

На правах рукопису

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

КРІЛЬ ІРИНА ЙОСИФІВНА

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

03.00.04 – біохімія

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Науковий керівник:

Кіт Юрій Ярославович,

доктор біологічних наук,

старший науковий співробітник

Львів-2016

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ	6
ВСТУП	8
ОСНОВНА ЧАСТИНА	
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	14
1 Загальна характеристика ревматоїдного артрити (РА). Імунопатогенез ревматоїдного артрити	14
2 Участь імунних клітин у початкових фазах формування ревматоїдного артрити	16
2.1 Роль нейтрофілів у розвитку ревматоїдного артрити	16
2.2 Моноцити/макрофаги в патогенезі ревматоїдного артрити	18
3 Роль протеїнів та низькомолекулярних медіаторів запальних процесів при прогресуванні ревматоїдного артрити	20
3.1 Роль протеїнів гострої фази у патогенезі ревматоїдного артрити	20
3.2 Роль ензимів фагоцитуючих клітин у патогенезі ревматоїдного артрити	22
3.3 Сірководень як вторинний посередник у міжклітинній взаємодії	26
4 Молекулярні механізми патогенезу пізніх фаз розвитку ревматоїдного артрити	27
5 Гуморальні механізми у формуванні деструктивного етапу ревматоїдного артрити	30
6 Експериментальні тваринні моделі ревматоїдного артрити	32
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	35
2.1 Матеріали дослідження	35
2.2 Об'єкт експериментальних досліджень	36
2.3 Методи досліджень	38
2.3.1 Біохімічні методи	38

2.3.1.1 Визначення вмісту аланінамінотрансферази в сироватці крові щурів	38
2.3.1.2 Визначення активності аспартатамінотрансферази в сироватці крові щурів	38
2.3.1.3 Вимірювання активності лужної фосфатази в сироватці крові щурів	39
2.3.1.4 Визначення вмісту креатиніну в сироватці крові щурів	39
2.3.1.5 Визначення вмісту сечовини в сироватці крові щурів	40
2.3.1.6 Визначення вмісту сечової кислоти в сироватці крові щурів	40
2.3.2 Визначення концентрації протеїнових фракцій сироватки крові методом електрофорезу на папері	40
2.3.3 Визначення фагоцитарної активності гранулоцитів та моноцитів у гепаринізованій крові у пацієнтів з РА та імунізованих тварин	41
2.3.4 Визначення циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові експериментальних тварин та пацієнтів з РА	42
2.3.5 Дослідження оксидативних процесів у гранулоцитах та моноцитах гепаринізованої крові піддослідних тварин та пацієнтів з РА	42
2.4 Дослідження вмісту апоптичних клітин у крові піддослідних тварин та пацієнтів з РА	43
2.4.1 Дослідження фаз апоптозу в експериментальних тварин та пацієнтів з ревматоїдним артритом	43
2.4.2 Лектиновий тест периферійних лімфоцитів у крові пацієнтів з РА	44
2.4.3 Визначення апоптичних клітин (пре-G1-фаза) у крові піддослідних тварин та пацієнтів з РА за допомогою проточної цитометрії	45
2.5 Визначення активних форм кисню та нітрогену в плазмі крові піддослідних тварин	45
2.5.1 Визначення активності ензимів NO-синтази в плазмі крові щурів	45
2.5.2 Визначення вмісту NO_2^- в плазмі крові щурів	47
2.5.3 Визначення вмісту NO_3^- в плазмі крові щурів	47

2.5.4	Визначення активності аргінази в плазмі крові піддослідних тварин	47
2.5.5	Визначення вмісту H_2O_2 в плазмі крові щурів	47
2.5.6	Визначення вмісту продуктів тіобарбітурової кислоти (ТБК-активних продуктів) в плазмі крові щурів	48
2.5.7	Визначення швидкостей генерації O_2^- та ОН-радикалів у плазмі крові щурів	48
2.5.8	Визначення вмісту сірководню в плазмі крові щурів	48
2.6	Дослідження протеолітичної активності препаратів імуноглобулінів у експериментальних тварин та у пацієнтів з ревматоїдним артритом	49
2.6.1	Очистка препаратів IgG із сироватки крові	49
2.6.2	Електрофорез протеїнів у поліакриламідному гелі	49
2.6.3	Аналіз протеолітичної активності АТ	50
2.7	Статистична обробка результатів	50
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ		52
3.1	Морфологічні зміни в кінцівках щура за умов гострого (карагенінового) і хронічного (колагенового) запалення	52
3.2	Характеристика біохімічних показників сироватки крові при експериментальному запаленні та у пацієнтів з ревматоїдним артритом	53
3.2.1	Зміна біохімічних показників сироватки крові щурів за умов гострого та хронічного запалення	53
3.2.2	Кількісний та якісний склад протеїнів сироватки крові за умов гострого та хронічного запальних процесів у експериментальних тварин	57
3.2.3	Кількісний і якісний склад протеїнів сироватки крові у пацієнтів з ревматоїдним артритом	60
3.3	Фагоцитарна активність нейтрофілів та моноцитів у крові експериментальних тварин та пацієнтів з ревматоїдним артритом	62
3.3.1	Фагоцитарна здатність нейтрофілів і моноцитів та рівень циркулюючих імунних комплексів у крові експериментальних тварин	62
3.3.2	Фагоцитарна здатність нейтрофілів і моноцитів та рівень	68

циркулюючих імунних комплексів у крові хворих на ревматоїдний артрит	
3.3.3 Рівень оксидативних процесів нейтрофілів і моноцитів у крові експериментальних тварин	71
3.3.4 Рівень оксидативних процесів в фагоцитах периферичної крові пацієнтів з ревматоїдним артритом	75
3.4 Зміна показників оксидативного та нітративного стресу в крові щурів при експериментальному гострому та хронічному артриті	79
3.4.1 Вміст сірководню в плазмі крові експериментальних тварин за умов карагенінового та колагенового артритів	86
3.5 Вміст апоптичних лімфоцитів у крові експериментальних тварин при розвитку карагенінового та колагенового артритів та пацієнтів з ревматоїдним артритом	87
3.5.1 Характеристика апоптичних клітин у експериментальних тварин з індукованим гострим та хронічним запаленням	88
3.5.2 Рівень апоптичних лімфоцитів у крові пацієнтів з ревматоїдним артритом	90
3.6 Протеолітична (каталітична) активність препаратів імуноглобулінів за умов гострого та хронічного запалення	95
РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	104
ВИСНОВКИ	119
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	121

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

РА – ревматоїдний артрит

КІА – колаген-індукований артрит

КІН – карагенін-індукований набряк

РФ – ревматоїдний фактор

анти-ССР – антитіла до циклічного цитрулінового пептиду

анти-МСV – антитіла до модифікованого цитрулінованого віментину

АТ – антитіла

Ауто-АТ – аутоантитіла

МНС – головний комплекс гістосумісності

HLA – система лейкоцитарних антигенів людини

TNF- α – фактор некрозу пухлин

MIF – фактор інгібіції міграції лейкоцитів

ІЛ – інтерлейкін

TGF- β – трансформуючий фактор росту β

TNF- α – туморнекротичний фактор альфа

IFN- γ – гама-інтерферон

G-CSF – гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор

GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор

NO – нітроген (II) оксид (оксид азоту)

NOS – синтаза оксиду азоту (NO-синтаза)

iNOS – індукцибельна синтаза оксиду азоту

ONOO⁻ – пероксинітрит

Ds-Na – додецилсульфат натрію

ПААГ – поліакриламідний гель

ОПМ – основний протеїн мієліну

АФО – активні форми кисню

АФН – активні форми нітрогену

fMLP – N-формілметіоніл-лейцил-фенілаланін

PMA – форбол-12-мірістат-13-ацетат

CD – кластер диференціації

RANKL – ліганд рецептора активатора NF- κ B

c-FMS (CSF-1) рецептор колонієстимулюючого фактору 1

hAAT – альфа-1-антитрипсин людини

НАДФН – нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат

MPO – мієлопероксидаза

MMRs – манозні рецептори на макрофагах

CSE – цистатіонін- γ -ліази

CBS – цистатіонін- β -синтази

ЛПС – ліпополісахариди

TRAIL – TNF-зв'язаний ліганд, індукуючий апоптоз

СЧВ – системний червоний вовчак

ОПМ – основний протеїн мієліну

ВСТУП

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) [1-3]. 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 [4, 5]. 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 фіброblastів, які сприяють проліферації сполучної тканини [6, 7]. Аутоантитіла до компонентів синовіальної оболонки посилюють запальну реакцію, яка спричиняє прогресуюче ураження суглобових тканин [8], як і продукцію активних форм кисню та нітрогену [9].

Для вивчення механізмів, залучених у розвиток РА, часто використовують тваринні моделі (колаген-індукований артрит [10, 11], ад'ювант-індукований артрит у щурів [12-14], спонтанний артрит мишей при індукції фактору некрозу пухлини та інші [15]). 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 [12,

16, 17]. Відомо, що РА, як і більшість системних автоімунних захворювань у людини, характеризується спонтанними загостреннями та ремісіями [18, 19]. 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 автоімунних процесів, пов'язаних із РА [15, 16, 20]. Це захворювання викликається імунізацією щурів колагеном II типу, емульгованим у неповному ад'юванті Фрейнда [21]. КІА характеризується розвитком клітинної та гуморальної ланки імунної відповіді на колаген II типу, що призводить до утворення сенсibiliзованих Т-лімфоцитів та продукції аутоантитіл, специфічних до колагену II типу [22]. При цьому набряк кінцівок, інфільтрація лімфоцитами і руйнування хряща у тварин є подібними до РА у людини [23]. 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 [24-27]. При цьому КІН викликає гострі та хронічні запальні реакції схожі із РА [28].

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 (NO_2^- та 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 артрити 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 артрити 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* (фагоцитарна 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 артрити.

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, апоптотичних 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 артрити.

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.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Загальна характеристика ревматоїдного артриту (РА).

