою активністю дезорієнтованих імунними комплексами лімфоцитів [71, 162]. Проведені наукові дослідження останнього часу засвідчують, що процеси утворення та відкладання імунних комплексів (ІК), а відтак і формування гіперімунокомплексного захворювання, залежать від рівня оксиду азоту (NO) в організмі та індукції активних форм кисню [200]. 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 [62, 84, 225, 244]. Тому імунорегуляторна роль оксиду азоту в імунокомплексних процесах та її вплив на міжклітинну кооперацію ефektorних і мішеневих клітин, за цих умов, стала об'єктом для більш ґрунтовного вивчення участі NO-залежних механізмів у розвитку лімфоцитарно-ендотеліальних взаємодій за умов хронічної гіперімунокомплексемії [258]. 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 L-аргініну в організмі [19, 123, 161]. Зміни в метаболізмі L-аргініну, особливо при інгібування його NO-синтазного шляху, можуть зумовити суттєві порушення у генетично обумовлених функціях імунокомпетентних клітин [30, 91, 218, 268].

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 і мембранопротекторів, здатні проявляти і селективну дію на популяції та субпопуляції імунокомпетентних клітин, що є особливо актуальним за умов гіперімунокомплексної патології. У плані корекції імунокомплексних захворювань перспективним є застосування біофлавоноїдів [210]. 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 індукцибельної NO-синтази, збереженням рівня оксиду азоту та модулюючою дією на його активні метаболіти [54, 87, 185, 189, 237, 264]. 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 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 ході виконання якої проведені дослідження ролі системи L-аргінін-NO-залежних механізмів лімфоцитів та ендотеліоцитів у розвитку ХГК на моделі хронічної сироваткової хвороби і вивчення впливу на ці механізми водорозчинної форми кверцетину – корвітину. В цих же умовах експерименту вивчено електронно-мікроскопічні зміни у структурі лімфоцитів і ендотеліоцитів та досліджено можливість корекції виявлених функціонально-морфологічних порушень корвітином. Тема дисертації затверджена Проблемною комісією “Патологічна фізіологія та імунологія” 26 січня 2006 року (протокол № 50).

**Мета роботи.** З’ясувати особливості NO-синтазного та аргіназного шляхів метаболізму L-аргініну у лімфоцитах та ендотеліоцитах за умов хронічної гіперімунокомплексемії та вивчити вплив 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 електронно-мікроскопічні 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); імунологічний (визначення вмісту ЦІК методом преципітації в ПЕГ, визначення активності системи комплементу); біохімічний (визначення ферментативної активності NO-синтаз – iNOS та cNOS, рівня стабільних метаболітів оксиду азоту –  $\text{NO}_2^-$  і  $\text{NO}_3^-$ , 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.** Внаслідок проведених експериментальних досліджень вперше виявлено вплив корвітину за умов *in vitro* на показники метаболізму L-аргініну у лімфоцитах та ендотеліоцитах інтактних і дослідних тварин при їх сумісній інкубації, що проявився його

селективним інгібуючим впливом на активність індуцибельної ізоформи NOS (iNOS) та зростанням конститутивної ізоформи NOS (cNOS), як у лімфоцитах, так і в ендотеліоцитах, і зумовило тенденцію до нормалізації всіх показників у цих тест-об'єктах. Уперше на основі отриманих результатів встановлено порушення процесів синтезу оксиду азоту, зокрема його NO-синтазного шляху в лімфоцитах та ендотеліоцитах за умов хронічної гіперімунокомплексної патології. Уперше встановлено, що розвиток хронічної гіперімунокомплексемії супроводжується зростанням рівня аргінази і вмісту сечовини у досліджуваних клітинах, що зумовлює активацію аргіназного шляху метаболізму NO. Встановлено, що за умов хронічної гіперімунокомплексемії, корвітин може виступати як інгібітор неокисного метаболізму L-аргініну по аргіназному шляху, внаслідок чого нормалізується окисний метаболізм L-аргініну по NO-синтазному шляху, за рахунок зменшення активності iNOS та нормалізації його cNOS і стабільних метаболітів оксиду азоту в лімфоцитах та ендотеліоцитах. Уперше показано 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 обґрунтовують 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 ім. Данила Галицького, кафедри 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 ім. І.Я. Горбачевського, на кафедрах патофізіології та ендокринології, клінічної імунології і алергології Донецького державного медичного університету ім. О.М. Горького, кафедрі клінічної імунології та алергології Київського національного медичного університету ім. О.О. Богомольця.

**Особистий внесок здобувача.** Дана 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. Виконання біохімічних досліджень – визначення активності ферментів NO-синтаз, вмісту нітрит- і нітрат аніонів, нітрозоглутатіону та рівнів аргінази і сечовини проведено 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 проведена статистична обробка результатів дослідження, аналіз і узагальнення отриманих даних, написання всіх розділів дисертації та підготовка публікацій до друку. Висновки і практичні рекомендації сформульовано разом з науковим керівником.

**Апробація результатів дисертації:** Основні положення дисертації представлені на науково-практичній конференціях: ”Стан і перспективи

розвитку медичної генетики, алергології, та клінічної імунології.“ (Львів-Трускавець, 2005), ”Сучасні методи діагностики та лікування алергічних 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). На Міжнародній науковій конференції “Імунодіагностика та імунотерапія ревматологічних хворих” (Львів, 2006), III 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 і конгресів та 1 деклараційний патент на корисну модель.

**РОЗДІЛ І**  
**НАУКОВІ ВІДОМОСТІ ПРО ОСНОВНІ ЛАНКИ ПАТОГЕНЕЗУ**  
**ХРОНІЧНОЇ ГІПЕРІМУНОКОМПЛЕКСЕМІЇ. РОЛЬ МЕТАБОЛІЗМУ**  
**L – АРГІНІНУ В ЛІМФОЦИТАРНО – ЕНДОТЕЛІАЛЬНИХ**  
**ВЗАЄМОДІЯХ.**

**1.1. Хронічний гіперімунокомплексний процес: клітинні основи та механізми розвитку**

Бурхливий розвиток цивілізації, особливо в останні десятиріччя, призвів до погіршення екологічної ситуації на нашій планеті. Дію різних шкідливих чинників, забруднення навколишнього середовища, а нерідко їх поєднаний вплив називають однією із найвагоміших причин зростання алергізації населення. Поширеність алергічних захворювань у різних країнах коливається від 20 до 35 % і, згідно прогнозів Європейської комісії з питань алергології, до середини ХХІ століття ці захворювання можуть уражити більш ніж 50 % населення нашої планети [35, 36, 141]. Цей тривожний прогноз обґрунтовано тим, що імунна система організму людини не завжди адекватно може прореагувати на постійне зростання антигенного навантаження та на динамічну зміну складу антигенів [5, 49, 50, 51, 160, 247]. Все це є сприятливим фоном для розвитку багатьох хвороб – інфекційних, запальних, онкологічних, алергічних, аутоагресивних. [3, 7, 8, 20, 34, 84, 116, 191]. У зв'язку із цим у практичній медицині виник ряд проблем, які потребують не лише поглиблених знань з клінічної імунології, але в першу чергу, чіткого розуміння їх патогенетичних механізмів.

Ще у 80-х роках минулого століття науковцями Лебером (P. Leber) та Мак Класкеєм (R. Mc.Cluskey) – в медичну термінологію було введено нову нозологічну форму захворювань – імунокомплексні, які є актуальною проблемою практичної медицини сьогодення [31, 201]. З'явився ряд нових

наукових напрямків із вивчення хвороб “іmunних комплексів“, оскільки перебіг алергічних реакцій, у розвитку яких беруть участь комплекси антиген-антитіло (АГ-АТ), розцінюється як основна патогенетична ланка багатьох захворювань.

Слід зазначити, що циркулюючі іmunні комплекси (ЦК) постійно утворюються і в здоровому організмі, як один із проявів нормальної імунологічної реакції. У кров'яному руслі постійно є присутній широкий спектр ЦК, що мають різну структуру і біологічну функцію [13, 24, 31, 56, 59, 180]. Індукторами утворення іmunних комплексів (ІК) являються всі екзо- і ендogenous антигени, що взаємодіють з специфічними рецепторами мембранних клітин [59, 63, 73, 74, 208]. Отже, утворення ІК є нормальним фізіологічним процесом, який спрямований на підтримку гомеостазу організму. Шляхом моделювання встановлено, що при еквімолярних співвідношеннях у плазмі АГ і АТ, циркулюючі іmunні комплекси преципітуються та елімінуються з кровоплину фагоцитами [36, 119, 163]. Проте у випадках, коли утворення ІК виходить з-під контролю і має прогресуючий характер, розвивається та чи інша імунокомплексна патологія [5, 110, 116, 206, 211]. Найчастіше ІК ініціюють патологічний процес у судинах, нирках, суглобах, рідше у легенях, печінці [24, 169, 213, 266]. При імунокомплексних захворюваннях розвивається 3 тій-тип імунопатологічних реакцій за класифікацією G.H. Gall, R.R Coombs: при первинному потрапленні в організм антигену, відбувається продукування АТ, найчастіше – імуноглобулінів класу G і M, які фіксуються на клітинних мембранах переважно опасистих, гладком'язових клітин і клітин шкіри. Цей процес – продукування і фіксації АТ – називається сенсibilізацією [36, 169, 248]. Піврозпад та елімінація імуноглобулінів становить в середньому 30-35 днів, і якщо за цей час не відбувається наступний контакт з АГ, АТ розпадаються, тобто захворювання не виникає. При повторному контакті організму з АТ утворюються ЦК [119]. Розміри, концентрація і час присутності у кров'яному руслі ЦК мають дуже велике значення [24, 70, 73, 85].



Найбільший вплив на структурні властивості ЦК має концентрація взаємодіючих АГ і АТ [24]. Концентрація ЦК залежить від швидкості їх утворення, кількості АТ, інтенсивності синтезу АТ, хімічних і фізичних властивостей АГ і АТ, а також швидкості елімінації з організму [16, 129, 144, 187]. Важливим показником патогенності ЦК вважається молекулярна маса. За умов більшої переваги концентрації АГ над концентрацією АТ, утворюються малі ЦК. Малі ЦК погано елімінуються, тривало персистують у циркуляції, і їх 90% кліренс відбувається 4 доби. Відкладаючись субендотеліально, ЦК не здатні активувати систему комплементу та без перешкод видаляються із організму через нирки [144, 145, 152]. Зростання надлишку АТ і наближення його до рівня рівноваги з концентрацією АГ продукує утворення ЦК середніх розмірів. ЦК середнього розміру мають високу комплементзв'язуючу здатність, вони погано фагоцитуються і незадовільно виводяться з організму, що і обумовлює їх патогенний потенціал [155, 160, 166]. Оптимальне співвідношення концентрацій АГ і АТ ініціює утворення великих ЦК, які упродовж години на 90% фагоцитуються і володіють обмеженою патогенністю [36, 59, 155].

У розвитку імунокомплексної патології велике значення має і тривалість персистенції антигену в організмі. Недовготривала його циркуляція, навіть при умові утворення ЦК, не приведе до пошкодження тканин, і клінічні прояви будуть транзитними. Тривала персистенція антигену в організмі формує умови для утворення патогенних ЦК і ураження тканин-мішеней [24, 83, 175, 191, 219, 253, 254].

Іще однією з важливих властивостей ЦК, що зумовлює їх роль у розвитку імунного запалення, крім здатності активувати систему комплементу є їх взаємодія з рецепторами до Fc-фрагменту, локалізованими на мембранах різних клітин [96, 111]. Наприклад, у нейтрофілах, після приєднання до них рецепторів ЦК, відбувається важлива перебудова апарату клітини, активується фагоцитоз [192, 196, 265]. Такий механізм активації нейтрофілів стимулює виділення основних білків, що мають здатність

підвищувати проникність капілярів, викликаючи дегрануляцію лаброцитів та вивільнення гістаміну [56]. Активація нейтрофілів таким шляхом (вивільнення лізосомальних ферментів, супероксиду, атомарного кисню і пероксидаз) є особливо патогенною, оскільки це приводить до пошкодження клітинних і тканинних структур [2, 62, 223, 234].

Взаємодія ІК з Fc-рецепторами тромбоцитів викликає аглютинацію, що супроводжується виділенням вазоактивних амінів та ініціює процеси зсідання крові [35, 86, 119].

Взаємодіючи з рецепторами лімфоцитів, ІК приймають участь у регуляції імунної відповіді [3, 17]; в малих концентраціях вони здатні викликати проліферацію В-лімфоцитів, а у великих – пригнічувати. Пригнічення імунної відповіді можливе також за рахунок підвищення активності Т-супресорів, під впливом великих концентрацій ІК, що в свою чергу приводить до пригнічення активності К- і НК- клітин [247, 251]. Отже, активність як Т-лімфоцитів, так і В-лімфоцитів, в яких наявні Fc-рецептори для імуноглобулінів, при взаємодії з цими рецепторами антитіл ІК може бути змінена, оскільки у деяких ситуаціях ІК мають причетність до пригнічення Т-лімфоцитів-хелперів [35].

Для імунокомплексних захворювань притаманне розгортання патологічного процесу в судинах мікроциркуляторного русла: в загальному кровоплинні, за наявності підвищеної концентрації ІК, або в судинах деяких органів (печінка, селезінка, нирки, легені, шкіра і т.п.) [104, 119]. Особливу увагу привертає вивчення ролі ІК в механізмах пошкодження судинного ендотелію [214, 258]. Так, порушення співвідношення між АГ і АТ ініціює надлишкове утворення ЦК, що веде до перенавантаження фагоцитарної системи та порушення її функції. Все це сприяє тривалій циркуляції ЦК у кровоплинні та їх посиленому відкладанню в судинному ендотелії різних органів і систем [199]. Фіксація ІК на рецепторах ендотеліальних клітин органів-мішеней викликає пошкодження і десквамацію ендотелію [63, 90]. Ці структурні ушкодження ендотелію полегшують процес проникнення ІК в

стілки судин тканин. Локалізація органів-мішеней обумовлена тими змінами, де до компонентів ІК є найбільше рецепторів, або там, де проходять інтенсивні процеси фільтрації (капіляри клубочків нирок, судинна система ока та ін.), або там, де фізіологічно наявний турбулентний рух крові [258].

Фіксація ЦК у мікроциркуляторному руслі веде до активації системи комплементу [36, 166] і є поштовхом до вивільнення прозапальних компонентів та стимуляцією продуктів системи ПОЛ [36, 83, 114, 174, 239].

Всі ці чинники призводять до пошкодження ендотелію судин. Ультраструктурні дефекти, внаслідок імунного запального процесу, ведуть до порушення основних фізіологічних функцій ендотелію: бар'єрної, обмінної, метаболічної, синтетичної, регуляторної, фібринолітичної і антикоагуляційної, а також активації механізмів імуноадгезії та ін. [27, 60, 163]. Цей далеко не повний перелік ілюструє функціональну багатозначність ендотеліальної поверхні в нормі та показує можливий вклад у патогенез захворювань, які пов'язані із пошкодженням судин [63, 143, 153, 225, 226, 231]. Тому більш глибоке вивчення ролі ЦК дозволяє не тільки краще зрозуміти основні клініко-патогенетичні закономірності розвитку імунокомплексного процесу, але й розширити межі імунокомплексної патології, включивши сюди ряд нових нозологічних форм.

## **1.2. Роль лімфоцитів в механізмі розвитку імунокомплексних реакцій**

Імунній системі, яку вважають мішенню впливу ендогенних та екзогенних факторів, надається особлива роль у збереженні динамічної рівноваги між довкіллям і організмом людини [49, 160]. Саме від стану імунної системи, її адаптаційних можливостей залежить адекватність реагування організму на генетично чужорідні агенти та вірогідність розвитку алергічних, інфекційних, аутоімунних і онкологічних захворювань [50, 68].

Отже, основне завдання імунної системи - розпізнавання збудника і відповідь на чужорідний антиген при будь-якій його локалізації [119].

Центральним елементом імунної системи є лімфоцити, оскільки їм належить провідна роль, як у природному, так і набутому імунітеті [173]. Таким чином, згідно гіпотези Чарльза Джанвея (2000), під імунітетом розуміють один із біологічних механізмів – (лімфоцитопосередкований) захисту багатоклітинних організмів від пошкоджень, нанесених різноманітними патогенами та травмами [131].

Відомо, що лімфоцити, як ключові елементи імунної системи, представлені двома великими популяціями – Т-клітинами і В-клітинами. Ці популяції займають різні ніші, контролюються різними механізмами і не конкурують між собою [58, 169].

Крім того, виділяють О- клітини, які не несуть маркерів Т- і В- лімфоцитів; D- клітини з поверхневими антигенами як Т-, так і В- лімфоцитів; К-клітини, які виконують антитілозалежний цитоліз, без участі комплементу, і НК-клітини – натуральні кілери, виконавці спонтанного, не опосередкованого антитілами лізису клітин-мішеней. Саме НК- клітинам належить вирішальна роль в протипухлинному імунітеті, не виключена і їх участь в елімінації старіючих клітин [109, 119, 212].

Місцем локалізації лімфоцитів є центральні і периферичні лімфоїдні органи, функція останніх полягає в об'єднанні лімфоцитів в особливі взаємодіючі системи та регуляції ефективності цієї взаємодії [172].

На межі коркової і мозкової речовини тимусу проходить поділ Т-лімфоцитів на дві основні популяції: Т-клітини-хелпери Т4 (CD4+-клітини), котрі розпізнають антиген з продуктами II класу HLA (на В- лімфоцитах, макрофагах та інших клітинах організму), і Т-лімфоцити, які несуть на своїй поверхні маркер CD8+ – кілери (цитотоксичні), та супресори, які “впізнають” антигени з продуктами I класу системи HLA на будь-яких клітинах організму [131, 133, 169, 190].

У процесі імунної відповіді нульові Т-клітини-хелпери (Th0), виходячи з тимусу, перетворюються в субпопуляції – Th1 і Th2, які різняться між собою медіаторами імунної відповіді та опосередковують реакції по клітинному (Th1) або гуморальному (Th2) типу. На відміну від Th1-клітин, які продукують в основному прозапальні цитокіни (ІФН $\gamma$ , ФНП $\alpha$ ), також ІЛ-2, дія медіаторів Th2- клітин (ІЛ-4,-5-6,-10, ФНП $\beta$ ) є протизапального характеру. Виділяючи різні набори цитокінів, Th1 і Th2- клітини не тільки стимулюють різні ефекторні механізми імунної відповіді, але і взаємно пригнічують активність один одного [36, 96, 97, 112, 169, 170]. Зміна субпопуляційного складу хелперних Т-лімфоцитів призводить до модифікації набору цитокінів, дисбалансу між рівнем цитокінів, що продукуються Th-1 і Th-2 типами клітин, і як наслідок – до дисбалансу в імунній системі. Цей дисбаланс між рівнем цитокінів може лежати в основі багатьох хвороб. На органному рівні – це є однією із причин розбалансування регуляції гомеостазу, що призводить до серйозних метаболічних порушень та зміни імунного статусу різних систем організму [142].

Система лімфоцитів з маркером CD8+ також диференційована на субпопуляції, з різними профілями продукованих ними цитокінів, які обумовлюють цитотоксичний ефект клітин-кілерів шляхом контактуючої взаємодії з мішенями або шляхом виділення цитокінів і екзоцитозу гранул [119]. Лізис клітин-мішеней проходить в результаті підвищення проникливості їх мембран і осмотичного набухання [65]. Окрема Т-цитотоксична клітина може викликати загибель клітин-мішеней протягом 3-4 годин [169]. При антигенній або мітогенній активації Т-лімфоцитів починається другий етап їх дозрівання і диференціації – складний процес розпізнавання антигенних детермінант, елімінації антигенів сенсibiliзованими лімфоцитами і регуляція імунної відповіді [36, 139, 219]. Т-кілери активуються або пригнічуються Т-супресорами.

Диференціювання і дозрівання В-лімфоцитів проходить у червоному кістковому мозку за участю стромальних клітин, макрофагів, дендритних

клітин і цитокінів (ІЛ-2, ІЛ-3, ІЛ-7, ІЛ-9 та ін.) Дозрівання В-лімфоцитів супроводжується появою мембранних імуноглобулінів, HLA-DR-антигенів і homing-рецепторів. Еміграція В-лімфоцитів проходить в основному в селезінку, більш зрілі клітини рециркулюють між периферичними лімфоїдними органами [36, 119, 156, 173, 216]. Після контакту з комплементарним антигеном диференціювання В-клітин приводить до утворення плазматичних клітин та клітин імунологічної пам'яті.

Хоч Т- і В- лімфоцити є морфологічно подібні, їх розрізняють за молекулярними основами розпізнавання антигенів та за виконанням ефекторних функцій в імунітеті [35, 72, 149, 172]. Тип рецепторів у кожного лімфоциту генетично запрограмований, але висловлюється припущення, що, можливо лімфоцити володіють унікальною здатністю формувати рецептори до антигенів не в результаті генетично заданої програми, а безперервно в ході імунної реакції, в процесі їх диференціювання і адаптації [139, 169].

Відомо, що будь-яке пошкодження тканини, незалежно від його природи, призводить до запалення [20, 83]. Ще на початку ХХ століття, у працях Давидовського І.В., було підкреслено, що “проблема запалення та імунітету близько дотичні між собою“, а на даний час запальні та імунні реакції розглядаються у нерозривній єдності [143].

В умовах пошкодження тканин, експресія адгезивних молекул на ендотелії і запальних клітинах крові є початковим етапом їх виходу у вогнище запалення. Саме здатність ендотеліальних клітин під впливом ІФНу до посилення експресії молекул клітинної адгезії забезпечує процес міграції імунокомпетентних клітин через ендотеліальний бар'єр у тканини, в яких розвивається запальний процес [138, 142, 143]. Проте надмірна і тривала активація адгезивних молекул на ендотелії і запальних клітинах крові сприяє персистенції запалення і підтримання хронізації його перебігу [178]. Активація ендотеліальних клітин та нейтрофілів пов'язана з раннім розвитком судинних змін, а прогресування цих змін супроводжується згуродженням Т-лімфоцитів та моноцитів. Ендотеліоцити під дією ФНПа

виділяють інтерлейкіни, які, зв'язуючись з ендотеліальною мембраною, посилюють активацію Т-лімфоцитів, що взаємодіють з ендотелієм у вогнищі запалення [183].

При імунологічному запальному процесі активовані ендотеліоцити можуть служити антигенпрезентуючими клітинами, бо експресують молекули МНС, котрі взаємодіють з CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Т-лімфоцитами в клітинно-опосередкованій відповіді [196]. За цих умов цитокини індукують секрецію антигенів МНС-1, для активації CD8<sup>+</sup> Т-лімфоцитів на поверхні ендотеліоцитів, що призводить до запальної відповіді, активації нейтрофілів та пошкодження ендотеліоцитів (мінється морфологія мембрани, організація клітинного матриксу та підвищується проникність судинної стінки) [190]. Додатково персистенція присутніх в інтимі антигенспецифічних Т-лімфоцитів підтримує запалення судинної стінки [209]. Акумуляція Т-лімфоцитів у пошкодженій тканині супроводжується підвищеною експресією хемоатрактантів: хемокінів, VCAM-1, ICAM-1, котрі опосередковують прикріплення нейтрофілів, моноцитів до запалених ендотеліальних клітин [122, 178].

Дослідження показали, що активація ендотеліоцитів цитокінами індукує експресію CD40- рецептора [182]. Трансмембранний білок (CD40) конститутивно експресований на ендотеліальних клітинах, і його експресія активується прозапальними цитокінами. Вивільнення розчинного ліганду CD40 – CD40sL стимульованими лімфоцитами та активованими тромбоцитами індукує запальну відповідь, за допомогою тригерної експресії IL-8, VCAM-1, ICAM-1 і MCP-1, котра служить хемоатрактантами в інтимі для циркулюючих лімфоцитів до ендотеліуму [37, 258]. Сигнал через CD40, завдяки CD40sL, експресованому на активованих CD40 лімфоцитах веде до підвищення експресії адгезивних молекул та вивільнення хемокінів, які є генеруючими сигналами для втягнення лейкоцитів в процес запалення [182]. Отже, взаємодія CD40 і CD40sL є дуже важлива у підтриманні активації

ендотеліоцитів та взаємодії з активованими Т-лімфоцитами для розгортання запалення.

Вважають, що взаємодія лімфоцитів із клітинами ендотелію судин через тригерну експресію адгезивних молекул і трансмембранних білків є ключовим моментом, що зумовлює нормальне або патологічне функціонування імунокомпетентних клітин і клітин ендотелію судин. У розшифруванні цих взаємодій – ключ до розуміння патогенезу і регуляції процесів запалення, а також лікування і профілактики гострих та хронічних запальних захворювань.

### **1.3. Фізіологічні та патологічні ефекти оксиду азоту в імунокомпетентних та ендотеліальних клітинах.**

#### **1.3.1. Регуляторна і дисрегуляторна роль оксиду азоту в імунокомпетентних клітинах при імунних та запальних процесах.**

Основною складовою виживання організму у зовнішньому середовищі є зміни імунної реактивності, в основі яких – процеси активації імунокомпетентних клітин [181, 247].

Останнім часом оксид азоту визнають одним із найбільш різносторонніх факторів, які проявляють свій регулюючий вплив на імунну систему, маючи дію як між, так і внутрішньоклітинної молекули, що запускає імунну відповідь [4, 12, 245]. NO втягується в патогенез і контроль інфекційних, пухлинних, аутоімунних процесів та хронічних дегенеративних захворювань [11, 118, 198, 246]. Проте на сьогоднішній день простої і однозначної картини впливу оксиду азоту на імунну систему немає. Часто захисна і токсична дія NO може спостерігатися одночасно [140].

Продукуючись цілим рядом клітин, які задіяні в імунних та запальних реакціях (макрофаги, дендритні клітини, лімфоцити, нейтрофіли, еозинофіли, моноцити, клітини Купфера, гепатоцити, мікроглія, ендотеліоцити,



епітеліоцити, фібробласти, шванівські клітини та ін.), оксид азоту відіграє роль ефектора в імунокомпетентних клітинах, впливаючи на процеси їх дозрівання, диференціювання, проліферації та апоптозу. Згідно даних ряду авторів [1, 57, 113], NO може активно впливати на: процеси селекції і розвитку Т-лімфоцитів в тимуса; міграцію та рециркуляцію лімфоцитів і рівновагу їх популяційно-клонального складу; підтримання балансу Т-хелперно-супресорної ланки імунної системи; сповільнення процесів вікової інволюції тимуса; сприяння продукції НК- клітинами ІФН $\gamma$  і підтримання їх цитолітичних властивостей; зменшення або збільшення синтезу цитокінів, тим самим стимулюючи або пригнічуючи цитотоксичну функцію імунокомпетентних клітин [1, 42, 58]. Питання синтезу первинними Т- і В-лімфоцитами NOS- ізоформ на даний час є відкритим. Алергічні та запальні процеси, обумовлені дією цитокінів, індукують підвищений NOS-залежний синтез NO в цілому організмі з переважанням індукцибельної ізоформи NOS [4, 29, 55, 132].

У ранній фазі імунної відповіді оксид азоту індукує ряд важливих ефекторних функцій у кооперації клітин імунної системи [132]. Активовані патогеном фагоцити виробляють прозапальні цитоїдини (ФНП $\alpha$ , ІЛ-12 та ін.), які, стимулюючи НК-клітини, починають синтезувати ІФН $\gamma$  [28, 212, 246, 255].

ФНП $\alpha$  і ІФН $\gamma$  являються промоторами іNOS в імунокомпетентних клітинах – продукований ними NO забезпечує кіллінг мікробних патогенів, проте надлишкова концентрація цього радикалу в НК- лімфоцитах погіршує їх функцію [76, 81]. Доказана здатність до переключання ІФН $\gamma$  програми Т-клітин від проліферації до апоптозу під впливом NO. Крім того оксид азоту здатний індукувати інтерферон-незалежний апоптоз Т- клітин – шляхом прямого впливу на проліферацію [44, 132].

Внаслідок значного зростання рівня NO в організмі пригнічуються: процеси міграції та рециркуляції лімфоцитів, експресія молекул МНС2, продукція імуноглобулінів і антитіл, проліферація Т- і В- лімфоцитів,

цитокінів і цілого ряду білків та ензимів, утворення різних молекул клітинної адгезії, таких, як: VCAM-1, ICAM- 1, E-селектин (CD62E) і P-селектин (CD62P) [57, 238]. Але практично немає відомостей про вплив NO на T- і B-клітинну адгезію.

Прогресування алергічного типу запалення пов'язують також із впливом підвищених концентрацій NO та його похідних на еозинофіли, внаслідок гальмування їх Fas-залежного апоптозу. В той же час індукція NO-нейтрофільного апоптозу в певній мірі сприяє зменшенню проявів алергічного запалення. Цитостатично-цитотоксичні ефекти оксиду азоту і пероксинітриту, зумовлені участю NO в процесі “респіраторного вибуху” макрофагів, сприяють більш активній елімінації інфекційних агентів.

У роботі [111] показаний вплив оксиду азоту на зміну субпопуляційного складу хелперних T-лімфоцитів, що призводить до модифікації набору цитокінів, які продукуються Th1-го і Th2- го типами клітин, і як наслідок – до виникнення якісного і кількісного дисбалансу в імунній системі. Наглядова функція T-лімфоцитів за цих умов знижується, а це призводить до “вислизання” з-під імунологічного нагляду трансформованих клітин, що є передумовою розвитку злоякісних захворювань [30, 111].

При пухлинному рості NK-лімфоцити використовують NO (або його похідні) для знешкодження бактерій та злоякісно перероджених клітин, проте надмірний синтез індукцибельної ізоформи та продуктів метаболізму NO викликаючи розбалансування і збій в імунитеті, знижує їх цитотоксичну здатність, запускаючи процеси передчасного апоптозу, а нерідко й некрозу [11].

При ряді імунних та запальних процесах експресія iNOS чітко корелюється з прогресуванням захворювання, що може вказувати на її аутоксичний і/або імуносупресивний ефект [132]. Нітрування білків при участі NO підвищує їх антигенність, що обумовлює важчий перебіг

аутоімунних процесів і обтяжує різноманітні прояви аутоімунного характеру [12, 18, 132].

Так, змодельоване експериментальним шляхом аутоімунне захворювання виявило значне підвищення продукції оксиду азоту з підвищенням вмісту  $\text{NO}_2^-$  і  $\text{NO}_3^-$  у крові [3]. Важке протікання склеродермії супроводжується зміною синтезу оксиду азоту [45]. У патогенезі ревматоїдного артриту також важливе значення надається впливу NO [46]. Активація iNOS опосередкована впливом цитокінів і ФНПа викликає цитотоксичний ефект в клітинах синовіального середовища суглобів [64].

Згідно даних [46], рівень нітритів/нітратів у хворих на ревматоїдний артрит підвищується незалежно від статі і прямо корелює із стадією захворювання, ЦІК та Ig G. Одночасно прослідковується і обернена кореляція з параметрами креатиніну і сечовини в крові.

Висока концентрація NO і продуктів його метаболізму встановлена у крові та спинномозковій рідині хворих на системний червоний вовчак (СЧВ) – у міру прогресування хвороби синтез оксиду азоту збільшується. Результатом цього є інгібування процесів проліферації та збільшення частоти апоптозу (внаслідок аберантності апоптичних сигналів) лімфоцитів і макрофагів, що ініціює розвиток вторинних імунодефіцитів [45, 77]. При СЧВ заслуговують на увагу дані про поліморфізм функціонального домену рецептора Fcγ R11a, зокрема, заміна аргініну на гістидин у положенні 131 впливає на метаболізм імунних комплексів і клінічну маніфестацію СЧВ [113].

Поряд із цитотоксичною дією NO є чимало прикладів, коли оксид азоту проявляє і цитопротекторну дію (зокрема, у В-лімфоцитах людини та культурах клітин *in vitro*, таких як спленоцити, еозинофіли, гепатоцити, ендотеліоцити) [132, 140, 165]. Захисний ефект NO на різні типи клітин, включаючи й імунокомпетентні, опосередковується через синтез цГМФ. Можливо, генерація цГМФ може активувати цГМФ – залежні протеїн-кінази, які в свою чергу, впливають на білки апоптичних каскадів (наприклад,

каспази, Bcl-2). У роботі [77] показано посилення експресії білків Bcl-2 – відомих проонкогенів, які здатні попереджувати апоптоз. Зацікавлення викликає і антиапоптотичний ефект NO, пов'язаний з інгібуванням каспаз. Активні форми NO, шляхом нітрузування SH-білкових груп, впливають на цистеїн, який є активним центром каспаз, що приводить до інгібування каспазного каскаду. В роботах деяких авторів [11, 57] наголошується на посилення експресії білків теплового шоку (Hsp), які є захистом для клітин при різноманітних стресах, антиапоптотична дія NO корелюється із збільшенням їх синтезу.

На сьогоднішній день майже немає даних про роль впливу аргіназного шляху метаболізму NO на функцію імунокомпетентних клітин. Фактом є те, що у активованих макрофагах та лімфоцитах паралельно із NO-синтазою активується аргіназа [137]. В таких умовах аргіназа може конкурувати із NO-синтазою за загальний субстрат аргінін і навіть інгібувати NO утворення.

Згідно даних [30], надмірний синтез аргінази в організмі корелюється із патологією, причому безпосередньо із її схильністю до хронізації процесу. Посилення продукції аргінази вносить дисбаланс у біосинтетику поліамінів, які шляхом нековалентної взаємодії з різними біомакромолекулами відіграють важливу роль у процесах проліферації всіх клітин організму ссавців. Порухений поліаміновий метаболізм може бути важливим фактором розвитку канцерогенезу, оскільки в пухлинних клітинах активність аргінази різко зростає. Рівень активації цих ферментів може бути використаним в якості маркера при ранній діагностиці злоякісних захворювань [158]. Зниження синтезу поліамінів приводить до інгібування росту метастазних пухлинних клітин *in vitro* та *in vivo* [30, 130].

Отже, можна допустити, що порушення рівноваги між двома шляхами – окисним (NO-синтазним) і неокисним (аргіназним) – призводить до суттєвих змін у генетично обумовлених функціях імунокомпетентних клітин, а на органному рівні – до змін імунного статусу різних систем організму.

Таким чином, вищенаведені дані є свідченням того, що роль системи L-аргініну при імунних та запальних процесах є досить неоднозначною і залежить від багатьох умов, а це обумовлює доцільність подальшого вивчення її як фізіологічних, так і патологічних ефектів в організмі.

### **1.3.2 Ендотелій, як регулятор імунних та запальних процесів, опосередкованих системою L-аргініну.**

Дослідження останніх років встановило, що призначення судинної системи не обмежується лише функцією транспорту крові, а клітини судинної стінки відіграють важливу роль у підтриманні гомеостазу організму та розвитку його захисних реакцій.

Оскільки клітини ендотелію виділяють велику кількість біологічно активних речовин у кров і оточуючі тканини, їх комплексно можна розглядати як активний ендокринний орган, найбільший в організмі, що дифузно розсіяний по всіх тканинах [41, 90, 163]. Різні морфо-функціональні особливості ендотелію обумовлені неоднаковими умовами гемодинаміки й метаболізму, тому він є істотно відмінним по формі, розмірах, функціях ядра та цитоплазми, а також типах рецепторів і ферментів внаслідок їх генетичної специфіки [60].

Особливо цікавими є відмінності між ендотеліальними вистилками вторинної лімфоїдної та нелімфоїдної тканин. Вторинна лімфоїдна тканина представлена високоендотеліальними венулами (ВЕВ) кубоподібної форми, що робить можливим експресію ряду молекул міжклітинної адгезії, які зв'язуючись із циркулюючими Т-лімфоцитами, направляють їх у лімфоїдну тканину [163]. Міграція лімфоцитів при гострих запальних реакціях, у різних лімфоїдних тканинах на ендотелії ВЕВ, регулюється іншими молекулами клітинної адгезії. За умов хронізації запального процесу, ендотелій навіть звичайних венул здатний метаморфозуватися у кубічний в ділянці запалення.

В ендотеліальних клітинах наявний стандартний для клітин набір органел і специфічні гранули – тільця Вейбеля-Палладе [163, 207, 231]. У тільцях виявлено гістамін, мультимери фактору Віллебранда, а в мембрані тілець – P-selectin (з класу адгезивних молекул) [90, 178].

