

**Міністерство освіти і науки України  
Львівський національний університет імені Івана Франка**

**КРІЛЬ ІРИНА ЙОСИФІВНА**

УДК: 616.72-002:611-018.54:577.156.6-079.1-092.9

**БІОХІМІЧНІ ТА ІМУНОЛОГІЧНІ ЗМІНИ У КРОВІ ЗА УМОВ  
ІМУНОЗАПАЛЬНОГО АРТРИТУ**

**03.00.04 – біохімія**

**АВТОРЕФЕРАТ  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук**

**Львів – 2015**

Дисертацією є рукопис

Робота виконана на кафедрі клінічної імунології та алергології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького

**Науковий керівник:** доктор біологічних наук,  
старший науковий співробітник  
**Кіт Юрій Ярославович,**  
Інститут біології клітини НАН України,  
завідувач лабораторії молекулярних механізмів  
міжклітинної взаємодії відділу регуляції проліферації  
клітин і апоптозу

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, професор  
**Столяр Оксана Борисівна,**  
Тернопільський національний педагогічний університет  
імені Володимира Гнатюка,  
професор кафедри хімії та методики її навчання

доктор біологічних наук, професор  
**Антоняк Галина Леонідівна,**  
Львівський національний університет  
імені Івана Франка,  
професор кафедри екології

Захист відбудеться « \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2016 р. о \_\_\_ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 35.051.14 Львівського національного університету імені Івана Франка за адресою: 79005, м. Львів, вул. Грушевського, 4, біологічний факультет, ауд. №333.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Львівського національного університету імені Івана Франка за адресою: 79005, м. Львів, вул. Драгоманова, 17.

Автореферат розісланий « \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2015 р.

Учений секретар  
спеціалізованої вченої ради К 35.051.14,  
кандидат біологічних наук, доцент

О. В. Іккерт

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** За даними ВООЗ поширеність ревматоїдного артриту (РА) серед світової популяції людей складає 0,5-2%, причому захворювання вражає переважно людей працездатного віку (20-50 років). Майже 1/3 пацієнтів, хворих на РА, протягом 20 років стають інвалідами, а тривалість життя за тяжкого перебігу вісцеральних проявів скорочується – протягом наступних 5 років половина пацієнтів помирає (Нейко Є.М., 2009). Поширеність РА серед громадян України становить 340 випадків на 100 тис. людей дорослого населення, що є одною із найвищих у світі (Малей М., 2010). Вважається, що РА, поряд із онкологічними, психічними захворюваннями та СНІДом є однією з чотирьох невирішених медичних проблем людства (Firestein G. S., 2005). Причини розвитку РА на сьогодні остаточно не з'ясовані, також дискусійним залишається і питання патогенезу РА.

Характерною особливістю РА є наявність хронічного запального процесу в суглобах, де спостерігається активація мононуклеарних клітин (макрофагів, лімфоцитів, плазматичних клітин), а також фібробластів, які сприяють проліферації сполучної тканини (Насонов Е.Л., 2013). Аутоантитіла до компонентів синовіальної оболонки посилюють запальну реакцію, яка спричиняє прогресуюче ураження суглобових тканин (Шуба Н.М., 2004), як і продукцію активних форм кисню та нітрогену (Сибірна Н. О., 2010).

Для вивчення механізмів, залучених у розвиток РА, часто використовують тваринні моделі (колаген-індукований артрит (Leonaviciene L., 2008), ад'ювант-індукований артрит у щурів (L. Bevaart, 2010), спонтанний артрит мишей при індукції фактору некрозу пухлини та інші (Bendele A.M., 2001). Тваринні експериментальні моделі, у яких патологічні прояви є найближчими до клінічної картини розвитку РА, є актуальними, оскільки допомагають об'єктивніше оцінити з одного боку, молекулярно-біологічні процеси, які закладені у розвиток цього захворювання, а з іншого боку, використати ці моделі як тест-системи для виявлення перспективних лікарських засобів, придатних для лікування РА (H. Wekerle, 2012). Відомо, що РА, як і більшість системних аутоімунних захворювань у людини, характеризується спонтанними загостреннями та ремісіями (Насонов Е.Л., 2008). Згідно з цим, тваринні моделі у яких молекулярні чинники розвитку запальних процесів є подібними до РА, необхідні для вивчення особливостей розвитку цього захворювання у людини.

Серед тваринних моделей ревматоїдного артриту колаген-індукований артрит (КІА) у щурів є одним з найбільш широко використовуваних у вивченні аутоімунних процесів, пов'язаних із РА (Bendele A.M., 2001). Це захворювання викликається імунізацією щурів колагеном II типу, емульгованим у неповному ад'юванті Фрейнда (Pandey Sh., 2010). КІА характеризується розвитком клітинної та гуморальної ланки імунної відповіді на колаген II типу, що призводить до утворення сенсibilізованих Т-лімфоцитів та продукції аутоантитіл, специфічних до колагену II типу (Vincent T. L., 2012). При цьому набряк кінцівок, інфільтрація лімфоцитами і руйнування хряща у тварин є подібними до РА у людини. Біохімічні процеси, які задіяні в розвитку запалення у щурів при КІА, головним чином, представлені оксидативними реакціями, які пов'язані із активністю моноцитів і макрофагів та є на сьогодні недостатньо вивченими. При цьому, тривалість перебігу запалення кінцівок

у тварин з КІА робить цю модель привабливою для вивчення біохімічних процесів при хронічних запаленнях у хворих з РА.

Моделлю гострого запалення кінцівок у тварин, пов'язаних із розвитком РА у людини, може слугувати карагенін-індукований набряк (КІН). КІН викликається введенням сульфатованого полісахариду карагеніну в задню кінцівку щурів, що призводить до розвитку запалення, некрозу тканин і використовується у моделі вивчення больових та фармакологічних реакцій у тварин. При цьому КІН викликає гострі та хронічні запальні реакції схожі із РА (D. Gong, 2009).

Системний аналіз біохімічних та імунологічних показників, отриманих при вивченні розвитку гострого і хронічного запалення кінцівок у піддослідних тварин дозволить встановити найбільш важливі параметри оцінки ефективності діагностики та прогнозування розвитку хвороби у пацієнтів з різними стадіями РА.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота є фрагментом планової теми кафедри клінічної імунології та алергології ЛНМУ імені Данила Галицького «Оцінка взаємозв'язку імунологічних, генетичних, гормональних механізмів, вторинних системних васкулітів та поліімунопатології за умов системних захворювань сполучної тканини та оцінка ефективності і безпеки застосування терапії супроводу біофлавоноїдів та бігуанідів» (2012–2016 р). державний реєстраційний номер: 0112U000166.

**Мета і завдання дослідження.** Метою роботи було з'ясувати стан змін біохімічних та імунологічних показників у крові імунізованих тварин (щурів, мишей) за умов експериментального (гострого і хронічного) запалення та у пацієнтів, хворих на ревматоїдний артрит.

Для досягнення поставленої мети було сформульовано такі завдання:

1. Індукувати у експериментальних тварин (щурів, мишей) гострий і хронічний артрит та дослідити біохімічні показники запальних процесів.
2. Визначити особливості перебігу оксидативних реакцій у крові тварин за хронічного та гострого запалення.
3. Дослідити зміни вмісту стабільних метаболітів оксиду азоту ( $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$ ) та продуктів перекисного окиснення ліпідів (ТБК-позитивних продуктів) за умов гострого та хронічного запалення у щурів.
4. Визначити кількість апоптичних лімфоцитів у крові щурів на різних стадіях запалення та у пацієнтів, хворих на РА.
5. Дослідити протеолітичну активність та субстратну специфічність препаратів імуноглобулінів класу IgG сироватки крові у тварин за експериментального гострого і хронічного артриту та у пацієнтів із РА.

**Об'єкт дослідження** – запальний процес у експериментальних тварин (щурі, миші) та у хворих на ревматоїдний артрит.

**Предмет дослідження** – біохімічні дослідження індикаторних ензимів сироватки крові, фагоцитарна та ензиматична активність нейтрофілів та моноцитів, оксидативний стрес та апоптоз клітин, протеолітична активність імуноглобулінів сироватки крові за умов колаген- та карагенін-індукованого артриту у тварин, хворих на ревматоїдний артрит.

**Методи дослідження.** У роботі використано *біохімічні* (визначення вмісту продуктів оксидативних реакцій, активності індикаторних ензимів та продуктів їх

реакції у сироватці крові), *цитологічні* (фагоцитозна здатність нейтрофілів та моноцитів, апоптоз, проточна цитофлуориметрія), фізико-хімічні (афінна хроматографія, електрофорез, високоефективна рідинна хроматографія) методи.