Імунопатогенез РА

Ревматоїдний артрит (РА) є системним аутоімунним захворюванням, етіологія якого залишається мало відомою, а його розповсюдженість сягає 1% серед населення Землі. РА уражає жінок втричі частіше, ніж чоловіків [29, 30]. В основі патогенезу РА лежить хронічне запалення суглобів, характерною особливістю якого є пухлиноподібна (інвазійний ріст у хрящ та кістку) гіперплазія синовіальної оболонки – панус, яка призводить до його руйнування [31, 32].

Запалення синовіальної оболонки лежить в основі кардинальних проявів цього захворювання, до яких належать: біль, набряк і болючість з подальшою деструкцією хряща, ерозією кістки і деформацією суглоба. При РА характерним є симетричне запалення суглобів, яке не спостерігається при інших формах артриту [33]. Крім того, при РА залучаються процеси за участю каскаду патогенетичних змін, які ще більше обтяжують перебіг хвороби [34, 35]. Аутоімунний стан часто передуює розвитку клінічних симптомів навіть протягом багатьох років, у результаті чого спостерігається повільна еволюція захворювання. РА вважається невиліковною хворобою і традиційні протиревматичні препарати, які уповільнюють прогресування РА, як правило, мають обмежену ефективність дії [36, 37].

Хоча етіологія РА невідома, результати багатьох досліджень дозволяють припустити, що умови навколишнього середовища та генетичні фактори залучені в його розвиток. Згідно з Яременко О. Б. (2005) вважається, що захворювання розвивається у генетично схильних осіб під дією різних зовнішніх чи внутрішніх впливів – вірусної чи бактерійної інфекцій, травм, психо-емоційного стресу, медикаментозного втручання, вікової гормональної

перебудова та ін. [30]. Існує думка, що сигаретний дим, продукти життєдіяльності бактерій, вірусні компоненти та інші екологічні стимули можуть сприяти розвитку цих реакцій. Клітини вродженого імунітету в осіб генетично схильних до розвитку аутоагресії експресують Fc-рецептори, які розпізнають бактеріальні антигени та сприяють розвитку швидкої запальної відповіді [3, 31].

При розвитку хвороби відбуваються постійні зміни певних типів імунокомпетентних клітин, що може прискорювати руйнування суглобів. Особливості експресії деяких генів, у тому числі антигени II класу головного комплексу гістосумісності (МНС), цитокінового промотора поліморфізму та ін. беруть участь в розвитку РА [38]. Встановлено факт сімейної схильності до РА. У близьких родичів хворих на РА захворювання розвивається в 3-8% випадків, що в кілька разів вище, ніж у загальній популяції [39]. Вважається, що генетичний внесок в етіологію РА відносно незначний – у межах 15-30% [30, 40]. Отже, якщо в генетично схильного індивідуума порушується регуляція імунної відповіді, це може проявитися у «затримці» завершення гострого запального процесу в суглобах (клінічно явного чи прихованого). Гостре запалення трансформується у хронічне, яке в подальшому перебігає за аутоімунним механізмом. У суб'єктів, генетично несхильних до РА, патологічний процес, на тлі нормальної регуляції імунної системи, закінчується повним одужанням [30].

Імунопатогенез РА можна розділити на п'ять стадій.

Перша стадія – невідомий етіологічний агент, ймовірноше через кровоплин, проникає в суглоб, з'являється гіперемія і набряк субсиновіальної тканини. Починається периваскулярна інфільтрація синовіальної тканини запальними клітинами, синтез і секреція цитокінів, що клінічно проявляється набряком суглобу і почервонінням шкіри над ним.

Друга стадія – медіаторна, коли клітини виділяють протеїни, які підтримують запальний процес [41]. Медіатори запалення, такі як матриксні металопротеїнази (ММР) і молекули клітинної адгезії (САМ), цитокіни, такі як

фактор некрозу пухлини-альфа (TNF- α) і інтерлейкін-1 (ІЛ-1), призводить до деструкції суглобів у пацієнтів з РА [11]. Активовані макрофаги продукують простагландини, колагеназу та ін., що стимулює продукцію активатора плазміногену синовіальними фібробластами.

Третя стадія – лімфоїдна, для якої характерне утворення лімфоїдних фолікулів; підвищений синтез ауто антитіл, гіперімунокомплексемія та гіперпродукція протеолітичних ферментів. Імунні комплекси фагоцитуються нейтрофілами.

Четверта стадія – агресивна, коли фібробласти проліферують, суглобовий хрящ деградує і відбувається розростання ревматоїдного пануса, що призводить до руйнування суглобового хряща.

П'ята стадія – деструктивна, коли запальний панус проникає в кістку під хрящем. Фіброзна грануляційна тканина заміщує хрящ і кістку, створюючи зрости, які ведуть до злиття рухомих поверхонь. Остеопороз, підвивих і зміни за рахунок тиску синовіальної рідини в суглобі складають клінічну картину деформації [41].

Отже, патологічний процес розвитку ревматоїдного артрити обумовлений почерговою активацією клітин вродженого (нейтрофіли, моноцити/макрофаги) і системного (Т-, В-лімфоцити) імунітету.

2 Участь імунних клітин у початкових фазах формування ревматоїдного артрити

2.1 Роль нейтрофілів у розвитку ревматоїдного артрити

Нейтрофіли є першою лінією захисту імунної системи при гострому запальному процесі, який виникає при РА. Гостре запалення спричиняє активацію не тільки нейтрофілів, а й інших клітин вродженого імунітету, таких як епітеліальні, ендотеліальні та тучні клітини, макрофаги, тромбоцити і т.д. Silva M.T. доводить, що завдяки спільному походженню, нейтрофіли і макрофаги виконують кілька однакових функцій (фагоцитоз чужорідних патогенів, активна поведінка під час інфекцій або запалення - міграція,

антимікробна й імуномодуюча активність). Нейтрофіли вносять важливий внесок в активацію макрофагів та їх міграцію у місце запального процесу. При активації вони генерують різні хемотактичні чинники, які впливають на моноцити/макрофаги і дендритні клітини (ДК). Продукуючи IFN- γ , активовані нейтрофіли викликають активацію макрофагів. Синтез макрофагами TNF- α , IL-1 β , G-CSF і GM-CSF у місці запалення або інфекції підвищує виживання нейтрофілів (тобто продовження тривалості життя нейтрофілів з 6-12 год до 24-48 год) [42]. Нейтрофіли також здатні експресувати індукцибельну форму NO-синтази (iNOS) і синтезувати оксид азоту (NO). Відомо, що нейтрофіли і макрофаги здатні активно утворювати вільні радикали кисню, виявляючи свою протимікробну дію; утворення пероксинітриду в реакції NO з вільними радикалами може посилювати антимікробний ефект цих клітин [43].

Нейтрофіли належать до найбільш поширених імунних клітин не тільки в синовіальній рідині суглоба пацієнтів з РА, а й на межі панусу/хряща в синовіальній тканині в місці активного руйнування хряща і кістки. При РА активовані нейтрофіли мігрують у суглоб і «знаходять» агрегати імуноглобулінів (наприклад, ревматоїдний фактор - РФ), які є як в синовіальній рідині, так і на поверхні суглоба [44]. Такі імунні комплекси з фіксованим на них комплементом стають стимулом для хемотаксису лейкоцитів і фагоцитарної реакції. Нейтрофіли і макрофаги, які є в синовіальній рідині, поглинають імунні комплекси. У результаті посиленого фагоцитозу відбувається розпад нейтрофілів із вивільненням лізосомних (протеолітичних) ензимів, які пошкоджують хрящ і синовіальну оболонку. При цьому в синовіальній оболонці й у синовіальній рідині виявляється велика кількість лізосомних ензимів. При цьому, основною патогенетичною ланкою є утворення імунних комплексів. Фагоцитоз гігантських імунних комплексів посилює запалення в синовіальній оболонці й у суглобах. Ревматоїдне запалення набуває перманентного характеру в зв'язку з тривалим синтезом імунних комплексів [45]. Ці комплекси імуноглобулінів приєднуються до Fc γ -рецептора на поверхні нейтрофілів, викликаючи дегрануляцію і продукцію АФК у синовіальній рідині

або безпосередньо на поверхні суглоба [44]. Запалення, викликане імунними комплексами, сприяє розвитку клітинних та молекулярних механізмів захворювання – залученню лейкоцитів та пошкодження тканин. Це означає, що нейтрофіли, ініціюючи запалення викликане імунними комплексами, запускають і прискорюють наступну імунну відповідь [46].

Затримка апоптозу, разом із синтезом прозапальних цитокінів та хемокінів, а також здатність презентувати антиген Т-клітинам, надає нейтрофілам можливість активно залучатися в запальні процеси [44].

Нейтрофіли залучаються в патогенез РА, продукуючи тканино-пошкоджуючі протеази, хемоатрактанти (ейкозаноїди та хемокіни) та цитокіни, які стимулюють запалення. Наявність в уражених суглобах пацієнтів з РА (як в синовіальній рідині, так і в синовіальній мембрані) нейтрофілів вказує на молекулярний механізм формування цього захворювання. Міграція нейтрофілів з циркуляторного русла в місце запалення контролюється взаємодією L-селектинів з ендотелієм судин. Нейтрофіли, залишивши циркуляторне русло та пройшовши через ендотелій, мігрують до запаленої тканини. Взаємодія нейтрофілів із хемоатрактантами, такими як N-формілметіоніл-лейцил-фенілаланін (fMLP) і компонент комплементу 5a (C5a) індукує клітинну поляризацію хеморецепторів і формування псевдоподій на передньому краю клітини, які багаті актином. В місці запалення мембранний рецептор для протеїнів компонентів комплементу й імуноглобулінів розпізнає та зв'язує опсонізовані бактерії, що призводить до фагоцитозу збудника і руйнування в межах внутрішньоклітинної фагосоми [44, 46].