Висока секреторна активність клітин судинної стінки дозволяє їм виконувати широкий спектр регуляторних впливів, як в самій судинній стінці, так і в крові: регуляція судинного тонуусу, гемостазу, імунної відповіді, міграції клітин крові, синтез факторів запалення та їх інгібіторів, бар'єрні функції. Отже, клітини ендотелію, завдяки їх розміщенню на межі між кров'ю та іншими тканинами, є відповідальними не лише за підтримання судинного гомеостазу, але й першими зустрічаються з агресивними проявами патологічного процесу [20, 78, 93, 95, 121, 244, 250, 258, 263].

Загальновідомим є той факт, що основою ушкодження різної етіології є запальний процес. Активованій за цих умов ендотелій виділяє медіатори запалення, що веде до припливу молекул клітинної адгезії. Багатостадійний етап адгезії є можливим завдяки експресії на ендотеліальних клітинах рецепторів для селектинів та інтегринів, які присутні у всіх імунокомпетентних клітинах [170]. Саме ця здатність ендотеліальних клітин під впливом їх активованого рецепторного апарату призводить до посилення експресії молекул клітинної адгезії і забезпечує процес міграції імунокомпетентних клітин через ендотеліальний бар'єр у тканини, в яких розвивається запальний процес [166, 167]. Ендотеліоцити виділяючи інтерлейкіни, посилюють активацію Т-лімфоцитів, які взаємодіють з ендотелієм у вогнищі запалення [168]. Наявність на ендотеліальних клітинах HLA-DR детермінант дозволяє експресувати на поверхні Ia-детермінанту, яка є сигнальною молекулою для Т-лімфоцитів при розпізнаванні антигену, особливо при зростанні антигенного навантаження та динамічній зміні їх складу. При надмірно тривалій та інтенсивній активації ендотеліоцити втрачають антиагрегаційні і протизапальні якості, створюють

протромбогенну поверхню і сприяють прогресуванню запалення, що в подальшому веде до розвитку дистрофічних і некротичних змін [153, 258].

Для імунотоксичного ушкодження притаманне розгортання запального процесу в основному у судинах мікроциркуляторного русла.

Опосередковані довготривалою персистенцією та субендотеліальним відкладенням, ІК здатні викликати пошкодження і десквамацію ендотелію. Ультраструктурні дефекти, внаслідок імунного запального процесу, є поштовхом до порушення основних фізіологічних функцій ендотелію: бар'єрної, обмінної, метаболічної, синтетичної, регуляторної, фібринолітичної і антикоагуляційної та ін. [14, 153, 163, 166, 171, 215].

Основною біохімічною ланкою реалізації всіх фізіологічних функцій ендотелію в організмі є система L-аргініну. Утворення NO ендотеліальними клітинами є важливим компонентом регуляції тонуусу кровоносних і лімфатичних судин [40, 87]. Утворюючись в ендотелії, NO дифундує в гладеньком'язеві клітини і викликає дилатацію судин через цГМФ-залежні механізми [217]. Судини малого калібру синтезують NO в більшій кількості, ніж великі, за рахунок чого забезпечується регуляція периферичного опору, артеріального тиску і розподілення току крові у судинах [60, 75]. Базальний рівень продукції NO є вищим у артеріях, ніж у венах [47]. Вплив NO на регуляцію ремоделювання судинної стінки пов'язують з його антимітогенними і антипроліферативними властивостями. Ендотеліальна ізоформа NOS забезпечує контрактильну функцію міокарда, збільшуючи релаксацію шлуночків і діастоли, а синтезований кардіоміоцитами NO контролює ізотропну і хронотропну відповідь на адренергічні і холінергічні стимули [79, 86, 87, 120, 159, 197].

Стосовно індукційної ізоформи NOS, то наявність її в клітинах ендотелію є непостійною і лише за умов патології її синтез значно зростає [79]. Так, гіпоксія стимулює синтез iNOS у гладеньком'язових клітинах дрібних судин, де в нормі вона не визначається, тяжка і хронічна форма

гіпоксії пригнічує синтез NO в ендотелії, сприяючи низці судинних порушень [222].

У процесі біотрансформації продуктів метаболізму NO (нітритів, нітратів, нітрозотіолів та ін.) синтезується оксид азоту, тому суттєві зміни в їхній концентрації є свідченням значних порушень у мікроциркуляції ділянки патологічного процесу [32, 107, 108]. Згідно отриманих даних [146] встановлено, що з віком значно зменшується вміст нітрит-аніона, очевидно, це пов'язане із зниженням активності eNOS. Активність iNOS з віком зростає, що може бути результатом надлишкової продукції та накопиченням у тканинах пероксинітриту в процесі старіння [262].

Дефіцит ендотеліальної NOS в умовах запального процесу пригнічує здатність прозапальних медіаторів подавляти експресію прозапальних генів, а саме транскрипційного фактора NF- $\kappa$ B, ініціюється взаємодія адгезивних молекул (ICAM-1, VCAM-1 і E-селектину) із лігандами, що унеможливило протистояння розвитку запалення [218]. Крім того, ФНПа може пригнічувати, або ж перекручувати судинні реакції за допомогою деяких механізмів: підвищення продукції супероксиданіону і активацію експресії проапоптозних генів, зменшення експресії субодиниць NO-синтази, що пов'язано із збільшенням iNOS в ендотелії і гладеньком'язових клітинах [168].

Хронічне пригнічення синтезу NO (у експерименті) провокує ранні прояви запальних змін у судинній стінці з різним ступенем вираженості і подальшим розвитком атеросклерозу [122].

Основним фактором запалення, що пошкоджує систему eNOS є оксидантний стрес. Збільшення за цих умов продукції вільних радикалів призводить до зниження синтезу NO і розвитку ендотеліальної дисфункції. Вільні радикали, особливо пероксиди, збільшуючи вміст внутрішньоклітинного кальцію, тим самим активуючи NOS, що приводить до синтезу високого рівня NO і, як наслідок до утворення ONOO<sup>-</sup>, і здатності індукувати апоптоз [198, 200, 226, 228]. Високі концентрації ONOO<sup>-</sup>



активуваючи окислення ЛПНЩ, тим самим запускають ще один механізм пошкодження системи ендотеліальної NOS [23, 134].

Суттєвим фактором ризику при атеротромботичних захворюваннях є обмежена доступність важливого для NOS кофактора – тетрагідробіпротерину ( $\text{BH}_4$ ), за відсутності достатньої концентрації якого міняються функції NO-синтаз у судинах [30].

Вважається, що ендотеліоцити також приймають участь в ініціації специфічної імунної відповіді через посередництво каскадних міжклітинних взаємодій, результатом чого є персистенція запалення, причому клітинний субстрат запалення регулюється аутокринно, паракринно і міжсистемно [182, 258]. Механізм впливу NO на протікання алергічного запального процесу включає його дію на ліберизацію гістаміну із небезпечних клітин, гістаміннезалежний та гістамінзалежний судинні ефекти [150]. Дія оксиду азоту на небезпечні клітини може бути обумовлена хімічною модифікацією протеїнів, що призводить до пригнічення викликаного антигеном дегрануляції і вивільненням медіаторів і цитокінів, включаючи гістамін [150, 263]. Стосовно судинного ефекту гістаміну, NO являється вторинним месенджером, який впливає і на супутні розлади гемостазу при алергічному запальному процесі (пригнічення стимульованого гістаміном синтезу ендотеліальними клітинами фактору Віллебранда) [236].

Першою реакцією на неадекватне підвищення судинного тону є збільшення продукції NO. Такі явища спостерігаються в патогенезі ранніх проявів артеріальної гіпертонії, легеневої гіпертензії, атеросклерозу, цукрового діабету, серцевої недостатності і дилатаційній кардіоміопатії. Проте, збільшення продукції NO, маючи важливе адаптативне значення для організму, може перетворюватись із ланки адаптації в патогенетичну і стати небезпечним пошкоджувальним фактором для організму [92, 197, 198, 252].

Не можна недооцінювати ролі NO при імунотоксичних захворюваннях. Дослідження, проведені впродовж останніх років, засвідчують, що процеси утворення і відкладання імунних комплексів (ІК)

також напряму залежать від рівня оксиду азоту в організмі [58]. Шляхом експерименту виявлено, що ураження судин легень і шкіри щурів, яке викликано імунними комплексами, зумовлене вивільненням надлишкової кількості NO [62]. Показано, що при хронічному гіперімунотоксичному процесі спостерігається зниження вмісту стабільного метаболіту оксиду азоту -  $\text{NO}_2^-$  у плазмі крові і нирках, а це передбачає можливість інтенсифікації при цій патології пошкоджувальної дії АФК, процесів адгезії і росту клітин [177, 199, 204]. Згідно даних [163], ЦК опосередковує синтез та виділення NO. Активація системи комплементу також корелюється із гіперпродукцією оксиду азоту, наслідком чого є збільшення на поверхні ендотеліоцитів генів, які кодують хемокіни – IL-8, MCP-1, RANTES [190, 192].

Отримані нами дані підтверджують можливість реалізації ефектів NO в ендотелії судин через NO-синтазний шлях метаболізму L-аргініну, а також ставлять в перспективі питання про принципово можливий і практично не вивчений аргіназний шлях метаболізму цієї амінокислоти, краще розуміння механізму яких дасть можливість реципрокної або синхронної модуляції цих двох шляхів.

У судинній стінці з віком спостерігається зниження як окисного – (NO-синтази), так і неокисного (аргіназа) шляхів перетворення аргініну [66, 81]. Причиною цих змін можуть бути вікові порушення в самих ендотеліоцитах, зменшення експресії генів, накопичення кальцію, оксидативний стрес, перебудова ліпідного складу мембран. Ці порушення вважають первинним чинником вік-залежної патології серцево-судинної системи [53, 66, 82, 229].

Як відомо, зменшення в судинах активності NO-синтази, а відтак і продукції NO, підвищує активність аргінази та сечовини, тобто змінюється баланс між окисним і неокисним шляхами метаболізму L-аргініну. Наслідком цього є порушення залежних від ендотелію дилататорних реакцій і підвищення судинного тону [115, 268].

Слід також відзначити, що переважаючим напрямком катаболізму аргініну в ендотеліальних клітинах є шлях орнітин/сечовина, в той час, як продукція оксиду азоту домінує лише в тому випадку, якщо клітини стимульовані цитокінами [30, 115]. Встановлено, що сечовина може регулювати активність багатьох ферментів, транспорт іонів через деякі канали і навіть експресію певних генів. Сечовина є інгібітором iNOS, ефективним “скавенжером” іонів заліза  $Fe^{2+}$ , що обумовлює її високу антиоксидантну активність [137]. У великих концентраціях сечовина володіє вазоконстрикторними властивостями [19] та може стимулювати проліферацію гладеньком’язових клітин судинної стінки. Можливо, підвищення рівня сечовини при зміні утилізації аргініну на неокисний шлях метаболізму має компенсаторне значення, враховуючи її відому антиоксидантну роль [176].

Таким чином, вищенаведені дані про механізми, які визначають розвиток ендотеліальної дисфункції, обумовлюють доцільність не тільки їх глибшого вивчення, але й потребують адекватної фармакологічної корекції, основні напрямки якої приведені в наступному розділі.

#### **1.4. Фармакологічні ефекти біофлавоноїдів в імунних та запальних процесах**

Не дивлячись на значні досягнення фундаментальної та прикладної імунології у вивченні природи та механізмів розвитку імунокомплексних захворювань, сучасні терапевтичні можливості лікування імунокомплексних захворювань є, на жаль, обмеженими. Цьому, в першу чергу, сприяє недостатнє вивчення механізмів патогенезу імунокомплексних захворювань і, як наслідок, неможливість виділення однорідних груп хворих [129]. Крім того, у хворих з одним і тим же імунопатологічним захворюванням, при подібній клінічній картині, виявляються різні зміни функції імунної системи

[50, 154]. За таких умов застосування певних імунних середників може давати лікувальний ефект або ж цього не буде [80, 85]. Тому завданням клінічної імунології сьогодення є індивідуалізація імуномодельючої терапії і нозологічної форми хвороби. Наукові розробки на сьогоднішній день характеризуються пошуком і вивченням середників з відносно селективною дією на популяції і субпопуляції імунокомпетентних клітин [6, 94]. У зв'язку з цим велике зацікавлення викликають нові препарати, які володіють властивостями антиоксидантів та мембранопротекторів. До них можна віднести також інгібітори ферменту 5-ліпоксигенази – ключового ферменту біотрансформації арахідонової кислоти за ліпоксигеназним шляхом метаболізму [105]. Результатом перетворення арахідонової кислоти під впливом 5- ліпоксигенази є утворення лейкотрієнів, основною біологічною функцією яких є індукція хемотаксису і хемокінез ПМЯЛ та підвищення проникливості судинної стінки, а це зумовлює їх виражені запальні властивості [102, 188]. Тому вплив на метаболізм і ефекти лейкотрієнів може бути одним із механізмів гальмування запального процесу, а синтез препаратів, які здатні пригнічувати ліпоксигеназний шлях метаболізму арахідонової кислоти, є одним із напрямків у створенні протизапальних препаратів нового покоління.

Флавоноїди є найбільш численною і розповсюдженою в природі активною групою природних антиоксидантів. По своїй будові вони є похідними фенолу і відносяться до групи поліфенолів. Основним джерелом флавоноїдів є рослинні продукти. Саме вираженою антиоксидантністю і обумовлена їх біологічна активність: протизапальна, антиалергічна, антивірусна, антиканцерогенна [151, 188, 193, 194]. Цей широкий спектр біологічних ефектів дає підстави розглядати флавоноїди як фармакологічний засіб для боротьби з оксидантним стресом на клітинному рівні [189] з подальшою перспективою терапевтичного застосування нетоксичних природних антиоксидантів при запальних, ішемізовано-реперфузійних, ендотоксинемічних та інших патологічних станах [15, 69, 102, 135, 195, 257].

У цьому плані увагу, як науковців так і лікарів-практиків, привертає кверцетин - натуральний екстракт із класу біофлавоноїдів. Антигістамінна дія кверцетину проявляється у гальмуванні синтезу ферментів, відповідальних за дегрануляцію опасистих клітин і викид гістаміну [54, 189]. Він блокує вироблення серотоніну і лейкотрієнів [54, 94], стабілізує клітинні мембрани [6, 117], інгібує ключовий фермент метаболізму арахідонової кислоти – 5- ліпоксигеназу [105].

Застосування кверцетину паралельно з базисною терапією інфаркту міокарда, при інфаркті міокарда на тлі метаболічного синдрому [103], сприяє істотному зменшенню як гемодинамічних порушень, так і об'єму некротичного ушкодження при гострій ішемії-реперфузії серця [102]. Його застосування у ранній та пізній після інфарктний період, покращує кардіогемодинаміку, поліпшує толерантність до фізичних навантажень у постінфарктний період. Цей ефект обумовлений мембраностабілізуючою дією препарату, що виражається у гальмуванні деградації мембранних фосфоліпідів і зменшення накопичення жирних кислот в ішемізованому міокарді, в інгібуванні активності ліпоксигеназ [88] та зниженні стаціонарного рівня циркулюючого метаболіту оксиду азоту –  $\text{NO}_2^-$  [105]. Це знаходить підтвердження у праці Караванської І.Л. із співавторами, де показано, що кверцетин нормалізує впливає на функціональну активність нейтрофілів і покращує фагоцитоз при гострому інфаркті міокарда [52].

Включення біофлавоноїду кверцетину до складу засобів комбінованої фармакотерапії онкохворих показало мембраностабілізуючий і антипроліферативний ефект препарату. Препарат пригнічує процеси перокисного окиснення ліпідів (ПОЛ), знижує продукцію цитотоксичного супероксиданіону, впливає на зміщення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги у хворих на рак у бік посилення активності антиоксидантної системи глутатіону, основою функціонування якої являється антиоксидантний захист і детоксикація перокисних сполук [243].

Застосування цього препарату при інфекційних станах, як із супутньою патологією органів травлення, так і без, знижує прояви ендогенної інтоксикації в організмі і проявляє гепатопротекторну дію [193, 241].

Володіючи протизапальною та протинабряковою дією, кверцетин бере участь в обмінних процесах, впливає на функціональні особливості судин різного типу (нормалізує калібр і прохідність мікросудин, підвищує артеріоловеноулярний коефіцієнт, збільшує число функціонуючих капілярів та знижує їх проникність, нормалізуючи реологічні властивості крові, сприяє усуненню сладж-синдрому) [52, 231, 235].

В роботі [237] акцентується позитивний ефект оксирутинів (в склад входить 3- гідроксилкверцетин) за умов хронічної венозної недостатності. Дослідження *in vivo* та *in vitro* показали, що оксирутини надають захисну дію навіть при пошкодженні ендотелію і, володіючи високою афінністю до ендотелію вен, нейтралізують активні форми кисню (АФК), тим самим сприяючи репарації ультраструктурних ушкоджень ендотелію, і навіть відновлюють до норми морфологічні зміни.

Кверцетину притаманні імуномодельючі властивості: підвищення неспецифічної резистентності організму [94, 183, 189, 210], зниження активації нейтральних протеїназ,  $\alpha$ 2- макроглобулінів [54] та дегрануляція нейтрофільних гранулоцитів [195], підвищення показників хемотаксису, збільшення рухливості нейтрофілів і їх здатності до фагоцитозу [195, 224] нормалізація активації субпопуляційного складу лімфоцитів та інгібування рівня їхньої активації [105]. Кверцетин блокує синтез ФНПа у синовіальній рідині хворих на ревматоїдний артрит, що призводить до гальмування утворення ІЛ- 8, відсутність цього медіатора знижує активність аутоімунного запального процесу [233]. Ця характеристика кверцетину, як імуномодулятора, робить можливим його успішне застосування при алергічних та імунокомплексних захворюваннях.

Протекторні властивості кверцетину являються важливим фактором впливу на синтез оксиду азоту. Кверцетин має здатність впливати як на експресію

мРНК індуцибельної NO-синтази [184, 185, 264], так і на активність самого ферменту [217]. Антиоксидантну дію кверцетину також пов'язують із здатністю впливати на рівень активних форм NO [13, 240]. В умовах окисного стресу кверцетин може виступати як інгібітор неокисного метаболізму L-аргініну по аргіназному шляху, внаслідок чого нормалізується окисний метаболізм L-аргініну по NO-синтазному шляху [38].

Таким чином, застосування такого поліфункціонального препарату, як кверцетин, та вивчення його нових фармакологічних ефектів, є актуальним та заслуговує експериментальних і клінічних розробок, оскільки це відкриває нові можливості у застосуванні цього препарату в лікуванні різноманітних захворювань, зокрема – хронічної імунокомплексемії.

Отже, узагальнивши доступні літературні дані, можна сміливо стверджувати, що підвищений вміст циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) відіграє провідну роль в патогенезі багатьох захворювань. Дуже велике значення у формуванні і протіканні патологічного процесу має їх концентрація, розмір, тривалість персистенції, реакція клітин-мішеней, співвідношення антигену до антитіла та функціональна активність імунокомпетентних клітин. Таким чином, підвищена персистенція ІК є не тільки основною патогенетичною ланкою багатьох захворювань, але і обумовлює різноманітність клініко-морфологічних проявів імунокомплексного захворювання. Тому з'ясування особливостей формування і протікання імунокомплексних захворювань та більш глибокі пізнання фізіологічних і патологічних ефектів оксиду азоту в імунокомпетентних та ендотеліальних клітинах сьогодні є необхідними в плані уточнення патогенезу алергічних, інфекційних, автоімунних та імунодефіцитних захворювань, контролю ефективності призначеної терапії і прогнозування перебігу недуги.

## РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 2.1. Об'єкти, етапи та умови проведення експерименту

Експериментальні дослідження, проведені на безпородних статевозрілих білих щурах-самцях, масою 200-250 г. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію. Наші дослідження проводилися в осінньо-зимовий період, беручи до уваги той факт, що показники імунної системи змінюються у відповідності до сезону. Всього в експерименті було задіяно 200 тварин.

У даній роботі нами використана класична модель хронічного гіперімунокомплексного процесу, запропонована Cochrane G., Koffer D [187]., у модифікації С. В. Willson et al [202] та посилання на праці попередніх досліджень Чоп'як В.В. [162].

Відомо, що багаторазове введення в організм розчинного антигену призводить до утворення циркулюючих імунних комплексів, які шляхом фіксації у мікроциркуляторному руслі викликають активацію комплементу, що спричиняє ряд каскадних міжклітинних взаємодій, результатом чого є персистенція запалення, причому клітинний субстрат запалення регулюється аутокринно, паракринно і міжсистемно.

Для відтворення моделі ХГК тваринам вводили один раз в тиждень у хвостову вену бичачий сироватковий альбумін (БСА) з розрахунку 100 мг/кг маси впродовж 12 тижнів. ХГК супроводжується збільшенням рівня ЦК у крові. За рівнем ЦК оцінювали розвиток хвороби.

Усі експериментальні тварини були поділені на 4 серії:

I серія – інтактні тварини, яким у хвостову вену кожні 7 днів впродовж 12 тижнів вводили фізіологічний розчин із розрахунку 100 мг/кг (50 тварин);

II серія – тварини із змодельованою і верифікованою лабораторними дослідженнями хронічною гіперімунокомплексемією, яким у хвостову вену



кожні 7 днів впродовж 12 тижнів вводили бичачий сироватковий альбумін із розрахунку 100 мг/кг (50 тварин).

III серія – інтактні тварини, яким вводили корвітин внутрішньоочеревинно в дозі 40 мг/кг маси тіла щура впродовж 10 днів (50 тварин);

IV серія – тварини із змодельованою і верифікованою лабораторними дослідженнями хронічною гіперімунокомплексемією, яким вводили внутрішньоочеревинно корвітин у дозі 40 мг/кг маси тіла щура впродовж 10 днів (50 тварин);

Дослідження *in vitro* проводилось у 8 серіях суспензії клітин лімфоцитів та ендотеліоцитів:

I серія - лімфоцити інтактних тварин, інкубовані без ендотеліоцитів (сумарно 20 тварин);

II серія - ендотеліоцити інтактних тварин, інкубовані без лімфоцитів (сумарно 20 тварин);

III серія - сумісна інкубація лімфоцитів та ендотеліоцитів інтактних тварин (сумарно 20 тварин);

IV серія - сумісна інкубація лімфоцитів та ендотеліоцитів інтактних тварин у присутності корвітину (сумарно 20 тварин);

V серія - лімфоцити тварин із змодельованою ХПК, інкубовані без ендотеліо (сумарно 20 тварин);

VI серія - ендотеліоцити тварин із змодельованою ХПК, інкубовані без лімфоцитів (сумарно 20 тварин);

VII серія - сумісна інкубація лімфоцитів та ендотеліоцитів тварин із змодельованою ХПК (сумарно 20 тварин);

VIII серія - сумісна інкубація лімфоцитів та ендотеліоцитів тварин із змодельованою ХПК в присутності корвітину (сумарно 20 тварин);

Тест-об'єктами наших досліджень служили лімфоцити периферичної крові щурів та ендотеліоцити черевної аорти. В усіх групах проведені дослідження показників синтазного та аргіназного шляху метаболізму оксиду азоту. Паралельно із дослідженнями, методом електронної мікроскопії,

вивчались ультраструктурні зміни у лімфоцитах периферичної крові та ендотеліоцитах черевного відділу аорти тварин.

Для проведення експериментів *in vitro* були використані лімфоцити периферичної крові і ендотеліальні клітини черевного відділу аорти білих щурів.

Отримані лімфоцити відмивали фізіологічним розчином і ресуспендували до робочих концентрацій ( $3 \cdot 10^6$ /мл) у 199 середовищі із 10% вмістом телячої ембріональної сироватки. Життєздатність клітин оцінювали за допомогою 0,1% розчину трипанового синього. Виділені ендотеліоцити відмивали 199 середовищем і доводили до концентрації  $3 \cdot 10^6$  в 1 мл у повному поживному середовищі. Клітини для інкубування підраховували в камері Горяєва.

Інкубацію лімфоцитів крові з ендотеліальними клітинами проводили в 24-лункових планшетах для культуральних досліджень в середовищі, яке складалося з 199 середовища та ембріональної телячої сироватки (20%). Клітини розділяли напівпроникними мембранами з діаметром пор  $3 \mu\text{M}$ , що дозволяло запобігти змішуванню клітин.

У кожен лунку планшети вносили по 200 мкл суспензії ендотеліоцитів ( $3 \cdot 10^6$ /мл) та лімфоцитів у співвідношенні 1:1. Клітини інкубували в термостаті при  $37^\circ\text{C}$  в атмосфері з 5%  $\text{CO}_2$  впродовж 1 год. При таких співвідношеннях і в умовах інкубування культура різних популяцій клітин є доброю моделлю для вивчення кооперативної взаємодії між цими клітинами, оскільки їх життєздатність становить від 83 до 96%.

Для з'ясування впливу корвітину на функціональну активність лімфоцитів та ендотеліоцитів інтактних тварин та тварин із змодельованою ХГІК у лунку планшети вносили по 200 мкл розчину корвітину в дозі  $1 \cdot 10^4$ /мл г/л.

Після інкубації у досліджуваних клітинах проводили визначення активності синтазу оксиду азоту, рівень стабільних метаболітів NO, вміст нітрозоглутатіону (GSNO), активність аргінази та сечовини.

Препарат корвітин розроблений в Україні (Київська медична академія

післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика та Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця і) і освоєний Борщагівським фармацевтичним заводом. Доза препарату складала 40 мг на кг маси тіла тварини, який вводили доочеревинно 1 раз на добу, курсом 10 днів. Підбираючи дозу препарату керувались даними літератури [52, 88].

Визначення досліджуваних показників проводили на 92 день від початку введення бичачого альбуміну і на 11 день від початку введення корвітину. Контрольним групам тварин вводили плацебо. Евтаназію тварин проводили шляхом декапітації з дотриманням Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1985).

## **2.2. Методи дослідження**

**2.2.1. Визначення циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові.** Рівень гіперімунокомплексемії визначали за вмістом циркулюючих імунних комплексів та комплементарною активністю сироватки крові [99]. Концентрацію ЦК визначали за допомогою методу селективної преципітації ЦК у присутності поліетиленгліколю (ПЕГ). Рівень "великих", "середніх" і "малих" ЦК у сироватці крові оцінювали з використанням різних концентрацій розчину ПЕГ-6000- 2%, 3,5%, 5% відповідно. 1 мл сироватки крові змішували з 1,2 мл боратного буфера (рН 8,4), перемішували та переносили по 0,3 мл в чотири пробірки. В одну з них додавали 2,7 мл 0,1% боратного буфера (контрольна проба), в наступні - по 2,7 мл розчину ПЕГ різних концентрацій (дослідні проби). Вміст ретельно перемішували і залишали на 1 год при кімнатній температурі. Результат оцінювали за допомогою ФЕК-2МП (Росія) при 450 мл. Отриманий підсумок множили на 1000, що виражало кількість ЦК в умовних одиницях.

Окрім цього, визначали концентрацію "середніх" ЦК із подальшим визначенням концентрації білка в преципітаті [73]. Після центрифугування крові 0,2 мл сироватки змішували з 3,8 мл 0,1М боратного буфера рН 8,41 і 2 мл 10,5% розчину ПЕГ-6000 в боратному буфері. Кінцева концентрація ПЕГ, при якій відбувається випадання ІК в осад, у досліджуваній сироватці становила 3,5%. Суміш інкубували 16 год. при 4° С, потім центрифугували 30 хв. при 3000 об/хв. Надосад зливали, преципітат ресуспендували і розчиняли в 5 мл дистильованої води. Концентрацію білка в розчині визначали за методом [180], використовуючи тест-системи фірми "Simko" (Україна), з наступним перерахунком концентрацій ЦК у досліджуваній сироватці за формулою:  $[ЦК] = E * 5 / 0,2$ , де E – оптична густина досліджуваної сироватки.

Для побудови калібрувальної кривої при визначенні концентрації білка застосовували кристалічний альбумін.

### **2.2.2. Визначення комплементарної активності сироватки крові.**

Принцип методу [99] полягає у визначенні гемолітичної активності комплементу за титром – найбільшим розведенням сироватки, яке забезпечує 50% гемоліз еритроцитів. Для постановки реакції готували гемсистему - суміш рівних об'ємів розведеної по 3-кратному титру гемолітичної сироватки і 3-5% завису еритроцитів барана. Гемсистему витримували 30 хв при 37° С для сенсibilізації еритроцитів.

Досліджувану сироватку, розведену 1:10, розливали в пробірки від 0,05 мл до 0,5 мл із різницею між дозами 0,05 мл. Сироватку доводили фізіологічним розчином до об'єму 1,5 мл, після чого в кожную пробірку додавали по 1,5 мл сенсibilізованих еритроцитів барана. Проби інкубували при 37°С 45 хв, після чого центрифугували 10 хв. при 1500 об/хв. Ступінь гемолізу визначали за допомогою ФЕК-2МП (Росія) при 540 нм. По екстинкції визначали відсоток гемолізу – за допомогою стандартної шкали.

За одиницю активності комплементу (СН50) – приймали ту концентрацію,

яка спричиняє 50% лізис 0,5 мл сенсibiliзованих еритроцитів.

**2.2.3. Виділення лімфоцитів.** Лімфоцити виділяли за загальновідомою [179] методикою з гепаринізованої цільної крові шляхом центрифугування в градієнті щільності фікол-верографіна з густиною 1,095 г/мл та 1,077. Нашаровану цільну кров, розведену 1:2 фізіологічним розчином та градієнт фікол-верографіну, центрифугували впродовж 40 хв при 1500 об/хв. Виділені клітини три рази відмивали середовищем 199 і ресуспендували в середовищі RPMI-1640, що містило 5% ембріональної телячої сироватки. Отриманий моношар лімфоцитів використовували для подальших досліджень.

**2.2.4 Виділення ендотеліоцитів.** Виділення клітин черевного відділу аорти проводили методом ферментативного диспергування [41].

Після декапітації тварин, швидко відпрепарували грудинно-черевний відділ аорти. Відпрепаровану черевну аорту щура завдовжки 2 см очищали від жирових наростів та промивали в охолоджену буфері Дюльбеко наступного складу (г/л): KCl - 0,20,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 0,20, NaCl - 8,0,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - 2,16, глюкоза – 1,98 (pH 7,4). Очищену судину розрізали навпіл по всій довжині, поміщали інтимальною поверхнею назовні на дно чашки Петрі (d=6см) та додавали 0,1 % розчин колагенази (Fluka Chemic A.S. Німеччина), приготовленої на буфері Дюльбеко. Інкубацію підготовленої таким чином аорти проводили при 37°C впродовж 1 год. Після цього в розчин колагенази з клітинами додавали 20% сироватки для інгібування ферменту і осаджували клітини центрифугуванням 10 хв при 1500 об/хв. Осаджені відмиті клітини ресуспендували в повному поживному середовищі і використовували для подальших досліджень.

**2.2.5. Визначення активності NO-синтаз.** Для оцінки активності NO-синтаз (Ca-залежної і Ca-незалежної) використовували класичний метод [249] пристосований до спектрофотометричного визначення одного з

продуктів реакції нітрит-аніону.

**2.2.6. Визначення активності сумарної конститутивної ( $\text{Ca}^{2+}$  - залежної) NO-синтази (cNOS).** Активність ферменту визначали колориметричним методом [249] у сироватці крові та в суспензіях клітин, які готували в середовищі, що містить 0,15M NaCl у 0,01M фосфатному буфері, pH=7,2. Визначення проводили в інкубаційній суміші (1 мл), що містила 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM NADPH, 0,22 mM L-аргініну. Реакцію запускали, додаючи до інкубаційної суміші 0,1 мл сироватки або суспензії клітин, що містять 100 мкг загального білка. Дослідні і контрольні проби інкубували при 37°C впродовж 60 хв, білок був попередньо денатурований 0,2 мл 2н  $\text{HClO}_4$ - Реакцію зупиняли, додаючи 0,2 мл 2н  $\text{HClO}_4$ . Денатурований білок осаджували центрифугуванням при 2500 об/хв впродовж 10 хв. У надосадковій рідині визначали вміст продуктів реакції – оксиду азоту (його стабільного метаболіту – нітрит-аніону  $\text{NO}_2$ ) за методом [244]. Розраховували питому активність NOS у пікомолях  $\text{NO}_2$ , який утворився за 1 хв в розрахунку на 1 мг загального білка проби.

**2.2.7. Визначення активності індукцйбельної ( $\text{Ca}^{2+}$  незалежної) NO-синтази (iNOS).** Методика визначення активності індукцйбельної NO-синтази аналогічна, як і для визначення сумарної конститутивної NO-синтази ) [249], за деякими відмінностями: для визначення активності  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежної NO-синтази в інкубаційну суміш замість  $\text{CaCl}$  додавали 2 мкмоль EDTA.

**2.2.8. Визначення вмісту нітрит-аніону ( $\text{NO}_2^-$ ).** Кількість  $\text{NO}_2^-$  визначали в безбілкових аліквотах сироватки крові і суспензій клітин (вміст білка 20-40 мг/мл), в колориметричній реакції за допомогою реактиву Грісса методом Гріна в модифікації Коцюруби А.В. та співав. [61, 205]. Реактив Грісса готували, змішуючи рівні частини 0,1% водного розчину нафтилетилендіамінгідрохлориду з 1% розчином сульфаніламіну в 5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$

безпосередньо перед визначенням. Визначення проводили в безбілкових аліквотах проб, які готували таким чином: до 0,5 мл зразка додавали 0,1 мл сульфосаліцилової кислоти, перемішували 1 раз через 5 хв. впродовж 30 хв., потім центрифугували при 10000g впродовж 10 хв. Надосадкову (кислоторозчинну фракцію, що містить  $\text{NO}_2^-$ ) нейтралізували 5% розчином  $\text{NaOH}$  та в її аліквоті визначали  $\text{MO}_2^-$ , додаючи реактив Грісса у співвідношенні 1:1. Величину екстинкції визначали спектрофотометрично при 543 нм через 5 хв. після змішування. Кількість  $\text{MO}_2^-$  розраховували за калібрувальною кривою, побудованою для стандартних розчинів  $\text{NaMO}_2$ .

**2.2.9. Визначення вмісту нітрат-аніону ( $\text{NO}_3^-$ ).** Кількість  $\text{NO}_3^-$  визначали в сироватці крові і суспензії клітин спектрофотометричним методом у модифікації Коцюруби А.В. [61, 177], де замість стрихніну використовували його гідроксильоване похідне – бруцин, що дозволило підвищити чутливість методу у 100 раз. Проби депротейнізували, додаючи до 0,5 мл сироватки крові або суспензії клітин (20-40 мг білка на мл) 0,25мл 2N  $\text{HClO}_4$ . Денатурований білок осаджували центрифугуванням при 2000 об/хв упродовж 15 хв. До 0,5 мл надосадкової фракції проб додавали 1,5 мл бруцинового реактиву. Бруциновий реактив готували, розчиняючи 60 мг бруцину (10,11-диметоксистрихнін) у 100 мл розведеної (2:1) сірчаної кислоти. У контрольні проби замість 0,5 мл безбілкової надосадкової фракції проб додавали 0,5 мл дистильованої води. Проби інкубували впродовж 10 хв. на водяній бані при 100°C. Проби швидко охолоджували і визначали екстинкцію при 405 нм. Кількість  $\text{NO}_3^-$  визначали за калібрувальною кривою, побудованою для стандартних розчинів  $\text{NaNO}_3$ .

**2.2.10. Визначення вмісту нітрозоглутатіону (GSNO).** Його вміст визначали за методом [203]. Загальний вміст нітрозотіолів визначали як різницю між вмістом  $\text{NO}_2^-$ -аніону після гідролізу S-N зв'язку іонами двоцвальної ртуті, які додавали в реактив Грісса, в білкових розчинах проб.

Гідроліз білкових розчинів проб здійснювали протягом ночі за наявності  $\text{Hg}^{2+}$ , після чого в гідролізат додавали рівний об'єм 1 N  $\text{HClO}_4$  для осадження білка, витримували на холоді, центрифугували для отримання безбілкових розчинів, в яких визначали вміст  $\text{NO}_2$ . Для визначення вмісту нітрозоглутатіону – низькомолекулярні нітрозотіоли (НМНТ/GSNO), в основному це нітрозоглутатіон (GSNO), визначали в білкових аліквотах проб (КРФ = кислоторозчинна фракція), як додатковий  $\text{NO}_2^-$  аніон після гідролізу S-N зв'язку ртуттю (нітрат ртуті) за формулою:  $\text{НМНТ} = \text{сумарний нітрит КРФ} - \text{вільний нітрит}$ .