#### **Наукова новизна одержаних результатів.**

Вперше проведено комплексне дослідження біохімічних показників периферійної крові на моделях гострого та хронічного артритів у експериментальних тварин (щурі, миші). Вперше на моделях гострого та хронічного запальних артритів у експериментальних тварин методом проточної цитометрії проведено дослідження фагоцитарної активності нейтрофілів та моноцитів, «оксидативного вибуху». Доповнено наукові дані про те, що рівень апоптичних клітин при гострому запальному процесі достовірно знижувався, а при хронічному артриті – достовірно зростав, порівняно з контрольною групою тварин. Уточнено наукові дані про вплив активних форм кисню та нітрогену при різних стадіях запального процесу, а саме спостерігалось зростання швидкості генерації супероксидного радикала при гострому та хронічному запаленнях на фоні зростання швидкості генерації гідроксильного радикалу. Доповнено наукові дані про вплив сірководню на розвиток запального процесу при експериментальному ревматоїдному артриті. Вперше показано, що при експериментальному колагеновому артриті у тварин і у пацієнтів з РА імуноглобуліни класу IgG сироватки крові володіють протеолітичною активністю щодо гістонів. Протеолітично активні IgG-антитіла є потенційним біохімічним маркером прогнозування розвитку ревматоїдного артриту.

#### **Практичне значення отриманих результатів.**

Результати досліджень дають можливість діагностувати різні патогенетичні типи запальних пошкоджень. Доведено доречність використання тваринних експериментальних моделей для дослідження клінічних форм розвитку хвороби в хворих на РА та спрогнозувати можливий тип формування стадій захворювання.

Встановлено нові аспекти патогенезу РА на експериментальних тваринних моделях. Створено алгоритм біохімічних маркерів для диференційної діагностики розвитку запального процесу. Визначення фагоцитарної здатності нейтрофілів і моноцитів, апоптичних явищ, вмісту активних форм кисню та нітрогену, протеолітичної активності імуноглобулінів сироватки крові є важливим для встановлення стадії запального процесу.

Визначення рівня гістон-гідролізуючої активності IgG використовується як діагностичний показник загострення розвитку РА на кафедрі клінічної імунології та алергології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького. Для цього застосовують інструкцію «Визначення гістон-гідролізуючої активності в препаратах імуноглобулінів класу IgG», затверджену 14.06.2013 р. Протеолітична активність препаратів IgG щодо гістонів, яка виявлена у сироватці крові хворих на ревматоїдний артрит, але була відсутня в IgG сироватки крові клінічно здорових донорів робить фракцію IgG потенційним біохімічним маркером прогнозування розвитку ревматоїдного артриту.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертаційна робота є самостійним науковим дослідженням. На основі проведеного інформаційного пошуку та літературного огляду автором спільно з науковим керівником було розроблено план проведення

досліджень і підібрано оптимальні методичні підходи до реалізації поставлених завдань. Експериментальну частину дисертаційної роботи виконано самостійно на кафедрі клінічної імунології та алергології ЛНМУ імені Данила Галицького або спільно з науковим керівником, завідувачем лабораторії молекулярних механізмів міжклітинної взаємодії відділу регуляції проліферації клітин і апоптозу Інституту біології клітини НАН України д.б.н. Ю. Я. Котом. Дисертантом проаналізовано наукову літературу, самостійно проведено статистичну обробку результатів дослідження, проаналізовано і узагальнено отримані результати, написано усі розділи дисертації. Спільно з науковим керівником сформульовані висновки, практичні рекомендації та підготовлені до друку публікації.

**Апробація одержаних результатів.** Результати досліджень, отримані в рамках виконання дисертаційної роботи, представлені у вигляді тез, усних доповідей на міжнародних науково-практичних конференціях, конгресах: «Імунотерапія, імунопрофілактика: реалії та перспективи» (Львів, 2008, 2010), «Нові стратегії в діагностиці та лікуванні алергічних, аутоімунних, імунодефіцитних захворювань» (Львів, 2014), X Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини» (2014, Львів), XI Українського біохімічного конгресу (Київ, 2014), 4-го з'їзду Українського товариства клітинної біології (Ужгород, 2014).

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 7 статей, в т.ч. 6 – у фахових вітчизняних та міжнародних журналах і 6 тез доповідей на наукових конференціях.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація містить наступні розділи: «Вступ», «Огляд літератури», «Матеріали і методи досліджень», «Результати досліджень», «Обговорення результатів досліджень», «Висновки», «Список використаних джерел». Дисертацію викладено на 139 сторінках, із них основна частина займає 105 сторінок. Робота містить 37 рисунків, 13 таблиць і 182 джерела літератури.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

### Огляд літератури.

В огляді літератури підсумовано сучасні дані про патогенез ревматоїдного артриту. Детально розглянуто функціональну активність нейтрофілів та моноцитів периферичної крові, роль активних форм кисню та нітрогену, процесів апоптозу при різних стадіях захворювання. Охарактеризовано найбільш вивчені каталітично активні антитіла (абзими) в нормі та при патології. Описані тваринні моделі, які найчастіше використовують в експерименті.

### Матеріали і методи досліджень.

Експериментальні дослідження проводилися на 30 білих нелінійних щурах-самцях масою 160-220 г, яких утримували за стандартних умов віварію. Дослідження проводили у трьох групах щурів: перша група щурів із запаленням, викликаним введенням карагеніну (n=10), друга – із колаген-індукованим артритом (n=10) та контрольна група – інтактні щурів (n=10).

Гострий карагеніновий набряк викликали однократним субплантарним введенням 1 мг (0,1 мл 1% розчину) карагеніну (Інтер Синтез, Китай) під апоневроз задньої кінцівки щурів лінії Wistar. Колагеновий артрит викликали однократним підшкірним введенням в подушечку правої задньої кінцівки щурів лінії Wistar 400

мкг колагену бика II типу в 15 мМ оцтової кислоти з неповним ад'ювантом Фрейнда (Calbiochem-behring corp). Після розвитку гострого (карагеніновий набряк) та хронічного (колагеновий артрит) запальних процесів на 6 та 36 день відповідно тварин декапітували під анестезією. Оцінку запальних процесів проводили за експериментальними моделями, відповідно, гострого (карагеніновий набряк) і хронічного (колагеновий артрит) запалень. Імунізацію мишей лінії BALB/c фракцією загальних гістонів із тимуса теляти проводили за схемою, використовуючи повний і неповний ад'ювант Фрейнда. На першому етапі імунізації мишам внутрішньочеревно вводили 50 мкг фракції загальних гістонів тимуса теляти в повному ад'юванті Фрейнда. Цю процедуру повторювали через 2, 4, 6 і 8 тижнів (останні дві імунізації проводили з неповним ад'ювантом Фрейнда і без нього). Через 10 днів після останньої імунізації тварин під наркозом декапітували і брали в них кров.

Дослідження проводили при дотриманні принципів біоетики у відповідності з положенням Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986 р.), Директиви Ради Європи 86/609/ЕЕС (1986 р.). Закону України № 3447-ІУ «Про захист тварин від жорстокого поводження», загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (2001р.). Зразки цільної крові хворих РА були надані відповідно до інформованої згоди згідно з Договором про співпрацю із Львівською обласною клінічною лікарнею. У листі інформування для пацієнтів чітко викладені усі положення, з якими необхідно ознайомити пацієнтів. Передбачені заходи стосовно безпеки для здоров'я пацієнта, дотримання його прав, людської гідності та морально-етичних норм у відповідності до принципів Гельсінської декларації прав людини, Конвенції Ради Європи про права людини і біомедицину та відповідних законів України. Для дослідження також брали зразки крові осіб контрольної групи (здорових донорів). Ревматоїдний артрит у пацієнтів діагностували на основі критеріїв Американської колегії ревматологів (ACR, 1987) і формували згідно з класифікацією, рекомендованою Асоціацією ревматологів України (2003 р.). Усіх хворих обстежували на присутність РФ, анти-CCP та анти-MCV.

Фагоцитарну активність гранулоцитів та моноцитів визначали у гепаринізованій крові пацієнтів з РА та імунізованих тварин згідно з інструкціями виробника наборів реактивів Phagotest та Phagoburst на проточному цитофлуориметрі FACSCalibur (Becton Dickinson, США), використовуючи програмне забезпечення CellQuestPro для збору та аналізу даних (Lun, 2000).

Для виявлення апоптотичних клітин шляхом детекції екстерналізації фосфатидилсерину використовували комбіноване фарбування клітин анексином V і пропідію йодидом набору Annexin V Apoptosis Detection Kit 1(BD Pharmingen™, США). Для дослідження клітинного циклу клітини фарбували пропідію йодидом (1 мкг/мл) й аналізували на проточному цитофлуориметрі FACSCalibur (Becton Dickinson, США) (Білий, 2010).

Активність NO-синтаз у плазмі крові ( $\text{Ca}^{2+}$ -залежної та  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежної) визначали на підставі особливостей функціонування різних ізоформ і пристосовану до спектрофотометричного вимірювання одного з продуктів реакції – L-цитруліну

(Сибірна, 2006). Кількість нітрит-аніону ( $\text{NO}_2^-$ ) у плазмі крові визначали в аліквотах в колориметричній реакції за допомогою реактиву Гріса методом Гріна. Кількість нітрат-аніону ( $\text{NO}_3^-$ ) визначали бруциновим методом в аліквотах проб спектрофотометричним методом (Green, 1982). Аргіназну активність у плазмі крові визначали за утворенням сечовини в інкубаційній суміші (1 мл), що містила L-аргінін і аліквоти проб в трис- $\text{HCl}$  ("Calbiochem") буфері ( $\text{pH}=8,0$ ) (Шугалей, 1977). Швидкість генерації  $\text{O}_2^{\cdot-}$  визначали по окисненню цитохрому с, фіксуючи зміни екстинції при 550 нм (Kuthan, 1982). Визначення рівнів генерації  $\text{OH}^-$ -радикалу проводили в інкубаційній суміші за утворенням малонового діальдегіду, який визначали за зміною поглинання при довжині хвилі 532 нм і виражали в умовних одиницях поглинання за 1 год на 1 мг білка (Conte, 1996).