2.2 Моноцити/макрофаги в патогенезі ревматоїдного артриту

Моноцити/макрофаги виконують ключову роль у патогенезі запалення при РА. Кількість цих клітин у запаленій синовіальній мембрані й у панусі є значною. Володіючи широкою прозапальною, руйнівною та ремодулюючою здатністю, вони сприяють запаленню та суглобовій деструкції як при гострій, так і при хронічній стадії РА. Крім цього, активація моноцитарної лінії клітин

не обмежується лише синовіальними макрофагами, а поширюється на циркулюючі моноцити та інші клітини системи мононуклеарних фагоцитів [47]. За результатами досліджень Burmester G. R. et al. (1995) у синовіальній оболонці хворих на РА у поверхневому шарі фібробластів знайдено макрофаги, що свідчить про їх активну участь в (ауто)імунному процесі. Tetlow L.C. та співр. (1993) визначили, що у місці запалення макрофаги синтезують значну кількість прозапальних цитокінів IL-1, TNF- α і GM-CSF і сприяють продукції протеаз колагенази, желатинази В та еластази [48]. Як відомо, NO-синтаза макрофагів є індукцибельним ферментом. Моноцити/макрофаги здатні синтезувати NO-синтазу і виділяти велику кількість оксиду азоту. Під впливом ліпополісахаридів мікробного походження та цитокінів у макрофагах починається синтез індукцибельної ізоформи NO-синтази, що утворює великий обсяг NO, який виявляє цитостатичну та цитолітичну дію на чужорідні агенти [43, 49].

Heller R.A. et al. (2000) виявили, що в периферичній крові пацієнтів з РА циркулюючі моноцити є активованими. Стан активації моноцитів/макрофагів проявляється наступним чином: синтезі прозапальних цитокінів, експресії Cu^{2+} супероксиддисмутази (ензиму, необхідного для контролю рівня вільних радикалів кисню; підвищенні фагоцитарної активності; підвищенні експресії інтегринів та інших адгезивних молекул). З іншого боку, при патології (зокрема, у хворих аутоімунними хворобами) моноцитам властива спонтанна продукція простаноїдів, простагландину, з'являються моноцити із супресорною функцією [47]. Більше того, моноцити/макрофаги, стимульовані цитокінами та імунними комплексами, стають причиною патологічної ерозії кістки при РА, у зв'язку з їх надмірною диференціацією в остеокласти. Таким чином, кістковий гомеостаз модулюється імунологічними чинниками, асоційованими із запаленням [50].

Моноцити/макрофаги в процесі запалення синтезують гострофазові протеїни.

3. Роль протеїнів та низькомолекулярних медіаторів запальних процесів при прогресуванні ревматоїдного артриту

3.1 Роль протеїнів гострої фази у патогенезі ревматоїдного артриту

Аналіз вмісту протеїнів – маркерів запалення – використовують для контролю активності захворювання при ревматичних хворобах. Рівень гострофазових протеїнів в сироватці крові корелює з іншими клінічними та лабораторними даними [51].

Протеїновий обмін плазми крові значною мірою визначає фізіолого-біохімічний гомеостаз організму. Загалом плазма крові – це динамічна система, яка перебуває в рівновазі з протеїнами тканин, а їх кількісний та якісний склад відображає зміни протеїнового обміну в організмі під впливом внутрішніх та зовнішніх факторів [52]. Хоча біохімічні показники сироватки крові при РА є неспецифічними щодо цього захворювання, вони широко використовуються для встановлення ступеню активності запального процесу. За даними Hung et al. (2005) при ад'ювант-індукованому системному запаленні має місце підвищена активація печінкових трансаміназ у плазмі крові та зміни морфології гепатоцитів. Беручи до уваги участь активних форм кисню при РА, ймовірно, що біохімічні та гістологічні зміни печінки асоціюються зі змінами оксидативного стану в клітинах печінки [53].

Основна частина загального протеїну крові припадає на альбуміни, глобуліни та фібриноген. Більша частина протеїнів плазми крові синтезується в печінці: альбуміни, α 1-, α 2- і частина β -глобулінів, фібриноген тощо. Частина β - і γ -глобулінів синтезуються в клітинах імунної системи. **Альбуміни** – це найбільш гомогенна фракція протеїнів, основною функцією яких є підтримка колоїдно-осмотичного тиску, транспорт вуглеводів, ліпідів, гормонів, пігментів. Організм пацієнта з активним ревматоїдним артритом більш активно споживає альбумін у місці запалення, в результаті чого розвивається гіпоальбумінемія. Крім цього, зростає проникливість кровоносних судин суглобів, що дозволяє макромолекулам швидше потрапляти в місце запалення. Метаболічні процеси в

клітинах синовіуму при РА є підвищеними [54]. Альбумін володіє антиоксидантними властивостями і знешкоджує надлишкові вільні кисневі радикали (ВКР), гальмуючи їх продукцію нейтрофілами. У сироватці крові пацієнтів з РА спостерігали зниження активації α 1-антипротеїнази під впливом гіпохлоритної кислоти та гідроген пероксиду [55].

Глобуліни сироватки крові представлені чотирма фракціями (α 1, α 2, β , γ), кожна з яких неоднорідна і містить декілька протеїнів, що відрізняються за своїми функціями. Людський альфа-1-антитрипсин (hAAT), синтезується макрофагами (клітинами Купфера) у печінці. Він може продукуватися також іншими типами клітин, зокрема нейтрофілами, моноцитами, макрофагами. Під час запалення при РА рівень hAAT може збільшуватися в 3-4 рази, здійснюючи імунорегуляторну та протизапальну дію. К. Kakimoto та співр. (1996) довели, що інгібітори нейтрофільної еластази hAAT здатні знизити захворюваність та важкість колаген-індукованого артрити у мишей і щурів. За повідомленнями Dhami R, Gilks B та співр. (2000), людський hAAT здатний повністю усунути гостру запальну інфільтрацію та зменшити ступінь пошкодження сполучної тканини в експериментальних моделях запалення у мишей. Також цей протеїн посилює експресію IL1-R α людськими мононуклеарними клітинами периферичної крові, зменшуючи апоптоз і запалення [56, 57].

Церулоплазмін, гаптоглобін та α 2-макроглобулін належать до найважливіших представників фракції α 2-глобулінів. Відомо, що підвищена концентрація α 2-глобулінів є сигналом загострення хронічного захворювання [58]. Підвищення вмісту α 2-глобулінів у сироватці крові, за сучасними уявленнями, пов'язано з деструкцією сполучної тканини [59].

При тривалому підгострому прогресуючому процесі спостерігається, головним чином, гіпергамаглобулінемія, що пов'язано зі зростанням рівня аутоантитіл. Зміна співвідношення протеїнових фракцій, зазвичай, відповідає тяжкості РА і відображає динаміку запального процесу. За даними Voit і Gamp (1995), зменшення альбумінів нижче 54%, збільшення α -2-глобулінів вище 9,5%

і значне збільшення гама-глобулінів (понад 24%) – однозначно свідчить про активний процес при РА [60].

3.2 Роль ензимів фагоцитуючих клітин у патогенезі ревматоїдного артриту

Одним із найбільш важливих руйнівних механізмів поглинутих патогенів є викликаний ними оксидативний вибух у нейтрофілах. При гострому запальному процесі спостерігається помітне збільшення кількості поліморфоядерних нейтрофілів у місці запалення, а при хронічному запаленні - інфільтрація мононуклеарними клітинами, руйнування тканини і фіброз. При хронічному запаленні через надлишкову продукцію вільних радикалів кисню і виснаження антиоксидантної системи захисту організму виникають побічні ефекти у вигляді руйнування суглобових поверхонь, посилення продукції прозапальних цитокінів, пошкодження ДНК тощо [61].

Ключова роль у процесі фагоцитозу належить активним метаболітам кисню. Нейтрофіли, моноцити і макрофаги, які володіють бактерицидними властивостями, є головними «винуватцями» руйнівних процесів [62]. Знищення чужорідних агентів здійснюється двома шляхами – киснезалежним та кисненезалежним. Кисненезалежний шлях реалізується через протеїнази, катіонні протеїни, лізоцим, лактоферин тощо. Киснезалежний шлях здійснюється за участю мієлопероксидази (МРО) з утворенням токсичних продуктів – синглетного кисню (O_2^*), гідроген пероксиду (H_2O_2), супероксидних ($\bullet O_2^-$) та гідроксильних радикалів ($\bullet OH$) та гіпохлоритної кислоти.

Процес активації імунокомпетентних клітин супроводжується посиленням вільнорадикального окиснення [62]. Взаємодія чужорідних частинок з поверхневими рецепторами фагоцита викликає його активацію, що проявляється перебудовою метаболізму клітини: відбувається збільшення іонної проникності клітинної мембрани, посилюється окиснення глюкози і різко (в десятки разів) зростає споживання кисню. Це явище отримало назву «оксидативний вибух». В його основі лежить різке підвищення утворення

НАДФН в клітині в результаті активації гексозомонофосфатного шунта й окиснення НАДФН ензимним комплексом НАДФН-оксидази. Це – мембрано-асоційований ензим, який відновлює молекулярний кисень до супероксидного радикала на зовнішній поверхні плазматичної мембрани за рахунок окиснення НАДФН на його внутрішньому боці. Отже, в результаті утворення пор у плазматичній мембрані в клітину надходять іони кальцію. Основна їх мета – індукція експресії кальмодуліну, який регулює функції низки ензимів, що беруть участь у реалізації оксидативного вибуху. Збільшення концентрації іонів кальцію може також викликати активацію протеїнкінази, яка має високу каталітичну активність. При цьому змінюється взаємодія між компонентами оксидазної системи, що приводить до транслокації їх в плазматичну мембрану. Зрештою відбувається збільшення активності НАДФН-оксидаз [63].

За даними Mitchell та Cheesman (2003) вільні радикали кисню продукуються двома важливими джерелами біологічної системи через клітинний метаболізм та фактори довкілля. Клітинний метаболізм реалізується за участю таких процесів, як запуск мітохондріального ланцюга переносу електронів, процесів окиснення в ендоплазматичному ретикулумі, активації НАДФН-оксидази, ксантинооксидази, синтезу простагландинів, синтази нітроген (II) оксиду, реперфузійного пошкодження, активації цитохрому P₄₅₀ [64].