**2.2.11. Визначення активності аргінази.** Аргіназну активність визначали спектрофотометричним методом [202]. по утворенню сечовини в інкубаційній суміші (1 мл), що містила L-аргінін і аліквоту проб у тріс- $\text{HCl}$  (Calbiochem) буфері (рН 8,0), як субстрат після інкубації протягом 60 хв. при 37 С. Реакцію зупиняли, додаючи 0,3 мл 2N  $\text{HClO}_4$ . Осад видаляли центрифугуванням і в над осадовій речовині визначали вміст сечовини, що утворилася.

**2.2.12. Визначення вмісту сечовини.** Вміст сечовини в інкубаційній суміші та безбілкових зразках проб визначали колориметричним методом за допомогою добірки реактивів (BIO-LA-TEST, MOKOVINA, "Lachema"(Чехія) та реактивів фірми "Філіст-Діагностика", (Україна) [98]. До суміші (1:1) розчинів диацетилмонооксима та тіосемикарбазида додавали 0,01 мл безбілкової проби. Отриману суміш витримували протягом 10 хв на киплячій водянній бані, охолоджували та фотометрували при  $\lambda = 500$  нм. Вміст сечовини розраховували, використовуючи оптичну густину калібрувальної проби.



**2.2.13. Визначення вмісту білка за Бредфордом.** Вміст загального білка в пробах визначали методом Бредфорда, використовуючи барвник Summasi – G-250 (Ferak, Німеччина) [180].

### **2.3. Електронно-мікроскопічні дослідження.**

**2.3.1. Забір аорти і проведення електронної мікроскопії.** Тваринам відразу після декапітації розтинали черевну порожнину і вирізали за допомогою леза черевний відділ аорти, яку поміщали у велику краплю 2% чотириокису осмію на 0,1М фосфатному буфері (рН 7,36). Після цього знежиреним в ацетоні лезом вирізали смужки досліджуваної тканини і швидко переносили їх в іншу краплю фіксуючого розчину того ж складу, поміщену на плитку зуболікарського воску, що лежала на льоду. Потім блоки тканин фіксували 2% розчином чотириоксиду осмію на 0,1М фосфатному буфері (рН 7,36) із сахарозою впродовж 2 год. на холоді. Після цього їх промивали буферним розчином цього ж складу (4 свіжі порції по 15 хв). Для підготовки до просмолення водорозчинними смолами відмиті від залишків фіксаторів блоки тканин проводили через етиловий спирт зростаючої міцності (схема проведення в розчинах етилового спирту: 40% - три свіжі порції по 10 хв.; 70% - три свіжі порції по 10 хв.; 96% - дві свіжі порції по 20 хв) і ацетон (схема проведення в ацетоні: ацетон марки "особливо чистий" - 6 свіжих порцій по 15 хв). Зневоднені шматочки поміщали у водорозчинну смолу епон-аралдіт наступного складу (Епон 812 5мл, аралдіт М - 3 мл, ВВ8А-11 мл, дибутил-фталат - 0,4 мл, ДМММП-30 - 15 крапель). Блоки тканин проводили через розчини смоли зростаючої концентрації (суміш ацетону і смоли у співвідношенні 3:1 - одна свіжа 51 порція на 2 години; суміш ацетону і смоли у співвідношенні 1:1- одна свіжа порція на 2 години; суміш ацетону і смоли у співвідношенні 1:3 - одна свіжа порція на 2 години; чиста смола - одна свіжа порція на 20 годин при кімнатній температурі). Потім блоки тканин поміщали в епон-аралдіт у желатинових капсулах. Полімеризацію матеріалу проводили ступінчасто при температурі 36, 45, 60°

С - упродовж 24 год. кожно.

Ультратонкі зрізи готували на ультрамікротомі УМТП-№ М за допомогою скляних ножів, виготовлених на приладі ССН-1. Для дослідження відбирали зрізи сріблястого або ніжно-лимонного кольору. Зрізи контрастували спочатку у 2% розчині уранілацетату, а потім - цитрату свинцю. Підготовлені зрізи переглядали в трансмісійному електронному мікроскопі УЭМВ-100К при напрузі 75 кV.

### **2.3.2. Забір лімфоцитів і проведення електронної мікроскопії.**

Виділені клітини фіксували в 2% розчині пропілен-осмію на 0,1М какодилатному буфері рН 7,2 протягом 2 годин на холоді. Після промивання зразки обезводнювали в зростаючих концентраціях етанолу (50°, 70°, 90° і абсолютній). Обезводнювали 2 рази в пропілен-оксиді і клали в епоксидну смолу "Епон 812". Після полімеризації блоків виготовляли зрізи за допомогою алмазного ножа "Diamone" на ультрамікротомі "УМТП-6". Зрізи контрастували в 2% уронілацитаті і в лимоннокислому свинці [179]. Підготовлені зрізи переглядали в трансмісійному електронному мікроскопі "ПЭМ-100" при напрузі 75кV, діафрагмі 30 мкМ. Фотографували на плівку FN-64.

## **2.4. Характеристика ключових механізмів біологічної дії досліджуваного середника**

Кверцетин – унікальна сполука рослинного походження, яка володіє широким спектром біологічної дії [188, 193, 194].

Його можна охарактеризувати як потужний антиоксидант, оскільки він блокує вільні радикали як ендогенного так і екзогенного походження, шляхом гальмування вільнорадикальної ліпопероксидації мембран, інгібуючи ключовий фермент метаболізму арахідонової кислоти – 5-ліпоксигеназу [105].

При застосуванні кверцетину істотно покращуються показники імунітету: підвищується кількість Т-лімфоцитів, число циркулюючих Т-хелперів/індукторів (CD4), нормалізується їх популяційний і молекулярний склад, підвищується фагоцитарна активність нейтрофільних гранулоцитів, знижується рівень ЦК [6, 95].

Антигістамінна дія кверцетину проявляється у гальмуванні синтезу ферментів, відповідальних за дегрануляцію опасистих клітин і викид гістаміну. Володіючи протизапальною та протинабряковою дією [15, 69, 102, 135, 195, 257] кверцетин бере участь в обмінних процесах, впливає на функціональні особливості судин різного типу (нормалізує калібр і прохідність мікросудин, підвищує артеріоловеноулярний коефіцієнт, збільшує число функціонуючих капілярів та знижує їх проникність; нормалізуючи реологічні властивості крові, сприяє усуненню сладж-синдрому) [52, 231, 235].

Ці особливості кверцетину і стали визначальними в доцільності його застосування для корекції функціонально-морфологічних порушень при хронічній гіперімунокомплексній патології. При проведенні досліджень в нашій роботі використана водорозчинна форма кверцетину – корвітин, розроблений і освоєний Борщагівським фармацевтичним заводом.

## **2.5. Статистична обробка результатів**

Статистичні дослідження проводили з допомогою програми Microsoft Excel, використовуючи персональний комп'ютер [67].

Отримані результати експериментальних даних оброблені методом варіаційної статистики у відповідності до сучасних вимог. Для обчислення абсолютних величин використаний критерій (t) Ст'юдента. За таблицею на підставі величини t визначили ймовірність відмінностей. Вірогідними вважали відмінності, у яких ймовірність статистичної похибки складала  $P < 0,05$ .

При оцінці достовірності відмінностей кількох серій спостережень, які проводилися в динаміці на одній і тій же групі тварин, користувалися методом відмінностей. Для цього визначалося середнє квадратичне відхилення таким чином: встановлювалася величина відхилення кожного з членів варіаційного ряду від середньої арифметичної. Знайдені відхилення підносилися до квадрату і сумувалися квадрати всіх відхилень. Отримана сума ділилася на число членів варіаційного ряду, зменшене на одиницю. А з отриманого результату добували квадратний корінь. Отримані результати порівнювали з таблицею, встановлювали рівень ймовірності “нульової гіпотези” (відсутність різниці між порівнюваними величинами)

З метою аналізу зв'язків між різними показниками проводилось порівняння їх для кореляційного аналізу [26].

**РОЗДІЛ 3**

**ХРОНІЧНИЙ ГІПЕРІМУНОКОМПЛЕКСНИЙ ПРОЦЕС:  
ХАРАКТЕРИСТИКА ПОКАЗНИКІВ NO-СИНТАЗНОЇ І АРГІНАЗНОЇ  
АКТИВНОСТІ В ЛІМФОЦИТАХ ТА ЕНДОТЕЛІОЦИТАХ БІЛИХ  
ЩУРІВ, ВПЛИВ КОРВІТИНУ НА ЦІ ПОКАЗНИКИ  
В УМОВАХ IN VITRO**

Результати дослідження даного розділу передбачають вивчення впливу показників обміну L-аргініну на лімфоцитарно-ендотеліальну взаємодію за умов норми та хронічної гіперімунокомплексемії.

Відомо, що умовах пошкодження тканин експресія адгезивних молекул на ендотелії і запальних клітинах крові є початковим етапом їх виходу у вогнище запалення, але при надмірно тривалій та інтенсивній активації веде до розвитку дистрофічних і некротичних змін у цих клітинах. Важливу роль в реалізації нормальної кооперації клітин в нормі і при патології відіграє система L-аргініну, під контролем якої знаходяться найважливіші імунні міжклітинні взаємодії, що складають суть функціонування імунної системи як фактору гомеостазу. Тому з'ясування цих механізмів розвитку і реалізації кооперативного процесу між лімфоцитами та ендотеліоцитами може привести до глибшого розуміння патогенезу і регуляції імунного запалення.

Для вивчення особливостей дії корвітину на два шляхи метаболізму оксиду азоту в умовах *in vitro* дослідження проведено як у контрольній групі тварин, так і у тварин із змодельованою хронічною гіперімунокомплексемією. NO-синтазну активність у лімфоцитах і ендотеліоцитах оцінювали за активністю ферментів конститутивної та індукційної NO-синтази, рівнем нітратів та нітритів і вмістом нітрозоглутатіону. Неокисний шлях синтезу NO у лімфоцитах та ендотеліоцитах оцінювали за активністю аргінази і вмістом сечовини, як кінцевого продукту аргіназної активності.

### **3.1. Особливості NO-залежних процесів у лімфоцитах і ендотеліоцитах тварин за умов норми та хронічної гіперімунокомплексемії, вплив корвітину на ці показники в умовах *in vitro***

Наведені в цьому підрозділі результати експериментальних досліджень дають змогу оцінити синтез оксиду азоту, показники активності NO-синтаз, рівень стабільних метаболітів NO ( $\text{NO}_2^-$  і  $\text{NO}_3^-$  – аніонів), нітрозоглутатіону (GSNO) в лімфоцитах і ендотеліоцитах тварин при їх ізольованій та сумісній інкубації за умов норми, хронічної гіперімунокомплексемії та з'ясувати особливості дії корвітину.

Внаслідок проведених досліджень встановлено, що присутність ендотеліальних клітин у інкубаційному середовищі за умов норми майже не впливає на NOS активність у лімфоцитах (таб. 3.1.). Свідченням цитотоксичної здатності лімфоцитів є вміст iNOS, однак при сумісній інкубації з ендотеліальними клітинами цей показник вірогідно зменшується на 23,53% до  $3,4 \pm 0,30$  ( $P < 0,05$ ), при цьому вміст фізіологічної - cNOS незначно зростає в 1,1 раза до  $22,57 \pm 2,94$  ( $P > 0,05$ ). Сумарна активність NOS у лімфоцитах за умов їх інкубації з ендотеліоцитами має лише тенденцію до зростання.

Отже, при дослідженні активності синтаз оксиду азоту у лімфоцитах інтактних тварин при їх інкубації без і в присутності ендотеліоцитів, значних змін їх активності не встановлено. Зменшення активності iNOS при інкубації з ендотеліоцитами компенсовано майже рівнозначним підвищенням активності cNOS.

Аналіз аналогічних досліджень у клітинах тварин із змодельованою хронічною гіперімунокомплексемією виявив дещо інші особливості ферментативної активності синтаз оксиду азоту в лімфоцитах (таб. 3.1.). Інкубація лімфоцитів в присутності ендотеліоцитів на сумарну активність NOS, по відношенні до контролю, майже не вплинула. Оцінка активності

ферментів оксиду азоту - iNOS та cNOS вказує на те, що рівень iNOS, як в інкубації без, так і в присутності ендотеліоцитів, збільшується: у порівнянні з контролем у 5,9 раза до  $3,4 \pm 0,30$  ( $P < 0,001$ ) та в 3,9 раза до  $2,60 \pm 0,21$  ( $P < 0,001$ ) відповідно, а cNOS істотно зменшується ( $P < 0,001$ ).

Таблиця 3.1.

**Показники NO - синтазної активності в лімфоцитах інтактних тварин і тварин із змодельованою хронічною гіперімунокомплексемією (ХГІК), після їх інкубації без і в присутності ендотеліальних клітин (пмоль/мг білка;  $M \pm m$ ;  $n=10$ )**

Умови досліджу	Умови інкубації					
	Інкубація без ендотеліоцитів			Інкубація в присутності ендотеліоцитів		
	NOS пмоль/мг білка	cNOS пмоль/мг білка	iNOS пмоль/мг білка	NOS пмоль/мг білка	cNOS пмоль/мг білка	iNOS пмоль/мг білка
<b>Контроль</b>	25,97±3,03	22,57±2,94	3,4±0,30	27,85±1,48	25,25±1,39	2,60±0,21
<b>P<sub>1</sub></b>	–	–	–	> 0,05	> 0,05	< 0,05
<b>Модель ХГІК</b>	26,10±1,23	7,16±0,62	18,94±1,16	21,38±1,67	11,22±1,04	10,16±1,01
<b>P<sub>2</sub></b>	–	–	–	< 0,05	< 0,01	< 0,001
<b>P<sub>1-2</sub></b>	> 0,05	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Примітка:(тут і в таб. 3.2.)

P<sub>1</sub> – вірогідність різниці показників сумісної інкубації без ендотеліоцитів і в їх присутності у контролі

P<sub>2</sub> – вірогідність різниці показників сумісної інкубації без ендотеліоцитів і в їх присутності у моделі

P<sub>1-2</sub> – вірогідність різниці показників сумісної інкубації без ендотеліоцитів і в їх присутності у контролі та моделі

Ферментативна активність NO (таб. 3.2.) характеризується незначним підвищенням рівня стабільних метаболітів оксиду азоту і вмісту

нітрозоглутатіону в інкубації, проведеній без і в присутності ендотеліальних клітин.

Таблиця 3.2.

**Показники вмісту стабільних метаболітів оксиду азоту та нітрозоглутатіону (GSNO) в лімфоцитах інтактних та дослідних тварин, після їх інкубації без і в присутності лімфоцитів. (пмоль/мг білка;  $M \pm m$ ;  $n=10$ )**

Умови досліджу	Умови інкубації					
	Інкубація без ендотеліоцитів			Інкубація в присутності ендотеліоцитів		
	$\text{NO}_2^-$ пмоль/мг білка	$\text{NO}_3^-$ нмоль/мг білка	GSNO пмоль/мг білка	$\text{NO}_2^-$ пмоль/мг білка	$\text{NO}_3^-$ нмоль/мг білка	GSNO пмоль/мг білка
<b>Контроль</b>	128,92±13,35	14,08±1,17	159,64±10,31	141,67±13,94	16,90±1,43	159,15±15,20
<b>P<sub>1</sub></b>	–	–	–	> 0,05	> 0,05	> 0,05
<b>Модель ХГІК</b>	26,97±2,13	3,08±0,30	11,16±0,99	32,24±3,14	12,44±1,01	22,67±2,01
<b>P<sub>2</sub></b>	–	–	–	> 0,05	< 0,001	< 0,001
<b>P<sub>1-2</sub></b>	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Дослідження інкубації лімфоцитів без ендотеліоцитів за умов ХГІК (таб. 3.2.) виявило наступні особливості: різке зниження вмісту  $\text{NO}_2^-$  - аніону у порівнянні з клітинами контролю на 79% до 128,92±13,35 пмоль/мг білка ( $P<0,001$ ), паралельно падає рівень  $\text{NO}_2^-$ , на 77,24% до 141,67±13,94 пмоль/мг білка ( $P<0,001$ ), стосовно сумісної інкубації з ендотеліоцитами. Показники рівня  $\text{NO}_3^-$  - аніону зазнають не настільки значних змін у порівнянні із  $\text{NO}_2^-$  - аніоном, лише в інкубації без ендотеліоцитів його рівень є понижений в 4,6 раза відносно контролю ( $P<0,001$ ). Паралельно із  $\text{NO}_2^-$  - аніоном спостерігається дуже різке зменшення вмісту GSNO у всіх досліджуваних тест-об'єктах. Так, при інкубації лімфоцитів без присутності



ендотеліальних клітин вміст GSNO знизився на 93% до  $159,64 \pm 10,31$  пмоль/мг білка ( $P < 0,001$ ), інкубація в присутності ендотеліаліоцитів показала зниження на 85,5% до  $159,15 \pm 15,20$  пмоль/мг білка ( $P < 0,001$ ). Показник сумарної активності NOS за цих умов залишився майже без змін.

Таблиця 3.3.

**Активність синтаз оксиду азоту в ендотеліоцитах інтактних тварин і тварин із змодельованою хронічною гіперімунокомплексемією (ХГІК), після їх інкубації без і в присутності лімфоцитів (пмоль/мг білка;  $M \pm m$ ;  $n=10$ )**

Умови досліджу	Умови інкубації					
	Інкубація без лімфоцитів			Інкубація в присутності лімфоцитів		
	NOS пмоль/мг білка	cNOS пмоль/мг білка	iNOS пмоль/мг білка	NOS пмоль/мг білка	cNOS пмоль/мг білка	iNOS пмоль/мг білка
<b>Контроль</b>	$14,06 \pm 2,02$	$12,73 \pm 1,97$	$1,32 \pm 0,29$	$29,76 \pm 2,27$	$26,98 \pm 2,20$	$2,77 \pm 0,27$
<b>P<sub>1</sub></b>	–	–	–	$< 0,001$	$< 0,001$	$< 0,001$
<b>Модель ХГІК</b>	$10,72 \pm 1,52$	$7,92 \pm 1,35$	$2,79 \pm 0,48$	$23,22 \pm 2,13$	$20,11 \pm 2,02$	$3,11 \pm 0,30$
<b>P<sub>2</sub></b>	–	–	–	$< 0,001$	$< 0,001$	$> 0,05$
<b>P<sub>1-2</sub></b>	$> 0,05$	$< 0,01$	$< 0,05$	$> 0,05$	$< 0,05$	$> 0,05$

Примітка: (тут і в табл. 3.4.)

P<sub>1</sub> – вірогідність різниці показників сумісної інкубації без лімфоцитів і в їх присутності у контролі

P<sub>2</sub> – вірогідність різниці показників сумісної інкубації без лімфоцитів і в їх присутності у моделі

P<sub>1-2</sub> – вірогідність різниці показників сумісної інкубації без лімфоцитів і в їх присутності у контролі та моделі

Активність синтаз оксиду азоту при інкубації без лімфоцитів і в їх присутності за умов норми (таб. 3.3.) є наступною: найбільші зміни

торкаються cNOS, активність якої в інкубації з лімфоцитами зросла у 2,1 рази ( $P < 0,001$ ), паралельно з цим зростає майже у 2 рази рівень iNOS та NOS ( $P < 0,001$ ). За умов ХГІК активність синтаз оксиду азоту у ендотеліальних клітинах (таб. 3.3.) після їх інкубації без і в присутності лімфоцитів зростає у всіх тест-об'єктах. За цих умов по відношенні до контролю спостерігаються наступні зміни: незначно знижується рівень NOS ( $P < 0,05$ ) більш істотно – cNOS ( $P < 0,001$ ), зі сторони iNOS – незначне зростання ( $P < 0,05$ ).

Рівень метаболітів нітрит- і нітрат-аніонів та вміст нітрозоглутатіону (таб. 3.4.) у ендотеліоцитах інтактних тварин після їх інкубації без і в присутності лімфоцитів є різноспрямованим. Підвищення активності спостерігається у наступних тест-об'єктах: рівень NOS зростає в 2,1 раза до  $14,06 \pm 2,02$  ( $P < 0,001$ ), активність  $\text{NO}_3^-$  в 1,4 раза до  $10,69 \pm 1,40$  ( $P < 0,08$ ), паралельно із цим вміст GSNO зріс незначно ( $P > 0,05$ ). Тільки зі сторони  $\text{NO}_2^-$  спостерігається тенденція до зниження на 16,7% до  $278,49 \pm 38,45$  ( $P > 0,05$ ).

Стосовно аналогічних досліджень за умов ХГІК прослідковується підвищення у всіх показниках. Значно зростає рівень NOS,  $\text{NO}_3^-$  та GSNO, а саме: NOS в 2,2 раза до  $10,72 \pm 1,52$  ( $P < 0,001$ ),  $\text{NO}_3^-$  та GSNO майже в 4 рази ( $P < 0,001$ ). По відношенні до контрольного рівня спостерігається пониження даних показників, особливо при інкубації без лімфоцитів ( $P < 0,001$ ), а стосовно вмісту GSNO – різке інгібування. Нітрозоглутатіон при інкубації ендотеліоцитів в цих умовах знизився на 90% до  $129,73 \pm 10,14$  нмоль/мг білка ( $P < 0,001$ ), а в умовах сумісної інкубації з лімфоцитами на 63,8% до  $134,56 \pm 11,02$  нмоль/мг білка ( $P < 0,001$ ).

Присутність корвітину за умов сумісної інкубації лімфоцитів та ендотеліоцитів (таб. 3.5.) інтактних тварин привела до пониження рівня iNOS, та зростання показників NOS і cNOS у лімфоцитах. Стосовно інкубації ендотеліоцитів з лімфоцитами, за даних умов, прослідковується незначне пониження у всіх тест-об'єктах NOS і cNOS ( $P > 0,05$ ), та істотне для iNOS ( $P < 0,05$ ).

Таблиця 3.4.

**Показники вмісту стабільних метаболітів оксиду азоту та нітрозоглутатіону (GSNO) в ендотеліюцитах інтактних та дослідних тварин, після їх інкубації без і в присутності лімфоцитів. (пмоль/мг білка;  $M \pm m$ ;  $n=10$ )**

Умови досліджу	Умови інкубації					
	Інкубація без лімфоцитів			Інкубація в присутності лімфоцитів		
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> пмоль/мг білка	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> нмоль/мг білка	GSNO пмоль/мг білка	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> пмоль/мг білка	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> нмоль/мг білка	GSNO пмоль/мг білка
<b>Контрольні тварини</b>	278,49±38,45	10,69±1,40	129,73±10,14	232,08±20,16	14,83±1,77	134,56±11,02
<b>P<sub>1</sub></b>	–	–	–	> 0,05	0,08	> 0,05
<b>Дослідні тварини</b>	123,33±12,83	3,67±0,58	12,72±1,02	145,86±14,23	13,29±1,40	48,76±4,28
<b>P<sub>2</sub></b>	–	–	–	> 0,05	< 0,001	< 0,001
<b>P<sub>1-2</sub></b>	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	> 0,05	< 0,001

Проведені дослідження сумісно інкубованих клітин у тварин з ХГК (таб. 3.5) показали, що для сумісної інкубації лімфоцитів з ендотеліюцитами характерне різке підвищення, в 3,9 раза до  $2,60 \pm 0,21$  ( $P < 0,001$ ), рівня iNOS, натомість показник сумарної NOS понизився на 23% до  $27,85 \pm 1,48$  ( $P < 0,001$ ). Значно більшого інгібування зазнає активність cNOS – на 55,6% до  $25,25 \pm 1,39$  ( $P < 0,05$ ). При додаванні корвітину в моделі – показники сумісної інкубації лімфоцитів з ендотеліюцитами стають різноспрямованими. Так, хоч і зростають показники cNOS, але цей рівень не досягає контролю. Проте на 71% до  $10,16 \pm 1,01$  ( $P < 0,001$ ) інгібований рівень iNOS, що майже зрівняло його показник з вихідним ( $P < 0,05$ ). Рівень сумарної NOS за цих умов понизився неістотно ( $P > 0,05$ ).

Таблиця 3.5.

**Вплив корвітину на активність синтаз NO в лімфоцитах і ендотеліоцитах інтактних інтактних тварин і тварин із змодельованою хронічною гіперімунокомплексемією (ХГІК), в умовах інкубації *in vitro* (пмоль/мг білка;  $M \pm m$ ;  $n=10$ )**

Умови досліджу	Клітини, що інкубувалися	Досліджувані клітини	NOS, пмоль за хв./мг білка	eNOS, пмоль за хв./мг білка	iNOS, пмоль за хв./мг білка
Контроль	Лімфоцити + ендотеліоцити	Лімфоцити	27,85±1,48	25,25±1,39	2,60±0,21
		Ендотеліоцити	29,76±2,27	26,98±2,20	2,77±0,27
	Лімфоцити + ендотеліоцити + корвітин	Лімфоцити	29,68±2,47*	28,60±2,45*	1,08±0,08*
		Ендотеліоцити	24,38±2,38*	22,57±2,25*	1,81±0,18*
Модель ХГІК	Лімфоцити + ендотеліоцити	Лімфоцити	21,38±1,67	11,22±1,04	10,16±1,01
		Ендотеліоцити	23,22±2,13	20,11±2,02**	3,11±0,30
	Лімфоцити + ендотеліоцити + корвітин	Лімфоцити	18,47±1,20**	15,51±1,16**	2,96±0,26**
		Ендотеліоцити	23,11±2,77	21,31±2,67	1,80±0,16**

Примітка: тут і в таб. 3.6.

\* – вірогідна різниця показників сумісної інкубації лімфоцитів і ендотеліоцитів та їх інкубації в присутності корвітину в інтактних тварин

\*\* – вірогідна різниця показників сумісної інкубації лімфоцитів і ендотеліоцитів та їх інкубації в присутності корвітину в модельних тварин

Стосовно сумісної інкубації ендотеліальних клітин з лімфоцитами (таб. 3.5.), то за умов хронічної гіперімунокомплексної патології спостерігаються

незначні зміни у показниках NOS та cNOS, активність iNOS збільшена в 1,1 раза до  $2,77 \pm 0,27$  ( $P > 0,05$ ). Ферментативна активність синтаз NO та сумарної NOS в присутності корвітину є наступною: показник NOS залишився без змін, в той же час cNOS незначно збільшилася ( $P > 0,05$ ) і майже досягнула рівня контролю. Активність патогенної iNOS понизилась на 42% до  $3,11 \pm 0,30$  ( $P < 0,001$ ) і досягла вихідного рівня.

Таблиця 3.6.

**Вплив корвітину вміст стабільних метаболітів NO в лімфоцитах і ендотеліоцитах інтактних і дослідних тварин в умовах інкубації in vitro. (пмоль/мг білка;  $M \pm m$ ; n=10)**

Умови досліджу	Клітини, що інкубувалися	Досліджувані клітини	NOS, пмоль за хв./мг білка	$\text{NO}_2^-$ пмоль за хв./мг білка	$\text{NO}_3^-$ нмоль за хв./мг білка
Контроль	Лімфоцити + ендотеліоцити	Лімфоцити	$27,85 \pm 1,48$	$141,67 \pm 13,94$	$16,90 \pm 1,43$
		Ендотеліоцити	$29,76 \pm 2,27$	$232,08 \pm 20,16$	$14,83 \pm 1,77$
	Лімфоцити + ендотеліоцити + корвітин	Лімфоцити	$29,68 \pm 2,47^*$	$103,40 \pm 12,53^*$	$25,52 \pm 2,76^*$
		Ендотеліоцити	$24,38 \pm 2,38$	$245,22 \pm 18,61$	$15,38 \pm 1,12$
Модель ХГІК	Лімфоцити + ендотеліоцити	Лімфоцити	$21,38 \pm 1,67$	$32,24 \pm 3,14$	$12,44 \pm 1,01$
		Ендотеліоцити	$23,22 \pm 2,13$	$145,86 \pm 14,23$	$13,29 \pm 1,40$
	Лімфоцити + ендотеліоцити + корвітин	Лімфоцити	$18,47 \pm 1,20^{**}$	$73,01 \pm 6,98^{**}$	$16,68 \pm 1,82$
		Ендотеліоцити	$23,11 \pm 2,77$	$74,37 \pm 6,15^{**}$	$16,92 \pm 1,61$

Особливості впливу корвітину на синтез стабільних метаболітів NO за умов норми представлені у (таб. 3.6.). Як впливає із отриманих даних, при сумісній інкубації лімфоцитів з ендотеліоцитами зі сторони NOS спостерігається лише тенденція до підвищення, показник  $\text{NO}_3^-$  зростає у 1,5 раза до  $16,90 \pm 1,43$  пмоль/мг білка ( $P > 0,05$ ), незначно понизився і рівень  $\text{NO}_2^-$  ( $P < 0,05$ ). Стосовно інкубації ендотеліоцитів з лімфоцитами, то, за даних умов, активність сумарної NOS неістотно понизилася ( $P < 0,05$ ), а показники рівнів  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  незначно зростають ( $P > 0,05$ ).

При сумісній інкубації лімфоцитів і ендотеліоцитів модельних тварин (таб. 3.6.) спостерігається незначне пониження у лімфоцитах рівня  $\text{NO}_3^-$  ( $P < 0,05$ ) та показника сумарної активності NOS ( $P < 0,05$ ). Значно інгібований рівень  $\text{NO}_2^-$  – на 77% відносно контролю ( $P < 0,001$ ).

Додавання до інкубаційного середовища корвітину зрівняло показник  $\text{NO}_3^-$  з вихідним рівнем контролю. Рівень  $\text{NO}_2^-$ , хоч і зростає в 2,3 раза, але на 48,5% є нижчим від контрольного ( $P < 0,001$ ), щодо активності сумарної NOS, то за цих умов її показник понижений в 1,6 раза до  $29,68 \pm 2,47$  ( $P < 0,05$ ). Що стосується ендотеліоцитів, то в цих клітинах за умов ХГК при їх сумісній інкубації з лімфоцитами (таб. 3.6.) спостерігається зниження рівнів  $\text{NO}_2^-$  і  $\text{NO}_3^-$  та сумарної активності NOS у тест-об'єктах. Найбільш знизився рівень  $\text{NO}_2^-$ , на 37,2% до  $232,08 \pm 20,16$  пмоль/мг білка ( $P < 0,01$ ).

Інкубація ендотеліоцитів з лімфоцитами при наявності в середовищі корвітину (таб. 3.6.), виявила наступні зміни у ферментативній активності метаболітів: значне зниження вмісту  $\text{NO}_2^-$ , на 49% до  $145,86 \pm 14,23$  пмоль/мг білка ( $P < 0,001$ ). Рівень  $\text{NO}_3^-$  у ендотеліоцитах в присутності корвітину незначно підвищився в 1,3 раза до  $13,29\% \pm 1,40$  пмоль/мг білка ( $P < 0,05$ ), проте це підвищення було недостатнім у порівнянні з аналогічними показниками при інкубації клітин без корвітину.

Дослідження впливу корвітину (рис.3.1.) на співвідношення величин cNOS/iNOS у лімфоцитах інтактних тварин (інкубованих окремо і в

присутності ендотеліальних клітин) показали, що сумісна інкубація приводить до підвищення даних величин у 1,5 раза до  $6,91 \pm 0,83$  ( $P < 0,05$ ).

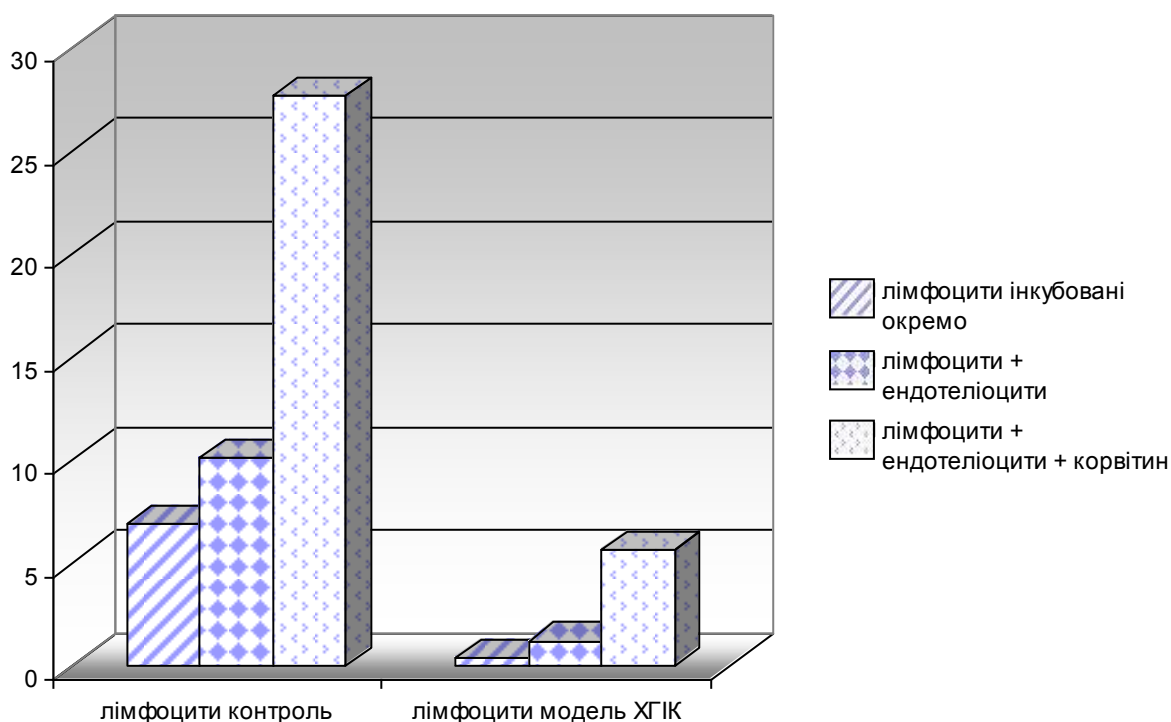


Рис. 3.1. Вплив корвітину на показники співвідношень cNOS/iNOS у лімфоцитах контрольних і дослідних тварин до і після їх інкубації з ендотеліоцитами.

Сумісна інкубація в присутності корвітину привела до збільшення даного показника у 2,7 раза до  $10,08 \pm 0,69$  ( $P < 0,05$ ), що в 1,9 раза перевищило вихідний рівень контролю ( $P < 0,05$ ). Вихідний рівень співвідношення величин у лімфоцитах тварин за умов ХГК по відношенні до контролю понизився на 94,4% пмоль/мг білка ( $P < 0,05$ ). Сумісна інкубація лімфоцитів з ендотеліоцитами на тлі ХГК показала підвищення співвідношень cNOS/iNOS у 3 рази до  $0,39 \pm 0,04$  ( $P < 0,05$ ), проте цей показник на 88% був нижче вихідного контрольного рівня. Додавання корвітину в інкубаційне середовище привело до зростання даних співвідношень у 4,7 раза до  $1,20 \pm 0,17$  ( $P < 0,05$ ), але це зростання було недостатнім для нормалізації величин

cNOS/iNOS, оскільки пониження відносно вихідного рівня становило - 79,7% до  $27,69 \pm 2,74$  ( $P < 0,05$ ).