Для дослідження протеолітичної активності препаратів антитіл використовували сироватку крові. Виділяли загальну фракцію імуноглобулінів, осаджуючи розчином сульфату амонію (50% від насиченого). Препарати IgG отримували хроматографією імуноглобулінової фракції на протеїн-G-сефарозі, із яких антигістон H1 IgG-антитіла очищали афінною хроматографією на колонці із протеїн-G-сефарозою. Якість очистки препаратів імуноглобулінів на кожному етапі контролювали денатуруючим електрофорезом у поліакриламідному гелі, а також за допомогою вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) у буферній системі, сприятливій денатурації імунних комплексів.

Субстратами протеолітичної реакції слугували комерційні препарати основного протеїну мієліну (ОПМ) мозку бика та гістону H1 тимусу теляти (Ахора, Німеччина), лізоциму курячого яйця, альбуміну сироватки крові бика (Sigma, США), а також препарати сумарних гістонів тимусу теляти, які були люб'язно надані нам д.б.н. Луциком М.Д. Реакцію гідролізу проводили протягом 2 год при  $37^{\circ}\text{C}$  в 20 мкл інкубаційного середовища, яке містило 20 мМ Tris- $\text{HCl}$ ,  $\text{pH}$  7,5, 1-3 мкг антитіл, 5-10 мкг білка. Реакцію зупиняли додаванням 5 мкл денатуруючого буферу (0,2 М Tris- $\text{HCl}$ ,  $\text{pH}$  6,8, 4 % додецилсульфат натрію, 8 % 2-меркаптоетанолу, 20 % гліцеролу). Продукти протеолітичної реакції виявляли методом електрофорезу білків в поліакриламідному гелі.

Статистичний аналіз проводили, користуючись критерієм Стьюдента (t). Для роботи використовувався комп'ютер на базі Intel Core 2 Duo з операційною системою Windows XP (Microsoft, США). Вірогідними вважали відмінності, в яких імовірність статистичної похибки –  $P < 0,05$ .

## **Результати досліджень**

**Характеристика біохімічних показників сироватки крові при експериментальному запаленні у тварин.** Ензиматична активність в плазмі крові є важливим показником функціонального стану життєво важливих органів та інтенсивності перебігу процесів обміну речовин в організмі.

Встановлено достовірне ( $P < 0,05$ ) зростання активності лужної фосфатази в сироватці крові як при карагеніновому запаленні, так і при колагеновому артриті відповідно в 2,5 і 2,0 рази (табл. 1). Активність лужної фосфатази при карагеніновому запаленні була достовірно вищою, ніж при колагеновому. У результаті проведених досліджень було встановлено достовірне зростання ( $P < 0,05$ )



активності АлАТ у 1,4 рази лише в щурів на колагеновій моделі порівняно з показниками карагенінового запалення та контрольними значеннями.

Таблиця 1

**Біохімічні показники індикаторних ензимів функціонального стану печінки у сироватці крові щурів із колагеновим та карагеніновим запаленням (M±m, n=10)**

Група	ЛФ, од/л	АлАТ, од/л	АсАТ, од/л
Контроль	288,1±13,21	52,7±4,11	243,4±14,01
Карагеніновий артрит	716,4±21,25* <sup>o</sup>	59,1±4,15	344,0±23,12*
Колагеновий артрит	548,0±17,14*	75,3±3,84*	370,5±25,28*

Примітки: \* – різниця достовірна (P<0,05) порівняно до контролю,

<sup>o</sup> – різниця достовірна (P<0,05) між групами експериментальних артритів

АсАТ відповідно зростає у 1,4 рази при карагеніновому та у 1,5 рази при колагеновому артриті порівняно з контролем.

Рівень креатиніну, який є важливим компонентом залишкового азоту, не змінюється в дослідних групах, порівняно з контрольною (P>0,05). Рівень сечовини (кінцевий продукт знешкодження аміаку), який утворюється в печінці, був у 1,3 рази вищий при карагеніновому артриті (8,6±1,01 мМ/л) порівняно з колагеновим артритом (7,9±0,98 мМ/л) та контрольною групою (6,7±0,52 мМ/л). Рівень сечової кислоти, яка є кінцевим продуктом розпаду пуринових нуклеотидів, при карагеніновому процесі був достовірно (P<0,05) вищим у 2,8 рази (85,01±10,55 мкМ/л), як і при колагеновому – в 4 рази (128,68±28,55 мкМ/л), порівняно з контрольною групою тварин (30,18±9,8 мкМ/л).

Встановлено, що за гострого та хронічного запалення кінцівок у щурів зростає рівень біохімічних маркерів запалення в сироватці крові, що відображає порушення метаболізму, які відбуваються загалом в організмі. Ці зміни більше виражені при колаген-індукованому артриті в щурів.

**Кількісний та якісний склад протеїнів сироватки крові за умов гострого та хронічного запальних процесів у експериментальних тварин.** Концентрація загального білка у сироватці крові щурів двох дослідних груп (табл. 2) достовірно не відрізнялася від відповідних показників щурів контрольної групи.

Таблиця 2

**Протеїновий склад сироватки крові щурів із колагеновим та карагеніновим запаленням (M±m)**

	Заг білок, г\л	Альбуміни,%	Глобуліни,%
Контроль (n=10)	65,4±1,02	51,2±2,02	48,8±0,76
Карагеніновий артрит (n=10)	70,4±0,95	49,0±1,14	51,0±1,24
Колагеновий артрит (n=10)	70,9±1,10	45,3±1,91	54,7±1,03

Примітки: \* – різниця достовірна (P<0,05) порівняно до контролю,

<sup>o</sup> – різниця достовірна (P<0,05) між групами експериментальних артритів

Співвідношення вмісту альбумінової та глобулінової фракцій сироватки крові свідчить про зниження вмісту альбумінів без достовірної різниці за колагенового артриту, що вказує на незначні порушення функціонального стану печінки.

У таблиці 3 відображено достовірні зміни ( $P < 0,05$ ) вмісту глобулінової фракції у сироватці крові щурів двох дослідних моделей порівняно з контролем.

Таблиця 3

**Глобуліни сироватки крові щурів із колагеновим та карагеніновим запаленням ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )**

	$\alpha 1$ - глобуліни, %	$\alpha 2$ - глобуліни, %	$\beta$ - глобуліни, %	$\gamma$ - глобуліни, %
Контроль	$9,9 \pm 0,09$	$8,1 \pm 0,27$	$13,1 \pm 0,47$	$17,7 \pm 1,14$
Карагеніновий артрит	$15,3 \pm 0,24^{* \circ}$	$10,4 \pm 0,58^*$	$12,3 \pm 0,55$	$13,0 \pm 0,65^*$
Колагеновий артрит	$10,1 \pm 0,19$	$9,7 \pm 0,17^*$	$12,6 \pm 0,91$	$22,3 \pm 0,91^{* \circ}$

Примітки: \* – різниця достовірна ( $P < 0,05$ ) порівняно до контролю,

° – різниця достовірна ( $P < 0,05$ ) між групами експериментальних артритів

У щурів за карагенінового артриту вміст  $\alpha 1$ -глобулінів достовірно підвищувався у 1,5 рази, а у щурів з колагеновим артритом був близьким до норми порівняно з контролем.

Зростання кількості  $\alpha 2$ -глобулінів у сироватці крові є сигналом про загострення хронічного захворювання. При карагеніновому запаленні вміст  $\alpha 2$ -глобулінів достовірно збільшувався на 20%, а при колагеновому – на 28% ( $P < 0,05$ ).

Вміст  $\beta$ -глобулінів у щурів двох дослідних груп достовірно не відрізнявся від показників інтактної групи щурів.

Виявлено достовірне підвищення вмісту гама-глобулінів у сироватці крові на 27% за колагенового артриту, що вказувало на хронічний запальний процес, а за карагенінового артриту спостерігали зниження вмісту цієї фракції на 26% порівняно з контролем, що характерно для гострого запального процесу.

**Фагоцитарна активність нейтрофілів та моноцитів у крові експериментальних тварин.** Встановлено достовірне ( $P < 0,05$ ) зростання спонтанної фагоцитарної здатності нейтрофілів в 1,8 рази за карагенінового артриту та в 1,4 рази за колагенового артриту порівняно з контрольними значеннями, які відображені на рис. 1.