Нейтрофіли містять різноманітні протеази і можуть генерувати активні форми кисню (АФО) для швидкого знищення опсонізованих мікроорганізмів. При цьому відбувається пошкодження довколишніх тканин токсичними молекулами, які продукуються активованими нейтрофілами [44]. Крім того, виділяючи різні прозапальні цитокіни, нейтрофіли виділяють мієлопероксидазу (МРО), яка використовує супероксид і гідроген пероксид для знищення поглинутих речовин. У плазмі фагоцитів МРО окиснює урати до радикалів (гідроген пероксиду та супероксиду). У результаті утворення сечової кислоти відбувається генерація супероксид-аніону, що призводить до активації системи перекисного окиснення ліпідів. Пряма антиоксидантна дія відбувається шляхом інгібування утворення оксиду азоту, супероксид-аніон радикалу та

гідроксильного радикалу [65] та стабілізації мембран клітин з модифікацією ензимів із скороченням числа залізовмісних центрів перекисного окиснення ліпідів [66].

Нейтрофіли в місці запалення синтезують гіпохлоритну кислоту, яка відноситься до сильних окислювачів [67] та захищає протеази гранул нейтрофілів від впливу інгібіторів у синовіальній рідині та ферменти гранул нейтрофілів (мієлопероксидази і лактоферину) [44]. МРО сприяє пошкодженню тканин та посилює експресію манозильних рецепторів на макрофагах (MMRs), що призводить до посилення продукції активних форм кисню в суглобах хворих на ревматоїдний артрит та підтримує хронічний запальний процес [67].

Активація оксидативного вибуху призводить до генерації АФО НАДФ-оксидазою. Радикали кисню призводять до пошкодження ДНК, окиснення ліпідів, протеїнів і ліпопротеїдів, а також можуть бути причетними до змін структури імуноглобулінів з утворенням ревматоїдного фактору (РФ) [63]. Серед АФО, які продукується хондроцитами, велику частку складають оксид азоту (NO) і супероксид аніон (O_2^-). Вони генерують похідні радикалів, в тому числі пероксинітрил ($ONOO^-$) і гідроген пероксид (H_2O_2). Активні форми кисню і нітрогену пошкоджують клітинні елементи хряща і компоненти позаклітинного матриксу шляхом прямої дії або непрямим шляхом за рахунок зниження синтезу матричних компонентів (протеогліканів, колагену II типу) та активності сульфування глікозаміногліканів, викликаючи їх апоптоз [68]. NO пригнічує біосинтез агрекану, головного макромолекулярного компоненту хрящової матриці. Kennett & Davies (2009) виявили, що радикали кисню руйнують гіалуронану і хондроїтину сульфати. Оксидативний стрес сприяє апоптозу синовіоцитів. За Blanco та співр. (1995) NO є первинним індуктором апоптозу хондроцитів суглобів. Del Carlo & Loeser (2002) виявили, що NO-опосередкована клітинна смерть хондроцитів потребує утворення додаткових форм вільних радикалів кисню, таких як $ONOO^-$ і O_2^- [69]. .

У пацієнтів з РА надвиробництво вільних радикалів призводить до дисбалансу в системі оксидант-антиоксидант. Цей дисбаланс призводить до пошкодження тканин і підтримки запалення при цьому захворюванні [70].

У хворих на аутоімунні хвороби прозапальні цитокіни стимулюють продукцію оксиду азоту (NO). При цьому NO може сприяти імунному захисту організму, виконуючи роль імуномодулятора, а у високих концентраціях проявляє цитотоксичну дію, яка ускладнює перебіг аутоімунної реакції [71]. NO легко вступає в реакцію з супероксид-аніоном з утворенням пероксинітриту, який опосередковує цитостатичні ефекти NO, такі як пошкодження ДНК, окислення ліпідів, інгібування мітохондріального дихання [72].

Субстратом для NO є амінокислота L-аргінін. Обмін L-аргініну здійснюється двома шляхами: окисним (NO-синтазним) і неокисним (аргіназним). Аргіназа регулює утворення NO шляхом конкуренції з NO-синтазою за L-аргінін. Вважають, що висока експресія аргінази в мітохондріях клітини свідчить про гуморальну відповідь з боку імунної системи на антиген, тобто підвищення продукції антитіл [71, 73].

L. W. Huang та співр. (2000) встановили, що в сироватці крові активність аргінази була значно вищою у пацієнтів з РА, ніж у пацієнтів, хворих на системний червоний вовчак (СЧВ), остеоартрит (ОА) чи в контрольній групі. У пацієнтів з РА була виявлена статистично достовірна кореляція між концентраціями у сироватці крові аргінази і ревматоїдного фактора. Ці дані вказують на збільшення продукції аргінази в клітинах пацієнтів з РА, чого не відбувається при інших імунозалежних захворюваннях. Збільшення продукції аргінази є унікальним і може відігравати важливу роль в патогенезі РА [74]. A. Beri, S. Singh, A. Gupta (2004) визначили, що при ювенільному ревматоїдному артриті високий рівень сироваткового NO корелює з клінічними індексами запалення та лабораторними показниками захворювання [75], в той час як така кореляція не є статистично достовірною в дорослих [76]. Зростання аргіназної активності спостерігається також у синовіальній рідині хворих РА [71, 77, 78]. Продукція NO у синовіальній рідині стимулюється імунними

комплексами, особливо при загостренні ревматоїдного артриту і підвищенні внутрішньосуглобового рівня NO. Це відображає порушення регуляції імунної системи [79].

Біологічна активність NO лімітується його швидким окисненням до нітрит- (NO_2^-) або нітрат-аніонів (NO_3^-). Завдяки взаємодії з гемовмісними протеїнами NO може окиснюватися до NO_3^- . Неорганічний нітрит-аніон NO_2^- є регулятором фізіологічних функцій і відповіді тканин на ішемію, тоді як більш стабільний нітрат-аніон NO_3^- вважається біологічно інертним [9].

3.3 Сірководень як вторинний посередник у міжклітинній взаємодії

За останнє десятиліття даних щодо ролі сульфїду водню (сірководень, H_2S), поряд з оксидом азоту як медіатора клітинних сигнальних систем, значно зросла. H_2S синтезується за участю піридоксальфосфат-залежних ензимів CSE (цистатіонін- γ -ліази) і CBS (цистатіонін- β -синтази) з цистеїну, гомоцистеїну і цистатіоніну [80-82]. У різних органах і тканинах фізіологічні концентрації гідроген сульфїду варіюють і становлять від 1 до 100 нмоль/г тканини [83]. Гідроген сульфїд виконує захисну функцію газотрансміттера в шлунково-кишковому каналі, серцево-судинній та нервовій системах тощо. Він є ендогенним модулятором адгезії лейкоцитів до судинного ендотелію [84-86]. При оксидативному стресі, подібно до NO, здійснює регуляцію процесів запалення, сприяє вазодилатації, виживанню нейронів – тобто впливає на життєздатність клітин, проліферацію, активацію, секрецію цитокінів та клітинну адгезію [87, 88]. Останнім часом стало відомо, що H_2S регулює також такі важливі біологічні функції, як кров'яний тиск, біль та запалення. При запаленні збільшується синтез H_2S ензимами CSE і CBS під впливом ЛПС (ліпополісахаридів) і прозапальних цитокінів [80, 89]. H_2S може спричиняти як індукуючий, так й інгібуючий вплив на механізми реалізації апоптозу клітини. Проапоптичний ефект гідроген сульфїду у високих (мілімолярних) концентраціях супроводжується генерацією активних форм кисню, зниженням вмісту глутатіону та залученням як рецепторного (Fas-

опосередкованого), так і мітохондріального шляхів реалізації апоптозу. Дія низьких (мілі- і мікромольних) концентрацій гідроген сульфіді може призводити до цитопротекторного (антинекротичного) впливу [83]. H_2S може викликати пошкодження ДНК, змінюючи клітинний цикл у різних клітинах ссавців. Клінічне дослідження показало збільшення продукції H_2S в синовіальній рідині суглобів хворих на РА як наслідок запальної індукції синтезу H_2S . Концентрація H_2S у синовіальній рідині при РА була значно вищою, ніж у пацієнтів з остеоартритом. Підвищення рівня H_2S у суглобовій рідині корелювало з клінічною оцінкою запалення і ревматоїдним артритом [89]. Н. Mitsuhashi, S. Yamashita (2005) встановили, що при запаленні АФО активованих нейтрофілів можуть окиснювати H_2S до сульфіту, який посилює адгезію лейкоцитів і функцію нейтрофілів. А М. Whiteman et al. (2005) зясували, активовані нейтрофіли конвертують H_2S у сульфід. Це перетворення залежить від активності НАДФ-оксидази та інгібується аскорбіновою кислотою, що вказує на участь оксидантів. Таким чином, реалізується захисний механізм H_2S [90]. L. Rinaldi et al. (2006) дослідили, що H_2S підтримує виживання гранулоцитів, сприяючи реалізації бактерицидної функції нейтрофілів [91]. М. Bhatia et al. (2005) вивчали розвиток запалення при карагінан-індукованому артриті в гризунів та виявили підвищення синтезу H_2S у суглобах, підтвердивши при цьому існування локальної надпродукції H_2S при запаленні [92].

4 Молекулярні механізми патогенезу ревматоїдного артриту

Механізми клітинної цитотоксичності відіграють головну роль в імунній відповіді проти чужорідного збудника. Цитотоксична дія макрофагів і гранулоцитів відноситься до неспецифічного феномену, пов'язаного з синтезом деяких цитотоксичних цитокінів (TNF) або вільних радикалів і ензимів, що пошкоджують мембрани клітин [93].

Порушення механізмів індукції апоптозу є важливою ланкою у патогенезі РА [94]. Завдячуючи апоптозу знищуються інфіковані чи патологічно змінені

аутологічні клітини. За умов формування РА апоптичному ураженню підлягають здорові клітини органів, які формують опорно-руховий апарат [95].