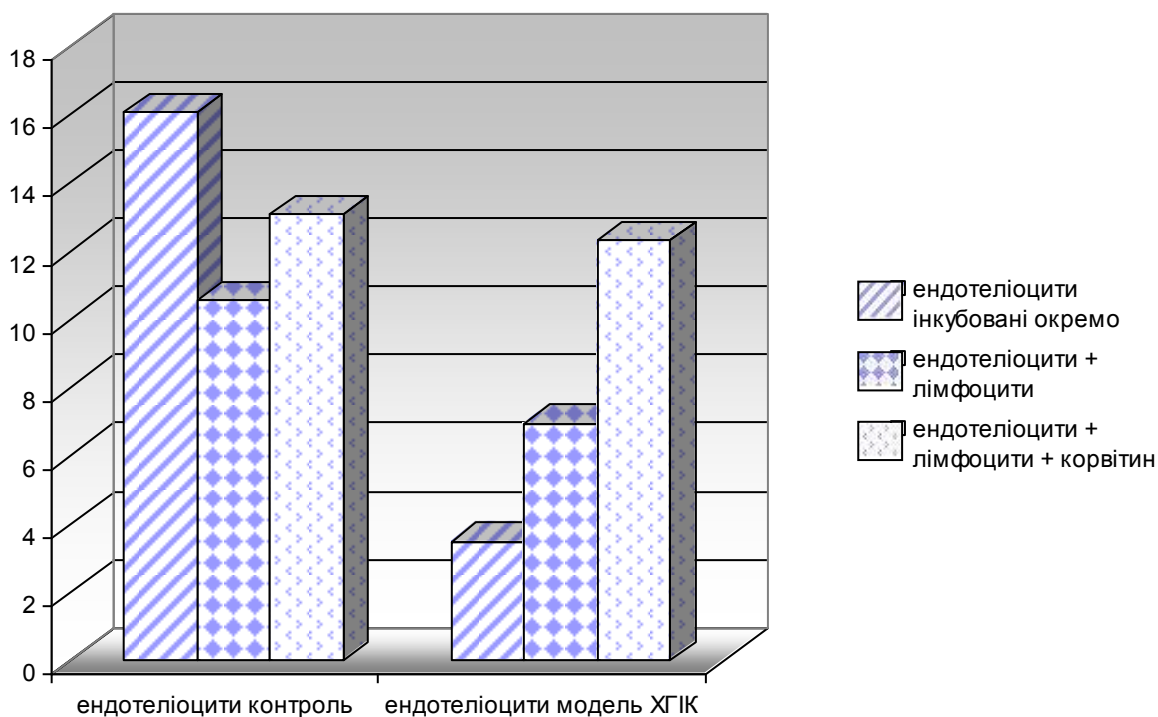


Рис. 3.2. Влив корвітину на показники співвідношень cNOS/iNOS у ендотеліоцитах контрольних і дослідних тварин до і після їх інкубації з лімфоцитами.

Сумісна інкубація ендотеліальних клітин у інтактних тварин (рис.3.2.) показала пониження вмісту cNOS/iNOS на 34,3% до  $16,06 \pm 5,82$  ( $P < 0,05$ ). Присутність корвітину в сумісній інкубації привело до зростання даних співвідношень в 1,2 раза до  $10,55 \pm 1,32$  ( $P < 0,05$ ). Але це зростання було нижчим на 18,6% по відношенні до контролю ( $P < 0,05$ ). Вміст cNOS/iNOS у ендотеліальних клітинах за умов ХГІК понизився на 78,3% відносно контролю ( $P < 0,05$ ). Сумісна інкубація, хоч і привела до зростання величин cNOS/iNOS майже у 2 рази, але це було недостатнім стосовно вихідних даних контролю. Інкубація в присутності корвітину дала зростання даних



величин у 1,8 раза до  $6,94 \pm 0,79$  ( $P < 0,05$ ), що майже зрівняло цей показник із контрольним ( $P < 0,05$ ).

Особливості синтезу GSNO за умов норми при інкубації лімфоцитів з ендотеліоцитами без корвітину і в його присутності представлені у (рис.3.3.). Як впливає із отриманих даних, при сумісній інкубації лімфоцитів з ендотеліоцитами зі сторони GSNO змін не виявлено.

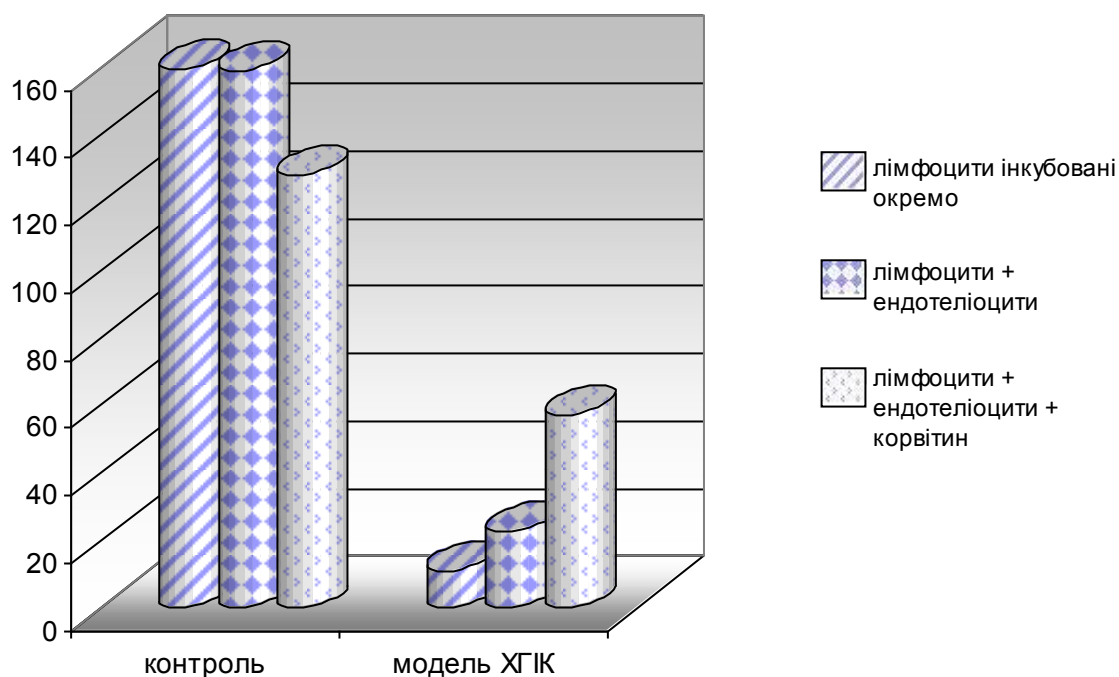


Рис. 3.3 Вплив корвітину на показники вмісту GSNO у лімфоцитах інтактних і дослідних тварин до і після їх інкубації з ендотеліоцитами.

На фоні застосування корвітину у лімфоцитах (рис.3.3.) встановлено зниження вмісту нітрозоглутатіону на 19% до  $159,15 \pm 15,20$  ( $P < 0,05$ ).

За умов ХГК (рис.3.3.) вміст GSNO при сумісній інкубації лімфоцитів з ендотеліоцитами зазнає різкого інгібування у порівнянні із аналогічними показниками контролю. Вихідний рівень нітрозоглутатіону у лімфоцитах понижений на 93% до  $159,64 \pm 10,31$  ( $P < 0,05$ ). Сумісна інкубація лімфоцитів з ендотеліоцитами привела до пониження GSNO відносно контролю на 85,8% до  $159,15 \pm 15,20$  ( $P < 0,05$ ). Присутність корвітину в інкубаційному

середовищі, хоч і підвищила вміст GSNO у 2,5 раза до  $22,67 \pm 2,01$  ( $P < 0,05$ ), але цей показник був нижчим за контрольний на 55,3%.

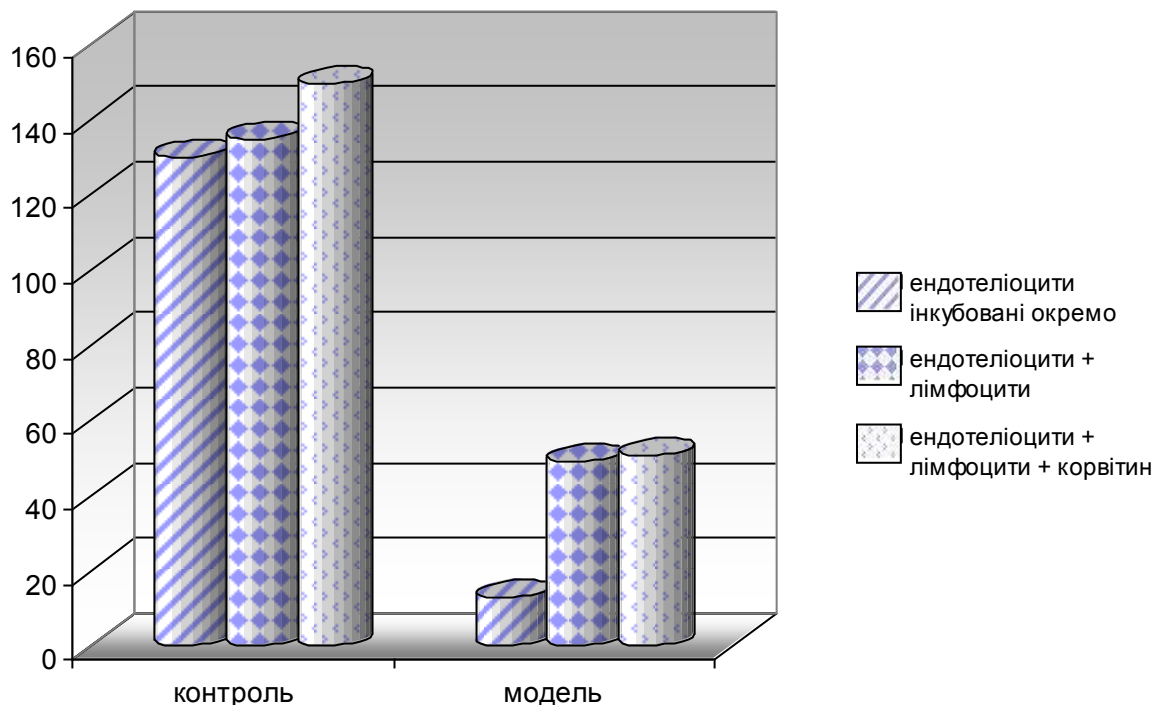


Рис. 3.4. Вплив корвітину на показники вмісту GSNO у ендотеліоцитах інтактних і дослідних тварин до і після їх інкубації з лімфоцитами.

У ендотеліоцитах інтактних тварин за умов їх інкубації з лімфоцитами (рис.3.4.) спостерігаємо незначне підвищення вмісту нітрозоглутатіону. У ендотеліоцитах, інкубованих з лімфоцитами у присутності корвітину, прослідковується тенденція до підвищення вмісту GSNO.

Хронічна гіперімунокомплексемія привела до різкого падіння вмісту GSNO у ендотеліоцитах. Так, вихідний вміст цього ферменту падає на 90% до  $129,73 \pm 10,14$  ( $P < 0,05$ ). Сумісна інкубація ендотеліоцитів з лімфоцитами привела до пониження GSNO відносно контролю на 63,8% до  $134,56 \pm 11,02$  ( $P < 0,05$ ). Застосування за цих умов корвітину привело до незначного зростання GSNO, вміст якого на 66% був нижчим у порівнянні з контролем ( $P < 0,05$ ).

### **3.2. Особливості синтезу аргіназної активності оксиду азоту у лімфоцитах і ендотеліоцитах тварин за умов норми та ХГІК, вплив корвітину на ці показники в умовах *in vitro***

У попередньому підрозділі нами була розглянута активність синтазного шляху оксиду азоту за умов норми та хронічної гіперімунокомплексної патології, з'ясовані особливості впливу корвітину на синтез NO в умовах *in vitro*.

Метою цього підрозділу роботи є дослідження особливостей аргіназного шляху оксиду азоту, а саме –активність аргінази та сечовини в лімфоцитах і ендотеліоцитах тварин при їх ізольованій та сумісній інкубації за умов норми, хронічної гіперімунокомплексемії та виявлення впливу корвітину на цей процес.

Аналізуючи активність аргінази та сечовини (таб. 3.7.) за умов норми, ми бачимо, що зміни торкаються лише показників сечовини, вміст якої понизився на 65,23% до  $18,69 \pm 2,01$  нмоль/мг білка ( $P < 0,05$ ). Зміни в активності аргінази за аналогічних умов були незначними. При проведенні досліджень у лімфоцитах тварин при їх інкубації без ендотеліоцитів за умов ХГІК (таб. 3.7.) відзначаємо суттєвий ріст активності аргінази по відношенні до лімфоцитів інкубованих без ендотеліоцитів у 5,9 раза ( $P < 0,05$ ), за аналогічних умов зростає і вміст сечовини у 2,6 раза ( $P < 0,05$ ) по відношенні до контролю.

Інкубація в присутності ендотеліоцитів показала наступні результати: незначне пониження активності аргінази в 1,3 раза в порівнянні до контролю ( $P < 0,05$ ). У порівнянні з лімфоцитами, інкубованими без ендотеліоцитів, пониження становить – 84,5% до  $22,21 \pm 1,86$  нмоль/мг білка ( $P < 0,05$ ). Вміст сечовини за умов ХГІК зростає в 5,6 раза до  $6,50 \pm 0,89$  нмоль/мг білка ( $P < 0,05$ ).

Таблиця 3.7.

Показники аргіназної активності оксиду азоту та вміст сечовини у лімфоцитах контрольних і дослідних тварин після їх інкубації без і в присутності ендотеліоцитів. (нмоль/мг білка;  $M \pm m$ ;  $n=10$ )

Умови досліджу	Умови інкубації			
	Інкубація без ендотеліоцитів		Інкубація в присутності ендотеліоцитів	
	Аргіназа	Сечовина	Аргіназа	Сечовина
Контрольні тварини	3,79±0,55	18,69±2,01	2,71±0,28	6,50±0,89
Дослідні тварини	22,21±1,86	47,78±4,01	3,44±0,36	36,24±3,34
$P_1$	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
$P_2$	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
$P_{1-2}$	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05

Примітка:  $P_1$  – вірогідність різниці показників сумісної інкубації без ендотеліоцитів і в їх присутності у контролі

$P_2$  – вірогідність різниці показників сумісної інкубації без ендотеліоцитів і в їх присутності у моделі

$P_{1-2}$  – вірогідність різниці показників сумісної інкубації без ендотеліоцитів і в їх присутності у контролі та моделі

Проведення інкубації ендотеліальних клітин без і в присутності лімфоцитів (таб. 3.7.) за умов контролю виявило незначне, на 14,4% до  $85,67 \pm 6,22$  нмоль/мг білка ( $P < 0,05$ ) зменшення вмісту сечовини. Що стосується аргінази, то в аналогічних умовах її активність зменшується на 60,38% до  $5,83 \pm 0,51$  нмоль/мг білка ( $P < 0,05$ ).

Аналізуючи дослідження у ендотеліоцитах тварин з ХГІК, інкубованих без і в присутності лімфоцитів (таб. 3.8.), спостерігаємо різнонаправлені зміни, як активності аргінази, так і у вмісті сечовини. Активність аргінази

зросла на 63% до  $10,01 \pm 1,07$  нмоль/мг білка ( $P < 0,05$ ), одночасно спостерігається значне падіння вмісту сечовини на 69,6% до  $53,32 \pm 5,20$  нмоль/мг білка ( $P < 0,05$ ). При порівнянні з контролем активність аргінази і сечовини в інкубації без ендотеліоцитів була наступною: майже в 2 рази зросла активність аргінази, а вміст сечовини на 37,9% у порівнянні з вихідним ( $P < 0,05$ ). Інкубація в присутності лімфоцитів за умов ХГІК по відношенні до контролю показала незначне підвищення активності аргінази та різке падіння вмісту сечовини – 77,8% до  $73,34 \pm 7,28$  нмоль/мг білка ( $P < 0,05$ ).

Таблиця 3.8.

**Показники аргіназної активності оксиду азоту та вміст сечовини у ендотеліоцитах контрольних і дослідних тварин після їх інкубації без і в присутності лімфоцитів. (нмоль/мг білка;  $M \pm m$ ;  $n=10$ )**

Умови досліджу	Умови інкубації			
	Інкубація без лімфоцитів		Інкубація в присутності лімфоцитів	
	Аргіназа	Сечовина	Аргіназа	Сечовина
<b>Контрольні тварини</b>	$5,83 \pm 0,51$	$85,67 \pm 6,22$	$2,31 \pm 0,26$	$73,34 \pm 7,28$
<b>Дослідні тварини</b>	$10,01 \pm 1,07$	$53,32 \pm 5,20$	$3,70 \pm 0,42$	$16,23 \pm 1,62$
<b>P<sub>1</sub></b>	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
<b>P<sub>2</sub></b>	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
<b>P<sub>1-2</sub></b>	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05

Примітка: P<sub>1</sub> – вірогідність різниці показників сумісної інкубації без лімфоцитів і в їх присутності у контролі

P<sub>2</sub> – вірогідність різниці показників сумісної інкубації без лімфоцитів і в їх присутності у моделі

P<sub>1-2</sub> – вірогідність різниці показників сумісної інкубації без ендотеліоцитів і в їх присутності у контролі та моделі

Особливості аргіназної активності при сумісній інкубації лімфоцитів з ендотеліоцитами інтактних тварин без корвітину (таб. 3.9.), полягають у пониженні активності аргінази на 28,5% до  $3,79 \pm 0,55$  ( $P < 0,05$ ) і значному зниженні сечовини на 65,23% до  $18,69 \pm 2,01$  ( $P < 0,05$ ). В умовах сумісної інкубації ендотеліальних клітин з лімфоцитами виявлено зменшення активності аргінази на 60,4% до  $5,83 \pm 0,51$  ( $P < 0,05$ ). Одночасно відзначено падіння вмісту сечовини у клітинах ендотелію на 14,4% до  $85,67 \pm 6,22$ .

Таблиця 3.9.

**Вплив корвітину на показники аргіназної активності оксиду азоту та вміст сечовини у лімфоцитах і ендотеліоцитах інтактних тварин за умов їх інкубації *in vitro*. (нмоль/мг білка;  $M \pm m$ ;  $n=10$ )**

Умови досліджу	Клітини, що інкубувались	Досліджувані клітини	Аргіназа	Сечовина
Контрольні тварини	Лімфоцити	Лімфоцити	$3,79 \pm 0,55$	$18,69 \pm 2,01$
	Ендотеліоцити	Ендотеліоцити	$5,83 \pm 0,51$	$85,67 \pm 6,22$
	Лімфоцити + ендотеліоцити	Лімфоцити	$2,71 \pm 0,28$	$6,50 \pm 0,89$
		Ендотеліоцити	$2,31 \pm 0,26$	$73,34 \pm 7,28$
	Лімфоцити + ендотеліоцити + корвітин	Лімфоцити	$0,90 \pm 0,08$	$6,42 \pm 0,53$
		Ендотеліоцити	$2,10 \pm 0,20$	$74,05 \pm 6,96$
$P_1$		$< 0,05$	$< 0,05$	$< 0,05$
$P_{1-2}$		$< 0,05$	$< 0,05$	$< 0,05$
$P_{2-3}$		$< 0,05$	$< 0,05$	$< 0,05$

Примітка:  $P_1$  – вірогідність різниці показників у порівнянні з клітинами, що інкубувались окремо в контролі

$P_{1-2}$  – у порівнянні з клітинами, що інкубувались разом в контролі

$P_{2-3}$  – у порівнянні з клітинами, що інкубувались разом в контролі та в присутності корвітину

З'ясувавши вплив корвітину на активність аргінази та вміст сечовини при інкубації лімфоцитів за умов норми (таб. 3.9.), бачимо, що наявність корвітину знижує активність аргінази на 66,4% до  $2,71 \pm 0,28$  ( $P < 0,05$ ). Рівень сечовини при цьому залишився незмінним. Присутність корвітину в середовищі ендотеліоцитів інкубованих з лімфоцитами, на показники аргінази і сечовини практично не вплинуло.

Таблиця 3.10.

**Вплив корвітину на показники аргіназної активності оксиду азоту та вміст сечовини у лімфоцитах і ендотеліоцитах дослідних тварин за умов їх інкубації *in vitro*. (нмоль/мг білка;  $M \pm m$ ;  $n=10$ )**

Умови досліді	Клітини, що інкубувались	Досліджувані клітини	Аргіназа	Сечовина
Дослідні тварини	Лімфоцити	Лімфоцити	$22,21 \pm 1,86$	$47,78 \pm 4,01$
	Ендотеліоцити	Ендотеліоцити	$10,01 \pm 1,07$	$53,32 \pm 5,20$
	Лімфоцити + ендотеліоцити	Лімфоцити	$3,44 \pm 0,36$	$36,24 \pm 3,34$
		Ендотеліоцити	$3,70 \pm 0,42$	$16,23 \pm 1,62$
	Лімфоцити + ендотеліоцити + корвітин	Лімфоцити	$1,84 \pm 0,16$	$21,79 \pm 2,26$
		Ендотеліоцити	$1,76 \pm 0,20$	$14,39 \pm 1,46$
$P_1$		$< 0,05$	$< 0,05$	$< 0,05$
$P_{1-2}$		$< 0,05$	$< 0,05$	$< 0,05$
$P_{2-3}$		$< 0,05$	$< 0,05$	$< 0,05$

Примітка:  $P_1$  – вірогідність різниці показників у порівнянні з клітинами, що інкубувались окремо в моделі

$P_{1-2}$  – у порівнянні з клітинами, що інкубувались разом в моделі

$P_{2-3}$  – у порівнянні з клітинами, що інкубувались разом в моделі та в присутності корвітину

Інкубація лімфоцитів з ендотеліоцитами тварин із хронічною гіперімунокомплексною патологією в присутності корвітину (таб. 3.10.) показала значне пониження активності аргінази у цих клітинах на 84,5% до  $22,11 \pm 1,86$  ( $P < 0,05$ ) та пониження вмісту сечовини – на 24,2% до  $47,78 \pm 4,02$  ( $P < 0,05$ ). Проте зниження аргінази не досягнули вихідного рівня і перевищували його на 51,5% до  $3,79 \pm 0,55$  ( $P < 0,05$ ). Вміст сечовини в 1,2 раза перевищив рівень контролю.

Стосовно ендотеліоцитів, то в цих клітинах, при їх сумісній інкубації з лімфоцитами (таб. 3.10.) зміни, виявлені у активності аргінази та вмісті сечовини, також були значними. Їх показники зменшились відповідно на 63% до  $10,01 \pm 1,07$  ( $P < 0,05$ ) і на 69,57% до  $53,32 \pm 5,20$  ( $P < 0,05$ ). Встановлено, що присутність корвітину в інкубаційному середовищі понижує активність аргінази та вміст сечовини (таб. 3.10.) у лімфоцитах відповідно на 46,7% до  $3,45 \pm 0,36$  ( $P < 0,05$ ), а сечовини на 39,9% до  $36,24 \pm 3,34$  ( $P < 0,05$ ). Проведені дослідження в ендотеліоцитах, інкубованих з лімфоцитами при наявності корвітину, виявили інгібування активності аргінази на 53% до  $3,70 \pm 0,42$  ( $P < 0,05$ ) та незначне падіння рівня сечовини, але це зниження не зрівняло показники досліджуваних тест-об'єктів із показниками контролю.

#### Висновки:

- аналіз взаємодії лімфоцитів та клітин ендотелію у тварин із хронічною гіперімунокомплексною патологією показав зниження cNOS в лімфоцитах – 2,2 раза ( $P < 0,05$ ) і в ендотеліальних клітинах – 1,3 раза ( $P < 0,05$ ) із одночасним наростанням iNOS у цих клітинах: в лімфоцитах – 4 рази ( $P < 0,05$ ) та ендотеліоцитах – 1 раз ( $P < 0,05$ ). Ці зміни зумовили активацію аргінази і сечовини, що було більше виражено у лімфоцитах;
- 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 є свідченням його селективності, особливо при хронічній гіперімунокомплексній.



Основні наукові положення даного розділу опубліковані в таких працях:

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. [235].

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 [157].

**РОЗДІЛ 4**  
**ХАРАКТЕРИСТИКА ОСОБЛИВОСТЕЙ МЕТАБОЛІЗМУ**  
**L-АРГІНІНУ В ЛІМФОЦИТАХ, ЕНДОТЕЛІОЦИТАХ І СИРОВАТЦІ**  
**ТВАРИН ПРИ ХРОНІЧНОМУ ГІПЕРІМУНОКОМПЛЕКСНОМУ**  
**ПРОЦЕСІ ТА ВПЛИВ КОРВІТИНУ НА ЦІ ОСОБЛИВОСТІ В**  
**УМОВАХ IN VIVO**

Результати дослідження даного розділу передбачають вивчення імунологічних показників розвитку гіперімунокомплексного процесу, а також можливих змін метаболізму L-аргініну та з'ясування дії корвітину за цих умов.

Оскільки утворення імунних комплексів (ІК) є фізіологічним механізмом захисту від дії антигенів, то в сироватці крові інтактного організму обов'язковим є наявність певного рівня циркулюючих імунних комплексів. Проте, спадковий чи набутий дефект фагоцитів або системи комплементу може зумовити розвиток тої чи іншої імунокомплексної патології. Патогенний ефект, зумовлений ІК, стає ще інтенсивнішим, якщо в його утворенні бере участь С3-компонент і система комплементу запускається класичним шляхом.

Найчастіше ЦІК ініціюють патологічний процес у судинах, нирках, суглобах.

Проведені дослідження засвідчують, що процеси утворення і відкладання ІК безпосередньо залежать від рівня оксиду азоту (NO) в організмі. Оксид азоту є багатовекторним регулятором функцій організму, і насамперед концентрація визначає його як фізіологічний, так і патологічний ефект.

Концентрації стабільних метаболітів оксиду азоту –  $\text{NO}_2^-$  і  $\text{NO}_3^-$ , сечовини, нітрозоглутатіону (GSNO) також мають залежність від ступеня активності патологічного процесу, є взаємозв'язані і, визначаючи енергетичний стан клітин, належать до потужних регуляторів

кровопостачання, антитромбозу, промоторів росту, протизапальних факторів, антиоксидантів тощо. Отже, за рівнем у крові цих ферментів можна оцінювати розвиток захворювання і контролювати ефективність лікувальних заходів.

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 системи L-аргінін оксид азоту в організмі.

Відомо, що рівновага між NO-синтазним та аргіназним шляхами стабільно порушується лише при певних патологічних станах, що іноді призводить до переваги активності аргінази і зміщення метаболізму в сторону неокисного перетворення аргініну на орнітин і сечовину.

Виходячи з цього, актуальним є експериментальний пошук можливостей імунокорекції ХГІК захворювань. Цікавим у цьому аспекті є корвітин – натуральний екстракт із класу біофлавоноїдів, який володіє не тільки потужною антиоксидантною ефективністю, але й відповідає за активацію та збереження рівня NO в організмі.

Перед тим, як застосувати даний препарат для корекції порушень досліджуваних 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.

#### 4.1. Характеристика імунного статусу інтактних тварин та тварин із змодельованою хронічною гіперімунокомплексемією на тлі введення їм корвітину

Результати дослідження даного підрозділу роботи передбачають вивчення імунологічних показників – концентрацію і молекулярну масу циркулюючих імунних комплексів (ЦК) та комплементарну активність сироватки крові (КАСК) інтактних і дослідних тварин а також з'ясування впливу корвітину за цих умов.

У результаті проведених досліджень встановлено, що у сироватці крові інтактних тварин вміст ЦК великих розмірів складав  $70,50 \pm 3,69$  одиниць оптичної густини, середніх розмірів -  $103,00 \pm 2,13$  одиниць оптичної густини, малих розмірів -  $161,50 \pm 5,00$  одиниць оптичної густини (табл.4.1.).

Таблиця 4.1.

#### Рівень циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові інтактних тварин і тварин із змодельованою ХГІК ( $M \pm m$ ; $n=10$ )

Умови досліджу	ЦК		
	Великі	Середні	Малі
Інтактні тварини	$70,50 \pm 3,69$	$103,00 \pm 2,13$	$161,50 \pm 5,00$
Дослідні тварини	$161,50 \pm 25,02$	$193,00 \pm 7,12$	$200,00 \pm 6,06$
<b>P</b>	$< 0,001$	$< 0,001$	$< 0,01$

Примітка:

P - вірогідність різниці показників у порівнянні з даними у групі інтактних тварин

Тривале введення бичачого сироваткового альбуміну супроводжувалось змінами досліджуваних показників у модельних тварин. Встановлено, що введення даного препарату зумовило суттєве зростання рівня патогенних ЦК. Концентрація ЦК великих, середніх та малих розмірів зросла відповідно у 2,3 ( $P<0,001$ ); 1,9 ( $P<0,001$ ) і 1,2 ( $P<0,01$ ) рази, що свідчить про розвиток хронічної гіперімунокомплексемії.

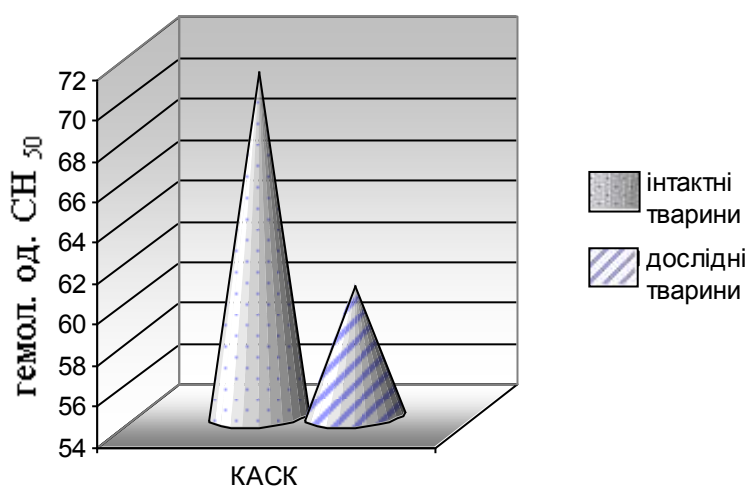


Рис. 4.1. Комплементарна активність сироватки крові (KACK) білих щурів за умов норми та хронічної гіперімунокомплексемії (гемол.од. СН<sub>50</sub>)

Комплементарна активність сироватки в інтактних тварин становила  $70,96 \pm 3,12$  гемолітичних одиниць СН<sub>50</sub> (рис.4.1). За умов ХГІК відзначено падіння показника гемолітичної активності сироватки в 1,2 рази ( $P<0,01$ ). Зменшення показника гемолітичної активності сироватки крові може свідчити про посилене використання компонентів системи комплементу для зв'язування ЦК з клітинами.

Як свідчать результати проведених досліджень, показники ЦК у сироватці крові інтактних тварин після введення корвітину достовірно знижуються (таб.4.2.). Рівень ЦК великих розмірів зменшився до  $54,00 \pm 2,45$  од.опт.густ., середніх розмірів - до  $93,50 \pm 2,11$  од.опт.густ., малих розмірів - до  $111,90 \pm 3,88$  од.опт. густ. Таким чином, вивчення впливу корвітину на

імунологічні показники інтактних тварин виявило, що даний препарат знижує рівні ЦК усіх розмірів, особливо великих і малих, та показник гемолітичної активності сироватки крові, що може свідчити про підвищення елімінації ЦК з кровоплину фагоцитуючими клітинами.

Таблиця 4.2.

**Вплив корвітину на вміст циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові інтактних тварин ( $M \pm m$ ;  $n=10$ )**

Умови досліджу	ЦК		
	Великі	Середні	Малі
Інтактні тварини	70,50±3,69	103,00±2,13	161,50±5,00
Інтактні тварини + корвітин	54,00±2,45	93,50±2,11	111,90±3,88
<b>P</b>	< 0,01	< 0,02	< 0,001

Примітка:

P - вірогідність різниці показників у порівнянні з даними у контрольній групі

На фоні цього відзначено також зниження показника гемолітичної активності сироватки крові до 60,03±3,22 гемолітичних одиниць  $CH_{50}$  (рис.4.2.).

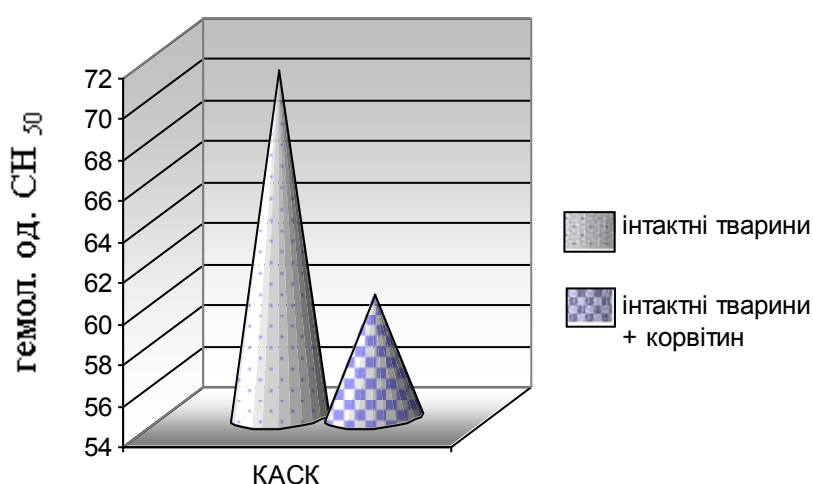


Рис. 4.2. Вплив корвітину на комплементарну активність сироватки крові (KACK) у інтактних тварин (гемол.од.  $CH_{50}$ ).

Застосування корвітину у модельних тварин показало пониження рівня ЦК усіх розмірів (таб. 4.3.). Вміст ЦК великого розміру зменшився у 1,7 раза ( $P < 0,001$ ), середнього – у 1,8 раза ( $P < 0,001$ ), малого – у 1,5 раза ( $P < 0,001$ ). Аналіз отриманих даних показав – найбільш значним було зменшення рівня малих ЦК, концентрація яких була нижчою на 15% ( $P < 0,02$ ) від вихідного; стосовно рівня середніх ЦК, які володіють найбільш патогенним потенціалом, спостерігається нормалізація їх концентрації у порівнянні з контролем ( $P < 0,05$ ); рівень великих ЦК у 1,2 раза перевищив показник контролю ( $P < 0,01$ ).

Таблиця 4.3

**Вплив корвітину на вміст циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові тварин із ХГК (од.опт.густ.;  $M \pm m$ ;  $n=10$ )**

Умови дослідю	ЦК		
	Великі	Середні	Малі
<b>Інтактні тварини</b>	70,50±3,69	103,00±2,13	161,50±5,00
<b>Дослідні тварини</b>	161,50±25,02	193,00±7,12	200,00±6,06
<b>Дослідні тварини + корвітин</b>	92,30±4,06	110,10±3,36	137,40±7,60
<b><math>P_{1-2}</math></b>	< 0,01	< 0,001	< 0,001
<b><math>P_{2-3}</math></b>	< 0,05	< 0,001	< 0,001
<b><math>P_{1-3}</math></b>	< 0,01	> 0,05	< 0,02

Примітки:

$P_{1-2}$  - вірогідність різниці показників у порівнянні інтактних і дослідних тварин;

$P_{2-3}$  - вірогідність різниці показників у порівнянні дослідних та дослідних тварин, яким вводили корвітин;

$P_{1-3}$  - вірогідність різниці показників у порівнянні інтактних і дослідних тварин, яким вводили корвітин.

На фоні таких змін зростає показник КАСК (рис. 4.3.) до  $72,51 \pm 4,66$  гемолітичних одиниць  $CH_{50}$  ( $P < 0,001$ ), що відповідає вихідному рівню контролю ( $P < 0,01$ ). Підвищення показника гемолітичної сироватки крові є свідченням нормалізації системи комплементу.

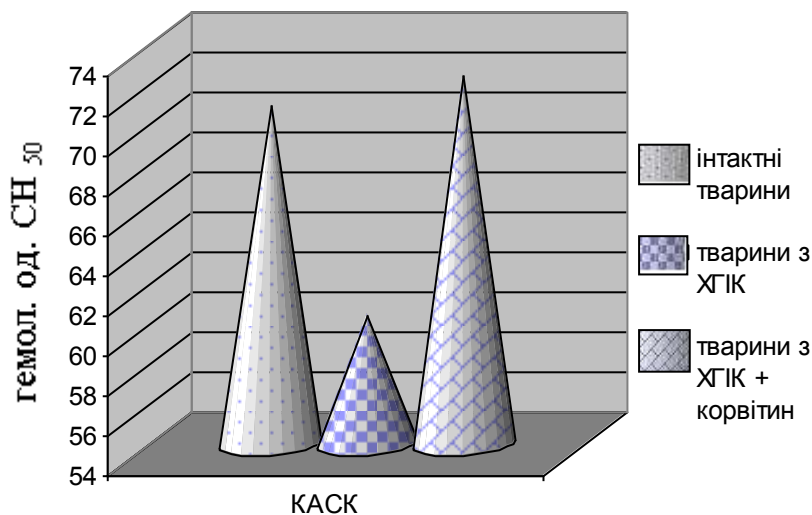


Рис. 4.3. Вплив корвітину на комплементарну активність сироватки крові (КАСК) за умов хронічної гіперімунокомплексемії.

Таким чином, розвиток хронічної гіперімунокомплексемії підтверджується зростанням показників циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) різної молекулярної маси та зниженням показника гемолітичної активності комплементу, що є свідченням посиленого використання компонентів системи комплементу для зв'язування ЦІК з клітинами. Вивчення впливу корвітину на імунологічні показники інтактних та модельних 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.