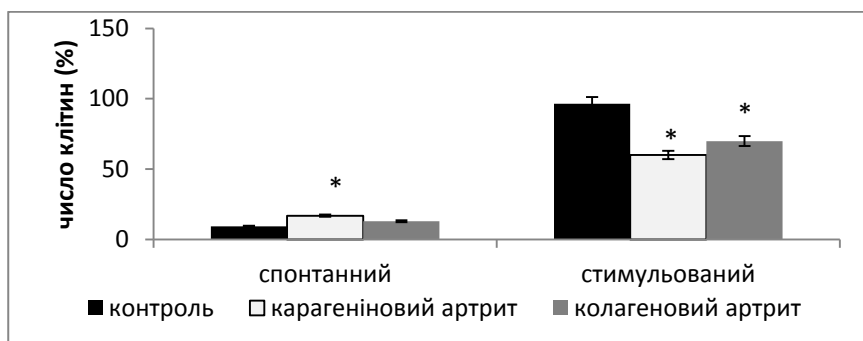


Рис. 1. Фагоцитарна активність нейтрофілів крові щурів із карагеніновим та колагеновим артритом (\*- $P < 0,05$  порівняно до контролю)

Після стимуляції нейтрофілів клітинами *E. coli* крові щурів спостерігали достовірне ( $P < 0,05$ ) зниження фагоцитозу у 1,6 рази за карагенінового і у 1,4 рази за колагенового артриту, порівняно з щурами контрольної групи.

Моноцити і макрофаги з'являються у синовіальній оболонці при запаленні вже на ранніх стадіях хвороби (рис.2).

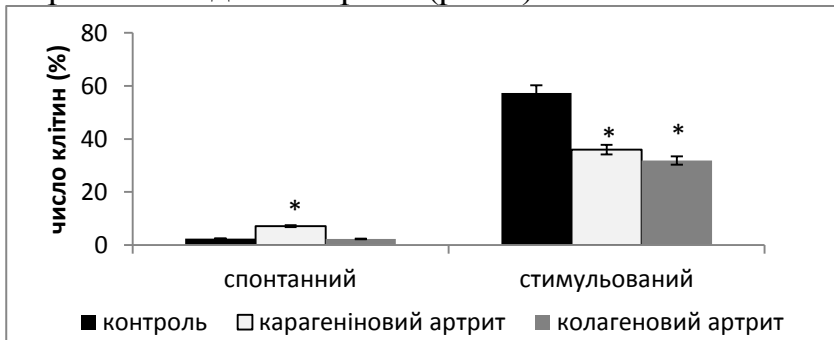


Рис. 2. Фагоцитарна активність моноцитів крові щурів із колагеновим та карагеніновим артритом (\*- $P < 0,05$  порівняно до контролю).

При карагеніновому запаленні у крові спостерігали достовірне зростання ( $P < 0,05$ ) фагоцитозу моноцитів у 3 рази порівняно з колагеновим артритом та інтактними щурами. Після стимуляції клітинами *E.coli* фагоцитоз моноцитів знижувався у 1,4 рази при карагеніновому і у 1,8 рази при колагеновому запаленні, порівняно з контрольною групою тварин.

Отже, за карагенінового запалення без стимуляції у крові піддослідних тварин спостерігалася значна активація фагоцитарних клітин, яка після стимуляції значно знижувалася, порівняно з контролем. При колагеновому артриті спонтанний фагоцитоз нейтрофілів був підвищений, а після стимуляції рівень нейтрофілів і моноцитів був достовірно знижений.

**Рівень оксидативних процесів у нейтрофілах і моноцитах крові експериментальних тварин.** Взаємодія чужорідних частинок з поверхнею фагоцита викликає його активацію, відбувається збільшення іонної проникності клітинної мембрани, посилюється окиснення глюкози і суттєво (в десятки разів) зростає споживання кисню. Це явище отримало назву «оксидативний вибух». При фізіологічному (табл. 4) «оксидативному вибуху» спостерігали достовірне ( $P < 0,05$ ) зростання кількості активованих нейтрофілів із зміненими морфо-функціональними властивостями у 2 рази на моделі карагенінового запалення і у 2,75 рази на моделі колагенового артриту, порівняно з контрольною групою тварин.

Таблиця 4

**Кількість нейтрофілів із зміненими морфо-функціональними властивостями в результаті «оксидативного вибуху» у периферичній крові щурів із колагеновим та карагеніновим артритом ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )**

	Без стимуляції, %	<i>E.coli</i> , %	fMLP, %	РМА, %
Контроль	7,6±1,11	70,4±2,91	10,2±0,72	81,0±3,15
Карагеніновий артрит	15,4±0,91*	65,7±2,04	23,7±0,01*°	77,7±2,14
Колагеновий артрит	20,9±1,22*°	68,5±2,23	16,8±0,41*	76,9±2,72

Примітки: \* – різниця достовірна ( $P < 0,05$ ) порівняно до контролю,

° – різниця достовірна ( $P < 0,05$ ) між групами експериментальних артритів

При використанні клітин *E. coli* для стимуляції нейтрофілів периферичної крові були відсутні достовірні ( $P>0,05$ ) зміни рівня оксидативних процесів за карагенінового запалення і за колагенового, порівняно з групою інтактних тварин. При використанні fMLP за карагенінового артриту, як і за колагенового артриту, спостерігали достовірне ( $P<0,05$ ) зростання кількості нейтрофілів із зміненими морфо-функціональними характеристиками у 1,6 рази та у 2,3 рази відповідно, порівняно з контрольною групою тварин. При використанні РМА не спостерігали достовірних ( $P>0,05$ ) змін кількості нейтрофілів як при карагеніновому, так і при колагеновому запаленні, порівняно з інтактною групою тварин.

Оксидативні процеси у моноцитах відображали зміни, які висвітлені у табл. 5. За карагенінового артриту без стимуляції відмічали достовірне ( $P<0,05$ ) зростання рівня кількості активованих моноцитів із зміненими морфо-функціональними особливостями у 4,4 рази, а за колагенового – у 3,9 рази, порівняно з контрольною групою тварин. Після стимуляції моноцитів клітинами *E.coli* при карагеніновому артриту, як і при колагеновому спостерігали достовірне зниження ( $P<0,05$ ) кількості активованих моноцитів у 1,6 рази порівняно з контрольною групою тварин. При використанні fMLP за карагенінового запалення, як і за колагенового, спостерігали достовірне ( $P<0,05$ ) зростання кількості морфо-функціонально-змінених моноцитів у 3,8 рази та у 2,2 рази, відповідно, порівняно з контрольною групою тварин.

Таблиця 5

**Кількість моноцитів із зміненими морфо-функціональними властивостями в результаті «оксидативного вибуху» у периферичної крові щурів із колагеновим та карагеніновим артритом ( $M\pm m$ ,  $n=10$ )**

	Без стимуляції, %	<i>E.coli</i> , %	fMLP, %	РМА, %
Контроль	3,6±0,54	72,2±2.84	6,4±1,02	74,6±3.13
Карагеніновий артрит	16,1±1,88*	45,7±1,66*	24,1±2,01*°	58,9±2.34
Колагеновий артрит	14,3±1.34*	45,1±1,65*	14,4±1,72*	68,1±2.62

Примітки: \* – різниця достовірна ( $P<0,05$ ) порівняно до контролю,

° – різниця достовірна ( $P<0,05$ ) між групами експериментальних артритів

Стимуляція протеїнкіназою С моноцитів за карагенінового запалення, як і за колагенового не виявляла достовірних ( $P>0,05$ ) змін кількості активованих моноцитів, порівняно з контрольною групою тварин.

**Зміна показників оксидативного та нітративного стресу у плазмі крові щурів при експериментальному гострому та хронічному артриті.** Взаємодія чужорідних антигенів з поверхневими рецепторами фагоцитарних клітин викликає їх активацію. При дослідженні змін окисного метаболізму в плазмі крові обох груп щурів (табл.6) достовірно ( $P<0,05$ ) зростала швидкість генерації гідроксильного та супероксидного радикалів порівняно з контрольною групою тварин.

За карагенінового артриту швидкість генерації  $\bullet\text{OH}$  у плазмі крові зросла у 3,8 рази ( $P<0,05$ ) порівняно з групою контрольних тварин. Швидкість генерації  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , який є показником активності нуклеотидних ксантин- і НАДФН-оксидаз, ліпідних

циклооксигенази і ліпоксигенази (генераторів супероксиду) при карагеніновому артриті достовірно зростала ( $P < 0,05$ ) у 2 рази порівняно з контролем, як і вміст  $H_2O_2$  достовірно ( $P < 0,05$ ) збільшився у 2 рази порівняно з контролем.

Таблиця 6

**Швидкість генерації гідроксильних і супероксидних радикалів та гідроген пероксиду в плазмі крові щурів ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )**

Умови досліджу	Швидкість генерації $\bullet OH$ -радикалу, $\Delta E/хв/мг$	Швидкість генерації $O_2^{\bullet -}$ радикалу, $\Delta E/ хв/мг$	Вміст $H_2O_2$ , мкмоль/мг
Контроль	$98,6 \pm 17,73$	$1,62 \pm 0,46$	$0,13 \pm 0,01$
Карагеніновий артрит	$370,33 \pm 54,46^*$	$3,81 \pm 1,64^*$	$0,23 \pm 0,09^*$
Колагеновий артрит	$450,14 \pm 79,59^*$	$14,93 \pm 2,52^{*\circ}$	$1,00 \pm 0,07^{*\circ}$

Примітки: \* – різниця достовірна ( $P < 0,05$ ) порівняно до контролю,

$\circ$  – різниця достовірна ( $P < 0,05$ ) між групами експериментальних артритів

$\Delta E$  – швидкість генерації

За колагенового артрити швидкість генерації  $\bullet OH$  ( $P < 0,05$ ) у плазмі крові достовірно зростає у 4,5 рази, а активність  $O_2^{\bullet -}$  – у 9 разів ( $P < 0,05$ ) порівняно з контролем. Вміст  $H_2O_2$  при колагеновому артриті достовірно зростає у 8 разів ( $P < 0,05$ ) порівняно з інтактною групою тварин.