Для виявлення апоптичних змін використовуються різні цитохімічні маркери. При апоптозі спостерігається переміщення фосфатидилсерину (ФС) з внутрішнього боку плазматичної мембрани на зовнішню. Наявність ФС на зовнішній поверхні мембрани спостерігається вже на ранній стадії апоптозу й утримується до повної деградації клітини. Анексин V з високою спорідненістю зв'язується з експонованим на поверхні апоптичної клітини ФС і є специфічним маркером апоптозу [96]. У проведених Р.О. Білим, Р.С. Стойкою, М. Hermann (2007) [97, 98] дослідженнях було визначено і описано зміни поверхневих гліканів, пов'язаних з апоптозом, а саме зростання рівня α -D-манозо- та β -D-галактозо-вмісних глікопротеїнів. Для визначення змін у спектрі глікопротеїнів плазматичної мембрани при апоптозі було успішно використано специфічні лектини [99]. Подальші дослідження дали змогу охарактеризувати та ідентифікувати ці глікопротеїни [100]. Під час апоптозу відбувається зміна спектра глікосфінголіпідів апоптичних клітин [101]. Факт зміни профілю поверхневих гліканів при апоптозі був використаний для виявлення апоптичних лімфоцитів при РА [102].

Згідно з G S Firestein (2004) у ревматоїдній синовіальній оболонці відбувається активне інгібування апоптозу, зумовлене надлишком антиапоптичних молекул, які виробляються синовіоцитами та синовіальними лейкоцитами. Це може відбуватися внаслідок руйнівного впливу вільних радикалів кисню, пероксидних сполук, NO та інших генотоксичних факторів мікросередовища запаленого суглоба та ДНК. Інгібування лейкоцитарного апоптозу аутореактивних Т-лімфоцитів у синовіальній рідині спостерігається вже на ранніх стадіях РА. Механізми цього інгібування відбуваються за рахунок високих рівнів антиапоптичних цитокінів (IL-2, IL-4, IL-15, GM-CSF тощо), які утворюються на початку розвитку ревматоїдного синовіїту [38, 103].

Ранні стадії РА (3 місяці після початку проявів симптомів) характеризуються дуже низьким рівнем апоптозу лейкоцитів у синовіальній

оболонці. За даними K. Raza та співр. (2005) під час цієї фази хвороби пацієнти мали значно нижчий вміст апоптичних нейтрофілів синовіальної рідини, ніж у пацієнтів з встановленим РА. Апоптоз лімфоцитів синовіальної рідини майже не спостерігався на стадії дуже раннього РА. Виявлена тенденція до більш високого апоптозу лімфоцитів у пацієнтів з хронічним РА [104]. Результати досліджень P. Szodoray et al. (2002) показали присутність у периферичній крові активованих довгоживучих Т-лімфоцитів із порушенням апоптозу. Це сприяє залученню цих клітин в місце пошкодження тканин і персистенції аутоімунного запального процесу [105]. Гальмування апоптозу лейкоцитів синовіальної рідини характерно для ранніх клінічних форм РА. Високі рівні загального γ -ланцюга цитокінів (IL-2, IL-4 і IL-15), G-CSF і GM-CSF при ранньому ревматоїдному ураженні, сприяють виживанню лімфоцитів і нейтрофілів на цій фазі захворювання. Макрофагальний IFN- α є потужним фактором виживання для Т-лімфоцитів і нейтрофілів. Синовіальні макрофаги вносять свій вклад в інгібування апоптозу лейкоцитів, що спостерігається на початку розвитку РА [104].

У нейтрофілах, які мігрували в суглоби при РА, виявлені молекулярні зміни, які пов'язані із затримкою поглинання апоптотичних тілець, що сприяють пошкодженню тканини суглоба. A. Cross та співр. (2006) дослідили, що синовіальна рідина при РА містить комплекс про- і антиапоптичних факторів, які при низькому місцевому тиску кисню (що характерно в суглобі при РА) сприяють тривалому виживанню нейтрофілів. При РА такий «відтермінований» апоптоз може призвести до тканинного пошкодження та прогресування запального процесу в суглобі [106].

Дослідження, проведені на моделі запального артрити K/VxN у нокаутних мишей, показали, що проапоптичний протеїн Bid, який є посередником між зовнішнім і внутрішнім шляхами апоптозу, відіграє важливу роль у розвитку запального артрити. Миші, позбавлені протеїну Bid, демонструють пришвидшений темп формування артрити, пов'язаного із запаленням, формуванням панусу, деструкцією кісткової тканини та інфільтрацією

лейкоцитами. Крім цього, в суглобах мишей із фенотипом $Bid^{-/-}$ виявили меншу кількість апоптотичних клітин, порівняно з мишами дикого типу, що може бути пов'язано із нездатністю до апоптозу в суглобі аутореактивних Т-лімфоцитів [107].

5 Гуморальні механізми у формуванні деструктивного етапу ревматоїдного артрити

До загальних властивостей ензимів та антитіл відноситься їх здатність зв'язувати специфічні молекули (ліганди) – субстрат чи антиген (АГ). Проте, відмінність функцій цих протеїнів полягає в тому що, антитіла зв'язують антиген для знешкодження, а ферменти зв'язують субстрат для подальшого перетворення у продукт [108]. Каталітичними називають АТ, які, окрім традиційного зв'язування з АГ, можуть використовувати АГ як субстрат у реакціях специфічного каталізу. Тобто, такі АТ володіють специфічною "функціональністю" [109]. Відомо, що анти-ДНК ауто-АТ сироватки крові хворих на РА також здатні гідролізувати ДНК і різні типи РНК, тобто володіють ДНКазною і РНКазною активністю. Виявлення значної каталітичної активності ДНК-абзимів характерно для РА з ранніми проявами позасуглобових проявів, а також для повільно протікаючих форм захворювання. При РА, як і при СЧВ спостерігаються високі рівні циркулюючих у крові нуклеосом, які провають продукцію ауто-АТ. Такі ауто-АТ активно беруть участь у формуванні РФ, тим більше, що при РА сповільнена елімінація з крові вільної ДНК [110]. Ауто-АТ з гідролізуючою ДНК-активністю (ДНК-абзими), які здатні проявляти як каталітичні, так і цитотоксичні властивості, розглядаються як важливий фактор контролю механізмів опосередкованої антитілозалежної цитотоксичності [111].

Каталітично активні АТ, які володіють протеолітичною активністю, отримали назву протабзимів [112, 113]. Вперше протабзими класу IgG, які здатні гідролізувати інтестинальний вазоактивний пептид (VIP), було виявлено у сироватці крові хворих на астму [114]. Встановлено, що руйнування певних аутоантигенів протабзимами тісно пов'язане із розвитком певних аутоімунних

захворювань. Наприклад, у хворих на гострий алергічний тиреоїдит анти-тиреоглобулінові ауто-АТ здатні гідролізувати тиреоглобулін [115], у хворих на алергічний міокардит виявлено ауто-АТ, які гідролізують міозин [116], а у хворих на розсіяний склероз присутні ауто-АТ із здатністю гідролізувати основний протеїн мієліну (ОПМ) [117, 118]. У крові хворих на СЧВ Я.Котом, Р.Білим та співр. (2009) були виявлені антитіла, які гідролізують гістон H1 та ОПМ, та їхня тісна кореляція із загостренням хвороби [119]. Встановлено, що субстратна специфічність IgG-протабзимів, а також рівень їх протеолітичної активності в сироватці крові пацієнтів тісно корелює з типом захворювання та його тяжкістю, що робить їх перспективними маркерами для діагностики перебігу аутоімунних захворювань [120].

Нещодавно у сироватці крові хворих на РА були виявлені IgG- і IgM-антитіла, здатні гідролізувати синтетичний пептид Pro-Phe-Arg-4-метилкумаринімід [121]. Аналіз даних літератури вказує на те, що ці протабзими можуть володіти захисною (протекторною) функцією. На користь цього судження слугують дані про те, що в сироватці крові людей із сепсисом міститься високий рівень протеолітично активних IgG-антитіл, здатних гідролізувати, подібно до IgM-антитіл хворих на СЧВ [122], Pro-Phe-Arg-4-метилкумаринімід [121]. При цьому титр протабзимів і рівень їхньої каталітичної активності позитивно корелює із сприятливим прогнозом клінічного розвитку сепсису у людей [123].

На відміну від анти-ДНК, функція антигістонових АТ у розвитку аутоімунних процесів при РА залишається мало вивченою. Нещодавно вперше було встановлено, що IgG-антитіла сироватки крові щурів за експериментального ревматоїдного артрити здатні руйнувати гістон H1 та основний протеїн мієліну. При цьому було встановлено, що гідроліз колагену II типу відбувається в присутності Mn_2^+ та Fe_2^+ [124]. Дослідження показали, що за антигенною специфічністю протеолітично активні АТ можна класифікувати як антигістонові ауто-АТ [125]. У подальшому, Котом Ю.Я. та ін. (2010) було висунуто гіпотезу про те, що протеолітично активні антигістонові ауто-АТ,

ймовірно, залучені у формування ускладнень при системній аутоімунній патології.

Таким чином, взаємодія між рівнем протабзимів та загостренням і ураженням різних органів і систем при РА залишається мало вивченою.

6 Експериментальні тваринні моделі ревматоїдного артриту

Експериментальні тваринні моделі ревматоїдного артриту широко використовують при дослідженні патогенезу запальних артритів. Важливими критеріями у виборі моделі є: здатність прогнозування розвитку хвороби; простота постановки експерименту; подібність розвитку патології та/або патогенезу, як у людини. Моделі РА відносно легкі до виконання, мають хорошу відтворюваність даних і, як правило, є короткотривалі. Більшість моделей РА мають певні патологічні особливості, аналогічні тим, які спостерігаються у хворих людей. Важливі відмінності включають: 1) розвиток хвороби в тваринних моделях РА є швидшим, ніж у людини і характеризується гострою запальною відповіддю; 2) у гризунів спостерігають потужну кісткову резорбцію і формування кісткової тканини (особливо періостальна/ендостальна) у відповідь на запалення суглобів [12-15].

Ад'ювантний артрит у щурів є експериментальною моделлю поліартриту, який широко використовується для доклінічних випробувань численних анти-артритних агентів. Відмінними рисами цієї моделі є надійний початок та прогресування хвороби, тривале, легко помітне запалення суглоба, значна резорбція кістки та її періостальна проліферація. Спостерігається руйнування хряща, але непропорційно м'яке, порівняно із запаленням та кістковою деструкцією [12-14, 126].