#### **4.2. Дослідження показників синтазного шляху метаболізму оксиду азоту в лімфоцитах і ендотеліоцитах білих щурів за умов норми, хронічної гіперімунокомплексемії та корекції корвітином**

Наведені в цьому підрозділі результати експериментальних досліджень дають змогу оцінити синтез оксиду азоту, показники активності NO- синтаз, рівень стабільних метаболітів NO ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ), нітрозоглутатіону (GSNO) в лімфоцитах і ендотеліоцитах тварин за умов норми, хронічної гіперімунокомплексемії та з'ясувати особливості дії корвітину в цих станах.

Вивчення впливу корвітину на активність синтаз оксиду азоту в лімфоцитах інтактних тварин показало, що його введення супроводжується різноспрямованими змінами всіх досліджуваних показників (таб. 4.4.). Даний препарат зумовив пригнічення активності iNOS на 56,6% до  $3,78 \pm 0,41$  ( $P < 0,001$ ). Одночасно відзначено підвищення активності cNOS, проте воно було незначним ( $P > 0,05$ ).

Розвиток ХГІК супроводжується значними змінами показників системи оксид азоту у лімфоцитах (таб. 4.4.). Так, за умов даної патології спостерігається значне підвищення в активності індукцйбельної ізоформи NO - синтази, показник якої зростає в 4,7 раза до  $3,78 \pm 0,41$  ( $P < 0,001$ ). При цьому активність конститутивної ізоформи зазнала значного інгібування. Її показник зменшився на 61,6% до  $19,73 \pm 1,59$  ( $P < 0,001$ ). Застосування корвітину в тварин з хронічним гіперімунокомплексним синдромом зумовило різнонаправлені зміни показників ферментативної активності NO-синтаз. Значно знижується активність iNOS – на 60,08% до  $17,76 \pm 1,66$  ( $P < 0,001$ ), проте це зменшення не було достатнім для нормалізації даного ферменту, величина якого перевищила контрольний рівень в 1,9 раза ( $P < 0,01$ ). Активність конститутивної NOS також зазнає змін. Її показник зріс в 2,6 раза ( $P < 0,001$ ) і практично не відрізнявся від активності cNOS у інтактних тварин.

Таблиця 4.4.

**Показники NO - синтазної активності в лімфоцитах інтактних і дослідних тварин та їх корекція корвітином (M ±m; n=10)**

Умови досліджувані	Досліджувані клітини	NOS пмоль/мг білка	cNOS пмоль/мг білка	iNOS пмоль/мг білка
Інтактні тварини	Лімфоцити	23,51±1,98	19,73±1,59 3	3,78±0,41
Інтактні тварини+ корвітин	Лімфоцити + корвітин	24,56±2,01	22,91±2,06	1,64±0,16
Дослідні тварини	Лімфоцити	25,33±1,89	7,57±0,71	17,76±1,66
Дослідні тварини + корвітин	Лімфоцити + корвітин	26,46±2,13	19,37±2,18	7,09±0,85
<b>P<sub>1-2</sub></b>		> 0,05	> 0,05	< 0,001
<b>P<sub>1-3</sub></b>		< 0,05	< 0,001	< 0,001
<b>P<sub>3-4</sub></b>		> 0,05	< 0,001	< 0,001
<b>P<sub>1-4</sub></b>		< 0,05	> 0,05	< 0,01

Примітки (тут і надалі):

P<sub>1-2</sub> - вірогідність різниці показників у порівнянні інтактних та інтактних тварин, яким вводили корвітин;

P<sub>1-3</sub> - вірогідність різниці показників у порівнянні інтактних і дослідних тварин;

P<sub>3-4</sub> - вірогідність різниці показників у порівнянні дослідних та дослідних тварин, яким вводили корвітин;

P<sub>1-4</sub> - вірогідність різниці показників у порівнянні інтактних і дослідних тварин, яким вводили корвітин.

Аналіз впливу корвітину на рівень стабільних метаболітів NO<sub>2</sub><sup>-</sup> і NO<sub>3</sub><sup>-</sup> у лімфоцитах інтактних тварин (таб. 4.5.) показав, що його застосування привело до незначних змін у рівні NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (P>0,05). Рівень NO<sub>3</sub><sup>-</sup> у лімфоцитах тварин даної групи зріс в 1,6 раза до 15,88±1,52 (P<0,001). Проведені дослідження у лімфоцитах тварин з хронічною гіперімунокомплексемією відзначають суттєві зміни у всіх показниках тест-об'єктів (таб. 4.5.).

Таблиця 4.5.

**Показники рівня стабільних метаболітів NO в лімфоцитах  
інтактних і дослідних тварин та їх корекція корвітином. (M ±m; n=10)**

Умови дослідю	Досліджувані клітини	NOS пмоль/мг білка	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> пмоль/мг білка	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> нмоль/мг білка
Інтактні тварини	Лімфоцити	23,51±1,98	139,47±11,26	15,88±1,52
Інтактні тварини+ корвітин	Лімфоцити + корвітин	24,56±2,01	175,34±18,10	25,59±2,02
Дослідні тварини	Лімфоцити	25,33±1,89	25,75±2,24	3,16±0,36
Дослідні тварини + корвітин	Лімфоцити + корвітин	26,46±2,13	72,86±8,93	8,97±1,07
<b>P<sub>1-2</sub></b>		> 0,05	> 0,05	< 0,01
<b>P<sub>1-3</sub></b>		< 0,05	< 0,001	< 0,001
<b>P<sub>3-4</sub></b>		> 0,05	< 0,001	< 0,001
<b>P<sub>1-4</sub></b>		< 0,05	< 0,001	< 0,01

Рівень як NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, так і NO<sub>3</sub><sup>-</sup> знижується – на 81,5% до 139,47±11,25 (P<0,001) і на 80,1% до 15,88±1,52 (P<0,001) відповідно. Застосування корвітину зумовило зростання, як нітрит-, так і нітрат-аніону в лімфоцитах дослідних тварин (таб. 4.5.). Рівні NO<sub>2</sub><sup>-</sup> та NO<sub>3</sub><sup>-</sup> збільшились у 2,8 раза (P<0,001), проте підвищення рівнів цих сполук було недостатнім для їх нормалізації. Рівень NO<sub>2</sub><sup>-</sup> був на 47,8% нижчим від вихідного (P<0,001). Вміст NO<sub>3</sub><sup>-</sup> – знизився на 43,5% проти контрольного (P<0,01).

Вплив корвітину на синтазний шлях метаболізму NO в ендотеліоцитах інтактних тварин (таб. 4.6.) показав незначні зміни в активності усіх ізоформ NO. В ендотеліальних клітинах за умов ХГК (таб.4.6.) зміни в активності ізоформ NO-синтази носять більш вираженіший характер.

Таблиця 4.6.

**Показники NO - синтазної активності в ендотеліоцитах інтактних і дослідних тварин та їх корекція корвітином. (M ±m; n=10)**

Умови досліджу	Досліджувані клітини	NOS пмоль/мг білка	eNOS пмоль/мг білка	iNOS нмоль/мг білка
Інтактні тварини	Ендотеліоцити	15,26±2,04	13,43±1,73	1,83±0,32
Інтактні тварини+ корвітин	Ендотеліоцити + корвітин	19,62±2,11	17,33±1,83	2,29±0,31
Дослідні тварини	Ендотеліоцити	12,22±1,34	8,48±0,80	3,74±0,61
Дослідні тварини + корвітин	Ендотеліоцити + корвітин	23,46±2,78.	20,49±2,39	2,97±0,44
<b>P<sub>1-2</sub></b>		> 0,05	> 0,05	> 0,05
<b>P<sub>1-3</sub></b>		> 0,05	< 0,05	< 0,01
<b>P<sub>3-4</sub></b>		< 0,001	< 0,001	> 0,05
<b>P<sub>1-4</sub></b>		< 0,05	< 0,05	< 0,05

Так, iNOS зростає в 2 рази до 1,83±0,32 (P<0,01) і знижується рівень eNOS на 36,9% до 13,43±1,73 (P<0,05). Дослідження рівнів синтаз оксиду в ендотеліальних клітинах тварин, яким на тлі хронічної імунокомплексної патології вводили корвітин (таб.4.6.), показало значне підвищення активності eNOS, величина якої збільшилася в 2,4 рази до 8,48±0,80 (P<0,001), тобто по відношенні до вихідного рівня у тварин із ХГІК. Паралельно із цим відзначено незначне зниження активності iNOS - на 28,6% до 3,74±0,61 (P>0,05) – вихідного рівня у дослідних тварин. Дані величини NO-синтаз вірогідно перевищили вихідний рівень контролю: eNOS у 1,5 рази до 13,43±1,73 (P<0,05) та iNOS в 1,6 рази до 1,83±0,32 (P<0,05).

Дослідження впливу корвітину на рівень стабільних метаболітів NO у ендотеліоцитах інтактних тварин (таб.4.7.) показали, що зміни за цих умов були незначними (P<0,05), хоч спостережена тенденція до зниження рівня

$\text{NO}_2^-$  та підвищення рівня  $\text{NO}_3^-$ . Дослідження ендотеліоцитів показало, що розвиток хронічної гіперімунокомплексемії супроводжується пониженням рівнів стабільних метаболітів NO. Так, рівень  $\text{NO}_2^-$  знизився на 51,2% до  $283,72 \pm 38,62$  ( $P < 0,01$ ), а рівень  $\text{NO}_3^-$  – на 42,81% до  $9,11 \pm 0,86$  ( $P < 0,001$ ). Застосування за даних умов корвітину дало підвищення вмісту  $\text{NO}_2^-$  в 1,9 раза до  $138,49 \pm 17,41$  ( $P < 0,01$ ), цей показник майже досягнув свого початкового рівня ( $P > 0,05$ ). Концентрація рівня  $\text{NO}_3^-$  в клітинах ендотелію піднялася в 3,6 раза до  $5,22 \pm 0,59$  ( $P < 0,001$ ), що значно перевищило його вихідний рівень в ендотеліоцитах інтактних тварин ( $P < 0,001$ ).

Таблиця 4.7

**Показники рівня стабільних метаболітів NO в ендотеліоцитах інтактних і дослідних тварин та їх корекція корвітином. (M  $\pm$  m; n=10)**

Умови досліді	Досліджувані клітини	NOS пмоль/мг білка	$\text{NO}_2^-$ пмоль/мг білка	$\text{NO}_3^-$ нмоль/мг білка
Інтактні тварини	Ендотеліоцити	$15,26 \pm 2,04$	$283,72 \pm 38,62$	$9,11 \pm 0,86$
Інтактні тварини+ корвітин	Ендотеліоцити + корвітин	$19,62 \pm 2,11$	$255,56 \pm 30,88$	$12,37 \pm 1,54$
Дослідні тварини	Ендотеліоцити	$12,22 \pm 1,34$	$138,49 \pm 17,41$	$5,22 \pm 0,59$
Дослідні тварини+ корвітин	Ендотеліоцити + корвітин	$23,46 \pm 2,78$	$268,92 \pm 40,14$	$18,91 \pm 2,29$
$P_{1-2}$		$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$
$P_{1-3}$		$> 0,05$	$< 0,01$	$< 0,001$
$P_{3-4}$		$< 0,001$	$< 0,01$	$< 0,001$
$P_{1-4}$		$< 0,05$	$> 0,05$	$< 0,001$

Вивчення впливу корвітину на співвідношення величин cNOS/iNOS у лімфоцитах тварин за умов норми (рис. 4.4.) показало, що в інтактних тварин спостерігається збільшення даних величин на 65,5% до  $5,56 \pm 0,56$ .

Розвиток ХГІК у лімфоцитах (рис. 4.4.) супроводжується різким падінням співвідношень cNOS/iNOS на 91,9% по відношенні до контролю ( $P<0,001$ ). Застосування на тлі хронічної гіперімунокомплексемії корвітину привело до помітного зростання величин cNOS/iNOS у 6,9 раза до  $0,45\pm 0,05$  ( $P<0,001$ ), але дане зростання не досягло вихідного рівня контролю ( $P<0,01$ ).

Вплив корвітину на співвідношення величин cNOS/iNOS у ендотеліоцитах (рис. 4.4.) інтактних і дослідних тварин привів до незначного падіння даних величин. Хронічна гіперімунокомплексемія за даних умов характеризується пониженням співвідношень cNOS/iNOS у ендотеліоцитах на 68,3% до  $8,35\pm 0,61$  ( $P<0,001$ ). Корекція корвітином за цих умов призвела до зростання даних співвідношень в 2,8 раза до  $2,64\pm 0,19$  ( $P<0,001$ ), що майже досягло вихідного рівня контролю ( $P>0,05$ ).

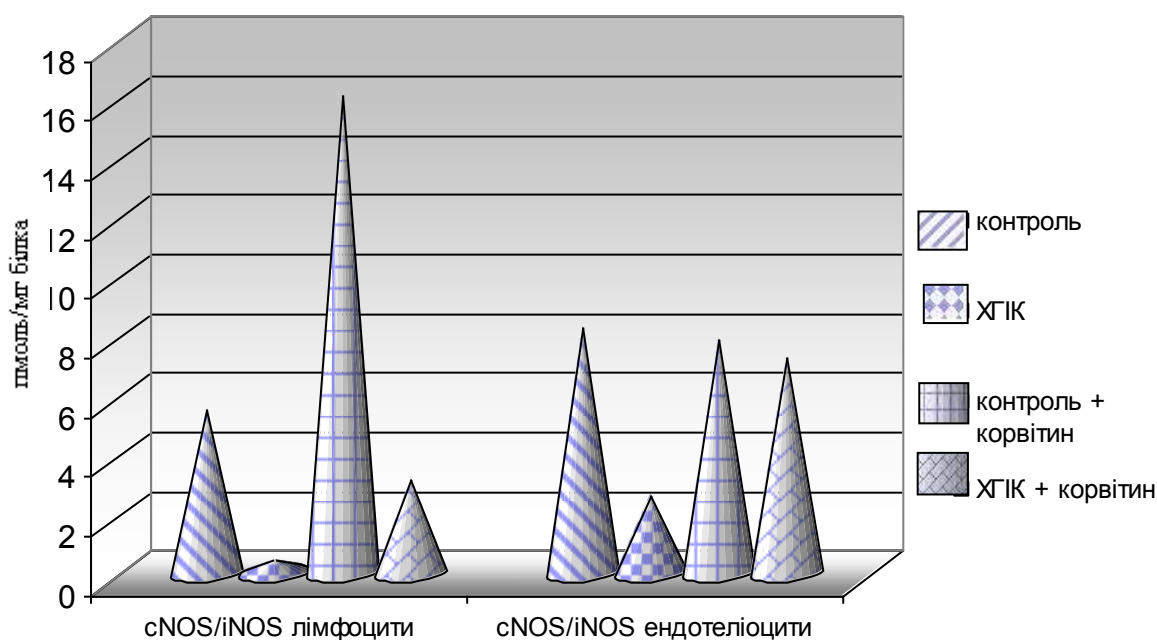


Рис. 4.4. Показники співвідношень величин cNOS/iNOS в лімфоцитах та ендотеліоцитах білих щурів в нормі, при хронічній гіперімунокомплексемії (ХГІК) та за умов введення корвітину.

Аналіз впливу корвітину на вміст GSNO у лімфоцитах інтактних тварин (рис. 4.5.) показав, що його застосування підвищило вміст GSNO, показник якого зростає в 1,8 раза до  $97,29 \pm 7,27$  ( $P < 0,001$ ).

Проведені дослідження у лімфоцитах тварин з хронічною гіперімунокомплексемією (рис. 4.5.) відзначають суттєві зміни у показниках цього тест-об'єкту, вміст якого зменшується на 89% до  $97,29 \pm 7,27$  ( $P < 0,001$ ). Застосування корвітину зумовило зростання вмісту GSNO майже у 4 рази до  $10,67 \pm 1,10$  ( $P < 0,001$ ). Проте підвищення концентрації цієї сполуки було недостатнім для її нормалізації, вміст GSNO був у 2,3 раза меншим, ніж у лімфоцитах контрольних тварин ( $P < 0,001$ ).

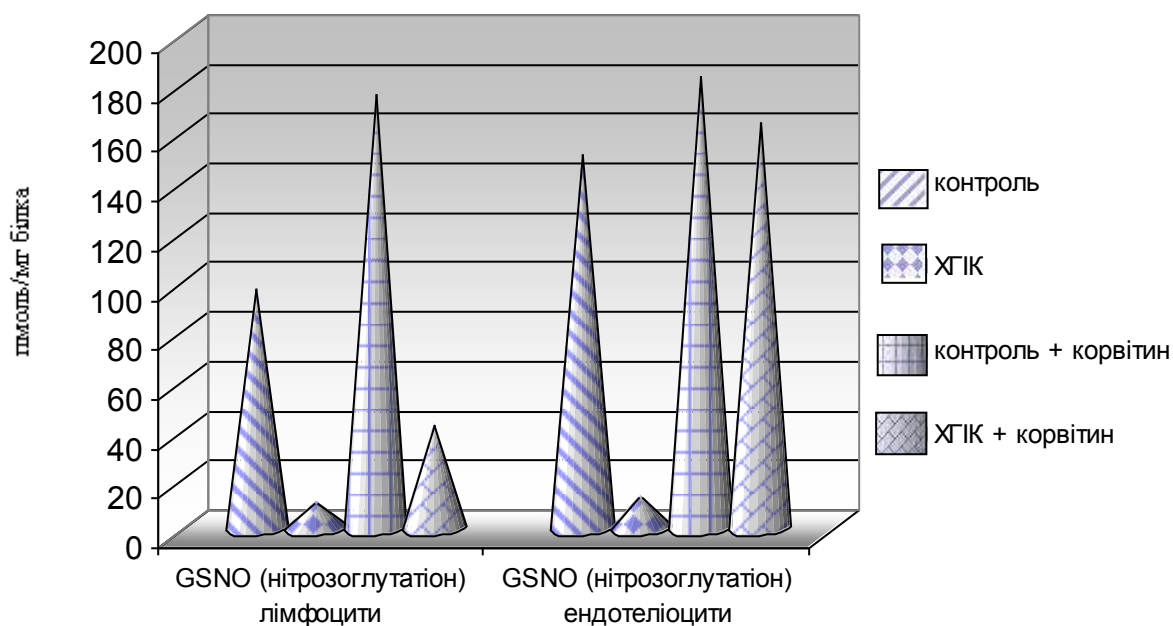


Рис. 4.5. Показники вмісту GSNO в лімфоцитах та ендотеліоцитах білих щурів в нормі, при хронічній гіперімунокомплексемії (XГІК) та за умов введення корвітину.

Дослідження впливу корвітину на вміст нітрозоглутатіону у ендотеліоцитах інтактних тварин (рис.4.5.) показали, що зміни за цих умов були незначними, його вміст зростає всього в 1,3 раза до  $151,86 \pm 11,42$

( $P < 0,05$ ). Розвиток хронічної гіперімунокомплексемії (рис.4.5.) супроводжується значним зниженням вмісту GSNO – на 91,2% до  $151,86 \pm 11,42$  ( $P < 0,001$ ). Застосування за цих умов корвітину привело до значного підвищення GSNO - в 12,4 раза до  $13,29 \pm 1,69$  ( $P < 0,001$ ), що навіть в 1,1 раза перевищує вихідний рівень нітрозоглутатіону в ендотеліоцитах інтактних тварин ( $P > 0,05$ ).

#### **4.3. Дослідження показників аргіназного шляху метаболізму оксиду азоту в лімфоцитах і ендотеліоцитах білих щурів за умов норми, хронічної гіперімунокомплексемії та корекції корвітином**

Метою цього підрозділу роботи є дослідження особливостей аргіназного шляху метаболізму оксиду азоту, а саме активність аргінази та сечовини в лімфоцитах і ендотеліоцитах тварин за умов норми, хронічної гіперімунокомплексемії та виявлення впливу корвітину на цей процес.

Як видно із даних (таб. 4.8.) у лімфоцитах інтактних тварин під впливом корвітину спостерігається зниження вмісту сечовини на 51,34% до  $13,50 \pm 1,13$  нмоль/мг білка ( $P < 0,001$ ) і зниження активності аргінази на 30% від  $4,17 \pm 0,34$  ( $P < 0,01$ ).

Розвиток ХГІК (таб. 4.8.) супроводжується збільшенням показників метаболізму аргіназного шляху NO: активність аргінази зросла в 5,12 раза до  $4,17 \pm 0,34$  нмоль/мг білка ( $P < 0,001$ ), вміст сечовини в 3,9 раза до  $13,50 \pm 1,13$  нмоль/мг білка ( $P < 0,001$ ). Введення корвітину тваринам із ХГІК (таб. 4.8.) зумовило зниження активності аргінази на 63,43% до  $21,38 \pm 0,81$  нмоль/мг білка ( $P < 0,001$ ), що перевищило рівень контролю в 1,9 раза ( $P < 0,001$ ). Вміст сечовини за цих умов знизився більш суттєво - на 83,4% до  $52,26 \pm 1,06$  ( $P < 0,001$ ), що є нижче рівня контролю ( $P < 0,01$ ).



Таблиця 4.8.

**Показники активності аргінази та вмісту сечовини в лімфоцитах інтактних та дослідних тварин та їх корекція корвітином (M ±m; n=10)**

Умови досліджу	Досліджувані клітини	Аргіназа нмоль/мг білка	Сечовина нмоль/мг білка
Інтактні тварини	Лімфоцити	4,17±0,34	13,50±1,13
Інтактні тварини + корвітин	Лімфоцити + корвітин	2,80±0,29	6,57±0,66
Дослідні тварини	Лімфоцити	21,38±2,06	52,26±4,01
Дослідні тварини + корвітин	Лімфоцити + корвітин	7,82±0,81	8,68±1,06 B
<b>P<sub>1-2</sub></b>		< 0,01	< 0,001
<b>P<sub>1-3</sub></b>		< 0,001	< 0,001
<b>P<sub>3-4</sub></b>		< 0,001	< 0,001
<b>P<sub>1-4</sub></b>		< 0,001	< 0,01

Примітки:

P<sub>1-2</sub> - вірогідність різниці показників у порівнянні інтактних та інтактних тварин, яким вводили корвітин;

P<sub>1-3</sub> - вірогідність різниці показників у порівнянні інтактних і дослідних тварин;

P<sub>3-4</sub> - вірогідність різниці показників у порівнянні дослідних та дослідних тварин, яким вводили корвітин;

P<sub>1-4</sub> - вірогідність різниці показників у порівнянні інтактних і дослідних тварин, яким вводили корвітин.

Вплив корвітину на активність аргінази та вміст сечовини у ендотеліоцитах інтактних тварин (таб. 4.9.) зумовив недостовірні зміни в показниках аргінази і сечовини ( $P > 0,05$ ). В ендотеліальних клітинах за умов хронічного гіперімунокомплексного процесу (таб. 4.9.) відзначаємо зростання як активності аргінази - в 1,6 раза до  $7,69 \pm 0,78$  нмоль/мг білка ( $P < 0,001$ ), так і вмісту сечовини - в 1,9 раза до  $90,97 \pm 7,34$  нмоль/мг білка ( $P < 0,001$ ). Застосування корвітину за умов ХГК (таб. 4.9.) привело до

помітного зниження у показниках аргіназного шляху NO у ендотеліальних клітинах.

Таблиця 4.9.

**Показники активності аргінази та вмісту сечовини в ендотеліоцитах інтактних та дослідних тварин та їх корекція корвітином (M ±t; n=10)**

Умови досліджу	Досліджувані клітини	Аргіназа нмоль/мг білка	Сечовина нмоль/мг білка
Інтактні тварини	Ендотеліоцити	7,69±0,78	90,97±7,34
Інтактні тварини + корвітин	Ендотеліоцити + корвітин	6,51±0,88	97,01±8,24
Дослідні тварини	Ендотеліоцити	12,76±1,05	172,16±13,54
Дослідні тварини + корвітин	Ендотеліоцити + корвітин	10,06±1,01	73,12±5,44
<b>P<sub>1-2</sub></b>		> 0,05	> 0,05
<b>P<sub>1-3</sub></b>		< 0,001	< 0,001
<b>P<sub>3-4</sub></b>		< 0,05	< 0,001
<b>P<sub>1-4</sub></b>		< 0,05	< 0,05

Примітки:

P<sub>1-2</sub> - вірогідність різниці показників у порівнянні інтактних та інтактних тварин, яким вводили корвітин;

P<sub>1-3</sub> - вірогідність різниці показників у порівнянні інтактних і дослідних тварин;

P<sub>3-4</sub> - вірогідність різниці показників у порівнянні дослідних та дослідних тварин, яким вводили корвітин;

P<sub>1-4</sub> - вірогідність різниці показників у порівнянні інтактних і дослідних тварин, яким вводили корвітин.

Показник аргінази, за даних умов, падає на 21,16% до 12,76±1,05 нмоль/мг білка (P< 0,05), що в 1,3 раза перевищує вихідний рівень у інтактних тварин (P< 0,05). Рівень сечовини у ендотеліоцитах інгібований корвітином на 57,5% до 172,16±13,54 нмоль/мг білка (P<0,001), і став нижчим показника контролю на 19,6% до 90,97±7,34 нмоль/мг білка (P<0,05).

**Висновки:**

- розвиток ХГІК підтверджується зростанням показників ЦІК різної молекулярної маси ( $P < 0,01$ ) та зниженням показника гемолітичної активності комплементу ( $P < 0,001$ );
- розвиток ХГІК супроводжують наступні зміни метаболізму NO-синтазного шляху: зростання активності iNOS у лімфоцитах – 4,7 рази ( $P < 0,001$ ), в ендотеліоцитах в 2 рази ( $P < 0,001$ ) та інгібування потенціалу cNOS у лімфоцитах-2,6 рази ( $P < 0,001$ ) і в 1,6 рази ( $P < 0,05$ ) – ендотеліоцитах;
- хронічний гіперімунокомплексний процес характеризується активацією показників аргіназного шляху метаболізму L-аргініну: активність аргінази у лімфоцитах зростає у 5,1 рази ( $P < 0,001$ ), в ендотеліоцитах в 1,6 рази ( $P < 0,001$ ); вміст сечовини у лімфоцитах зростає у 3,9 рази ( $P < 0,001$ ), в ендотеліоцитах – 1,9 рази ( $P < 0,001$ );
- зміни у показниках метаболізму NO- синтазного шляху, зумовлені розвитком ХГІК, призвели до 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. Інгібування вмісту нітрозоглутатіону (також більш виражене в лімфоцитах) свідчить про напруження системи антиоксидантного захисту за цих умов;
- застосування корвітину, на тлі ХГІК, призвело до зниження концентрації ЦІК різної молекулярної маси і зростання показників комплементарної активності сироватки крові, а також зумовило корекцію змін NO-синтазного шляху сприяючи цим відновленню порушеного балансу в метаболізмі L-аргініну.

Основні наукові положення даного розділу опубліковані в таких працях:

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. [25].

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. [124].

Садляк О.В. Регуляторна і дисрегуляторна роль системи L-аргінін-оксид азоту в лімфоцитах білих щурів за умов хронічного гіперімунокомплексного синдрому //Здобутки клініч. та експериментальної медицини. – 2007. – № 2 (7). – С. 143 – 146 [125].

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 [164].

Садляк О.В. Корируючий вплив корвітину на NO-синтазний шлях оксиду азоту в лімфоцитах білих щурів за умов хронічної гіперімунокомплексемії. //Тези доповідей наук.-практ. конф. ”IV чтение им. В.В. Подвысоцкого“ – Одеса, 2007. – С. 103 – 104 [126].

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 доповідей наук.-практ. конф. ”IV чтение им. В.В. Подвысоцкого“ – Одеса, 2007. – С. 72 – 73 [22].

Садляк О.В. Вплив корвітину на показники системи оксиду азоту в ендотеліоцитах білих щурів за умов хронічної гіперімунокомплексемії //Тези доп. підсумкової наук.-практ. конф. ”Здобутки клінічної і експериментальної медицини“. Тернопіль, 2007. – С. 149 - 150 [127].

Садляк О.В. Характеристика окисного і неокисного шляху метаболізму L-аргініну в лімфоцитах білих щурів, за умов хронічного

гіперімунокомплексного 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 [128].

Особливості синтазного та аргіназного шляхів метаболізму NO в ендотеліоцитах білих щурів за умов хронічного гіперімунокомплексного синдрому /Садляк О.В., Чоп'як В.В., Любінець Л.А., Качмарська М.О., Вальчук І.В. //Медична хімія. /Тези доповідей науково-практ. конференції "Роль месенжерних систем у патогенезі патологічних процесів різної етіології" – 2007. – Т.9, № 4.- С. – 69-70 [100].

## РОЗДІЛ 5

### УЛЬТРАСТРУКТУРНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЛІМФОЦИТІВ І ЕНДОТЕЛІОЦИТІВ ЧЕРЕВНОЇ АОРТИ БІЛИХ ЩУРІВ В НОРМІ, ПРИ ХРОНІЧНІЙ ГІПЕРІМУНОКОМПЛЕКСЕМІЇ ТА ЗА УМОВ ЗАСТОСУВАННЯ КОРВІТИНУ

#### **5.1. Ультроструктурна характеристика лімфоцитів білих щурів у нормі, при хронічній гіперімунокомплексемії та за умов застосування корвітину**

Відомо, що функціонування імунної системи забезпечується завдяки її морфологічному субстрату, причому взаємозв'язок елементів імунної системи визначається як внутрішньосистемними, так і генетичними та нейроендокринними механізмами регуляції. Лімфоцити є унікальним об'єктом для вивчення фундаментальних процесів у клітині, зокрема тих, що розвиваються при хронічному гіперімунокомплексному процесі. Морфологічні зміни в імунокомпетентних клітинах передують функціональним, що може бути використано в якості прогностичного критерію імунопатології або розвитку захворювання. Електронно-мікроскопічні дослідження активованих лімфоцитів описані при різних патологічних станах [89].

Дослідження цих клітин на ультратонкому структурному рівні дозволяє більш точно визначити клітинні порушення як основу патогенезу і встановлення захворювання. Хоч Т- і В- лімфоцити є морфологічно подібні, вони диференціюються за молекулярними основами розпізнавання антигенів та за виконанням ефекторних функцій в імунітеті [58, 72, 106]. Реактивність активованих лімфоцитів визначається їх здатністю формувати рецептори до антигенів, продукцією медіаторів імунної відповіді, набором прозапальних цитокінів, підвищеною експресією хемоатрактантів. Адекватність реакцій на різноманітні стимули забезпечується завдяки узгодженій дії багатьох

ефекторних ланцюгів, що пов'язані із змінами в структурній організації цих клітин.

Мета даного розділу – на основі ультраструктурних особливостей лімфоцитів, отриманих від тварин із змодельованим ХГК, дати електронно-мікроскопічну характеристику ступеня активації та ушкодження в цих клітинах і з'ясувати стабілізуючу роль корвітину в цих процесах.

Аналіз електронно-мікроскопічних препаратів групи інтактних тварин, дозволяє прийти до висновку, що ультраструктура лімфоцитів відповідає загальноприйнятим уявленням про інтактні клітини (рис. 5.1.).

Рис. 5.1. Лімфоцит інтактної тварини. Клітина з чітко окресленою плазматичною (ПМ) і ядерною мембранами (Ям). Ядро (Я), ядерце (Яд), цитоплазматичний матрикс (Цм), зустрічаються поодинокі мітохондрії (М). 3б.х 11000.

Лімфоцити інтактних тварин мають чітко окреслені цитоплазматичні та ядерні мембрани. Ядра цих клітин круглі, хроматин дрібнозернистий, розподілений рівномірно. Ядерця дрібні, круглі, мають ділянку просвітлення, що розташована у центрі. Цитоплазматичний матрикс дрібнозернистий, однорідної щільності. У цитоплазмі розміщуються поодинокі мітохондрії,

матрикс яких помірно щільний, кристи довгі. Цистерни цитоплазматичної сітки дрібні, тубулярного типу, просвіт їх вільний. Рибосоми формують полісоми, розміщуються дифузно. Плазматична мембрана визначається на всьому протязі, місцями мембрана вкриває поодинокі дрібні цитоплазматичні ворсиноподібні виступи, що контактують з плазматичною мембраною оточуючих клітин.

Дослідження лімфоцитів тварин з хронічним імунокомплексним ураженням виявило виражену реакцію лімфоцитів на змодельований патологічний процес (рис 5.2., рис. 5.3.).

Рис. 5. 2. Лімфоцит тварини із змодельованою хронічною гіперімуно-комплексемією. Активованій лімфоцит з альтеративними змінами. Ультратруктура плазматичної мембрани (ПМ) та ядерної мембрани (ЯМ) порушена, Ядро (Я) наближається до “розщепленого” типу, неоднорідний цитоплазматичний матрикс (Цм). Зб.х 11000.

Клітина з ознаками запального процесу (рис 5.2.), ядро бобоподібної форми, наближається до “розщепленого” типу. Ядерце відсутнє, хроматин глибокий, однорідний. Об’єм цитоплазми збільшений, клітина асиметрична. Цитоплазматичний матрикс неоднорідної щільності, кількість



органел збільшена, розміщуються вони асиметрично в ділянці збільшеного об'єму цитоплазми. хроматин розміщується нерівномірно. Кількість мітохондрій збільшена, розміри і форма мітохондрій неоднорідні, поодинокі з них круглі, великих розмірів, матрикс просвітлений, кристи вкорочені або не контуруються. Решта мітохондрій також мають ознаки набухання різного ступеню розвитку. Цистерни цитоплазматичної сітки неоднорідні за діаметром, вміст їх просвіту різного ступеня електронної щільності. Плазматична мембрана місцями відсутня, цитоплазма клітини безпосередньо контактує з екстрацелюлярним матриксом.

Рис. 5. 3. Лімфоцит тварин із змодельованою хронічною гіперімуно-комплексемією, початкова фаза некрозу. Глибокі зміни в ультраструктурі плазматичної мембрани (ПМ), яка місцями відсутня. Ядро (Я) і ядерце (Яд) збережено, безструктурний цитоплазматичний матрикс (Цм).  
Зб.х 11000.

Лімфоцит у початковій стадії некрозу (рис. 5.3.). Отримані дані виявили виражену реакцію лімфоцитів на хронічне імунокомплексне запалення. У лімфоцитах переважають деструктивні процеси: ядро круглої форми, хроматин великозернистий, розміщується нерівномірно, ядерце відсутнє. Ядерна оболонка збережена. Цитоплазматичний матрикс електроннопрозорий і безструктурний, органи не розпізнаються, можна

розрізнити лише скупчення електроннощільного гранулярного матеріалу. Плазматична мембрана має множинні дефекти і цитоплазматичний 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.

На електроннограмі клітин, виділених із групи контрольних тварин, яким вводили розчин корвітину, представлений лімфоцит в активованому стані. Ядро збільшене в розмірах, ядрце розміщується на периферії ядра, розміри його значні, контури не чіткі. Хроматин глибокий, розподілений рівномірно, його ділянки більші за об'ємом порівняно з клітинами, виділеними в інтактних тварин. Кількість органел збільшена. Мітохондрії круглі, матрикс їх дещо просвітлений, кристи фрагментовані. Цистерни цитоплазматичної сітки множинні, просвіти їх нерівномірні, містять дрібнозернистий матеріал низької електронної щільності.

Рис. 5. 4. Лімфоцит інтактною тварини, яка отримувала корвітин. Клітина в активованому стані – збільшені розміри ядра (Я) і ядрця (Яд). Хроматин (Х), розподілений рівномірно, мітохондрії (М) круглі. Ядерна оболонка (Яо) і плазматичний матрикс (ПМ) чітко окреслені. Зб.х 11000.

Введення корвітину тваринам із змодельованою ХГК суттєво поліпшило морфофункціональний стан досліджуваних клітин. Клітини із помірно вираженою активацією, спостерігається суттєве покращення морфофункціонального стану досліджуваних клітин – ядро овальне, ядерце щільне, незначного об'єму, розташоване на периферії ядра. Ядерні мембрани звичайної будови. Хроматин дрібнозернистий, розміщується дифузно. Клітина асиметрична, з одного полюсу містить значний об'єм цитоплазми. Кількість органел збільшена. Мітохондрії круглі, збільшені в розмірах, матрикс помірно щільний, кристи довгі, розташовані мітохондрії групами. Цистерни цитоплазматичної сітки та комплексу Гольджі також гіперплазовані, просвіти їх дещо розширені. При цьому повністю реалізується мембранопротекторний ефект препарату – цитоплазматичний матрикс помірної щільності, гранулярний, рибосоми множинні, сформовані полісоми.