При карагеніновому артриті у плазмі крові не спостерігали достовірних ( $P > 0,05$ ) змін (рис. 3) активності сумарної NO-синтази (NOS), а при колагеновому артриті вона достовірно ( $P < 0,05$ ) зростає у 1,7 рази порівняно з контрольною групою тварин. Активність індукбельної NO-синтази (iNOS) у плазмі крові достовірно зростає в 1,6 рази за карагенінового артрити ( $P < 0,05$ ) – у 2,6 рази за колагенового порівняно з контрольною групою тварин.

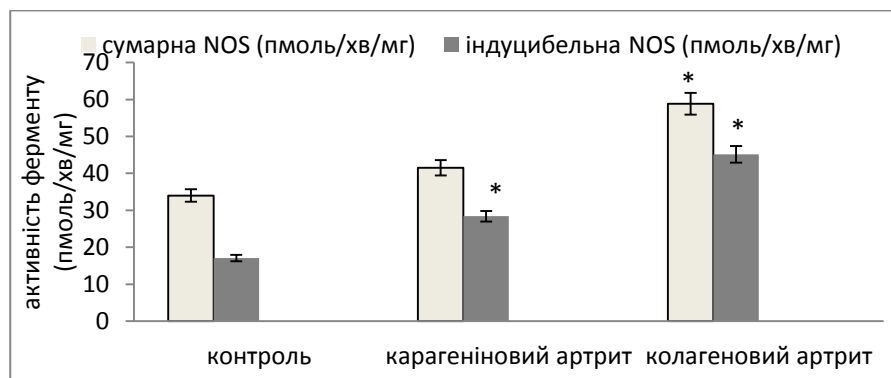


Рис. 3. Активність NO-синтази в плазмі крові контрольних та хворих на артрит тварин (\*-  $P < 0,05$  порівняно до контролю).

Оксид азоту (NO), як продукт окисного перетворення L-аргініну конститутивними та неконститутивними ізоформами NOS, надалі зазнає окисно-відновних перетворень з наступним утворенням його стабільних метаболітів (табл. 7).

За карагенінового артрити у плазмі крові встановлено достовірне зростання концентрації  $NO_2^-$  у 1,6 рази ( $P < 0,05$ ), а за колагенового артрити – в 4,5 рази, порівняно з контрольною групою тварин. Вміст  $NO_3^-$  у плазмі крові за

карагенінового артриту зростав у 2 рази, а за колагенового артриту – у 8,2 рази порівняно з контрольною групою тварин.

Таблиця 7

**Вміст  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  у плазмі крові щурів  
за карагенінового та колагенового артритів ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )**

Умови досліджу	Вміст $\text{NO}_2^-$ , пмоль/мл	Вміст $\text{NO}_3^-$ , мкмоль/мл
Контроль	30,41±6,38	0,35±0,09
Карагеніновий артрит	49,43±3,52*	0,71±0,05*
Колагеновий артрит	134,04±22,61* <sup>°</sup>	2,87±0,19* <sup>°</sup>

Примітки: \* – різниця достовірна ( $P < 0,05$ ) порівняно до контролю,

° – різниця достовірна ( $P < 0,05$ ) між групами експериментальних артритів

Встановлено достовірне ( $P < 0,05$ ) зростання аргіназної активності у плазмі крові (табл. 8) при карагеніновому та колагеновому запальних процесах у 7 та 8 разів, відповідно порівняно з тваринами контролю, що свідчить про активізацію неокисного метаболізму, який конкурує з окисним, NO-синтазним шляхом метаболізму L-аргініну.

Таблиця 8

**Аргіназна активність та величина співвідношення неокисного та окисного (аргіназа/NOS) шляхів метаболізму аргініну в плазмі крові щурів ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )**

Умови досліджу	Аргіназна активність, нмоль/хв/мг	Аргіназа/NOS, од
Контроль	1,65±0,63	48,53±7,34
Карагеніновий артрит	11,91±3,45*	287,13±75,66*
Колагеновий артрит	13,89±3,86*	235,94±27,22*

Примітки: \* – різниця достовірна ( $P < 0,05$ ) порівняно до контролю,

° – різниця достовірна ( $P < 0,05$ ) між групами експериментальних артритів

Виявлено достовірне ( $P < 0,05$ ) зростання співвідношення рівня неокисного та окисного шляхів метаболізму L-аргініну (аргіназа/NOS) за карагенінового артриту в 5,9 рази і за колагенового артриту – у 4,9 рази, порівняно з його величиною у контрольної групи тварин.

Відомо, що під час оксидативного стресу внаслідок інтенсифікації перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) має місце значне пошкодження цілісності клітинних мембран. Маркером інтенсивності процесів ПОЛ у плазмі крові є ТБК-позитивні продукти (ТБК-ПП), результати визначення концентрації яких у плазмі крові показано на рисунку 4. Спостерігали достовірне ( $P < 0,05$ ) зростання концентрації ТБК-ПП у 2 рази за карагенінового і за колагенового артриту порівняно з концентрацією ТБК-ПП у контрольної групи тварин.

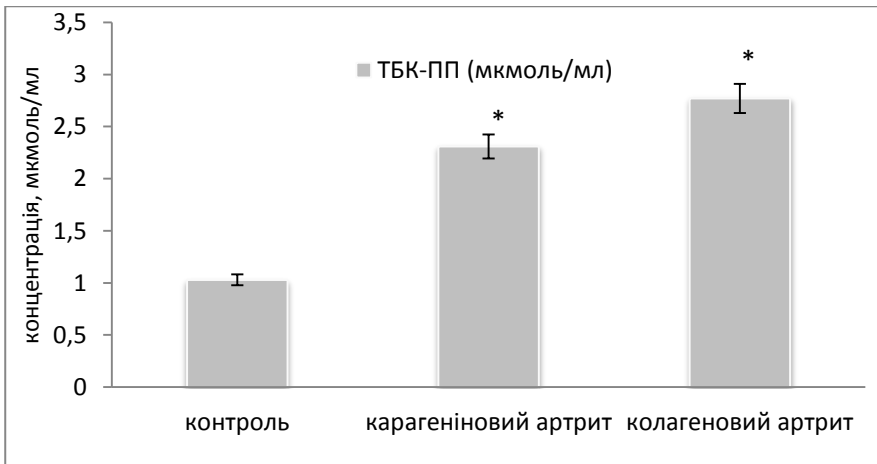


Рис. 4. Концентрація ТБК-позитивних продуктів у плазмі крові щурів за карагенінового та колагенового артритів (\*- $P < 0,05$  порівняно до контролю).

**Характеристика апоптичних клітин у експериментальних тварин з індукованим гострим та хронічним запаленням.** При РА спостерігали порушення балансу між проліферацією та апоптозом лімфоцитів. Встановлено, що за карагенінового артрити достовірно знижується ( $P \leq 0,05$ ) майже у 1,4 рази кількість ( $AnV^+$ ) апоптичних лімфоцитів ( $3,74 \pm 0,41\%$ ) відносно контрольних (неімунізованих) щурів ( $5,1 \pm 0,67\%$ ) (рис. 5). При колагеновому артриті спостерігали достовірне зростання ( $P \leq 0,05$ ) майже у 1,8 рази рівня апоптичних лімфоцитів ( $9,40 \pm 0,95\%$ ).