Колагеновий артрит II типу в щурів виникає при імунізації гомогенним або гетерогенним колагеном II типу. Отриманий поліартрит характеризується помітним руйнуванням хряща, пов'язаним з осіданням імунних комплексів на суглобових поверхнях, резорбцією кістки і періостальної проліферації, помірного синовіту і периартикулярного запалення. Пошкодження при

колагеновому артриті II типу аналогічні тим, які спостерігаються у хворих на РА, ніж при ад'ювантного артриту, оскільки більш значнішим є панус, асоційований із деструкцією хряща [12].

Практично будь-які види тварин можуть бути використані при дослідженні антигенного артриту. При введенні антигену в суглоб спостерігається гостре швидко прогресуюче запалення, яке призводить до деструкції суглоба. Внутрішньочеревне введення водних суспензій стрептококів групи А або пептидогліканів їхніх клітинних стінок призводять до поліартриту з гістологічною картиною ад'ювантного артриту [15].

У мишей із колаген-індукованим артритом (КІА) виявляються антитіла проти цитрулінованого протеїну, які включаються у патогенез аутоімунного артриту. Kuhn et al. (2006) виявили, що антитіла проти колагену II типу і циклічного цитрулінованого пептиду (ССР) з'явилася на початку імунізації колагеном II типу, до розвитку припухлості суглобів [127].

На моделі пасивного переносу в мишей з дефіцитом низькоафінного інгібуючого Fc-рецептора FcγRIIB виявляли АТ. Petkova et al. (2006) показали, що плазма або сироватка пацієнтів з активним РА викликає запалення та гістологічні зміни в FcγRIIB^{-/-} мишей, у випадку імунізації збагаченою фракцією IgG. Сироватка крові здорових донорів не викликала артрит. Це говорить про те, що гуморальний імунітет безпосередньо сприяє аутоімунному артриті [107].

Щоб обґрунтувати роль Т-лімфоцитів при хронічних запальних артритах, використовують ІІ-1Ra-дефіцитних мишей (ІІ-1Ra ендогенно блокує рецептор ІІ-1). У цих мишей, артрит не розвивається при відсутності Т-лімфоцитів, тоді як введення Т-лімфоцитів цих мишей безтимусним мишам призводило до виникнення артриту. Holmdahl R. et al. (2004) виявили природну мутацію в гені, який кодує протеїн Ncf1, субодиниці комплексу НАДФ-оксидази. Ця мутація знижує оксидативний вибух макрофагів і нейтрофілів. Це свідчить про те, що неоптимальний оксидативний вибух може знизити Т-клітинну толерантність до колагену II типу в мишей [128, 129].

Підсумок. На основі огляду літературних даних відомо, що РА є системним аутоімунним захворюванням, етіологія якого залишається маловідомою, а провідну роль у розвитку запалення виконують CD4⁺-лімфоцити, які інфільтрують синовіальну оболонку. Вказані лімфоцити виробляють γ -IFN, GM-CSF та інші цитокіни, які активують макрофаги та, стимулюючи проліферацію В-лімфоцитів, сприяють їх диференціації у плазматичні клітини. Спостерігається тривала активація Т-лімфоцитів невідомими чинниками (екзогенними антигенами, суперантигенами чи зміненими власними протеїнами). Відомо, що при РА розвивається хронічний синовіт, який супроводжується змінами синовіальної рідини, які характерні для гострого запалення. Продукти, які утворюються клітинами в синовіальній оболонці (простагландин E2, гістамін та інші вазоактивні речовини) стимулюють вихід клітин у зону запалення. Проте, недостатньо відома сама роль нейтрофілів і моноцитів у периферичній крові хворих на РА, ступінь їх активації та фагоцитарної здатності. Недостатньо вивчена роль оксидативних процесів у фагоцитуючих клітинах, роль активних форм кисню та нітрогену, які виділяються при активації нейтрофілів та моноцитів із метою знищення чужорідних антигенів, а також медіаторів клітинних сигнальних систем. Дослідження процесів апоптозу при різних стадіях захворювання з використанням різних методів може відобразити стан запального процесу в пацієнтів на РА. Відомо, що при РА спостерігається утворення аутоантитіл до антигенів різного походження. Не досліджена роль антигістонових антитіл при РА, які можуть використовувати антиген як субстрат та бути перспективними маркерами для діагностики різного перебігу аутоімунних захворювань. Для вище зазначених досліджень будуть використані тваринні моделі гострого та хронічного запального процесів з метою виявлення адекватних характеристик прогнозування розвитку та попередження можливих ускладнень РА у людини.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Матеріали дослідження

Для виконання роботи використано такі набори реактивів:

Лужної фосфатази (ALP (DEA) SL), аспартатамінотрансферази (AST/(GOT) 4+1 SL), аланінамінотрансферази (ALT/GPT 4+1 SL), креатиніну (Creatinine jaffe), сечовини (Urea UV SL), сечової кислоти (Uric acid mono SL) та контрольної сироватки (ELITech Clinical Systems, Франція) для біохімічних досліджень.

«Phagotest» (ORPEGEN Pharma, ФРН) для дослідження фагоцитарної активності та «Phagoburst» (ORPEGEN Pharma, ФРН) для дослідження оксидативного вибуху гранулоцитів та моноцитів.

FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit 1 (BD Pharmingen™, США) для виявлення апоптичних клітин у популяції.

Реактиви:

KH_2PO_4 (ч.д.а.), MgCl_2 (ч.д.а.), CaCl_2 (ч.д.а.), НАДФН (“Sigma”, США), L-аргінін (ч.д.а.), 2 N HClO_4 (ч.д.а.), 2 мкмоль EDTA, 0,1% водний розчин нафтилетилендіаміндігидрохлориду (“Sigma”, США) з 1% розчином сульфаніламіну (“Sigma”, США) в 5 % H_3PO_4 (ч.д.а.), NaNO_2 (х.ч.). Бруциновий реактив: бруцин (“Sigma”, США) у 50% сірчаної кислоти (х.ч.). NaNO_3 (х.ч.). трис- HCl (“Calbiochem”). 0,1 M розчин KJ (ч.д.а.), надлишок лактопероксидази (50 нМ) (“Sigma”, США) в 0,05M фосфатному буфері pH7,33. 1% розчин тіобарбітурової кислоти в 50 mM NaOH і 2,8% розчин трихлороцтової кислоти, ацетат цинку, 20mM розчин N,N-DPD та 30 mM FeCl_3 для визначення активних форм кисню та азоту, МДА, сечової кислоти та сірководню.

Для визначення каталітичної активності імуноглобулінів сироватки крові: гістон H1 тимусу теляти, основний протеїн мієліну мозку бика (Аххога,

Німеччина), альбумін сироватки бика (AppliChem GmbH, Німеччина), лізоцим яйця курки, цитохром С серця бика («Sigma-Aldrich», США), препарат сумісних гістонів тимусу теляти надано д.б.н., проф. Луциком М.Д. (Інститут біології клітини НАН України).

Використано такі сорбенти:

протеїн G-сефароза Fast Flow («Sigma-Aldrich», США); Bio-Sil SEC 250 («Bio-Rad», США), ціаноген бромід активована сефароза (CN-сефароза 4B) («Sigma-Aldrich», США), до якої згідно з протоколом виробника було іммобілізовано такі протеїни як гістон H1 та сумарні гістони тимусу теляти.

2.2 Об'єкт експериментальних досліджень

Експериментальні дослідження проводилися на 30 білих нелінійних щурах-самцях масою 160-220 г, які утримувалися в звичайних умовах віварію. Дослідження проводили у двох 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).

Моделі карагенінового запалення та колагенового артрити в щурів та мишей

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 [125].

Колагеновий артрит викликали однократним підшкірним введенням в подушечку правої задньої кінцівки щурів лінії Wistar 400 мкг колагену бика II типу в 15 mM оцтової кислоти з неповним ад'ювантом Фрейнда (Calbiochem-behring corp) [10].

Після розвитку гострого (карагеніновий набряк) та хронічного (колагеновий артрит) запальних процесів на 6 та 36 день відповідно тварин декапітували під анестезією.

Імунізацію мишей лінії BALB/c фракцією загальних гістонів із тимуса теляти проводили за раніше розробленою нами схемою, використовуючи

повний і неповний ад'ювант Фрейнда [130]. 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.

Оцінку запальних процесів проводили за експериментальними моделями, відповідно, гострого (карагеніновий набряк) і хронічного (колагеновий артрит) запалень.

Об'єктом досліджень були: цільна кров експериментальних тварин, імунізованих карагеніном та колагеном і група контрольних тварин; препарати імуноглобулінів, виділені з сироватки крові експериментальних тварин, імунізованих карагеніном та колагеном і групи контрольних тварин, периферична кров експериментальних тварин, імунізованих карагеніном та колагеном і групи контрольних тварин, виділена з цільної крові. Зразки крові тварин були отримані у Віварії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького. Зразки цільної крові хворі РА надали відповідно до Інформованої Згоди згідно з Договором про співпрацю із Львівською обласною клінічною лікарнею. Для дослідження також брали зразки крові осіб контрольної групи (здорових донорів). РА у пацієнтів діагностували на основі критеріїв Американської колегії ревматологів (ACR, 1987) і формували згідно з класифікацією, рекомендованою Асоціацією ревматологів України (2003). Усіх хворих обстежували на присутність РФ, анти-ССР та анти-МСУ.

Виконання досліджень із використанням біологічних зразків (головним чином, венозної крові), одержаних від донорів і пацієнтів клінічних установ, здійснювали за погодженням із Етичними комітетами Львівської обласної клінічної лікарні та Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького. Зразки крові у лабораторних тваринах відбиралися 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-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження», загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (2001р.). Усі зразки цільної крові досліджували у день забору крові (на протязі 24 год), а сироватки крові зберігалися при -20°C до початку досліджень.