Рис. 5.5. Лімфоцит тварин із змодельованою хронічною гіперімунокомплексемією, які отримували корвітин. Клітина з помірною активацією – нормалізовані розміри ядра (Я) і ядерця (Яд). Хроматин (Х) розподілений дифузно, цитоплазматичний матрикс (ЦМ) помірно щільний, кристи довгі (К), мітохондрії (М) розміщені групами. Зб.х 11000.

## **5.2. Ультраструктурна характеристика ендотеліоцитів черевного відділу аорти білих щурів в нормі, при хронічній гіперімунокомплексемії та за умов застосування корвітину**

Внаслідок електронно-мікроскопічного дослідження ультратонких зрізів черевної частини аорти інтактних тварин встановлено, що вона має форму трубочки, центральна частина якої заповнена кров'ю, а стінки сформовані з ендотелію, базальної мембрани, субендотеліального шару, внутрішньої еластичної мембрани, середньої та зовнішньої оболонок ( рис. 5.6.).

Рис. 5.6. Ультраструктура просвіту аорти (ПА), ендотеліальних клітин (ЕК), базальної мембрани (БМ), внутрішньої еластичної мембрани (ВЕМ) та гладком'язових клітин (ГМК) черевного відділу інтактного щура. Зб.х 3000.

Ендотелій значної частини аорти організований плоскими клітинами, які містять цитоплазму середньої електронної щільності і ядро з великою кількістю випинань. Ядра ендотеліальних клітин злокалізовані, в основному, в апікальній частині цитоплазми, тоді як базальна частина представлена дрібнозернистою гіалоплазмою, рибосомами, полісомами, агранулярним

ендоплазматичним ретикулумом. Базальна частина плазматичної мембрани ендотеліальних клітин перебуває у тісному взаємозв'язку із базальною мембраною стінки аорти. Інколи в кортикальному шарі базальної цитоплазми плазматична мембрана утворює випинання і заглибини, у яких спостерігається згромадження електроннощільних частин базальної мембрани, що, можливо, забезпечує сильніше зчеплення між ними.

Люмінальна поверхня ендотеліальних клітин має хвилеподібний рельєф із невеликою амплітудою. У кортикальних шарах цитоплазми ендотеліальних клітин трапляються поодинокі, невеликих розмірів, електроннощільні аутофаголізосоми. Окремі ділянки ендотелію аорти представлені ендотеліальними клітинами, які мають витягнуту форму і своєю апікальною частиною, де локалізовано ядро, занурені у плазму крові.

Рис. 5.7. Ультраструктура гладком'язової клітини середньої частини стінки черевного відділу аорти інтактного щура, що має значних розмірів ядро (Я) та середньої електронної щільності цитоплазму, заповнену міофіламентами (МФ), дрібними мітохондріями (М), рибосомами (Р) та оточену по периферії плазматичною (ПМ) та базальною (БМ) мембранами. 36x6500.

Гладком'язові клітини, що перебувають усередині стінки аорти, мають зіркоподібну форму і латеральними частинами контактують між собою та з ділянками вкорочених вікончастих еластичних мембран (рис.5.7.).

Цитоплазма таких гладком'язових клітин насичена значною кількістю рибосом, міофіламентів, дрібних мітохондрій. Ядра цих клітин великі за розміром, неправильної форми, насичені еухроматином та вміщують ядрце. Периферичні ділянки цитоплазми цих клітин є у контакті із базальною мембраною незначної товщини. В міру наближення до зовнішньої еластичної мембрани гладком'язові клітини зменшуються і набувають пальцеподібної форми (рис. 5.8.). Часто між цими клітинами виявляються фібробласти, значні поля колагенових волокон. Зовнішня еластична мембрана є тонкою і контактує із сполучною тканиною, що заповнена фібробластами та колагеновими волокнами.

Рис. 5.8. Ультраструктура гладком'язових клітин (ГМК), видовженої форми, зовнішньої еластичної мембрани (ЗЕМ) та скупчення пучків колагенових волокон (КВ), що є між ними, черевного відділу аорти інтактного щура. Зб.х2000.

В умовах хронічної гіперімунокомплексемії плазма крові, що прилягає до люмінальної поверхні ендотеліальних клітин аорти, є електроннощільною, вміщує частково гемолізовані еритроцити, преципітати та коагуляти. Окремі ділянки базальної мембрани стінки аорти є деендотелізованими. До цих ділянок прилягають скупчення гемолізованих еритроцитів, фрагментів цитоплазми клітин, що розпалися, преципітати та коагуляти (рис. 5.9.).

Рис. 5.9. Ультраструктура внутрішньої оболонки черевного відділу аорти щура з ХГІК, до потоншеної внутрішньої еластичної мембрани (ВЕМ) якої прилягають скупчення преципітатів (ПЦ), коагулянтів (К) плазми крові, гемолізовані еритроцити (Е), фрагменти цитоплазми клітин (ФК), що розпались. Зб.х4000.

Значна частина ендотеліального шару утворена сплющеними ендотеліальними клітинами, що мають електроннощільну цитоплазму, яка сконцентрована, в основному, біля ядра (рис. 5.10.). Периферійні ділянки цитоплазми цих клітин являють собою дуже тонкий шар, який на значну віддаль простягається від ядра. Термінальні закінчення тонкого шару цитоплазми ендотеліальних клітин часто не перебувають у контакті із

сусідніми ендотеліальними клітинами. Зареєстровано, що люмінальна поверхня ендотеліальних клітин утворює значну кількість ворсинок або вип'ячувань та інвагінацій. У цитоплазмі ендотеліальних клітин є дезорганізовані, а то й вакуолізовані мітохондрії, канали зруйнованого ендоплазматичного ретикулуму. Ядра ендотеліальних клітин мають дуже нерівний контур, значну кількість куполоподібних випинань. Плазматична мембрана ендотеліальних клітин на багатьох ділянках є розпушеною, перерваною, і з внутрішнього боку до неї тісно прилягає значна кількість дуже дрібних електроннощільних утворів у формі депозитів.

Рис. 5.10. Ультраструктура дезорганізованого ендотелію (ЕТ). У субендотеліальному шарі депозити (Д). Внутрішня еластична мембрана (ВЕМ) вміщує розширені фенестри, є потоншеною та насиченою електроннощільними депозитами (Д) – як з боку ендотелію, так і з боку гладком'язових клітин (ГМК) черевного відділу аорти щура з ХГК. 36.x2000.

Зафіксовано, що базальна мембрана є дезорганізованою. Утворює густо переплетену сітку у вигляді гомогенних, перерваних електроннощільних тяжів (рис. 5.11.). Часто в розширеному



субендотеліальному шарі локально виявляються електроннощільні депозити, скупчення пучків колагенових волокон. Депозити видовженої форми локалізуються також на поверхні внутрішньої еластичної мембрани. Дезорганізованою та такою, що має у своєму складі дрібні електроннощільні включення у формі депозитів, є внутрішня еластична мембрана. Треба також зазначити, що відростки цитоплазми ендотеліальних клітин часто через розширені вікончасті утвори в еластичній мембрані заходять у м'язовий шар та мають контакт із цими клітинами.

Рис. 5.11. Ультраструктура розширеного субендотеліального шару (СШ) черевного відділу аорти щура з ХГІК, в якому сконцентровані перервані шари базальної мембрани (БМ), що переплітаються та мають у своєму складі дрібні електроннощільні депозити (Д). Зб.х10400.

Зареєстровано також, що електроннощільні скупчення колагенових волокон і розгалужених перерваних електроннощільних профілей тяжів, що відходять від базальної мембрани, насичують міжклітинний простір, що контактує із внутрішньою еластичною мембраною та гладком'язовими клітинами.

Гладком'язові клітини, що насичують середню оболонку черевної аорти, заокруглені. В їх центрі – електроннощільні ядра, що мають значну кількість пальцеподібної форми випинань. Часто такі випинання периферійних частин ядра заходять далеко у цитоплазму або виявляються у формі самостійних апоптичних тіл (рис. 5.12.).

Рис. 5.12. Ультраструктура ядра (Я) із значною кількістю випинань та дезорганізованою цитоплазмою (Ц) гладком'язових клітин, що прилягають до міжклітинного простору, заповненого скупченнями колагенових (КВ), еластичних волокон (ЕВ) та еластичної мембрани (ЕМ) із значним вмістом депозитів (Д) черевного відділу аорти щура з ХГІК. Зб.х 10000.

Цитоплазма гладком'язових клітин дезорганізована. Пучки міофіламентів лізовані, не мають чітких контурів. Плазматична мембрана цих клітин, як і базальна мембрана та каріотека, дезорганізована. Міжклітинні простори, що прилягають до таких гладком'язових клітин, розширені, вміщують скупчення підвищеної електронної щільності колагенових та еластичних волокон. Часто серед скупчень еластичних волокон виявляються електроннощільні депозити. Еластичні мембрани, що

розмежують такі гладком'язові клітини, дезорганізовані, мають розпливчастий контур.

Ділянки стінки тканин аорти, що прилягають до дезорганізованої зовнішньої еластичної мембрани, представлені клітинами невеликих розмірів. Інколи гладком'язові клітини тісно взаємозв'язані боковими поверхнями. Ядра цих клітин мають форму, близьку до овальної, насичені хроматином, в оточенні якого міститься значних розмірів ядрце. Зовнішня еластична мембрана, як і всі інші утвори цього роду, має нечіткі контури та насичена електроннощільними депозитами різної форми.

Таким чином, електронно-мікроскопічні дослідження черевного відділу аорти тварин із ХГІК виявили порушення цілісності ендотеліального шару. На значних ділянках він представлений дезорганізованими ендотеліальними клітинами, плазматична мембрана яких часто була пошкоджена та містила дрібні депозити. Електроннощільними депозитами був також насичений субендотеліальний шар та локальні ділянки базальної мембрани. Витягнутої форми депозити виявлялися по периферії внутрішньої еластичної мембрани. Гладком'язові клітини середньої оболонки були дезорганізованими, містили апоптичні тіла, значна частина внутрішньоцитоплазматичних елементів була лізована. Отримані дані можуть свідчити про структурні порушення при ХГІК в усіх шарах аорти.

За умов введення інтактним тваринам корвітину ультраструктурна організація плазми крові у черевній частині аорти зберігала дрібну зернистість та містила еритроцити, подібні до таких, як у контрольних тварин. Люмінальна плазматична мембрана, як і плазматична мембрана інших частин ендотеліальних клітин, зберігала чітку контурність (рис. 5.13). Ендотеліальні клітини вміщували значних розмірів ядро, наповнене еухроматином та обмежене з боку цитоплазми каріотекою. Цитоплазма ендотеліальних клітин містила дрібнозернисту гіалоплазму, юні мітохондрії.

Серед гіалоплазми, поєднаної із мітохондріями, виявились також канали гранулярного та агранулярного ендоплазматичного ретикулумів.

Субендотеліальний шар суттєво не відрізнявся від такого, як у контрольних тварин. У ньому відрізнялась чітка базальна мембрана, яка часто мала розгалужений пористий рельєф і простягалась до поверхні еластичної мембрани. В складі ендотелію, крім вищеописаної поздовжньої форми прилягання протопласту, виявлено ділянки, в яких ендотеліальні клітини мають перпендикулярне прилягання до базальної мембрани. Їх основна маса – цитоплазма, що зайнята ядром, виступає у просвіт судини. При цьому базальна мембрана, яка контактує із цитоплазмою таких клітин, перебуває майже в прямому контакті із поверхнею еластичної мембрани. Еластична внутрішня мембрана на всьому протязі є приблизно однакової товщини і має середню електронну щільність, характерну для цього роду структур.

Рис. 5.13. Ультраструктура плазми крові (ПК), еритроцита (Е), оптимально розвинутих ендотеліальних клітин (ЕК), що вміщують юні мітохондрії (ЮМ), субендотеліального шару (СШ) та внутрішньої еластичної мембрани (ВЕМ) черевного відділу аорти інтактного щура за умов введення корвітину. Зб.х8000.

Гладком'язові клітини, що прилягають до внутрішньої еластичної мембрани, мають дещо підвищену електронну щільність цитоплазми, в якій

містяться у значних кількостях пучки міофіламентів, комплекс Гольджі, рибосоми, полісоми, поодинокі мітохондрії, гранулярний ендоплазматичний ретикулум, поєднаний із розвинутою каріотекою. Ядра таких клітин насичені хроматином. Плазматична мембрана гладком'язових клітин є чіткою, поверх неї – тонка базальна мембрана. Гладком'язові клітини в міру наближення до зовнішньої еластичної мембрани та адвентиційної оболонки стають електронносвітлими, набувають округліших форм (рис. 5.14.).

Рис. 5.14. Ультраструктура гладком'язових клітин (ГМК) черевного відділу аорти інтактного щура за умов введення корвітину. Цитоплазма клітин насичена оптимально розвиненими міофіламентами (МФ), мітохондріями (М), рибосомами (Р), гранулярним ендоплазматичним ретикуломом (ГЕР). Клітини контактують із зовнішньою еластичною мембраною (ЗЕМ). Ядро (Я) гладком'язових клітин – овальної форми та насичене еухроматином (ЕХ). Зб.х8000.

Проте їх цитоплазма залишається в стані насичення сформованими міофіламентами, присутності значної кількості мітохондрій, рибосом, полісом, каналів гранулярного ендоплазматичного ретикулуму.

Плазматична мембрана таких клітин є чіткою, поверх неї – тонка базальна мембрана, що контактує із незначно розширеними міжклітинними просторами. В багатьох випадках у таких міжклітинних просторах перебувають незначні кількості пучків колагенових волокон.

Таким чином, при введенні інтактним тваринам корвітину, всі оболонки стінки аорти зберігали цілісність і були організовані клітинними та неклітинними елементами, що властиві цьому органу за умов норми. Однак нами виявлено високого ступеня контурність плазматичних мембран ендотеліальних клітин та мембранних структур цитоплазматичних органел та ядра. Це може свідчити про мембраностабілізуючу дію корвітину.

За умов введення модельним тваринам корвітину спостерігали наповнення просвіту аорти дрібнозернистою плазмою крові та поодинокими еритроцитами. Ендотеліальний шар був цілісним та організованим, в основному, ендотеліоцитами, що мали середню електронну щільність (рис. 5.15.). Такі ділянки ендотелію організовані ендотеліальними клітинами, які тісно прилягають своїми латеральними поверхнями одна до одної та мають форму, близьку до кубічної. Плазматична мембрана таких клітин, як правило, перебувала у тісному взаємозв'язку з тонкою, нерозгалуженою базальною мембраною, а та, своєю чергою, – з внутрішньою еластичною мембраною.

Цитоплазма цієї групи ендотеліальних клітин насичена дрібнозернистою гіалоплазмою, каналами гранулярного ендоплазматичного ретикулуму, рибосомами, полісомами, поодинокими мітохондріями. Ядра даних клітин значні за розміром та наповнені еухроматином. Траплялися ділянки ендотелію, сформовані витягнутими ендотеліальними клітинами, і такі, що контактували лише віддаленими ділянками цитоплазми та не утворювали перфорацій.

У багатьох випадках зареєстровано, що плазматична мембрана ендотеліальних клітин, яка прилягає до базальної та внутрішньої еластичної мембрани, вміщує значну кількість мікропіноцитозних випинань.

Рис. 5.15. Ультраструктура дрібнозернистої плазми крові (ПК), ендотелію, що організований тісно прилягаючими ендотеліальними клітинами (ЕК) середньої електронної щільності та оптимально розвинених базальної (БМ) і внутрішньої еластичної мембран (ВЕМ) черевного відділу аорти щура з ХГК при введенні корвітину. Зб.х6000.

Значну кількість мікроміхурців, заповнених електроннощільним матеріалом, виявлено в субендотеліальному шарі. Окремі мікроміхурці були поєднані із поверхнею кортикального шару базальної частини цитоплазми ендотеліальних клітин (рис. 5.16.). Внутрішня еластична мембрана, що прилягає до таких ділянок ендотелію, не відрізняється від такої, як у контрольних тварин. Плазматична мембрана ендотеліальних клітин була цілісною, а цитоплазма їх насичена дрібнозернистою гіалоплазмою, рибосомами та полісомами. Контури ядер у цих клітинах мали звивистий характер, а внутрішній вміст ядер представлений, в основному,

еухроматином. Базальна мембрана, що прилягала до таких ендотеліальних клітин, була на стадії формування та перебувала у взаємозв'язку з їх системою розгалужених мікротяжів, що простягалися до еластичної мембрани.

Рис. 5.16. Взаємозв'язок ультраструктур кортикального шару базальної частини цитоплазми ендотеліальних клітин (ЕК), субендотеліального шару (СШ), що заповнений мікротяжцями (ММ), базальної мембрани (БМ) та внутрішньої еластичної мембрани (ВЕМ) черевного відділу аорти щура з ХГІК при введенні корвітину. Зб.х20000.

Гладком'язові клітини досліджуваної частини аорти також подібні і суттєво не відрізняються від таких, як у контрольних тварин (рис. 5.17). Гладком'язові клітини мають середню електронну щільність цитоплазми та витягнутої форми ядра, наповнені еухроматином. Периферійні ділянки цитоплазми цих клітин мають чітко контуровані плазматичну та базальну мембрани. У міжклітинних просторах є в помірній кількості пучки колагенових волокон. Фенестровані еластичні мембрани зберігають хвилеподібну форму та помірну гофрованість. Присутність у ендотелії



щільно упакованих одна до одної ендотеліальних клітин, що мають середню електронну щільність ядра, наповненого еухроматином та цитоплазми, багаті на рибосоми, полісоми і мітохондрії, засвідчують посилені регенеративні процеси у внутрішній оболонці аорти тварин із ХГК за умов введення корвітину.

Рис. 5.17. Ультраструктура оптимально розвинених гладком'язових клітин (ГМК), міжклітинних просторів (МП) та фенестрованих еластичних мембран (ЕМ) черевного відділу аорти щура з ХГК при введенні корвітину. 36.x2300.

Таким чином, зміни ультраструктури досліджуваних тест-об'єктів, виявлені при застосуванні корвітину у тварин із ХГК, можуть свідчити про те, що даний препарат сприяє відновленню оптимального стану клітинних та неклітинних структур синусоїдних гемокапілярів і аорти. Дослідження показали, що корвітин в умовах ХГК виявляє цитопротекторний, ендотелійстабілізуючий і, певною мірою, ендотелійпроліферативний ефект.

## Висновки:

–хронічний гіперімунокомплексний процес супроводжується порушенням морфофункціонального стану лімфоцитів та ендотеліоцитів. Зміни в лімфоцитах характеризуються переважанням деструктивних процесів із елементами початкового некрозу. Морфологічні дослідження різних відділів черевної аорти білих щурів виявляють значні порушення ендотеліального шару судинної стінки внаслідок відкладання імунних комплексів;

–застосування корвітину зумовлює стабілізацію морфологічних змін лімфоцитів та ендотеліоцитів, що може стверджувати його цитопротекторну і мембраностабілізуючу дію за умов хронічної гіперімунокомплексемії.

Основні наукові положення даного розділу опубліковані в таких працях:

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. [21].

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. [147].

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. [39].

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. [33].

## РОЗДІЛ 6

### АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Питання патогенезу хвороб, розвиток яких пов'язаний з циркулюючими імунними комплексами антиген-антитіло, та механізми імунотоксичного ушкодження тканин і органів без сумніву є одним з актуальних і перспективних завдань сучасної імунопатології [220, 199].

Імунотоксичні хвороби, як загальнопатологічна категорія, широко представлена сучасною нозологією, оскільки ця патогенетична ланка супроводжує низку запальних, онкологічних, аутоагресивних та алергічних захворювань [20, 31, 49, 73, 135, 148]. Сформовані за цих умов імунні комплекси здатні виявляти пошкоджуючу дію на судинну стінку, що в подальшому веде до розвитку вторинних системних васкулітів, а їх вплив на різні тканини організму – підґрунтя до формування імунodefіцитних та аутоімунних захворювань [119, 156, 207, 253].

При імунотоксичних ураженнях основні події розвиваються в судинах. Найбільш важкі пошкодження виникають у тих ділянках, де є турбулентна течія крові, наприклад у місцях вигину чи біфуркації артерій, а також у судинах мікроциркуляторного русла [119]. Залежно від розміру, складу, структури та гідростатичного тиску в різних судинах, імунні комплекси або знаходяться у циркуляції, або відкладаються у тканинах, найчастіше у периваскулярних просторах. У результаті в останніх виникають місцеві осередки запалення, які нерідко переходять у генералізований процес, що пошкоджує переважно дрібні судини. Аналіз патогенетичних особливостей розвитку хронічної гіперімунотоксичності доводить, що відкладені на стінках судин імунні комплекси можуть призводити до порушення цілісності ендотелію, його функціональної здатності та збільшення проникливості судинної стінки [232]. Тому рання діагностика цього патологічного процесу і оцінка механізмів його розвитку, вивчення та розкриття нових біохімічних основ порушення нормальної кооперації клітин,

котрі формують стінку судин і постійно циркулюючих у кровотоці, є надзвичайно актуальною.

Розвиток ранніх судинних змін пов'язаний із активацією ендотеліоцитів та нейтрофілів, а прогресування цих змін супроводжується згромадженням Т-лімфоцитів та моноцитів. Оскільки ендотеліоцити презентують антигени активованим Т-лімфоцитам і навпаки, то виділені Т-лімфоцитами сигнали змінюють функціональні норми ендотеліальних клітин через згромадження на них прозапальних лейкоцитів [122, 178].

Пошкодження ендотелію асоціюється із підвищенням вивільненням прозапальних цитокінів, характерною особливістю яких є плеїотропність дії, наявність дублюючих і перекриваючих ефектів, каскадність взаємодії в єдиній регуляторній мережі. Ендотеліальні клітини, синтезуючи ІЛ-1, можуть активувати Т-лімфоцити та ініціювати імунологічні процеси у судинній стінці. Крім цього ІЛ-1 та TNF- $\alpha$  є потенційними індукторами ендотеліально-лейкоцитарних адгезивних молекул ELAM-1 і VCAM-1, котрі можуть підвищувати адгезію лейкоцитів до ендотеліальних клітин в стінці кровоносних судин [178]. Вивільнення запальних субстанцій стимулює моноцити крові для прилипання до ендотеліуму і міграції в інтиму, де вони перетворюються в макрофаги, котрі знову ж таки синтезують прозапальні цитокіни, що є стимулом для більшого прилипання лейкоцитів і згромадження Т-лімфоцитів [181, 183, 258].

Від того, які з цитокінів перебувають в оточенні Т – лімфоцитів під час контакту з патогеном, залежить за яким типом (клітинним або гуморальним) відбуватиметься подальший процес імунної відповіді організму [64, 131]. Цитокіни індукуючи секрецію антигенів МНС-1 для активації CD8+ Т-лімфоцитів на поверхні ендотеліальних клітин, приводять до запальної відповіді-активації нейтрофілів, результатом якої є пошкодження ендотелію (зміна морфології мембрани, організації клітинного матриксу та підвищення проникнення судинної стінки) [20, 50, 74, 263, 265].

T-лімфоцити – CD4+ та CD8+, виділяючи цитокіни (IL-1, IF $\gamma$ , TNF $\alpha$ ), приводять до запальної відповіді та ушкоджень у судині, а персистенція присутніх в інтимі антигенспецифічних T-лімфоцитів може підтримувати цей запальний процес [259]. При васкулітах ініціюючі зміни спричиняються нейтрофілами, але після згромадження та інфільтрації T-лімфоцитів [183].

Акумуляція T-лімфоцитів в пошкодженій тканині супроводжується підвищеною експресією хемоатрактантів: хемокінів та міжклітинних молекул адгезії VCAM-1, ICAM-1, котрі опосередковують прикріплення нейтрофілів, моноцитів та лімфоцитів до запалених ендотеліальних клітин [178, 192, 230]. Активовані T-лімфоцитами ендотеліальні клітини мають змінені ефекторні функції, а їх спільна взаємодія веде до активації та підвищення росту каскаду запалення [258].

Інші механізми, такі, як пряма клітинна токсичність чи антитіла, спрямовані проти компонентів інтими, або антитілозалежна цитотоксичність, працюють в синергізмі з цитокінами та хемокінами для досягнення прогресу судинного запалення [197, 260]. Адгезивні молекули за цих умов грають провідну роль в згромадженні лейкоцитів і прогресування судинного ушкодження [207].

Попередні дослідження показали, що судинні зміни та експозиція до вазодилітаторів асоціюється із зростанням рівнів розчинного ICAM-1 і підвищує імунологічну вразливість ендотеліоцитів. У цьому контексті довготривало персистуюче запалення в ендотеліальних клітинах приводить до зростання васкулярних порушень [21, 215].

За умов ХГК також порушується рівновага між функціонуванням активних метаболітів кисню, оксиду азоту та систем антиоксидантного захисту [62]. Розвиток оксидативного та нітрозактивного стресу не тільки індукує надходження імунокомпетентних клітин у вогнище запалення, але і змінює їх рецепторні властивості. Так, надмірний синтез NO посилює експресію на ендотеліоцитах молекул адгезії ICAM-1 і E- селектину [200, 225] ; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> індукує експресію Fc- рецепторів (CD64, CD32, CD16) для

імуноглобулінів, понижує вміст С- рецепторів (CD35, CD11b, CD18) для білків системи комплементу на цитоплазматичній мембрані; на відміну від пероксиду водню, супероксиданіон-радикал індукує експресію С- рецепторів на поверхні клітин [196].

За даними літератури [84] при пошкодженні ендотелію експресія іNOS компенсує втрату еNOS і тому є захисним механізмом, який, послаблюючи рекрутування моноцитів і нейтрофільних гранулоцитів, обмежує запальний процес і суттєво попереджує гіперплазію інтими. Проте у високій концентрації NO володіє цитотоксичною дією і здатністю викликати клітинний апоптоз, а пероксинітрит, що виникає при паралельному утворенні великих кількостей NO і  $O_2^-$ , чинить виражену прооксидантну дію, яка і є визначальною в дисфункції ендотелію [101, 115].

Експресія іNOS у судинній стінці при запаленні [9] поєднується з експресією COX-2. Це супроводжується вивільненням великої кількості прозапальних ейкозаноїдів типу простагландинів  $E_2$ ,  $F_{2\alpha}$ , простацикліну і є одним з механізмів прогресування запалення.

Отже, некомпенсована генерація вільних радикалів виявляється у руйнуванні клітинних компонентів і може призводити до формування тяжких системних патологій. Тому однією із актуальних проблем клінічної імунології є пошук і вивченням середників не тільки здатних захищати тканини організму від агресивної дії кисневих радикалів, але і з відносно селективною дією на популяції і субпопуляції імунокомпетентних клітин. Дослідження показали, що одним із препаратів, який володіє властивостями антиоксиданта, мембранопротектора та імуномодулятора є біофлавоноїд – кверцитин [52, 88]. Останнім часом проводяться дослідження щодо участі кверцетину в процесах синтезу оксиду азоту [184, 185, 217].

Виходячи з того, що питання терапії хронічного гіперімунокомплексного процесу є досить складним і суперечливим, метою нашої роботи стало вивчення і розкриття нових механізмів залучення лімфоцитів та ендотеліальних клітин у розвиток цього процесу, а також

експериментальна оцінка впливу на ці механізми парентеральної форми кверцетину – корвітину. Дослідження впливу корвітину проводились на імунологічні, NO-залежні механізми та структуральні зміни лімфоцитів і ендотеліоцитів, а також їх асоціації при хронічній гіперімунокомплексемії в умовах *in vitro* та *in vivo*.

Для досягнення мети необхідно було вирішити наступні завдання:

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.

Хронічна гіперімунокомплексна патологія була змодельована за методикою G. Cochrane, D. Koffer [187] в модифікації R. Williams [202]. Дослідження проводились на білих щурах-самцях, масою 200-250 гр.

Усі експериментальні тварини були поділені на 4 серії:

I серія – інтактні тварини, яким у хвостову вену кожні 7 днів впродовж 12



тижнів вводили фізіологічний розчин із розрахунку 100 мг/кг (50 тварин);

II серія – тварини із змодельованою і верифікованою лабораторними дослідженнями хронічною гіперімунокомплексемією, яким у хвостову вену кожні 7 днів впродовж 12 тижнів вводили бичачий сироватковий альбумін із розрахунку 100 мг/кг (50 тварин).

III серія – інтактні тварини, яким вводили корвітин внутрішньоочеревинно в дозі 40 мг/кг маси тіла щура впродовж 10 днів (50 тварин);

IV серія – тварини із змодельованою і верифікованою лабораторними дослідженнями хронічною гіперімунокомплексемією, яким вводили внутрішньоочеревинно корвітин у дозі 40 мг/кг маси тіла щура впродовж 10 днів (50 тварин);

Відомо, що новим напрямком у сучасній імунології є вивчення біохімічних основ порушення нормальної кооперації клітин, котрі формують стінку судин і постійно циркулюючих у кровоплинні [143, 171]. Основну роль у реалізації нормальної кооперації цих клітин, як у нормі, так і при патології, відіграє система L-аргініну [57]. З'ясування механізмів NO–синтазної та аргіназної активності, як в ізольованих лімфоцитах та ендотеліальних клітинах, так і при їх сумісній інкубації, за умов норми та ХГК, може привести до глибшого розуміння патогенезу і регуляції імунного запалення.

Дослідження *in vitro* проводилось у 8 серіях суспензії клітин лімфоцитів та ендотеліоцитів:

I серія – лімфоцити інтактних тварин, інкубовані без ендотеліоцитів (сумарно 20 тварин);

II серія – ендотеліоцити інтактних тварин, інкубовані без лімфоцитів (сумарно 20 тварин);

III серія – сумісна інкубація лімфоцитів та ендотеліоцитів інтактних тварин (сумарно 20 тварин);

IV серія – сумісна інкубація лімфоцитів та ендотеліоцитів інтактних тварин у присутності корвітину (сумарно 20 тварин);

V серія – лімфоцити тварин із змодельованою ХГК, інкубовані без ендотеліо

(сумарно 20 тварин);

VI серія – ендотеліоцити тварин із змодельованою ХПК, інкубовані без лімфоцитів (сумарно 20 тварин);

VII серія – сумісна інкубація лімфоцитів та ендотеліоцитів тварин із змодельованою ХПК (сумарно 20 тварин);

VIII серія – сумісна інкубація лімфоцитів та ендотеліоцитів тварин із змодельованою ХПК в присутності корвітину (сумарно 20 тварин);

Виходячи із вищесказаного, першим етапом нашої роботи було дослідження процесів NO-синтазної активності, як в ізольованих лімфоцитах та ендотеліальних клітинах, так і при їх сумісній інкубації, за умов норми та хронічної гіперімунокомплексної патології.

Для запобігання змішуванню лімфоцитів та ендотеліоцитів клітини розділяли напівпроникними мембранами.

Отримані нами результати встановили, що наявність в інкубаційному середовищі ендотеліальних клітин за умов норми, здатна впливати на процеси синтезу оксиду азоту в лімфоцитах. Ця присутність зумовила зменшення активності iNOS ( $P < 0,05$ ), яка хоч і була компенсована рівнозначним підвищенням активності cNOS ( $P < 0,05$ ), але є свідченням зниження цитотоксичної активності лімфоцитів в цих умовах. Незначно підвищується рівень стабільних метаболітів NO, вміст нітрозоглутатіону (GSNO) при цьому вірогідно не змінився.

Активність NOS у ендотеліоцитах при їх інкубації в присутності лімфоцитів за умов норми є наступною: найбільші зміни торкаються cNOS, активність якої при сумісній інкубації з лімфоцитами зростає ( $P < 0,001$ ), паралельно з цим зростає рівень iNOS та NOS ( $P < 0,001$ ). За цих умов рівень метаболітів NO у ендотеліоцитах інтактних тварин після їх інкубації в присутності лімфоцитів є різноспрямованим. Спостерігається підвищення активності  $\text{NO}_3^-$  ( $P < 0,05$ ) та незначно – вмісту GSNO ( $P > 0,05$ ). Зі сторони “агресивного” метаболіту  $\text{NO}_2^-$  – тенденція до зниження ( $P > 0,05$ ). Отримані

результати підтверджують той факт, що ендотеліальні клітини володіють сильною системою захисту від ушкоджувального впливу зі сторони агресивних факторів, що і проявилось значним збільшенням потенціалу NOS і cNOS ( $P < 0,001$ ) та менш значним “захисного” метаболіту  $\text{NO}_3^-$  ( $P < 0,08$ ).

Аналіз аналогічних досліджень у клітинах тварин із змодельованою хронічною гіперімунокомплексемією виявив дещо інші особливості.

Інкубація лімфоцитів в присутності ендотеліоцитів по відношенні до контролю показала різке підвищення iNOS ( $P < 0,001$ ) та істотне зменшення cNOS ( $P < 0,001$ ). Досить цікавим за цих умов є зниження вмісту  $\text{NO}_2^-$  - аніону у порівнянні з клітинами контролю ( $P < 0,001$ ), показник рівня  $\text{NO}_3^-$  - аніону є також понижений ( $P < 0,001$ ). Паралельно з цим спостерігається дуже різке зменшення вмісту GSNO у всіх досліджуваних тест-об'єктах ( $P < 0,001$ ), що за умов даної патології може бути розцінено як напруження системи антиоксидантного захисту. Показник сумарної активності NOS за цих умов також понизився ( $P < 0,05$ ).

Інкубація ендотеліоцитів в присутності лімфоцитів за умов ХГІК привела до зростання iNOS ( $P < 0,05$ ) по відношенні до контролю. Активність NOS, cNOS і рівень стабільних метаболітів за даних умов є пониженим.

Отже, отримані результати дозволяють припустити, що при гіперімунокомплексній патології, пониження синтезу оксиду азоту в активованих лімфоцитах прямо або опосередковано призводить до порушення процесів його синтезу в ендотеліальних клітинах, що в подальшому може призвести до порушення функціональної здатності ендотелію та ушкодження судин. Гальмування фізіологічної регуляторної функції оксиду азоту за умов ХГІК, створює умови для інгібування NO – синтазного шляху і веде до активації аргіназного шляху метаболізму системи L-аргініну.

Виходячи з цього, наступним етапом нашої роботи було дослідження особливостей аргіназного шляху метаболізму оксиду азоту, а саме можливої активності аргінази та сечовини, як в ізольованих лімфоцитах та

ендотеліальних клітинах, так і при їх сумісній інкубації, за умов норми та при ХГК.

Аналіз показників активності аргінази та сечовини у лімфоцитах тварин при їх інкубації без ендотеліоцитів та в їх присутності за умов контролю, показав пониження вмісту сечовини ( $P < 0,05$ ). Зміни в активності аргінази за аналогічних умов були незначними ( $P < 0,05$ ). Проведення інкубації ендотеліальних клітин без і в присутності лімфоцитів за умов контролю виявило незначне зменшення активності аргінази та вмісту сечовини ( $P < 0,05$ ).

Дослідження, проведені у лімфоцитах тварин, при їх інкубації без і в присутності ендотеліоцитів за умов ХГК, показали вірогідне зростання аргіназної активності ( $P < 0,05$ ) по відношенні до контролю. За даних умов значно підвищується вміст сечовини ( $P < 0,05$ ), як кінцевого продукту аргіназного обміну. Сумісна інкубація ендотеліоцитів з лімфоцитами за умов ХГК привела до різноспрямованих змін: підвищення аргіназної активності ( $P < 0,05$ ) та значного інгібування вмісту сечовини ( $P < 0,05$ ), що в цій ситуації може бути свідченням розвитку оксидантного стресу в ендотеліальних клітинах

Для з'ясування особливостей дії корвітину на два шляхи метаболізму NO в умовах *in vitro*, дослідження проведено як у контрольній групі тварин, так і в тварин із змодельованим хронічним гіперімунокомплексним синдромом. Для цього в лунку планшети вносили по 200 мкл розчину корвітину в дозі  $1 \cdot 10^4$  г/л.

Присутність корвітину в інкубаційному середовищі сумісно інкубованих лімфоцитів та ендотеліоцитів інтактних тварин привело до пониження у лімфоцитах рівня iNOS,  $\text{NO}_2^-$  ( $P < 0,05$ ) та вмісту GSNO. За даних умов зростають показники NOS, cNOS та  $\text{NO}_3^-$ .