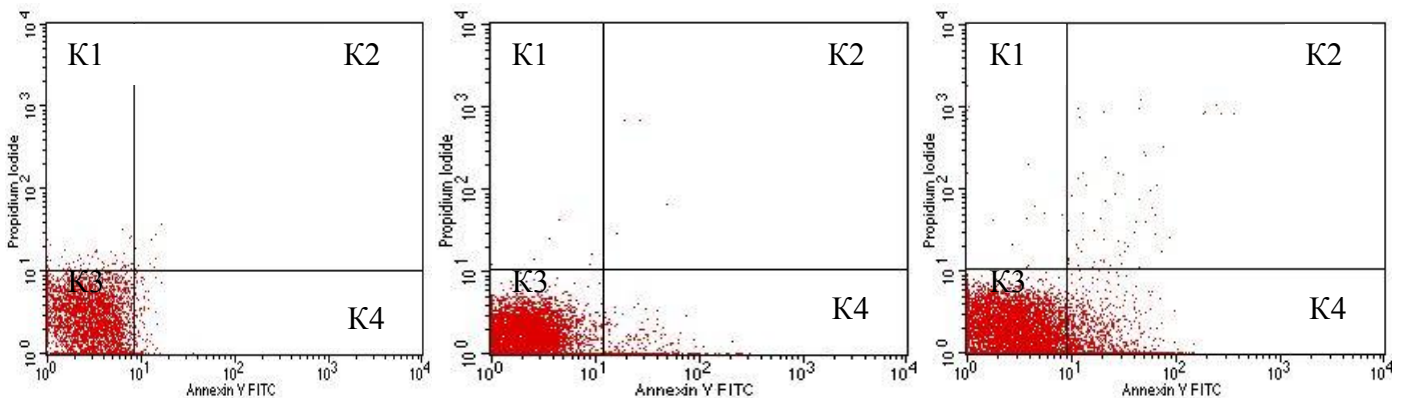
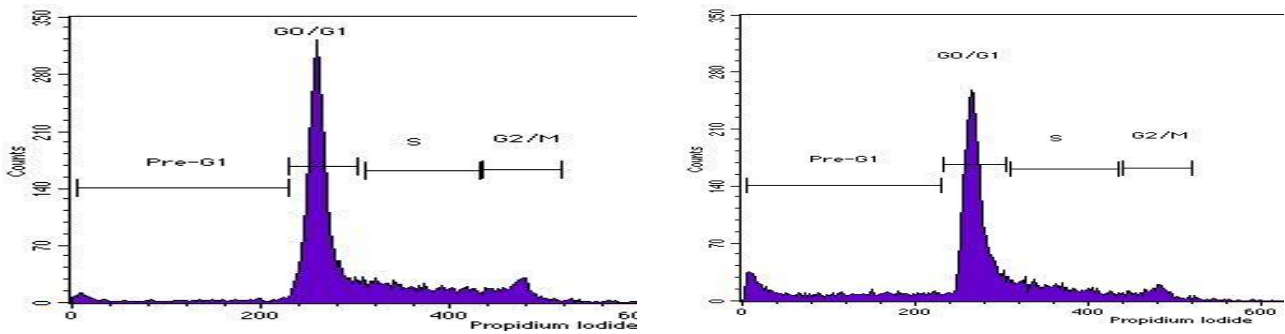


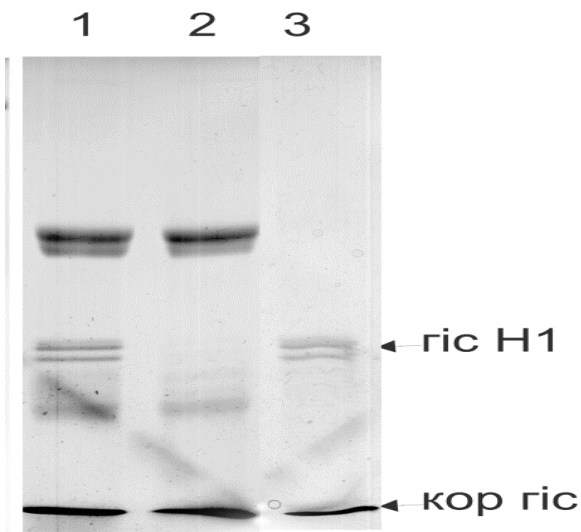
Рис. 5. Гістограма розподілу лімфоцитів за ступенем апоптозу при карагеніновому артриті (зліва), контролі (в центрі) та при колагеновому артриті (справа): квадрант К3 – живі клітини ( $AnV^-/PI^-$ ), квадранти К2 і К4 – стадія апоптозу ( $AnV^+$ ) і квадрант К1 – мертві клітини ( $AnV^-/PI^+$ ). Канали флуоресценції FL1 (Annexin V, вісь абсцис, відн.од) та FL3 (пропідію йодид, вісь ординат, відн.од)

Основні фази клітинного циклу: пресинтетичний (активного росту) G0/G1, синтетичний S (синтез ДНК), премітотичний G2 і M (мітозу), які належать до висококонсервативних процесів. Використання пропідію йодиду, який має високу спорідненість до нуклеїнових кислот, робить можливим виявлення фрагментації ДНК в апоптичних клітинах (популяція pre-G1). При дослідженні клітинного циклу лімфоцитів (рис. 6) периферичної крові 38 пацієнтів з РА та 10 здорових донорів спостерігали достовірне ( $P \leq 0,05$ ) зростання кількості клітин у фазі пре-G1 в 5 разів у пацієнтів з РА ( $3,43 \pm 0,52\%$ ) порівняно з групою здорових осіб ( $0,68 \pm 0,11\%$ ).



*Рис. 6.* Результати проточної цитофлуориметрії клітинного циклу лімфоцитів периферичної крові людини у контролі (зліва) та при загостренні РА (справа). Канал флуоресценції FL3 (пропідію йодид, вісь абсцис – відн.од, вісь ординат – число клітин). G0/G1, S, G2/M – фази клітинного циклу, Pre-G1 – апоптотичні клітини.

**Протеолітична (каталітична) активність імуноглобулінів за умов гострого та хронічного запалення.** Препарати імуноглобулінів класу IgG, очищені з сироватки крові щурів з експериментальним колагеновим артритом, здатні розщеплювати гістон H1, складову частину загальних гістонів тимусу теляти (рис. 7). IgG, ізольовані з неімунізованих тварин, не виявляли такої активності. Не спостерігали також деструкції кóрових гістонів IgG в імунізованих і контрольних тварин.



*Рис. 7.* Результат електрофоретичного аналізу протеолітичної активності гістонів тимусу теляти у препаратів Ig G, очищених із сироватки крові імунізованих та неімунізованих (контрольних) щурів. Доріжка 1 – неімунізовані (контрольні) тварини. Доріжка 2 – тварини на 36-й день після імунізації. Доріжки 3 – контрольні препарати загальної фракції гістонів за відсутності доданих препаратів Ig G. Справа вказано положення на гелі гістона H1 і кóрових гістонів тимусу теляти (кор гіс).

Виявлено, що препарати IgG сироватки крові експериментальних тварин розщеплюють гістон H1 (рис. 8 лінії 5, 5'). Серед інших пептидних продуктів спостерігалася висока гідролітична активність щодо основного протеїну мієліну (ОПМ) (рис. 8 лінії 4, 4'). В той же час не спостерігалася гідролізуюча активність до альбуміну сироватки бика (БСА) та казеїну (рис. 8 лінії 2, 2', 3, 3'). Отримані результати вказують на те, що при хронічному запаленні в організмі утворюються антитіла із селективною протеолітичною активністю.



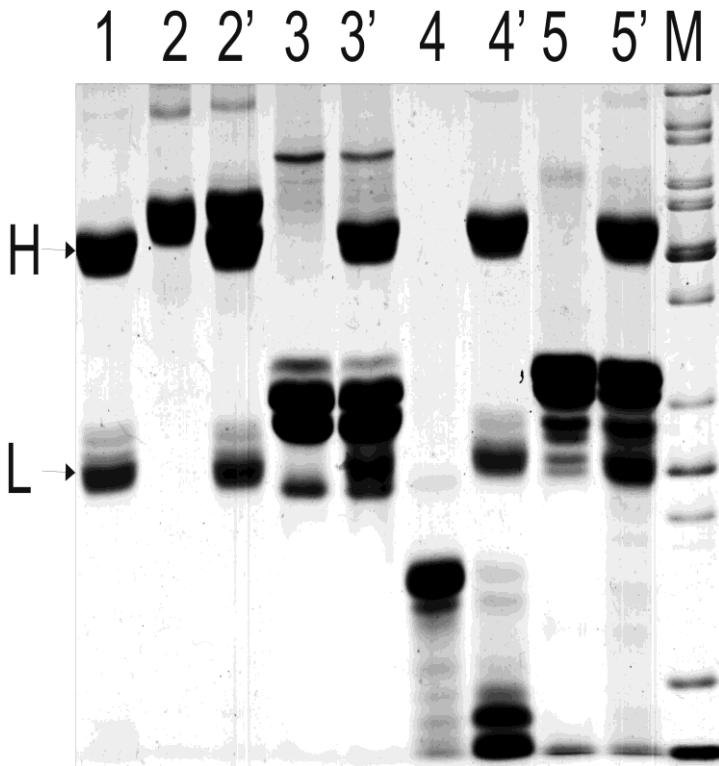


Рис. 8. Результат електрофоретичного аналізу протеолітичної активності препаратів IgG, очищених із сироватки крові імунізованих щурів. Доріжка 1 – препарат IgG; 2, 2' – бичачий сироватковий альбумін; доріжка 3, 3' – казеїн коров'ячого молока; 4, 4' – основний протеїн мієліну бика; 5, 5' – гістон H1 бика. Доріжки 2, 3, 4, 5 – протеїнові субстрати за відсутності IgG. Доріжки 2', 3', 4', 5' – протеїнові субстрати за дії IgG. М – маркери молекулярної маси протеїнів (зверху донизу - 150, 120, 100, 85, 70, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10 кДа). Зліва вказано положення на гелі важких (H) і легких (L) ланцюгів IgG.

Відомо, що гістони та антигістонові антитіла можуть брати участь у розвитку запальних та аутоімунних процесів. Проведено дослідження протеолітичної активності до гістонів тимусу теляти у препаратах IgG-антитіл, очищених із сироватки крові хворих на ревматоїдний артрит і клінічно здорових донорів. Встановлено, що 7 із 8 препаратів IgG-антитіл сироватки крові хворих на ревматоїдний артрит здатні розщеплювати корові гістони тимуса теляти (рис. 9 А). При цьому жоден із 8 препаратів IgG-антитіл сироватки крові здорових донорів не володів протеолітичною активністю щодо цих протеїнів (рис. 9 Б).