2.3 Методи досліджень

2.3.1 Біохімічні методи

2.3.1.1 Визначення вмісту аланінамінотрансферази в сироватці крові щурів (КФ 2.6.1.2)

Визначення виконували згідно [131]. Обстеження проводили на автоматичному аналізаторі ChemWell2900. Для цього у лунки планшети внесли відповідно по 20 мкл контрольної сироватки «Elitrol 1» («ELIttech», Франція) та досліджуваної сироватки крові. У кожену лунку додали по 200 мкл робочого реактиву (Робочий реактив – реактив1: реактив2 = 5:1) реактив 1 (трис буфер рН 7,5 – 125ммоль/л, L-аланін – 680 ммоль/л, лактатдегідрогеназа; реактив 2 (α -кетоглутарат – 97 ммоль/л. НАД Н – 1,1 ммоль). Вміст лунок ретельно перемішали та інкубували 50 с при $t=37^{\circ}\text{C}$. Виміряли зміну оптичної густини тричі на протязі 175 с при довжині хвилі 340 нм і визначили концентрацію за формулою: активність ОД/л = $\Delta\text{ОГ}/\text{хв.} \times 1746$.

2.3.1.2 Визначення активності аспартатамінотрансферази в сироватці крові щурів (КФ 2.6.1.1)

Визначення виконували згідно [131]. Обстеження проводили на автоматичному аналізаторі ChemWell2900. Для цього у лунки планшети внесли відповідно по 20 мкл контрольної сироватки «Elitrol 1» («ELIttech», Франція) та досліджуваної сироватки крові. У кожену лунку додали по 200 мкл робочого

реагенту (Робочий реагент – реагент1: реагент2 = 5:1) реагент 1 (трис буфер рН 7,8 – 100ммоль/л, L-аспартат – 330 ммоль/л, лактатдегідрогеназа \geq 2000 Од/л, малатдегідрогеназа - \geq 1000 Од/л.; реагент 2 (α -кетоглутарат – 78 ммоль/л. НАД Н – 1,1 ммоль). Вміст лунок ретельно перемішали та інкубували 50 с при $t=37^{\circ}\text{C}$. Виміряли зміну оптичної густини тричі при довжині хвилі 340 нм на протязі 150 с і визначили концентрацію за формулою: активність Од/л = $\Delta\text{ОГ}/\text{хв.} \times 1746$.

2.3.1.3 Вимірювання лужної фосфатази в сироватці крові щурів (КФ 3.1.3.1)

Визначення виконували згідно [131]. Обстеження проводили на автоматичному аналізаторі ChemWell2900. Для цього у лунки планшети внесли відповідно по 5 мкл контрольної сироватки «Elitrol 1» («ELItech», Франція) та досліджуваної сироватки крові. У кожен лунку додали по 200 мкл робочого реагенту (Робочий реагент – реагент1: реагент2 = 5:1) реагент 1 (діетаноламін рН 10,2 – 1,4 моль/л, магнію хлорид – 0,625 ммоль/л; реагент 2 (р-нітрофенілфосфат – 50 ммоль/л). Вміст лунок ретельно перемішали та інкубували 50 с при $t=37^{\circ}\text{C}$. Виміряли зміну оптичної густини тричі при довжині хвилі 405 нм на протязі 75 с і визначили концентрацію за формулою: активність Од/л = $\Delta\text{ОГ}/\text{хв.} \times 2750$.

2.3.1.4 Визначення вмісту креатиніну в сироватці крові щурів

Визначення виконували згідно [131]. Обстеження проводили на автоматичному аналізаторі ChemWell2900. Для цього у лунки планшети внесли відповідно по 20 мкл стандарту (177 мкмоль/л), контрольної сироватки «Elitrol 1» («ELItech», Франція) та досліджуваної сироватки крові. У кожен лунку додали по 200 мкл робочого реагенту (Робочий реагент – реагент1: реагент2 = 1:1) реагент 1 (пiкринова кислота – 8,73 ммоль/л, реагент 2 (натрій гідроксид – 312,5 ммоль, динатрій фосфат – 12,5 ммоль/л). Вміст лунок ретельно перемішали при $t=37^{\circ}\text{C}$. Виміряли зміну оптичної густини при довжині хвилі

500 нм через 25 с та через 2 хв і визначили концентрацію за формулою: $C = \Delta O_{\Gamma} \text{ зразку} / \Delta O_{\Gamma} \text{ стандарту} \times n$ (C стандарту).

2.3.1.5 Визначення вмісту сечовини в сироватці крові щурів

Визначення виконували згідно [131]. Обстеження проводили на автоматичному аналізаторі ChemWell2900. Для цього у лунки планшети внесли відповідно по 3 мкл стандарту (8,33 мкмоль/л), контрольної сироватки «Elitrol 1» («ELItech», Франція) та досліджуваної сироватки крові. У кожену лунку додали по 300 мкл робочого реактиву (Робочий реактив – реактив1: реактив2 = 1:1) реактив 1 (трис-буфер – (рН 7,6) 125 ммоль/л, ADP – 1 ммоль/л, α -кетоглутарат – 9 ммоль/л, уреаза – ≥ 8100 U/л, глутаматдегідрогеназа ≥ 1350 U/л), реактив 2 (натрій дегідрогеназа – 1,5 ммоль/л). Вміст лунок ретельно перемішали при $t=37^{\circ}\text{C}$. Виміряли зміну оптичної густини при довжині хвилі 340 нм між 25 та 75 с і визначили концентрацію за формулою: $C = \Delta O_{\Gamma} \text{ зразку} / \Delta O_{\Gamma} \text{ стандарту} \times n$ (C стандарту).

2.3.1.6 Визначення вмісту сечової кислоти в сироватці крові щурів

Визначення виконували згідно [131]. Обстеження проводили на автоматичному аналізаторі ChemWell2900. Для цього у лунки планшети внесли відповідно по 5 мкл стандарту (357 мкмоль/л), контрольної сироватки «Elitrol 1» («ELItech», Франція) та досліджуваної сироватки крові. У кожену лунку додали по 200 мкл робочого реактиву (буфер фосфатний (рН 7,0) – 100 ммоль/л, EHSPT – 0,72 ммоль/л, фероціанід – 0,03 ммоль/л, аміно-4-антипирин – 0,37 ммоль/л, уріказа - ≥ 150 U/л, пероксидаза - ≥ 12000 U/л). Вміст лунок ретельно перемішали при $t=37^{\circ}\text{C}$. Виміряли оптичну густину при довжині хвилі 550 нм через 325 с і визначили концентрацію за формулою: $C = \Delta O_{\Gamma} \text{ зразку} / \Delta O_{\Gamma} \text{ стандарту} \times n$ (C стандарту).

2.3.2 Визначення концентрації протеїнових фракцій сироватки крові методом електрофорезу на папері

Електрофоретичний аналіз проводили згідно [132]. Для цього попередньо приготовлений хроматографічний папір, намочили в барбіталовому буферному розчині (рН 8,6), надлишки вологи видалили. Нанесли на папір сироватку крові (10 мкл), відступивши 5 мм від краю паперу. Проводився електрофорез на апараті ЕФ-1 (Україна). Розділення здійснювали за градієнта напруги 3-8 В/см та сили струму 0,1-0,3 мА/см. Стрічки паперу, після вимикання приладу, висушили на протязі 10 хв при 105°C у сушильній шафі. Фарбували впродовж 30 хв. у розчині бромфенолового синього та відмивали у розчині оцтової кислоти (20г/л). Забарвлені стрічки висушили за кімнатної температури. Вимірювання здійснювали на денситометрі після елюювання. Для цього дослідні стрічки та контрольний зразок розрізали на окремі смужки і поміщали у різні пробірки. У пробірки додали по 5 мл розчину натрій гідроксиду (0,3 ммоль/л) (у пробірку з фракцією альбуміну – 10 мл). Через 1 год фотометрували за довжини хвилі 500-560 нм у кюветі завтовшки 10мм на КФК-2МП (Росія). Знайшовши суму екстинцій окремих фракцій (екстинцію альбуміну подвоїли) і прийнявши її за 100%, обчислювали частку кожної фракції з урахуванням концентрації загального протеїну, що становить 100%.

2.3.3 Визначення фагоцитарної активності гранулоцитів та моноцитів у гепаринізованій крові у пацієнтів з РА та імунізованих тварин

Дослідження проводили за інструкцією виробника Phagotest (ФРН) та згідно [133]. Для цього, попередньо охолоджену на протязі 10 хв, цільну гепаринізовану кров (100 мкл на одну пробірку) змішували з 20 мкл бактеріями *Escherichia coli*, які є опсонізовані з антитілами і комплементом, збагаченої сироватки у двох пробірках. Гепаринізовану кров інкубували у водяній бані з ФІТС-міченими бактеріями *E.coli* при 37°C на протязі 10 хв, негативний контроль залишався на льоді. Фагоцитоз зупиняли додаванням на льоді 100 мкл нейтралізуючого розчину. Після двох етапів відмивки, еритроцити лізували на протязі 20 хвилин. Для виключення з аналізу артефактів додавали ДНК-мічений розчин (200 мкл). Дослідження проводили на проточному цитофлуориметрі

FACSCalibur (Becton Dickinson, США), використовуючи програмне забезпечення CellQuest Pro (Becton Dickinson, США).

2.3.4 Визначення циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові експериментальних тварин та пацієнтів з РА

Концентрацію ЦІК визначали за допомогою методу селективної преципітації у присутності поліетиленгліколю (ПЕГ) з подальшим визначенням концентрації протеїну в преципітаті за допомогою модифікованої методики [134]. Концентрацію протеїну в розчині визначали за методом Лоурі, використовуючи тест-системи фірми “СІМКО” (Україна). Визначення рівня ЦІК проводили за допомогою ФЕК-2МП (Росія).

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 ЦІК 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. Відібравши 0,6 мл досліджуваного зразка, додавали 3 мл 0,5% CuSO_4 і через 10 хв 0,3 мл розчину Фоліна-Чекальтеу. Надалі дослідний зразок колориметризували при 750нм.

Перерахунок концентрації ЦІК у досліджуваній сироватці відбувався за формулою: $[\text{ЦІК}] = \text{ОГ} \times 5 / 0,2$, де ОГ – оптична густина досліджуваної сироватки.