Аналогічні дослідження, проведені в ендотеліоцитах інтактних тварин, виявило незначне пониження ферментативної активності синтаз оксиду азоту та невірогідне зростання рівнів  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  ( $P > 0,05$ ). Спостерігається

тенденція до підвищення вмісту GSNO та iNOS, яку за цих умов можна розцінити як компенсаторну.

Проведені дослідження впливу корвітину на показники синтезу оксиду азоту та рівня стабільних метаболітів в лімфоцитах і ендотеліоцитах тварин із ХГК за умов їх сумісної інкубації.

Присутність корвітину в інкубаційній суміші призвела до зниження активності iNOS ( $P < 0,05$ ), активація якої спостерігалась за умов інкубації лімфоцитів з ендотеліоцитами при ХГК. Паралельно підвищується вміст sNOS та рівень стабільних метаболітів у лімфоцитах ( $P < 0,05$ ). Виявлено також виражений нормалізуючий ефект корвітину на функціональну активність ендотеліоцитів, що проявилось зниженням активності індукбельної NO- синтази ( $P < 0,05$ ), пониженням рівня  $\text{NO}_2^-$  і стимулюючим впливом на рівень  $\text{NO}_3^-$  та вміст нітрозоглутатіону ( $P < 0,05$ ).

Вивчення впливу корвітину на особливості синтезу аргіназної активності оксиду азоту у лімфоцитах і ендотеліоцитах тварин за умов норми та ХГК показало наступне: за умов норми, наявність корвітину в інкубаційному середовищі знижує активність аргінази ( $P < 0,05$ ) у лімфоцитах, рівень сечовини при цьому залишається незмінним. Присутність корвітину в середовищі ендотеліоцитів, інкубованих з лімфоцитами, на показники аргінази і сечовини практично не вплинула.

Присутність корвітину в інкубаційній суміші клітин тварин із хронічною гіперімунокомплексною патологією показала вірогідне зниження активності аргінази ( $P < 0,05$ ) та вмісту сечовини ( $P < 0,05$ ).

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 індукбельної 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 ХГК, проявляється також в інгібуванні аргіназної активності і

позитивною зміною неокисного шляху метаболізму системи L-аргініну на окисний.

Результати отримані в умовах *in vitro*, стали основою для подальшого дослідження особливостей двох шляхів метаболізму L-аргініну на функціональний стан лімфоцитів та ендотеліальних клітин за умов експериментальної гіперімунокомплексемії. Також було проведено дослідження коригуючої дії корвітину за цих умов.

Перед тим, як застосувати даний препарат для корекції порушень досліджуваних 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.

Згідно даних [241] виявлено, що біоактивність кверцетину в умовах *in vivo*, біотрансформується внаслідок адсорбції. Встановлено, що в печінці, нирках та плазмі крові щурів кверцетин знаходиться у вигляді сульфатованого глікозиду метил – кверцитину.

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

Розвиток хронічної імунокомплексемії супроводжується значними змінами зі сторони як імунокомплексних процесів так і активності комплементу сироватки крові. У експерименті встановлено зростання рівня “великих” ( $P < 0,01$ ) і “середніх” ЦК ( $P < 0,01$ ). Високий рівень ЦК можна пояснити

виснаженням захоплювальної здатності фагоцитів впродовж 12 тижнів досліду. Підтримання хронічної персистенції ЦК у судинному руслі може також бути результатом недостатньої активності рецепторів мембран еритроцитів, які є основними їх носіями до “кліренсних” органів [186]. За участю цього механізму вони елімінуються фагоцитарною системою [38, 169]. При надмірному утворенні ЦК ця система може не спрацьовувати і вони починають проявляти патогенну дію по відношенні до клітин-мішеней. Підтвердженням порушення функцій мембран цих клітин свідчать роботи проведені Чоп'як В.В [162]. Крім того, це комплексоутворення є комплементзалежним ( $P < 0,05$ ), оскільки в умовах довготривалої імунної відповіді склад ІК поповнюється новими АТ, що створює умови для фіксації та активації системи комплементу. Активація системи комплементу також корелюється із гіперпродукцією оксиду азоту, наслідком чого є збільшення в ендотеліоцитах генів, які кодують хемокіни – ІЛ-8, MCP-1, RANTES [163, 247]. Зменшення показника гемолітичної активності сироватки крові може свідчити про посилене використання компонентів системи комплементу для зв'язування ЦК з клітинами. За цих умов особливо страждає кілінгова функція фагоцитів, сприяючи накопиченню ЦК на клітинах-мішенях, а також їх преципітації в судинному мікроциркуляторному руслі [226]. Поглиблення проявів фагоцитарного імунодефіциту за цих умов формує сприятливе тло для млявого автоімунного запального ушкодження [227].

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

Вплив корвітину на процеси синтезу оксиду азоту у лімфоцитах та ендотеліальних клітинах в контролі 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 індукбельної ізоформи NOS в лімфоцитах є інгібована ( $P < 0,001$ ), а у ендотеліоцитах зростання її показника є недостовірним.

Розвиток ХГК супроводжувався експресією індукбельної NO – синтази в лімфоцитах ( $P < 0,001$ ) і ендотеліальних клітинах ( $P < 0,01$ ) та зниженням потенціалу конститутивної ізоформи NOS у цих клітинах. Паралельно з підвищенням ферментативної активності iNOS виявлено пониження вмісту стабільних метаболітів оксиду азоту. Оскільки концентрація стабільних метаболітів оксиду азоту –  $\text{NO}_2^-$  і  $\text{NO}_3^-$  має залежність від ступеня активності патологічного процесу, а за її рівнем у крові можна оцінювати розвиток захворювання і навіть контролювати ефективність лікувальних заходів [43], то зниження їх рівня у лімфоцитах і ендотеліальних клітинах, очевидно, може бути пов'язано із підвищеним вивільненням вмістимого цих клітин, унаслідок деструктивних процесів та збільшення проникності їх мембран за умов хронічного імунокомплексного запалення. Згідно даних [62] показано, що при хронічному гіперімунокомплексному процесі спостерігається зниження вмісту стабільного метаболіту оксиду азоту -  $\text{NO}_2^-$  у плазмі крові і нирках, а це передбачає можливість інтенсифікації при цій патології пошкоджувальної дії АФК, які є ініціаторами перекисного окиснення ліпідів та хімічної модифікації білкових молекул і молекул нуклеїнових кислот. Тому значне пониження у лімфоцитах та ендотеліоцитах вмісту GSNO ( $P < 0,001$ ), на тлі даної патології, може кваліфікуватися як напруження системи антиоксидантного захисту, оскільки саме концентрація GSNO є показником адаптації і антиоксидантної спроможності організму при патологічних станах

Також зміни у вмісті метаболітів оксиду азоту значною мірою можуть залежати від активності ферментів NO - синтаз. Так, інгібування активності cNOS може призвести до активації родини транскрипційних факторів NF- $\kappa$ B, AP-1, які зв'язують сайти в промоторних регіонах багатьох генів, залучених у



запальну та імунну відповідь [218]. Інгібування ферментативної активності NOS може бути зумовлено пониженням біодоступності запасів L-аргініну [48, 60]. Окрім цього, виявлені зміни в активності NO – синтаз, очевидно, можуть бути пов'язані із тим, що активовані ІК фагоцити індукують продукування прозапальних цитокінів, які є промоторами іNOS в імунокомпетентних клітинах [54, 227, 261, 264], а модифікація їх набору веде в подальшому до виникнення якісного і кількісного дисбалансу в імунній системі. Стійка активація прозапальних цитокінів створює сприятливі умови для розвитку автоімуноагресії та подальшого підтримання гіперімунокомплексемії. Також наявні дані про те, що запальні цитокіни можуть діяти як тригери, що переключають синтез NO з конститутивної ізоформи на індукцибельну [182, 258].

Дія корвітину на показники NO-синтазної активності за умов ХГІК мала наступні особливості: введення корвітину супроводжувалось нормалізацією сNOS як у ендотеліальних клітинах ( $P < 0,001$ ), так і в лімфоцитах ( $P < 0,001$ ), де спостерігається відновлення активності ферменту до показників контролю. 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 іNOS, особливо в лімфоцитах ( $P < 0,001$ ). Існує достатньо літературних даних щодо механізму впливу кверцетину на пониження активності іNOS. Згідно досліджень [192, 207], показано вплив цього препарату на активність ферменту індукцибельної ізоформи NOS, як на транскрипційному, так і на посттрансляційному рівнях, шляхом інгібування експресії мРНК [185, 217] та пониження серії сигнальних інтрацелюлярних шляхів [184].

Зростання рівня нітрит- і нітрат аніонів у групі тварин із ХГІК, яким вводили корвітин, супроводжується більш вираженим підвищенням концентрації “захисного” метаболіту  $\text{NO}_3^-$ , як в лімфоцитах ( $P < 0,001$ ), так і в ендотеліальних клітинах ( $P < 0,001$ ), тим самим не допускаючи розвиток NO-

залежного і оксидантного стресу. Отже, антиоксидантна дія кверцетину, зумовлює його здатність до блокування вільнорадикальної ліпопероксидації мембран, захисту ліпідного шару клітинних мембран від пошкодження і перехоплювання супероксиданіон – радикалу [54]. Це і спричинило підвищення вмісту нітрозоглутатіону (GSNO), особливо в ендотеліальних клітинах ( $P < 0,05$ ), значно переважаючи його показник у інтактних тварин.

Відомо, що обмін L-аргініну, як субстрату для синтезу оксиду азоту, здійснюється, як мінімум, двома шляхами: окисним і неокисним, що значно розширює розуміння його ролі в організмі.

Ця рівновага між NO-синтазним та аргіназним шляхами стабільно порушується лише при певних патологічних станах [10, 19, 115, 161].

Дослідження впливу корвітину на активність аргінази і сечовини у лімфоцитах та ендотеліальних клітинах інтактних тварин зумовило вірогідне пониження їх вмісту лише у лімфоцитах ( $P < 0,001$ ).

Розвиток хронічної гіперімунокомплексемії супроводжувався значною активацією аргінази і сечовини, як в лімфоцитах ( $P < 0,001$ ), так і у ендотеліальних клітинах ( $P < 0,001$ ).

На сьогоднішній день майже немає даних про роль впливу аргіназного шляху метаболізму NO на функцію імунокомпетентних клітин. Фактом є те, що у активованих макрофагах та лімфоцитах паралельно із NO-синтазою активується аргіназа [137]. Посилення синтезу аргінази блокує NO-синтазний шлях, (за рахунок виснаження аргіназою фонду загального L-аргініну), понижує вивільнення NO, що призводить до зміщення метаболізму в сторону неокисного перетворення аргініну на орнітин і сечовину [19], а на органічному рівні до змін імунного статусу різних систем організму.

Посилення продукції аргінази вносить дисбаланс у біосинтетичку поліамінів, які відіграють важливу роль у процесах проліферації всіх клітин організму ссавців. Порушений поліаміновий метаболізм може бути важливим фактором

розвитку канцерогенезу, оскільки наглядова функція Т-лімфоцитів за цих умов понижується, а це призводить до “вислизання” з-під імунологічного нагляду трансформованих клітин [30]. Зниження синтезу поліамінів призводить до інгібування росту метастазних пухлинних клітин *in vitro* та *in vivo* [30, 169].

Катаболізм аргініну в ендотеліальних клітинах проходить шляхом – орнітин/сечовина, а продукція оксиду азоту домінує лише в тому випадку, якщо клітини стимульовані цитокінами [30]. Зменшення в судинах ферментативної активності NO-синтаз, а відтак і продукції NO, підвищує активність аргінази та сечовини. Наслідком цього є порушення залежних від ендотелію дилататорних реакцій і підвищення судинного тонуусу [115].

Також причиною цих змін можуть бути і вікові порушення в самих ендотеліоцитах, оскільки з віком спостерігається зниження як окисного, так і неокисного шляхів перетворення аргініну, і, як наслідок, – зменшення експресії генів, накопичення кальцію, оксидативний стрес, перебудова ліпідного складу мембран. Ці порушення вважають первинним чинником вікзалежної патології серцево-судинної системи.

Сечовина є інгібітором iNOS, ефективним “скавенжером” іонів заліза  $Fe^{2+}$ , що обумовлює її високу антиоксидантну активність [137]. Встановлено, що сечовина може регулювати активність багатьох ферментів, транспорт іонів через деякі канали і навіть експресію певних генів [123]. Вивільнюючись у стресових ситуаціях, сечовина ефективно захищає центральну нервову систему і клітини крові від окислювального стресу, пригнічуючи продукти ПОЛ [11, 77]. Так, посилення циклу сечовини у печінці, очевидно, відноситься до ранніх проявів загибелі клітин і є прямо залежним від надмірної дезінтоксикаційної функції цього органу при патологічних станах [137, 158, 256]. Можливо, підвищення рівня сечовини при зміні утилізації аргініну на неокисний шлях метаболізму має компенсаторне значення, враховуючи її відому антиоксидантну роль.

Корекція корвітином на тлі ХГК привела до помітного зниження у показниках аргіназного шляху оксиду азоту: інгібування активності аргінази у лімфоцитах ( $P < 0,001$ ) та більш суттєвого пониження вмісту сечовини ( $P < 0,001$ ). Стосовно показників аргіназного шляху NO у ендотеліальних клітинах, то за даних умов показник аргінази падає ( $P < 0,05$ ). Вміст сечовини у ендотеліоцитах значно інгібований корвітином ( $P < 0,001$ ), а відносно показника контролю становить ( $P < 0,05$ ).

Отже, протекторні властивості кверцетину являються важливим фактором впливу на синтез оксиду азоту. В умовах окисного стресу кверцетин може виступати як інгібітор неокисного метаболізму L-аргініну по аргіназному шляху, внаслідок чого нормалізується окисний метаболізм L- аргініну по NO-синтазному шляху [38].

Таким чином, вищенаведені дані є свідченням того, що роль системи L-аргініну в імунокомпетентних та ендотеліальних клітинах є досить неоднозначною і залежить від багатьох умов, а це обумовлює доцільність її подальшого вивчення в плані уточнення патогенезу алергічних, інфекційних автоімунних захворювань, контролю ефективності призначеної терапії та прогнозування перебігу недуги.

Імунологічні та біохімічні зміни, зумовлені розвитком хронічної гіперімунокомплексемії у тварин, спричинили морфологічні зміни в лімфоцитах та ендотеліальних клітинах.

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 і цитоплазматичний простір вільно сполучається з оточуючим інтерстицієм.

Введення корвітину супроводжувалось покращенням морфофункціонального стану клітин із ознаками нормального функціонування. Морфологічна дія корвітину на лімфоцити проявилась відновленням їх ультраструктур, інгібуванням рівня їхньої активації та ознаками нормального функціонування. Цитопротекторний ефект корвітину можна пояснити його комплексним впливом на різноманітні рецепторні системи, ферменти та білки цих клітин [102]. Одним із можливих механізмів може бути гальмування ліпоксигеназного шляху метаболізму арахідонової кислоти, що в подальшому запобігає розгортанню запального процесу. Блокуючи вільнорадикальну ліпопероксидацію мембран, корвітин захищає їх ліпідний шар від пошкодження, тим самим попереджуючи деструктивні зміни самої клітини [103, 135].

При дослідженні черевного відділу аорти тварин з ХГК, встановлено, що плазма крові насичена лапатими масами, гемолізованими еритроцитами, преципітатами та коагулятами. Виявлені зміни відображають порушення системи гемостазу та насичення при цьому плазми крові нетиповими тілами, які, можливо, мають імунокомплексну природу. Ендотеліальний шар аорти модельних тварин в ряді місць був деендотелізований, на значних його ділянках представлений сплющеної форми дезорганізованими клітинами, плазматична мембрана яких була часто перервною та вміщувала дрібні депозити. Отримані дані свідчать про глибокі пошкодження та вказують на значні альтеративні впливи, що ініційовані довготривалим введенням БСА. Такі альтеруючі впливи на окремі ділянки внутрішньої оболонки приводять аж до некрозу та десквамації ендотеліальних клітин у просвіт артерії. На подібність морфологічних змін за умов довготривалого впливу БСА на організм вказували [221]. 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 БСА. Присутність значної кількості депозитів в субендотеліальному шарі, на поверхнях внутрішньої еластичної мембрани та фенестрованих еластичних мембран стінки аорти цих тварин говорить про глибоке проникнення та відкладання при цьому електроннощільних структур, що можуть мати імунокомплексну природу [187, 221].

Введення корвітину модельним тваринам привело 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 ендотеліостабілізуючого впливу. Отже, отримані нами дані підтверджують позитивний ендотеліопротекторний ефект корвітину за умов ХГК, який, володіючи високою афінністю до ендотелію, нейтралізуючи активні форми кисню, сприяє репарації ультраструктурних ушкоджень ендотелію і навіть відновлює до норми морфологічні зміни. Застосування цього препарату дозволить удосконалити фармакологічну корекцію вільнорадикальних процесів, які інтенсивно розвиваються за умов гіперімунокомплексної патології і призводять, в першу чергу, до ушкодження судин мікроциркуляції.

## 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 ЦК 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 – 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 ЦК 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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Абрамов А.Б., Комишин О.М., Преподобний Є.Ю. Вплив L-аргініну на будову лімфоїдної популяції тимуса //Вісник наук. дослід. – 2006. - №3 – С. 84-85.
2. Адаменко Г.П. Кооперативное взаимодействие поли – и мононуклеарных фагоцитов крови человека: влияние совместного культивирования клеток на их хемолуминисценцию и секрецию миелопероксидазы // Иммунология. – 2000. - №4. – С.26-29.
3. Аутоиммунный синдром в клинике аллергических болезней. /Семидоцкая Ж.Д., Чернякова И.А., Бездетко Т.В., Химич Т.Ю. //Астма та алергія. – 2005. – № 2-4. – С. 14-17.
4. Бабій В. П. NO – залежні механізми еміграції лейкоцитів: Автореф. дис. канд. мед. наук: 14.03.04 / Одеський держ. мед. універ. – Одеса, 2004. – 18 с.
5. Бажора Ю.І., Кресюн В.Й. Клінічна імунологія: проблеми і значення для практичної медицини // Одес. мед. журн. – 1999. - №3. – С.74-77.
6. Бідюк М.М., Чоп'як В.В., Любінець Л.А. Хронічна гіперімунокомплексемія. Вплив імунотропних препаратів. //Фізіол. журн. – 1998. – Т. 43, № 3-4. – С. 11-18.
7. Белоцкий С. М. Воспаление и иммунный ответ в таблицах и рисунках. – М.: Гончарь, 2006. – 64 с.
8. Бережная Н.М., Чехун В.Ф. Иммунология злокачественного роста. – К.: Наукова думка, 2005. – 790 с.
9. Братусь В.В. Оксид азота как регулятор защитных и гомеостатических реакций организма //Укр. ревматол. журн. – 2003 – Т. 4, 314. – С. 3-11.
- 10.Бродяк І.В., Сибірна Н.О. Механізми адаптації лейкоцитів крові до зміни продукції оксиду азоту за умов експериментального цукрового діабету // Матеріали науково-практ. конференції ”Роль месенжерних

- систем у патогенезі патологічних процесів різної етіології“ – Тернопіль – Медична хімія. – 2007. - Т.9, № 4.- С. 14 – 16.
11. Брюне Б., Сандау К., фон Кнетен А. Апоптотическая гибель клеток и оксид азота: механизмы активации и антагонистические сигнальные пути //Биохимия – 1998 – Т. 63, вып. 7 - С. 966-975.
  12. Ванин А.Ф. Оксид азота в биомедицинских исследованиях //Вестн. Рос. АМН. – 2000. - №4. – С.5-10.
  13. Вальчук І.В., Чоп'як В.В. Синтез оксиду азоту в нейтрофілах білих щурів за умов норми і хронічної гіперімунокомплексемії //Установч. з'їзд Укр. тов-ва кл. біології, 23-28.04.2004., м. Львів.- 2004.- С.287
  14. Васильева Г.И., Иванова И.А., Тюкавкина С.Ю. Кооперативное взаимодействие моно- и полинуклеарных фагоцитов опосредованное моно- и нейтрофилокинами // Иммунология. - 2000. – №5. – С.11-17.
  15. Ватутин Н.Т., Калинкина Н.В., Захама С. Влияние кверцетина на функциональное состояние левого желудочка у пациентов, получавших малые кумулятивные дозы антрациклинов //Запорожский мед. журнал – 2007. – № 2. (41)– С. 46 - 49.
  16. Вільхова Т.К., Гаврилюк А.М., Кульчицька А.С. Переваги методу кількісного визначення рівня циркулюючих імунних комплексів //X Конгрес СФУЛТ: Тези доповідей. Чернівці-Київ-Чикаго.- 2004. – С. 386.
  17. Взаємозв'язок гіперімунокомплексемії з імуноадгезивними властивостями мембран лімфоцитів / Гаврилюк А., Андрійчук Н., Чоп'як В., Луцик Б. та ін.. //Актуал. проблеми кл. імунол. та алергології. – 1996 - вип. 1, - № 1. - С. 111.
  18. Влияние донаторов NO нитрозотиола глутатиона на уровень окислов азота и малонового диальдегида в крови крыс. /Каминская Л.Ю., Жлоба А.А., Александрова А.А., Моисеева О.М. и др. //Артериальная гипертензия – 2005.-Т.11, №1. - С. 11-20.
  19. Вміст L-аргініну і амінокислот, що утворюються за його метаболізму по окисному і неокисному шляхах у крові пацієнтів з еректильною

- дисфункцією. Горпинченко І.І., Гула Н.М., Мірошніков Я.О., Коцюруба А.В. та ін. //Урологія. – 2002. – №3. – С. 85 - 90.
20. Воспаление. Руководство для врачей /Под. ред.. В.В. Серова., В.С. Паукова. – М.: Медицина, 1995. – 640 с.
21. 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.
22. 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.
23. Вплив ліпопротеїнів на продукцію стабільних метаболітів оксиду азоту аортою дорослих і старих щурів. /Потапенко Р.І., Ніжанковська О.В., Новикова С.М., Бурчинська М.К. та ін. //Буковинський мед. вісник. – 2005. – Т 9, №2. – С. 210-212.
24. Гаєвська М.Ю. Циркуючі імунні комплекси за умов норми та патології // Вісник наук. досл. – 2002. - №4. – С.37-40.
25. Гіперімунокомплексний синдром в експерименті та клініці /Чоп'як В.В., Вальчук І.В., Гайдучок І. Г., Садляк О.В. та ін. //Вісник наукових досліджень. – 2007. – №1. – С. 5-8.
26. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
27. Гомазков О.А. Эндотелий – эндокринное древо // Природа. – 2000. – № 5. – С. 21-39.
28. Голиков П.П., Николаева Н.Ю. Генерация оксида азота лейкоцитами периферической крови в норме и при патологии // Пат. физиол. и exper. тер. – 2003. - №4. – С. 11-13.

- 29.Гоженко А.И., Бабий В.П., Бабиенко В.В. Эмиграция лейкоцитов и обмен оксида азота при воспалительных и опухолевых процессах. . – Одесса: Черноморье, – 2005. - 223 с.
- 30.Граник В.А. Метаболизм L-аргинина (обзор). //Химико-фармацевтический журнал . – 2003. – Т.37, №3. – С.3-20.
- 31.Гуревич П.С. Иммунокомплексные болезни // Вісник наукових досліджень – 2002. - №4. – С.37-43.
- 32.Данилович Ю.В., Тугай А.А. Вплив активних метаболітів азоту і кисню на рівень сGMP в міоцитах матки //Укр. біохім. журн. – 2006. – Т.78, №1 – С. 102-106.
- 33.Деклараційний патент на корисну модель 13287, Україна МПК А61К 31/33. Застосування корвітину як ендотеліопротектора за умов гіперіммунокомплексного 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.
- 34.Денисенко О.І. Стан антиоксидантної системи крові хворих на алергодерматози. //Буковинський мед. вісник – 2005. – Т.9, №2 . – С. 83-84.
- 35.Долгих В.Т. Основы иммунопатологии. – М. Медицинская книга. – 2003.- 225 с.
- 36.Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология. – Одесса: Астро Принт. – 2006. – 603 с.
- 37.Дриянская В.Е., Возианов А.Ф., Дранник Г.Н. Экспрессия проапоптотического маркера (СД95) и молекул адгезии (ICAM-1) на лимфоцитах у больных хроническим мочеполовым хламидиозом //Здоровье мужчин. – 2004. - №4. – С.64-72.
- 38.Дрюк Н.Н. Профилактика повреждения тканей сложных лоскутов при ишемии-реперфузии в эксперименте // Травма. – 2002. – Т.3, №2. – С. 133-136.

39. Дослідження ультраструктури стінки аорти за умов хронічної гіперімунокомплексемії / Садляк О.В., Чоп'як В.В., Бідюк М.М. та ін. // Вісник наукових досліджень. – 2006. – №4. – С. 41-44.
40. Дубинина В.Г. Оксид азота и дизрегуляционная патология организма человека. // Буковинський мед. вісник. – 2005. – Т 9, №4. – С. 23-26.
41. Ендотеліальні клітини за умов культивування (порівняльний аналіз методичних підходів) / Т.Н. Коваленко, О.І. Осадченко. І.Р. Ніконенко, Т.Г. Скібо // Фізіол. журнал. – 1999.- Т.45, №4.- С. 120-124.
42. Эмиграция лейкоцитов и обмен оксида азота при воспалительных и опухолевых процессах / Гоженко А.И., Бабий В.П., Бабиенко В.В. – Одеса: Черноморье, 2005. – 37 с.
43. Заячківська О.С. Значення NO-опосередкованого механізму у резистентності слизової стравоходу. // Укр. морфолог. альманах. – 2006 – Т.4, №4.- С.28-30.
44. Залесский В.Н., Фильченков А.А., Дынник О.Б. Методы визуализации апоптоза // Журн. АМН України. – 2004. – Т. 10, № 2. – С. 326-338.
45. Звягина Т.В., Белік І.Ю., Кривоший А.А. Вивчення нітритів/нітратів як метаболітів оксиду азоту в біологічних рідинах хворих на системний та шкірний червоний вовчак. // Буковинський мед. вісник – 2002. – Т.6, №2 – С. 33-36.
46. Звягина Т.В., Гамаюнов И.В., Губанова Е.А. Изменения метаболизма оксида азота при ревматических заболеваниях. // Укр. ревмат. журн. – 2002. - №3(9). – С.10-15.
47. Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Реутов В.П. NO-синтазы в норме и при патологии различного генеза // Вестн. Рос. АМН. – 2000. – № 4. – С. 30-34.
48. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты. – М.: МАИК “Наука/Интерпериодика”. – 2001. – 343 с.

- 49.Игнатъева Г.А. Современные представления об иммунитете (контуры общей теории). // Пат. физиол. и exper. терапия. – 2003. - №2.- С. 2-7.
- 50.Иммунный статус, принципы его оценки и коррекция иммунных нарушений / Передерий В.Г., Земсков А.М, Бычкова Н.Г., Земсков В.М. – К.: Здоров'я. – 1995. – 211 с.
- 51.Имунопатология и аллергология. Стандарты диагностики и лечения /Под ред. Р.М. Хаитова. – М.: ГЭОТА РМЕД, 2001. – 96 с.
- 52.Караванская И.Л., Коваль Е.А. Влияние кверцетина (парентеральной формы кверцетина) на функциональное состояние основных популяций лейкоцитов у больных с острым Q – инфарктом миокарда. //Кардиология. – 2001. – № 2. – С. 48 – 53.
- 53.Кардіопротективна роль L-аргініну /Юськів Н.Я., Тумановська Л.В., Коцюруба А.В., Мойбенко О.О. // Буковинський мед. вісник. –2003.- Т.7, №1-2.– С.75-83.
- 54.Ковалев В.Б., Ковган В.В., Колчина Е.Ю. Механизмы лечебного действия биофлавоноида кверцетина (обзор литературы) //Укр. мед. альманах. – 1999. – Т. 2, № 4. – С. 176 – 184.
- 55.Ковальчук Л.В., Хараева З.Ф. Роль оксида азота в иммунопатогенезе стафилококковых инфекций // Иммунология.-2003.-№3.-С.186-188.
- 56.Коваль С.Б., Середенко М.М., Луніна Н.В. Механізм впливу циркулюючих нейтрофільних гранулоцитів на реакцію вивільнення із тромбоцитів крові людини // Фізіологічний журнал. – 2001. – Т.47, № 3. – С. 26-34.
- 57.Колесник Ю.М., Абрамов А.В., Камишний О.М. Эффекты NO в иммунной системе: NO и тимус. // Запорожский мед. журнал. – 2006. – № 2. (35)– С. 5-11.
- 58.Комісаренко С.В. Молекулярні механізми активації лімфоцитів //Укр. біохім. журнал. - 2002 .- Т. 74, № 46 (додаток 2) - С. 8.
- 59.Константинова Н.А., Хомякова Н.Ф. Влияние иммунных комплексов различной молекулярной массы на функциональную активность и

- внутриклеточный рН нейтрофилов в условиях УФ – облучения и без него //Бюлл. эксперимен. биологии и медицины. – 2001. – Т. 132, №9. – С. 293-300.
60. Корж А.Н. Современные представления о структуре, функции и биологической роли сосудистого эндотелия // Междунар. мед. журн. – 2003. – №1. – С. 130-134.
61. Коцюруба А.В., Семикопна Т.В., Вікторов В.В. Спосіб кількісного визначення нітрит-аніону в біологічній рідині. Патент України № 6 601N33152. Біол.. № 7. – 11 від 15. 12. 2000 р.
62. Коцюруба А.В., Бідюк М.М, Чоп'як В.В. Хронічний гіперімунокомплексний процес та його взаємозв'язок з системами, що генерують вільні радикали // Фізіол. журн.-2000.-Т.46, №1.- С. 17-23.
63. Кочуева М.Н. Роль факторов иммунного воспаления в развитии диастолической сердечной недостаточности различной этиологии. //Экспериментальна і клінічна медицина. – 2007. – №1. – С. 114-115.
64. Клеточные и гуморальные факторы рецидивирующего течения ревматоидного артрита. /Коваленко В.П., Гаврик А.С., Гавриленко Т.И. та ін. //Укр. ревматол. журнал – 2007. – № 1 (27). – С. 47-54.
65. Кузьмичева Л.В., Киселева Р.Е., Новожилова О.С. Изменения фосфолипидного состава мембран лимфоцитов при бронхолегочных заболеваниях. // Иммунология. – 2005. – №5. – С. 304-308.
66. Кульчицький О.К. Система оксиду азоту та вік. // Буковинський медичний вісник – 2005. – Т.9, № 2. – С. 143-144.
67. Лапич С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медикобиологических исследованиях с использованием Excel. – Морион, 2000. – 320 с.
68. Лаповець Л.С, Луцик Б.Д. Посібник з лабораторної імунології. – Львів, 2002.-173 с.

69. Левицький А.П., Розсаханова Л.М. Вплив биофлавоноїдів на активність фосфоліпази  $A_2$  з підшлункової залози і бджолоїної отрути. // Досягнення біол. та мед. – 2007. – № 1.(9) – С. 8 – 11.
70. Лебедев К.А., Понякина И.Д. Иммуная недостаточность // М.: Медицинская книга, 2003.- 443 с.
71. Лебедев К.А. Иммунофизиологические основы течения хронических воспалительных процессов и принципы их лечения // Аллергология и иммунология. – 2005. – Т.6, №2. – С. 161 – 168.
72. Литвиненко Г.И. Морфоцитохимические особенности лимфоцитов крови человека в разные фазы суточного и годового циклов в норме и при развитии иммунодефицитного состояния: Автореф. дис. канд. мед. наук / Новосибирский мед. инст. - 1998. – 16 с.
73. Логинський В.Г., Фецич Т.Г., Захарчук Л.С. Количественное определение ЦИК у гематологических и онкологических больных // Лаб. дело. – 1983. - № 3. – С. 16-19.
74. Луб'яна С.С. Профіль прозапальних цитокінів IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  у системі мати-плід у жінок із вагінальними інфекціями // Одес. мед. журн . – 2000. - №6(62). – С. 37-40.
75. Лямина Н.П., Сенчихин В.И., Сипягина А.Г. Оксид азота и артериальная гипертензия // Междунар. мед. журн. – 2002. – Т.8. №1-2. – С. 216-223.
76. Маеда Х., Акаике Т. Оксид азота и кислородные радикалы при инфекции, воспалении и раке // Биохимия.-1998.-т.63.-№7.-С. 1007-1019.
77. Мазепа М.А., Мазепа А.І. Роль апоптозу в патогенезі системного червоного вовчака. // Укр. ревматолог. журн. 2001. - № 3-4 (5-6). – С. 26-29.
78. Мазур Н.А. Дисфункция эндотелия, монооксид азота и ишемическая болезнь сердца // Терапевт. архив. – 2003. - №4. – С.84-86.



79. Манухина Е.Б., Малишев Н.Ю. Роль оксида азота в сердечно-сосудистой патологии: взгляд патофизиолога // Рос. кардиол. журн. – 2000. – №5. – С. 55-63.
80. Манько В.М., Петров Р.В., Хаитов Р.М. Иммуномодуляция: история, тенденции развития, современное состояние и перспективы // Иммунология. – 2002. – №3. – С. 132-138.
81. Марков Х.М. Роль оксида азота в патогенезе болезней детского возраста // Росс. вестн. перинатологии и педиатрии. – 2000. – №4. – С. 43-47.
82. Марков Х.М., Надирашвили С.А. О регуляции деятельности сердца системой L-аргинин-оксид азота // Пат.физиол. и эксперим. терапия. – 2003. - №4. – С. 9-13.
83. Мисула І.Р., Вайда О.В. Тканинний протеоліз кукси бронха після пульмектомії у тварин з різним типом запальної реакції // Вісник морфології. – 2004.-№1.-С. 95-97.
84. Мисула І.Р., Перепелиця М.П. Особливості імунологічних та метаболічних зрушень у дорослих і старих щурів при розвитку адренергічного ушкодження печінки // Вісн. наук. досл. – 2007. - №1. – С. 105-108.
85. Михайленко А.А., Покровский В.И. Вторичная иммунная недостаточность // Тер. арх. – 2002. - №11. – С. 5-9.
86. Мищенко В.П., Мищенко И.В. Физиология системы гемостаза. – Полтава: ООО “АСМИ“, 2003. – 124 с.
87. Мойбенко А.А., Павлюченко В.Б., Даценко В.В. Роль оксида азота в рефлекторной саморегуляции кровообращения // Досягнення біології і медицини. – 2003. – №1. – С. 10-11.
88. Мойбенко А.А., Пархоменко А.И., Кожухов С.Н. Эффективность водорастворимой формы кверцетина (корвитина) при лечении острого коронарного синдрома с элевацией сегмента ST // Журнал АМН України. – 2003. – Т.9, №2. – С. 361-370.

89. Морфологические изменения лимфоцитов при ревматоидном артрите /Дударь Л.В., Кошукова Г.И., Петров А.В., Золотницкий Г.А. //Буковинський медичний вісник. – 2002.-Т.6, №2-3. – С. 43-46.
90. Морфофункциональная характеристика специфических гранул сосудистого эндотелия в норме и в аспекте ишемического и реперфузионного синдрома повреждения миокарда /Волков А.М., Казанская Г.М., Дьяконица Т.М. и др. //Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2002. – №3. – С. 51.
91. Нещерет О. П. Ендотелійзалежні механізми регуляції кровообігу //Фізіол. журн. – 2003. - Т. 49, №4.– С. 24-32.
92. Нещерет О. П. Оксид азоту та нейрогормональна регуляція. //Патологія. – 2005. - Т. 2, №1 – С. 19-20.
93. Нещерет О. П., Шепеленко І.В., Гончар І.В. Фундаментальні експериментальні дослідження участі нервових, імунологічних та метаболічних чинників у патогенезі серцево-судинних ушкоджень. //Український кардіологічний журнал. – 2006. – Спец. випуск. – С. 150-155.
94. Никитюк Г.П., Бідюк М.М. Вплив кверцетину на фагоцитарну активність нейтрофільних гранулоцитів при експериментальній імунокомплексній патології // Клін. та експеримент. патологія. – 2003. – Т. 2. №1. – С. 47-50.
95. Никитюк Г.П., Бідюк М.М., Угрин О.М. Характеристика фагоцитарних процесів в умовах інкубації нейтрофілів з ендотеліоцитами тварин з хронічним гіперімунокомплексним процесом // Клін. та експеримент. патологія. – 2004. – Т. 3. №2. – С. 357-358.
96. Нікітін Є.В., Чабан Т.В., Сервецький С.К. Роль цитокінів у патогенезі інфекційних захворювань //Інфекційні хвороби. – 2007. – № 1. – С. 51-56.
97. Никонова М.Ф., Ярилин А.А. Пролиферативный статус ТН1 - и ТН2-клеток человека. // Иммунология. – 2006. – №4. – С. 203-208.