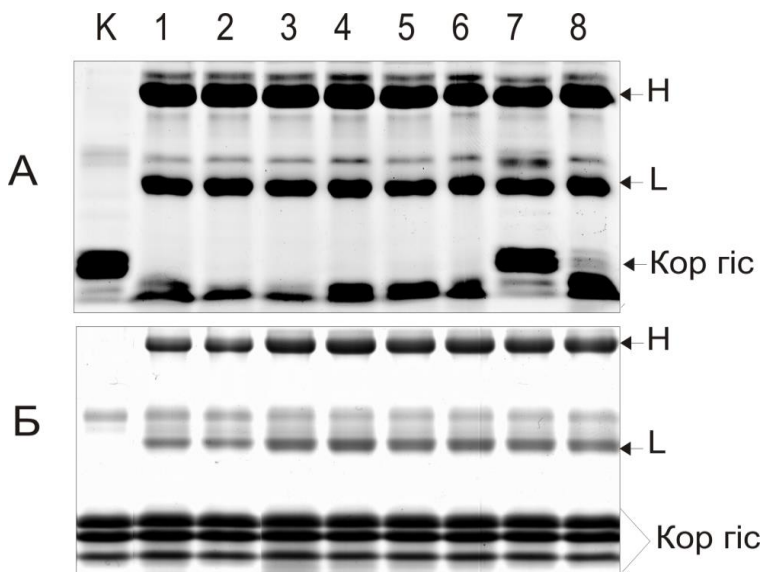


Рис. 9. Результати електрофоретичного визначення протеолітичної активності щодо загальних гістонів тимуса теляти препаратів IgG-антитіл, очищених хроматографією на протеїн G-сефарозі із сироватки крові хворих на ревматоїдний артрит (А) та клінічно здорових донорів (Б). Стрілками вказано положення на гелі важких (H) і легких (L) ланцюгів IgG, а також корових гістонів. К – загальні гістони тимуса теляти за відсутності IgG-антитіл

В результаті проведених досліджень встановлено, що в сироватці крові колаген-індукованих щурів присутні антитіла, здатні розщеплювати гістон H1 та

ОПМ. Протеолітично активні антитіла із подібною субстатною специфічністю були виявлені у сироватці крові хворих на ревматоїдний артрит.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі, відповідно до поставленої мети і завдань, здійснено детальну характеристику біохімічних та імунологічних показників крові щурів за гострого (карагенінового) та хронічного (колагенового) запалення кінцівок, пацієнтів, хворих на ревматоїдний артрит і крові мишей за гістон-індукованої імунізації.

За результатами проведеного дослідження зроблено наступні висновки:

1. За карагенін-індукованого артрити у сироватці крові щурів виявили зростання рівня активності лужної фосфатази у 2,5 разів, аспартатамінотрансферази – у 1,4 рази і сечової кислоти – у 2,8 разів, а також підвищення вмісту фракцій  $\alpha 1$ - і  $\alpha 2$ -глобулінів і зниження вмісту фракції  $\gamma$ -глобулінів, що свідчить про розвиток гострого запалення.
2. За гострого запалення у плазмі крові щурів встановлено зростання швидкості генерації активних форм кисню ( $O_2\bullet$  – у 2,3 рази,  $\bullet OH$  – у 3,7 раз), а також вмісту  $H_2O_2$  – в 1,8 разів, стабільних метаболітів оксиду азоту ( $NO_2^-$  – в 1,6 разів і  $NO_3^-$  – у 2 рази).
3. За карагенін-індукованого запалення у крові піддослідних щурів має місце зниження ( $P \leq 0,05$ ) в 1,5 разів кількості  $AnV^+$ -апоптотичних лімфоцитів, порівняно з контрольними (неімунізованими) щурами, що корелює із показниками загострення хвороби у пацієнтів із діагностованим ревматоїдним артритом.
4. За колаген-індукованого артрити у сироватці крові щурів спостерігали підвищення рівня лужної фосфатази (в 1,9 разів), аланінамінотрансферази (в 1,4 рази), аспартатамінотрансферази (в 1,5 рази) і сечової кислоти (у 4 рази) а також зростання вмісту фракцій  $\alpha 2$ -глобулінів і  $\gamma$ -глобулінів, що свідчить про розвиток хронічного запалення. Подібні зміни біохімічних показників мають місце у сироватці крові пацієнтів із діагностованим ревматоїдним артритом.
5. За хронічного запалення відбувається зростання у плазмі крові швидкості генерації активних форм кисню ( $O_2\bullet$  – у 9,2 разів,  $\bullet OH$  – у 4,6 разів), а також вмісту  $H_2O_2$  – у 7,9 разів, продуктів обміну оксиду азоту ( $NO_2^-$  – у 4,4 рази і  $NO_3^-$  – у 8,2 разів), порівняно з їхнім вмістом у контрольних тварин.
6. За хронічного запалення, індукованого колагеном, у крові піддослідних щурів зростає в 1,8 разів ( $P \leq 0,05$ ) кількість  $AnV^+$ -апоптотичних лімфоцитів, порівняно з контрольними (неімунізованими) щурами, що корелює із ремісією захворювання у пацієнтів із діагностованим ревматоїдним артритом.
7. Імунізація мишей лінії BALB/c препаратом загальних гістонів тимусу теляти викликає появу у сироватці крові IgG-антитіл, які володіють протеолітичною активністю щодо гістону H1 та основного протеїну мієліну, що вказує на розвиток хронічного запалення у тварин.
8. Протеолітична активність препаратів IgG щодо гістонів виявлена у сироватці крові хворих на ревматоїдний артрит, але була відсутня в IgG сироватки крові клінічно здорових донорів. Це робить протеолітично активні IgG потенційним біохімічним маркером прогнозування розвитку ревматоїдного артрити.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Активні форми кисню та нітрогену в сироватці крові щурів за умов гострого і хронічного експериментального артриту / І. Й. Кріль, А. М. Гаврилюк, А. В. Коцюруба, Ю. Я. Кіт, В. В. Чопяк, Р. С. Стойка // Біол. Студ. – 2014. – Т. 8, №3-4. – С. 31–40. *(Здобувач провела дослідження та статистичну обробку даних, проаналізувала літературні джерела, взяла участь в аналізі даних, написанні та оформленні статті.)*
2. Proteolytic activity of IgGs from blood serum of wistar rats at experimental rheumatoid arthritis / Yu. Ya. Kit, S. L. Myronovsky, I. I. Kril, A.M. Havrylyuk, V.V. Chopyak, R.S. Stoika // Ukr. Biochem. J. – 2014. – Vol. 86, № 5. – С. 95–101. *(Здобувач виконала дослідження та статистичну обробку даних та взяла участь у написанні та оформленні статті.)*
3. Зміни функціональної активності нейтрофілів щурів за умов експериментального колагенового артриту / І.Й. Кріль, А.М. Гаврилюк, В. В. Чопяк, Ю.Я. Кіт, А.В. Коцюруба, Р.С. Стойка // Біол. тварин. – 2014. – Т. 16, № 3. – С. 60–67. *(Здобувач виконала дослідження та статистичну обробку даних та взяла участь у написанні та оформленні статті.)*
4. Характеристика ензиматичної активності та білкового складу сироватки крові за умов індукованого імунізацією запалення суглобів / І.Й. Кріль, А.М. Гаврилюк, Р.С. Стойка, В.В. Чопяк, Ю.Я. Кіт // Експер. та клін. фізіол. і біохім. – 2014. – № 2. – С.15–23. *(Здобувач виконала дослідження, проаналізувала дані та взяла участь у написанні та оформленні статті.)*
5. Протеолітична активність IgG-антитіл мишей, імунізованих гістонами тимуса теляти / Ю. Я. Кіт, Н. Корній, І. Й. Кріль, І.Б. Магорівська, В.Ткаченко, Р.О. Білий, Р.С. Стойка // Ukr. Biochem. J. – 2014. - Vol. 86, № 2. – С. 80–89. *(Здобувач виконала дослідження, проаналізувала літературні джерела та взяла участь у написанні та оформленні статті.)*
6. Evaluation of immunological criteria for rheumatoid arthritis / A. Havrylyuk, R. Bilyy, J. Tolstiak, I. Kril, M. Synenka, J. Zabek, A. Palacz, J. Bogaczewicz, V. Chopyak, R. Stoika // Centr. European J. of Immunology. – 2009. - № 34(3). – P. 176–181. *(Здобувач виконала дослідження, проаналізувала дані та взяла участь у написанні та оформленні статті.)*
7. Апоптотичні зміни у глікон'югантах плазматичної мембрани периферичних лімфоцитів крові при системному червоному вовчаку / Р.О. Білий, Я.Ф. Толстяк, І.Й. Кріль, Л.В. Немеш // Актуальні проблеми сучасної медицини. – 2010. – №4. – С.57–62. *(Здобувач виконала дослідження, взяла участь у написанні та оформленні статті.)*
8. Протеолітична активність IgG сироватки крові щурів за експериментального ревматоїдного артриту / С.Мироновський, І.Кріль, Ю.Кіт, Я.Чайка // X Міжн. наук. конф. студентів і аспірантів: тези доп. - Львів, 2014. – С.34–35.
9. Кріль І. Й. Зміни функціональної активності нейтрофілів щурів за умов гострого та хронічного експериментальних артритів / І. Й. Кріль, Ю. Я. Кіт // XI Укр. біохім. конгрес: тези доп. – Київ, 2014. – С. 91–92.
10. Кріль І. Й. Активність конститутивної та індуцибельної NO-синтази та аргінази у щурів за умов експериментального колагенового і карагенінового індукованого артриту / І. Й. Кріль, А. В. Коцюруба, Ю. Я. Кіт // Матеріали міжн. наук-практ. конф. «Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини»: тези доп. – Львів, 2014. – С. 182.

11. Вміст сірководню у сироватці крові щурів за гострого і хронічного експериментального артриту/ Ю. Я. Кіт, І. Й. Кріль, А. М. Гаврилюк, А.В. Коцюруба, В. В. Чопяк, Р.С. Стойка // XI Укр. біохім. конгрес: тези доп. – Київ, 2014. – С. 84.
12. Рівень апоптичних лімфоцитів у крові щурів за умов гострого та хронічного артриту / І. Кріль, А. Гаврилюк, В. Чопяк, Р. Стойка, Ю. Кіт // 4-й з'їзд Укр. товариства кліт. біол. з міжн. представництвом: тези доп. – Ужгород, 2014. – С. 116.
13. Оцінка апоптозу та аутоантитіл у хворих на ревматоїдний артрит / В.В. Чопяк, Р.С. Стойка, А.М. Гаврилюк, Я. Зомбек, Я.Ф. Толстяк, І.Й. Кріль, Р.О. Білий // XII Конгрес світової федерації укр. лікарських товариств: тези доп. – Івано-Франківськ-Київ-Чикаго, 2008. – С. 285.

## АНОТАЦІЯ

**Кріль І.Й. Біохімічні та імунологічні зміни у крові за умов імунозапального артриту. – На правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, 2015.

Дисертаційна робота присвячена з'ясуванню механізмів патогенезу ревматоїдного артриту в експериментальних тварин. У дослідженні використано дві моделі експериментальних запальних процесів: гострий, викликаний введенням карагеніну та хронічний, колаген-індукований артрит. Показано, що при гострому запаленні з гіперпродукцією  $\alpha 1$ - та  $\alpha 2$ -глобулінів, процеси запального характеру були більш вираженими, ніж при хронічному колагеновому артриті. Збільшення гама-глобулінової фракції при хронічному запальному процесі вказує на залучення в патологічний процес гуморальної ланки імунної системи з ймовірною гіперпродукцією аутоантитіл. При карагеніновому імунозапальному артриті спостерігається значна активація фагоцитарних клітин, яка після стимуляції недостовірно зростає. При колагеновому експериментальному артриті фагоцити посилюють свою функціональну здатність лише після стимуляції. За колагенового артриту виявлено значну інтенсифікацію процесів ПОЛ і підвищення вмісту стабільних метаболітів оксиду азоту, що свідчить про значну генерацію активних форм кисню та нітрогену. Спостерігалось переважання NO-синтазного шляху метаболізму аргініну над аргіназним (окисний шлях переважає над неокисним). За гострого запалення у крові піддослідних щурів має місце зниження, а за хронічного – зростання кількості апоптичних лімфоцитів порівняно з контрольними (неімунізованими) щурами. Виявлено, що антигістон Н1 IgG-антитіла володіють протеолітичною активністю щодо гістону Н1 та основного протеїну мієліну. Встановлено, що протеолітична активність препаратів IgG щодо гістонів виявлена у сироватці крові хворих на ревматоїдний артрит, але була відсутня в IgG сироватки крові клінічно здорових донорів. Це робить фракцію IgG потенційним біохімічним маркером прогнозування розвитку ревматоїдного артриту.

Ключові слова: ревматоїдний артрит, карагенін, колагеновий артрит, активні форми кисню та нітрогену, апоптоз, протеолітична активність

## АННОТАЦИЯ

**Криль И.И. «Биохимические и иммунологические изменения в крови в условиях аутоиммунного артрита». - На правах рукописи.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 – биохимия. – Львовский национальный университет имени Ивана Франко, Львов, 2015.

Диссертация посвящена выяснению механизмов патогенеза ревматоидного артрита у экспериментальных животных. В исследовании использованы две модели экспериментальных воспалительных процессов: острый, вызванный введением каррагинана и хронический, коллаген-индуцированный артрит. Показано, что при остром воспалении с гиперпродукцией  $\alpha 1$ - и  $\alpha 2$ -глобулинов, процессы воспалительного характера были более выраженными, чем при хроническом коллагеновом артрите. Увеличение гамма-глобулиновой фракции при хроническом воспалительном процессе указывает на вовлечение в патологический процесс гуморального звена иммунной системы с вероятной гиперпродукцией аутоантител. При каррагинановом иммуновоспалительном артрите наблюдается значительная активация фагоцитарных клеток. При коллагеновом экспериментальном артрите фагоциты периферической крови усиливают свою функциональную способность только после стимуляции. Как при каррагинановом, так и при коллагеновом артрите наблюдается увеличение числа нестимулированных нейтрофилов и моноцитов. После стимуляции клеток интенсивность оксидативного взрыва нейтрофилов достигала показателей контрольной группы, а активность моноцитов оставалась низкой. При использовании слабого стимулятора fMLP активность энзиматической системы нейтрофилов и моноцитов была повышенной, а при использовании сильного стимулятора РМА эти показатели достигали контрольных значений. При коллагеновом артрите выявлено значительную интенсификацию процессов ПОЛ и повышения содержания стабильных метаболитов оксида азота, что свидетельствует о значительной генерации активных форм кислорода и азота. Наблюдалось преобладание NO-синтазного пути метаболизма над аргиназным (окислительный путь метаболизма L-аргинина преобладает над неокислительным). При ревматоидном артрите наблюдается нарушение баланса между пролиферацией и апоптозом лимфоцитов. При остром воспалении в крови подопытных крыс имело место снижение, а при хроническом – рост количества апоптотических лимфоцитов по сравнению с контрольными (неиммунизированными) крысами. При исследовании клеточного цикла лимфоцитов периферической крови пациентов с РА наблюдали увеличение апоптотической фазы пре-G1. Выявлено, что антигистон H1 IgG-антитела обладают протеолитической активностью в отношении гистона H1 и основного протеина миелина. Установлено, что протеолитическая активность препаратов IgG к гистонам обнаружена в сыворотке крови больных ревматоидным артритом, но отсутствовала в IgG сыворотки крови клинически здоровых доноров. Это делает фракцию IgG потенциальным биохимическим маркером прогнозирования развития ревматоидного артрита.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, каррагинан, коллагеновый артрит, активные формы кислорода и азота, апоптоз, протеолитическая активность

### Summary

#### **Kril I. Y. Biochemical and immunological changes in the blood in immunoinflammatory arthritis – The manuscript.**

Thesis for PhD degree, specialty 03.00.04 – biochemistry. – Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, 2015.

This dissertation was devoted to the estimation of rheumatoid arthritis pathogenesis mechanisms in experimental animals. Two models of experimental inflammation were used in the study: acute, caused by carrageenan and chronic, collagen-induced arthritis. It has been revealed that during the acute inflammation with hyperproduction of  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$ -globulin, inflammatory processes were more pronounced than during chronic collagen-induced arthritis. The increase of gammaglobulin fraction during chronic inflammatory process indicates the involvement in the development of pathological process of the humoral link of immunity with hyperproduction of autoantibodies. In carrageenan-induced immunoinflammatory arthritis was a significant activation of phagocytic cells, with some increasing after stimulation was observed. In the case of experimental collagen-associated arthritis phagocytes were able to increase their functional ability after stimulation. Collagen arthritis was revealed a significant intensification of LPO and improved the content of stable metabolites of nitric oxide, indicating the substantial generation of reactive oxygen and nitrogen. Some predominance of NO-synthase pathway compared to arginase pathway were detected (oxidative way over nonoxidative). The acute inflammation was characterized by a decrease in a number of apoptotic lymphocytes in the blood of experimental rats and chronic inflammation was characterized with their increase compared with control (non-immunized) rats. It had been estimated that antihistone H1 IgG-antibodies have some proteolytic activity against histone H1 and myelin basic protein. It had been established that the proteolytic activity of IgG on histone was detected in the serum of patients with rheumatoid arthritis, but there was no IgG in the serum of healthy donors. This makes the IgG fraction as a potential biochemical marker for predicting of rheumatoid arthritis development.

Keywords: rheumatoid arthritis, carrageenan, collagen-induced arthritis, reactive oxygen and nitrogen, apoptosis, proteolytic activity

Підписано до друку 11.12.2015. Формат 60х90/16  
Папір офсетний. Гарнітура Times New Roman. Друк на різнографі.  
Ук. Друк. Арк. 1,85. Наклад 100 прим. Замовлення №120

Друкарня «Львівпринт»  
м. Львів, вул. Чайковського, 6.