98. Определение мочевины в сыворотке крови и моче по цветной реакции с диацетилмонооксимом. В кн. : Клиническая биохимия. – Минск: Беларусь, 1976. – С. 41-43.
99. Осипов С.Г., Еремеев В.В., Руднев В.И. Методы определения иммунных комплексов // Лаб. дело. – 1983. - №11. – С. 3 - 7.
100. Особливості синтазного та аргіназного шляхів метаболізму NO в ендотеліоцитах білих щурів за умов хронічного гіперімунокомплексного синдрому /Садляк О.В., Чоп'як В.В., Любінець Л.А., Качмарська М.О., Вальчук І.В. //Медична хімія. /Тези доповідей науково-практ. конференції "Роль месенжерних систем у патогенезі патологічних процесів різної етіології" – 2007. – Т.9, № 4.- С. – 69 - 70.
101. Паливода С.Н., Черепок А.А. Роль оксидативного стресса в нарушении метаболизма азота оксида при гипертонической болезни //Серце і судини.-2004.-№1 .-С. 39 - 44.
102. Пархоменко А.И., Иркин О.И., Кожухов С.Н. Возможности фармакологической защиты миокарда при синдроме ишемии-реперфузии в экспериментальной и клинической практике //Ліки України. – 2002. - №7-8. – С. 2 - 11.
103. Пархоменко А.Н., Кожухов С.Н., Мойбенко А.А. Использование метаболически активного препарата корвитина у больных острым инфарктом миокарда: влияние на ближайший и отдаленный прогноз //Клін. та експеримент. патологія. – 2004. – Т. 3. №2. – С. 32-34.
104. Паттерсон Р., Греммер Л.К., Гринберг П.А. Ааллергические болезни: диагностика и лечение: Пер. с англ. – Москва: Геотар. Медицина, 2000. – 733 с.
105. Первый опыт применения внутривенной формы ингибитора 5 – липоксигеназы у больных острым инфарктом миокарда: клинико-гемодинамические параллели, влияние препарата на размеры некроза

- /Пархоменко А.Н., Мойбенко А.А., Кожухов С.Н. и др. //Укр. кардіол. журн. – 2000. – № 1-2. – С. 5-9.
106. Підковка Н.О., Воробець З.Д., Зіменковський А.Б. Дослідження деяких властивостей АТФаз у лімфоцитах крові людини // Клінічна фізіологія та біохімія.-2002.-№3.-С. 38 – 41.
107. Пікас О.Б., Петренко В.І. Стан системи оксиду азоту у хворих на вперше виявлений туберкульоз легень. //Запорожский мед. журн. – 2006 – №1 (36).- С. 49 - 52.
108. Пікас О.Б., Петренко В.І. Оксид азоту (III) у плазмі крові ліквідаторів наслідків аварії на ЧАЕС, хворих на десимінований туберкульоз легень. //Запорожский мед. журн. – 2007 – Т.40, №1.- С. 43- 45.
109. Пинегин Б.В., Дамбаева С.В. НК – клетки: свойства и функции. //Иммунология. – №2. – С. 105-113.
110. Пищальников А.Ю. Врожденные дефекты гуморального звена иммунитета по данным регионального регистра первичных иммунодефицитов // Иммунология. – 2000. - №4. – С. 58-60.
111. Победьонна Г.П. Системні порушення цитокінового оксидантного та стрес лімітуючого гомеостазу при загостренні бронхіальної астми важкого перебігу. //Астма та алергія – 2005. - № 2-4. – С. 22-24.
112. Подавление пролиферации и экспрессии внутриклеточных цитокинов в активированных Т-лимфоцитах человека под влиянием контактов с эпителиальными клетками различного органного происхождения. / Никонова М.Ф., Григорьева Т.Ю., Лиепиньш Д.Я., Шарова Н.И. и др. // Иммунология. – 2001. – № 4. – С. 33-37.
113. Покровский В.И., Виноградов Н.А. Оксид азота, его физиологические и патофизиологические свойства // Тер. архив.-2005.- №1.-С. 82-87.

114. Пороховська Н.В. Стан антиоксидантної системи при хронічній сироватковій хворобі // Експеримент. та клін. фізіологія та біохімія. – 2003. – №2. – С. 40-43.
115. Порушення ендотелійзалежних судинних реакцій, аргіназного та NO- синтазного шляхів обміну L-аргініну при артеріальній гіпертензії. Сагач В.Ф., Базілюк О.В., Коцюруба А.В., Буханевич О.М. // Фізіол. журн. – 2000. – Т.46, №3. – С. 3-12.
116. Постинфекционный аутоиммунный синдром: особенности патогенеза и современные протоколы клинической иммунодиагностики. /Сучков С.В., Шогенов З.С., Хитров А.Н., Вострикова И.Л. и др. // Терапевт. архив. – 2007. – №4. – С. 71-76.
117. Почерняева В.Ф., Цебржинский О.И., Шиш Н.В. Прооксидантно-антиоксидантный гомеостаз. //Буковинський мед. вісник – 2005. – Т.9, №2 .- С. 212-214.
118. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Косицын Н.С. Проблемы оксида азота и цикличности в биологии и медицине // Успехи современной биологии. 2005. №1. С. 41-65.
119. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. - М.: Мир.– 2000. – 581 с.
120. Роль депо оксида азота (NO) в адаптации сердечно-сосудистой системы /Манухина Е.Б., Ванін А.Ф., Смирин Б.В. и др. // Клін. та експеримент. патологія. – 2004. – Т. 3. №2. – С. 22-24.
121. Роль оксида азота в физиологии и патологии системы гемостаза /Гоженко А.И., Котюжинская С.Г., Реутов В.П. Одесса, 2005.-С. 139.
122. Роль факторів запалення у формуванні патології міокарда. /Грунова К.М., Зозуля І.С., Павлюк В.Д., Демидюк С.М. //Буковинський мед. вісник – 2006. - Т.10, №3. – С. 44-46.
123. Сагач В.Ф., Коцюруба А.В., Базілюк О.В. Інгібітори аргіназного шляху метаболізму L-аргініну як новий клас антигіпертензивних

- сполук: дія карбаміду на окисний метаболізм ліпідів і судинний тонус при артеріальній гіпертензії. //Фізіол. журн. – 2001. – Т. 47, №5. – С. 3-11.
124. 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.
125. 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
126. 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.
127. Садляк О.В. Вплив корвітину на показники системи оксиду азоту в ендотеліоцитах білих щурів за умов хронічної гіперімунокомплексемії //Тези допов. підсумкової наук.-прак. конф. ”Здобутки клінічної і експериментальної медицини.“ Тернопіль, 2007. – С. 149-150.
128. Садляк О.В. Характеристика окисного і неокисного шляху метаболізму L-аргініну в лімфоцитах білих щурів, за умов хронічного гіперімунокомплексного синдрому і стабілізуючий вплив корвітину на ці процеси //Тези допов. III міжнародної наук. конф. ”Гомеостаз: фізіологія, патологія, фармакологія і клініка“. – Одеса, 2007. – С. 46 - 48.
129. Сапин М.Р., Никитюк Д.Б. Иммуная система, стресс и иммунодефицит. – М.: АПП Джангар, 2000. – 184 с.

130. Северина И.С., Пятакова Н.В., Щеголев А.Ю. Потенцирование NO-зависимой активации растворимой гунилатциклазы полиаминами. //Биомедицинская химия.- 2007.- Т 53, вып. 1, с. 44-49.
131. Сепиашвили Р.И. Функциональная система иммунного гомеостаза //Аллергология и иммунология. – 2003. – Т. 4, № 4.– С. 5-14.
132. Сепиашвили Р.И., Шубич М.Г, Карпюк В.Б. Оксид азота при астме и различных формах иммунопатологии // Астма.-2001.-Т.2, №2.- С.5-14.
133. Сепиашвили Р.И., Балмасова И.П. Физиологические основы функционирования новой субпопуляции лимфоцитов-ЕКТ //Аллергология и иммунология.- 2005.-Т.6, 31.-С. 14-22
134. Синяченко О.В., Звягина Т.В. Оксид азота в терапевтической практике. - Донецк: ООО "Юго-Восток", ЛТД.-2001.- 258 с.
135. Сиволап В.П., Михайлівська Н.С. Застосування кверцетину ("Корвітину") у хворих на Q-інфаркт міокарда з метаболічними порушеннями (цукровий діабет, гіперхолістеринемія, ожиріння, артеріальна гіпертензія). //Науковий вісник Ужгородського університету, серія "Медицина". – 2005. – вип. 25.- С. 98-101.
136. Системна склеродермія і атеросклероз. / Амосова К.М., Ковганич Т.О., Тер-Вартаньян С.Х. та ін. //Укр. ревм. журнал. – 2007. – 1 (27). – С. 3-6.
137. Смердова Л.Н., Дмитренко Н.П. Роль оксида азота, ионов аммония, мочевины в механизмецитотоксического действия N-нитрозодиметиламина. //Сучасні проблеми токсикології – 2002.- №1.- С. 22-26.
138. Собчак Д.М., Корочкина О.В. Оценка показателей Т- клеточного иммунитета и медиаторов иммунного ответа у больных хроническим гепатитом С. // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2007. – №2. – С. 37-43.

139. Содержание центральных и эффекторных клеток памяти и функциональные свойства Т- лимфоцитов новорожденных и взрослых при различных способах активации *in vitro*. / Талаев В.Ю., Зайченко И.Е., Бабайкина О.М., Ломунова М.А. и др. //Иммунология. – 2005. – №5. – С. 267-274.
140. Соловьев А.И. Метаморфозы в “семействе” оксида азота. От зарождения жизни на земле до апоптоза и регуляции клеточных функций и коммуникаций //Лікування та діагностика. – 2003 – №3.– С. 8-14.
141. Солошенко Э.Н. I национальный конгресс Украины по иммунологии, аллергологии и иммунореабилитации //Международный медицинский журнал. – 1998. – Т.4, №2. – С. 136-137.
142. Субпопуляционный состав лимфоцитов регионарных лимфатических узлов, тимуса и селезенки при экспериментальном воспалении внутренних половых органов у крыс-самок. / Дергачева Т.И., Шурлыгина А.В., Старкова Е.В., Вербицкая Л.В. и др. // Иммунология. – 2000. – №5. – С. 17-19.
143. Талаева Т.В. Механизмы взаимодействия клеток крови и сосудистой стенки в реализации воспалительного и иммунного ответов // Укр. ревматологический журн. – 2001. – № 3-4 (5-6). – С. 45-52.
144. Теплова С.Н., Звоняцковская Е.А., Накушкина К.В. Система комплемента и циркулирующие иммунные комплексы у больных с ожогами // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол. – 1999. - №3. – С. 61-65.
145. Терехов О.П. Иммунная система – эндогенная система питания многоклеточных организмов //Иммунология. – 2005. – Т.26, №1. – С. 59-61.
146. Ткаченко МТ.М., Сагач В.Ф. Вікові зміни NO-залежного механізму регуляції судинної реактивності // Клін. та експеримент. патологія. – 2004. – Т. 3. №2. – С. 74.



147. Ультраструктурні особливості лімфоцитів та ендотеліоцитів за умов хронічної гіперімунокомплексемії /Садляк О.В., Чоп'як В.В., Бідюк М.М. та ін. // Буковинський медичний вісник. – 2006. – №3. – С. 120 - 123.
148. Участь нейтрофільних механізмів у патогенезі хронічної гіперімунокомплексемії /Бідюк М.М., Чоп'як В.В., Любінець Л.А., Павлович С.А. // Фізіологічний журнал. – 1997. - Т.43, №3-4. – С. 11-18.
149. Фенотипический и функциональный анализ лимфоцитов крови и патологического очага у больных туберкулезом легких. / Космиади Г.А., Абрамова З.П., Герберт В.Я., Титюхина М.В. // Проблемы туберкулезу. – 1995. – № 2. С. 42-43.
150. Филиппова Н.А., Каминская Л.Ю., Михаленкова И.В. Продукты NO- синтазной активности и воспаление дыхательных путей: метаболизм патофизиологическая роль при аллергических заболеваниях (Обзор литературы). //Клин. лаб. диагн. – 2006.- №8. – С. 3-9.
151. Флавоноїд кверцетин: фармакологічні властивості та клінічне застосування / Ватутін М.Т., Гончаренко Т.С., Склянка О.В., Вакхама С. // Ліки. – 2005. - № 3-4. – С. 19 – 27.
152. Фролов Б.А. Система комплемента и антитела в патогенезе болезней иммунных комплексов. – Оренбург, 1997. – 158 с.
153. Фуштей И.М., Подсевахина С.Л., Ткаченко О.В. Иммуновоспалительная активность и ее влияние на сосудодвигательную функцию эндотелия при ишемической болезни сердца в зависимости от клинического течения заболевания. // Укр. мед. альманах. – 2007.- Т 10, № 2.- С. 176-178.
154. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Современные иммуномодуляторы: основные принципы их применения // Иммунология. – 2000. – №5. – С. 4 – 7.

155. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Современные представления о защите организма от инфекции //Иммунология. – 2000. - №1. – С. 61-64.
156. Характеристика лимфоцитов периферической крови у больных с общей вариабельной иммунологической недостаточностью и возможный путь коррекции несостоятельности лимфоидных элементов. /Варфоломеева М.И., Латышева Т.В., Сетдикова Н.Х., Григорьева Т.Ю. // Иммунология. – 2002. – № 6. – С. 340-343.
157. 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.
158. Хухліна О.С., Воевідка О.С., Окопна А.М. Діагностичне та прогностичне значення активності аргінази в крові при стеатозі печінки та стеатогепатиті різної етіології. // Буковинський медичний вісник – 2005. – Т.9, № 2. – С. 251-253.
159. Цыкл оксида азота и NO-синтазные системы в миокарде /Реутов В.П., Гоженко А.И., Охотина В.Е., Котюжинская С.Г., Шукшин А.В., Сорокина Е.Г., Гоженко Е.А. – Одеса, 2007. – 37 с.
160. Цодікова О.А. Характеристика імунного гомеостазу дітей залежно від рівня неспецифічної резистентності, та типу адаптаційних реакцій //Буковинський медичний вісник. – 2005 .- Т. 9, № 4.- С. 60-65.
161. Чалисова Н.И., Закуцкий А.Н., Анискина А.И. Влияние аргинина и его метаболитов на культуру ткани крыс. //Росс. физиол. журнал – 2007. – Т.93, № 4. – С. 366 – 374.
162. Чоп'як В.В. Системні васкуліти: імунозалежні механізми розвитку та принципи імунотерапії //Автореф. дис. д-ра. мед. наук.- К., 1998. – 32 с.
163. Чоп'як В.В., Потьомкіна Г.О., Вальчук І.В. Ендотеліоцит: фізіологія та патологія //Серце і судини. – 2004. - № 1. – С. 105 - 109.

164. 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
165. Швалев В.Н. Возрастные изменения регуляторных механизмов сердечно-сосудистой системы и значение синтазы оксида в норме и при патологии. // Кардиология. – 2007. – №5. – С. 67-72.
166. Шебеко В.И. Дисфункция эндотелия при активации системы комплемента // Иммунопатология. – 2000.-№1.- С. 17-23.
167. Шестакова М.Ф. Дисфункция эндотелия – причины или следствие метаболического синдрома ? //Русский мед. журн. – 2001. – Т.9, №2. – С. 17-23.
168. Школьник В.В., Кочубей О.А. Імунне запалення та ендотеліальна дисфункція як фактори розвитку гострого інфаркту міокарда. //Практична медицина.- 2007. - № 3 (57).- С. 6-9.
169. Якобисяк М. Імунологія / Пер. з пол. під ред. проф. В.В. Чоп'як. – Вінниця.: Нова книга, 2004.-672 с.
170. Ярилин А.А. Система цитокинов и принципы ее функционирования в норме и патологии // Иммунология.-1997.-№3. - С. 7-12.
171. Ярилин А.А. Межклеточная кооперация при иммунном ответе. Выбор клеткой ответа // Иммунология.- 1999.-№1.- С. 17-24.
172. Ярилин А.А. Симбиотические взаимоотношения клеток иммунной системы. //Иммунология. – 2001. - Т. 25, № 4.- С. 16-20.
173. Ярилин А.А. Гомеостатические процессы в иммунной системе. Контроль численности лимфоцитов. //Иммунология. – 2004. - Т. 25, № 5.- С. 312 – 319.

174. Ahsa H., AH A., Ali R. Oxygen free radicals and systemic autoimmunity // *Clin. Exp. Immunol.* - 2003. - Vol.131, №3. - P.398-404.
175. Analysis of polymorphisms affecting immune complex handling in syntenic lupus erythematosus / Sullivan K.E., Jaward A.F., Piliero L.M., Kim N. et al. – 2003. –Vol. 42.- P.446-452.
176. Aoyagi K. Inhibitions of arginine synthesis by urea: a mechanism for arginine deficiency in renal failure which leads to increased hydroxyl radical generation // *Mol. and Cell. Biochem.* – 2003. – 244 (1-2). – P. 11-15.
177. Bank N.R. Aynedjian H.S. Role of EDRF (nitric oxide) in diabetic renal hyperfiltration // *Kidney Int.* – 1993. – Vol. 43.-P. 1306 – 1312.
- 178.Boehme M.W., Raeth U., Scherbaum W.A. et al. Interaction of endothelial cells and neutrophils in vitro: kinetics of thrombomodulin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1): implications for the relevance as serological disease activity markers in vasculitides // *Clin. and Exper.Immunol.*-2000.-Vol. 119 (1).-P. 250-254.
179. Boyum A. // *Scand. J. clin. Lab. Invest.* – 1987. – Vol. 97. – Suppl. 21. – P. 77-89.
180. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding //*Anal. Biochem.*- 1976.- Vol. 72, № 5.- P.248-254.
181. Butcher E. C., Williams M., Youngman K.O. et al. Lymphocyte trafficking and regional immunity // *Adv. Immunol.* – 1999. – Vol.72.- P.209-253.
182. Cattaruzza M., Slodowski W., Stojakovic M. et al. Interleukin-10 induction of nitric oxide synthase expression attenuates CD40-mediated interleukin-12 synthesis in human endothelial cells // *The J. of Biolog. Chem.*-2003.-Vol. 278.-P.37874-37880.

183. Cell-cell interactions:leukocyte-endothelial interactions / McIntyre T.M., Prescott S.M., Weyrich A.S., Zimmerman G.A. // *Cur. Opinion in Hemat-2003.-Vol.10.-P.150-158.*
184. Chakravorty M., Sugiyama T., Koide N. et al. The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264/7 macrophages cells // *J. Endotoxin. Res.-2001.-Vol.7(6).-P.431-438.*
185. Chen Y.C., Shen S.C., Lee W.R. Inhibition of NOS inhibitors and LPS – induced iNOS and cyclooxygenase – 2 gene expression by rutin, quercetin and quercetin pentaacetate in RAW 2647 macrophages // *J. Cell. Biochem. 2001. – Vol. 82 (4). – P. 537 – 548.*
186. Clq governs deposition of circulating immune complex and leukocyte Fcγ receptors mediate subsequent neutrophil recruitment / Stokol T., O'Donnell P., Xiao L., Knight S., Botto M. et al. // *JEM.-2004.-Vol.200, N27.-P.835-836.*
187. Cochrane C.G., Koffer D. Immune complex in experimental animal and man.// *Advanc.Immunol.- 1973.- Vol.16.-P.185-204.*
188. Cook N.C., Samman S. Flavonoids - chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary source // *J.Nutr.Biochem.-1996.-Vol.7.-P.66-76.*
189. Cytoprotective effect of green tea extract and quercetin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress / Jeong Y.M., Choi Y.G., Kim D.S., Park S.H. et al. // *Arch. Pharm. Res.-2005.-Vol.28(11).-P.1251-1256.*
190. David-Watine B., Israel A., Kourilsky P. The regulation and expression of MHC class I genes.// *Immunol. Today. - 2000.- Vol.11. – P. 287-292.*
191. Dijkstra H. M., van de Winkel J. C., Kallenberg G. M. Inflammation in autoimmunity:receptors for IgG revisited // *Trends. Immunol.- 2001.-Vol.22.- P.510-516.*
192. Effect of immune complexes in serum from patients with rheumatoid vasculitis on the expression of cell adhesion molecules on

- polymorphonuclear cells / Haruta K., Kobayashi S., Tajima M., Sakai A., Tamura N. et al. // *Clin. Exp. Rheumatol.*-2001.-Vol.29, AH. P. 59-68.
193. Effect of quercetin on metalloprotein, nitric oxide synthases and cyclooxygenase-2 expression on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats / Morales A.I., Vicente-Sanchez C., Jerkic M., Santiago J.V. et al. // *Toxicol. Appl. Pharmacol.*-2006.-Vol.210(1-2).-P.128-135.
194. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function / Middleton E., Hickey R., Kubec P. et al. // *Adv. Exp. Med. Biol.*- 1998. – Vol.439.- P.175-182.
195. Effekt of three flavonoids isolated from Japanese Polygonum species on superoxide generation in human neutrophils / Lur G., Wang W., Masuoka N., Asobe T., Yanashita K. et al. // *Planta Med.* – 2005.Vol.71(10). – P.933-937.
196. Elghetany M.T., Lacombe F. Physiologic variations in granulocytic surface antigen expression: impact of age, gender, pregnancy, race and stress // *J. of Leuk. Biol.*-2004.-Vol.75.-P.1-6.
197. Endothelial cell activation by endotoxin involves superoxide/NO-mediated nitration of prostacyclin synthase and thromboxane receptor stimulation / Bachschmid M., Thureau S., Zou M.H., Ullrich V. // *FASEB J.*-2003.-Vol.17.- P. 914-916.
198. Endothelial nitric oxide synthase activation is critical for vascular leakage during acute inflammation in vivo / Bucci M., Roviezzo F., Posadas I., Yu J. et al. // *PNAS.*-2005.-Vol.102.-P.904-908.
199. Fernandes N., Jancar S., Crespo S.M. Blood and endothelium in immune complex – mediated tissue injury // *Trends. Pharmacol.Sci.*- 2004. – Vol.25,№10.- P.512-517.
200. Forstermann U. Endothelial NO synthase as a source of NO and superoxide. // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* – 2006. – Vol. 62. (Suppl 13) – P. 5-12.

201. Freitas A.A., Rocha B. // *Ann. Rev. Immunol.*- 2000.- Vol. 18. – P. 83-111.
202. Gardanta C.L., Bond J.S. Assay and kinetics of arginase // *Anal. Biochem.* – 1982. – 126, № 1/ - P. 131-138.
203. Gerdel D. Gederbaum A.J. Inhibition of the catalytic activity of alcohol dehydrogenase by NO is associated with S – nitrosylation and the release of zinc // *Biochemistry.* – 1996. – 35, № 50/ – P. 16186 – 16194.
204. Gomez-Cuerrero C, Lopez-Franco O., Suzuki Y. et al. Nitric oxide production in renal cells by immune complexes: Role of kinases and nuclear factor-kappa B // *Kidney Int.*-2002.-Vol.62, №6.-P.2022-2034.
205. Green L.C., David A.W., Glogowski J. et al. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids // *Anal. Biochem.*-1982.-Vol. 126, X21.-P.131-138.
206. Hart S., Karen M., Dransfield I. Immune complexes bind preferentially to FcγRIIa (CD32) on apoptotic neutrophils, leading to augmented phagocytosis by macrophages and release of proinflammatory cytokines // *J. Immunol.*-2004.-Vol. 172.- P. 1882-1887.
207. Haruta K., Kobayashi S., Tajima M. Effect of immune complexes in serum from patients with rheumatoid vasculitis on the expression of cell adhesion molecules on polymorphonuclear cells // *Clin. Exp. Rheumatol.*- 2001.-Vol.29, №1. - P.59-68.
208. Immune complexes from SLE sera induce IL 10 production from normal peripheral blood mononuclear cell by an Fc gamma RH II dependent mechanism implications for a possible vicious cycle maintaining B cell hyperactivity in SLE / Ronneliol J., Tejole A., Mathsson L. et al. // *Am. Rhum. Dis.*- 2003.- Vol.62,№1.- P.37-42.
209. Infectionen and Vaskulitis / T.Gluck, R.Straub,J. Scholmerich, B. Lang // *Zeitschrift fur Rheumatologie.* – 1997.- Vol.56.,№3. – P. 105-113.
210. Inhibitory activity of flavonoids from *Lychnophora* sp. on generation of reactive oxygen species by neutrophils upon stimulation by immune

- complexes / Kanashiro A., Kabeya L.M., Policello A.C., Lopes N.P. et al. // *Phytother.res.* – 2004.Vol.18,№1. – P.61-65.
211. Jancar S., Crespo S. Immune complex-mediated tissue injury: a multistep paradigm // *Trends. Immunol.*-2005.-Vol.26, №1.- P.48-55.
212. Jyothi M.D., Khar A. Interleukin-2-induced nitric oxide synthase and nuclear factor-kappaB activity in activated natural killer cells and the production of interferon-gamma // *Scand.J.Immunol.*-2000.-Vol. 52(2). – P. 145-148.
213. Kari J.A. Early presentation of membranoproliferative glomerulonephritis in Arab children // *Saudi Med.J.* – 2003. – Vol. 24.№2. – P.157-160.
214. Kawana S. The membrane attack complex of complement alters the membrane integrity of cultured endothelial cells:a possible pathophysiology for immune complex vasculitis // *Acta Dermato-Venerologica.* – 1996. Vol. 76, №1.P.13-1
215. Kawana S. Vascular endothelial cell injury in allergic vasculitis // *Jornal of the Nippon Medical School.* – 1998. – Vol. 65, №3.-P.1950-200.
216. Ke X., Terashima M., Nariai Y. Nitric oxide regulates actin reorganization through cGMP and Ca calmodulin in RAW 264.7 cells // *Biochem. Biophys. Acta.*-2001.-Vol.1539(1-2). - P.101 -113.
217. Kim N.K., Cheon B.S., Kim Y.H. et al. Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships // *Biochem.Pharmacol.*-1999.-Vol.58, X25.-P.759-765.
218. Kitamoto S., Egashira K., Kataoka C. Increased activity of Nuclear Factor-kB participates in cardiovascular remodeling induced by chronic inhibition on nitric oxide in rats // *Circulations.*-2005.-Vol. 102(15).-P.806-812.
219. Lammas D.A., Casanova J. L., Kumararatne D. S. // *Clin. Exp. Immunol.* – 2000. – Vol. 121. – P.417-425.



220. Langford C.A. Vasculitis. // J. Allergy Clin. Immunol. – 2003. – Vol. 111. – P.602 - 612.
221. Lefkowitz J.B. Leucocyte migration in immune complex glomerulonephritis: role of adhesion receptors // Kidney International. - 1997. - Vol.51, JSa5. - P.1469-1475.
222. Li H., Forstermann U. Nitric oxide in pathogenesis of vascular disease // J.Pathol.-2000.-Vol.90.-P.244-245.
223. Le Shingu M., Nonaka S., Nishimukai H. Activation of complement in normal serum by hydrogen peroxide and hydrogen peroxide-related oxygen radicals produced by activated neutrophils // Clin. and Experim. Immunol.-2002.-Vol. 90.-P.72-78.
224. Liu G., Wang W., Masuoka N. Effect of three flavonoids isolated from Japanese Polygonum species on superoxide generation in human neutrophils // Planta Med.-2005.-Vol.71(10).-P.933-937.
225. Lum H., Roebuck K.A., Oxidant stress and endothelial cell dysfunction // Am. J. Physiol. – 2001. – Vol. 280. – P.719 - 741.
226. Malinski T. The Nitric Oxide-superoxide in dysfunctional endothelium // Abstr. First Ukr. Congress Cell Biol.-2004. - P.207-208.
227. Mantovani B., Chedraoui-Silva S. The role in the modulation by fluid-phase IgG of the production of reactive oxygen species by polymorphonuclear leukocytes stimulated with IgG immune complexes // Braz. J. Med. Biol. Res.-2006.-Vol.36, №12.-P. 1695-1672.
228. Magro C.M., Crovson A.N. Sterile neutrophilic folliculitis with perifollicular vasculopathy: distinctive cutaneous reaction pattern reflecting systemic disease // Journal of Cutaneous Pathology. – 1998. – Vol.25, №4. – P.215-225.
229. Moncada S. The L-arginine: nitric oxide pathway // Acta Physiol.Scand. – 1992. – Vol.145.P.201-227.
230. Moser B., Loetscher P. Lymphocyte trafficking control by chemokines // Nat. Immunol. – 2001.- Vol.2 – P.123-125.

231. Nawroth P.P., Bierhaus A. Endothelial cell dysfunction // *Ann. Hematol.* – 1992. – Vol.64 (1). – P.93-99.
232. Nangaku M., Couser W.G. Mechanisms of immune-deposit formation and the mediation of immune renal injury // *Clin. Exp. Nephrol.*-2005.- Vol.9, №3.- P. 183-191.
233. Neutrophils in rheumatoid inflammation / Biosi D., Carletto A., Caramaschi P. et al. // *Recenti Prog.Med.* – 2003. - Vol.94.P.24-30.
234. Nishimura M., Ishikawa Y., Satake M. Activation of polymorphonuclear neutrophils by immune complex: possible involvement in development of transfusion-related acute lung injury // *Trends. Med.*-2004.-Vol. 14, № 5.- P.359-367.
235. 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.
236. Norman M., Lister K., Yang Y. TNF regulates leukocyte-endothelial cell interactions and microvascular dysfunction during immune complex-mediated inflammation // *Br. J. Pharmacol.*-2005.-Vol.144, №2.-P.265-274.
237. Pietta P.G. Flavonoids as antioxidants // *J. Nat. Prod.* – 2000.Vol.63.- P.1035-1042.
238. Poon B.V., Raharjo E., Kamala D., et al. Complexity of inducible nitric oxide synthase // *Circulation.*-2003. – Vol.108.- P.1107-1115.
239. Precipitated immune complexes of IgM induce the generation of reactive oxygen species by rabbit polymorphonuclear leucocytes /V. Luciano, A. de Mello, E.Vasgues, B. Mantovani // *Brasizilian Journal & Biological Research.* – 1998. – Vol.31., №6. – P.793-798.

240. Raso G.M., Muli R., Carlo G. Inhibition of iNOS and COX-2 expression by flavonoids in macrophage J 774A.1 // *Life Sci.*-2001.-Vol.68(9).-P.921-931.
241. Rat gastrointestinal tissues metabolize quercetin / Graf B.A., Ameho C., Dolnikowski G.G., Milbury P.E. et al.// *J. Nutr.*-2006.-Vol.136(1). – P. 39-44.
242. Ravetch V.J. A full complement receptors in immune complex diseases // *J. Clin. Invest.*-2002.-Vol. 110.-P. 1759-1761.
243. Robak J., Gryglewski R.I. Flavonoids are scavengers of superoxide anion / *Biochem. Pharmacol.* – 2000. – Vol. 37. – P.837-841.
244. Roebuck K. Oxidant stress regulation of IL-8 and ICAM-1 gene expression: differential activation and binding of transcription factors AP-1 and NF- $\kappa$ B // *Int. J. Med.*-1999.-Vol.4.-P.223-230.
245. Rollinghoff M., Diefenbach A. The role of nitric oxide in innate immunity // *Immunol. Rev.*-2000.-Vol.3.-P.17-26.
246. Salvucci O., Kolb J., Dugas B. The induction of nitric oxide by interleukin-12 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in human natural killer cells: relationship with the regulation of lytic activity // *Blood.*-1998.-Vol.92(6).-P.2093-20102.
247. Sen C. R., Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription // *FASEB J.* – 1996. - Vol. 10. - P.709-720.
248. Sell. S. Immunology, Immunopathology, Immunity // Stamford: Lauge.- 1996. – P. 1014.
249. Selter M., Knowles R.G., Moncada S. Wide spread tissue distribution and changes in activity of Ca<sup>2+</sup> - dependent NO-synthase // *FEBS Lett.* - 1991.- Vol. 291, № 1.-P.145-149.
250. Sica D.A. Endothelial cell function: new considerations // *Eur. Heart J.* – 2000. – Vol.2, №2.- P.13-21.
251. Setiady Y., Pramoonjago P., Tung K. Requirements of NK cells and proinflammatory cytokines in dependent neonatal autoimmune ovarian disease

- triggered by immune complex // *J. Immunol.*-2004.-Vol.173(2).-P.1051-1058.
252. Suarezpinzon W., Strynadka K., Schultz R. Mechanisms of cytokine-induced destruction of rat insulinoma cells - the role of nitric oxide // *Endocrinology.*-2004.-Vol.134.-P.1006-1010.
253. Sullivan K., Jaward A., Piliero L. Analysis of polymorphisms affecting immune complex handling in systemic lupus erythematosus. - 2003.-Vol.42.-P.446-452.
254. Suzuki Y., Gomez-Guerrero C., Shirato I. et al. Pre-existing glomerular immune complexes induce polymorphonuclear cell recruitment through an Fc-receptor-dependent respiratory burst: potential role in the perpetuation of immune nephritis // *J. Immunol.*-2003.-Vol.170.-P.3243-3253.
255. Takabayashi A., Kawai Y. Nitric oxide induces a decrease in mitochondrial membrane potential of peripheral blood lymphocytes, especially in natural killer cells // *Antioxid. Redox Signal.*-2000.- Vol.2(4).-P.673-680.
256. Tanaka N., Takana K., Nagashima Y. et al. Nitric oxide increase hepatic arterial blood flow in rats with carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury // *Gastroenterology.* - 1999. - 117, № 1. - P. 173-178.
257. Ternaux J.P., Portalier P. Effect of quercetin on survival and morphological properties of cultured embryonic motoneurons // *Neurosci Let.* - 2002. - Vol.332(1). - P.33-36.
258. Tesfamariam B., DeFelice A.F. Endothelial injury in the initiation and progression of vascular disorders. // *Vascular Pharmacology* 46 (2007) 229-237.
259. Tejeda A., Mathsson L., Ekdahl K. Immune complex-stimulated production of interleukin-12 in peripheral blood mononuclear cells is regulated by the complement system // *Clin. Exp. Pathol.*-2004.-Vol. 137, №3.-P.521-528.

260. The participation of neutrophilic mechanisms in the pathogenesis of chronic elevated blood immune complexes / Bidiuk M., Chopiak V., Liubinetz L. et al. // *Fisiologichnyj Zhurnal.* – 1997. – Vol.43., №3-4. – P.11-18.
261. Uesugi M., Hayashi T., Jasin H. Covalent cross-linking of immune complex by oxygen radicals and nitrite // *J. Immunol.*-1998.-Vol.161, №3.-P.1422-1427.
262. Vergnani L., Hatric S., Ricci F. et al. Effect of native and oxidized low-density lipoprotein on endothelial nitric oxide and superoxide production: Hy role of L-arginine availability // *Circulation.*-2000.-Vol. 101.-P. 1261-1266.
263. Vos I.H., Briscoe D.M. Endothelial injury:cause and effect of alloimmune in flammation // *Transpl. Infect.Dis.* – 2002 – Vol.4,№3. – P.152-160.
264. Wadsworth T., Koop D. R. Effects of Ginkgo biloba extract quercetin on lypopolysaccaride – induced release of nitric oxide // *Chem. Biol. Interact.* – 2001. – Vol. 137., № 1. – P.43 - 48.
265. Watson F., Edwards Stimulation of primed neutrophils dy solule immune complex // *Biological.* – 1996. – Vol.24,№4. – P.307-311.
266. Weyand C.M. New insights into the pathogenesis of rheumathology arthritis // *Rheumathology.* – 2000. – Vol. 139, Suppl.1. P.3-8.
267. Williams R.C. Immune complex in clinical and experimenthal medicine // Cambridge: Harvard Univer. Press.-1980. - 520 p.
268. Zhang C., Reuters C., Eiserich J.P. et al. L-arginine chlorination products inhibit endothelial nitric oxide production // *J. of Biol. Chem.*-2001.-Vol.276, M29.-P.27159 - 27165.