2.3.5 Дослідження оксидативних процесів у гранулоцитах та моноцитах гепаринізованої крові піддослідних щурів та пацієнтів з РА

Дослідження виконували з використанням набору Phagoburst (ФРН) за описаною методикою та згідно [133]. На одне дослідження використовували 4 пробірки. У охолоджену на протязі 10 хв, цільну гепаринізовану кров (100 мкл на одну пробірку) додавали: в першу пробірку забуферений фізіологічний розчин (негативний контроль); у другу - немічені опсонізовані бактерії

Escherichia coli; у третю – хемотаксичного пептиду N-formyl-MetLeuPhe (fMLP), в якості «низького» фізіологічного стимулу; у четверту – ліганд протеїнкінази C phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), в якості «сильного» стимулу. Досліджувані зразки інкубувалися на протязі 10 хв. при 37°C на водяній бані. До усіх пробірок додавали флюорогенний субстрат дигідрородаміну (DHR) 123, який після стимуляції гранулоцитів і моноцитів, які продукували АФО, перетворювався у родамін (R) 123. Зупинка реакції відбувалася шляхом лізування еритроцитів. Клітини відмивали двічі та для виключення з аналізу артефактів додавали охолоджений ДНК-мічений розчин. Дослідження проводили на проточному цитофлуориметрі FACSCalibur (Becton Dickinson, США), використовуючи програмне забезпечення CellQuest Pro (Becton Dickinson, США) для збору та аналізу даних.

2.4 Дослідження вмісту апоптичних клітин в крові піддослідних щурів та пацієнтів з ревматоїдним артритом

2.4.1 Дослідження фаз апоптозу у експериментальних тварин та у пацієнтів з ревматоїдним артритом

Виділення лімфоцитів із гепаринізованої крові (20–25 ОД гепарину на 1 мл крові) виконували за модифікованим методом А. Воум (1976), який заснований на седиментації клітин у градієнті густини фікол-урографіну ($\rho = 1,077$ г/мл) [135]. Для цього у центрифужну пластикову пробірку наливали 2 мл градієнта густини Ficoll Raque та нашаровували 4 мл відстояної, попередньо розведеної вдвічі у фізіологічному розчині, плазми і верхній шар еритроцитів. Пробірки центрифугували упродовж 30 хв з прискоренням 200 g за кімнатної температури. Інтерфазне кільце із лімфоцитів відбирали в суху конічну центрифужну пробірку. Отриману суспензію клітин двічі відмивали в холодному забуференому фізіологічному розчині (ЗФР) таким чином: до суспензії лімфоцитів додавали 4 мл ЗФР, вміст пробірки ретельно перемішували і центрифугували з прискоренням 200–300 g за кімнатної температури, потім рідину над осадом відбирали. Після відмивання клітини

ресуспендували в попередньо розведеному (1:10) зв'язуючому буфері з набору реактивів FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit 1 (BD Pharmingen™, США), підраховували їх кількість клітин у камері Горяєва та доводили їх кількість до 1×10^6 кл/мл. Відбирали 100 мкл суспензії клітин (1×10^5 кл) до пробірки. До суспензії додавали 5 мкл FITC анексину V і 5 мкл пропідій йодиду (PI). Змішували клітини та інкубували при кімнатній температурі у зв'язуючому буфері. В якості негативного контролю використали немічені клітини. Дослідження проводили на проточному цитофлуориметрі FACSCalibur (Becton Dickinson, США), використовуючи програмне забезпечення CellQuest Pro (Becton Dickinson, США) для збору та аналізу даних. Результати виражали у вигляді відсотку клітин, які приєднали FITC Annexin V чи PI. Клітини є живі, коли вони є FITC Annexin V і PI негативні, а коли FITC Annexin V позитивні – то знаходяться у стадії апоптозу.

2.4.2 Лектиновий тест периферійних лімфоцитів крові пацієнтів з РА

Виділення поліморфоядерних клітин периферичної крові здійснюють відповідно до загально прийнятих лабораторних методик із використанням диференційного центрифугування у градієнті фікол-верографіну [135], або середовища LymphoPrep (Gibco-BRL, США, згідно з інструкціями виробника) чи іншими методами. Аглотинацію клітин здійснюють наступним чином: до 20 мкл клітинної суспензії з 10^7 клітин/мл додавали 20 мкл розчину лектину (розведення від 1000 мкг/мл до 7,8 мкг/мл) у 96-лунковому імунологічному планшеті й інкубували протягом 30 хв при кімнатній температурі.

Для цього:

1. У ряд А аглютинаційного планшету вносили 40 мкл/лунку лектину в концентрації 1000 мкг/мл;
2. В ряди В-Н вносили 20 мкл/лунку фізіологічного забуференого фізіологічного розчину;
3. 20 мкл рідини з лунок А переносили у лунки В, двічі ресуспендували, після чого 20 мкл рідини з лунок В переносили у лунки С і т.д. до досягнення

лунок Н, з яких останні 20 мкл рідини виливали. Таким чином, забезпечувалася рівномірна концентрація лектину в усіх лунках;

4. В усі лунки ряду (А-Н) вносили по 20 мкл суспензії попередньо відмитих лімфоцитів периферичної крові в концентрації 20 млн клітин/мл;

5. Проводили інкубацію упродовж 30 – 60 хв при кімнатній температурі.

6. Оцінювали мінімальну концентрацію лектину в кожному ряді, яка ще здатна викликати помітну аглютинацію клітин.

2.4.3 Цитоденситометричне визначення апоптичних клітин (пре-G1-фаза) у крові піддослідних тварин та пацієнтів з РА за допомогою проточної цитометрії

При апоптозі відбувається прогресуюча деградація ДНК в клітині, частина ДНК виходить з клітини, з'являються клітини з меншим ніж нормальний вмістом ДНК – з'являється додатковий пік на цитофлуорограмі – пре-G1 пік. По кількості цих клітин визначали рівень апоптозу на проточному цитофлуориметрі FACSCalibur (Becton Dickinson, США) [136].

Суспензію клітин (1-2 млн. клітин/мл) промивали холодним фосфат забуференим фізіологічним розчином (PBS), а потім ресуспендували в 1 мл холодних еритроцитів. В центрифужній пробірці змішували 3 мл льодяного 70% етанолу та 1 мл суспензії еритроцитів для їх швидкої дисперсії, потім інкубували суміш 45 хвилин. При необхідності застосували інкубацію протягом 12 годин. Клітини осаджували і обережно відбирали супернатант, ресуспендуючи його в розчині пропідій йодиду та РНКазі до концентрації $0,5 \cdot 10^6$ клітин/мл. Інкубували суспензію при 37° С протягом 30 хвилин. Аналіз зразків проводився у FCS Express Software, версія 3.

2.5 Визначення активних форм кисню та нітрогену в плазмі крові піддослідних тварин

2.5.1 Визначення активності ензимів *de novo* NO-синтази в плазмі крові експериментальних тварин

Активність ферменту визначали на підставі особливостей функціонування різних ізоформ [137]. Конститутивні ізоформи NO-синтази (нейрональна та ендотеліальна) регульовані Ca^{2+} /кальмодуліном, тому видалення Ca^{2+} з інкубаційної системи забезпечує визначення активності індукційної ізоформи ферменту (яка є Ca^{2+} -незалежною). Методика пристосована до спектрофотометричного вимірювання одного з продуктів реакції – L-цитруліну. З цією метою у 10 разів збільшили об'єм субстратної суміші і визначення активності ензиму проводили з мінімальною кількістю кофакторів для наближення активності NO-синтаз, що визначалися, до існуючого (базального) рівня активності в плазмі. L-аргінін добавляли з надлишком, враховуючи його можливу утилізацію в аргіназній реакції.

А) Визначення активності сумарної NO-синтази (cNOS+iNOS). Аліквоти проб, що містили 300 мкл плазми крові щурів інкубували з 1,5 мл субстратної суміші (загальний об'єм 1,8 мл) наступного складу (мкмоль/мл): KH_2PO_4 (ч.д.а.) – 50, MgCl_2 (ч.д.а.) – 1, CaCl_2 (ч.д.а.) – 2, НАДФН (“Sigma”, США) -1, L-аргінін (ч.д.а.) -2, рН 7,0 протягом 60 хв при 37°C. Реакцію зупиняли, додаючи 0,3 мл 2 N H_3PO_4 (ч.д.а.) Контролем були проби, що містили повну субстратну суміш і 0,3 мл дистильованої води. Суміш центрифугували при 3500об./хв протягом 10 хв і в надосадковій рідині визначали вміст NO_2^- високоспецифічним спектрофотометричним методом за кольоровою реакцією з реактивом Гріса. Результат розраховували за калібрувальним графіком, який робили відповідно до складу та об'єму субстратної суміші для NOS, з використанням стандартних розчинів нітриту натрію.

Б) Визначення активності iNOS. Методика визначення аналогічна попередній за деякими відмінностями: для визначення активності Ca^{2+} -незалежної NOS в інкубаційну суміш замість CaCl_2 добавляли 2 мкмоль ЕДТА.

В) Розрахунок активності cNOS. Сумарну активність cNOS (eNOS+nNOS) вираховували, віднімаючи від сумарної активності NOS активність iNOS.

Активність ензимів виражали в пікомолях новоутвореного L-цитруліну за 1 хв в розрахунку на 1 мг загального протеїну в пробі.

2.5.2 Визначення вмісту NO_2^- у плазмі крові щурів

Кількість нітрит-аніону (NO_2^-) визначали в безпротеїнових аліквотах плазми крові в колориметричній реакції за допомогою реактиву Гріса методом Гріна [139]. Реактив Гріса готували, змішуючи рівні частини 0,1% водного розчину нафтилетилендіаміндігідрохлориду (“Sigma”, США) з 1% розчином сульфаніламіну (“Sigma”, США) в 5 % H_3PO_4 (ч.д.а.) безпосередньо перед визначенням. Кількість NO_2^- визначали за допомогою калібрувальної кривої, побудованої з використанням NaNO_2 (х.ч.).

2.5.3 Визначення вмісту NO_3^- у плазмі крові щурів

Кількість нітрат-аніону (NO_3^-) визначали бруциновим методом в безпротеїнових аліквотах проб спектрофотометричним методом [140]. Аліквоти проб плазми крові інкубували при 100°C протягом 10 хв після чого охолоджували і визначали величину екстинції при 405 нм. Бруциновий реактив готували шляхом розчинення 60 мг бруцину (“Sigma”, США) у 100 мл 50 % сульфатної кислоти (х.ч.). Кількість NO_3^- визначали за допомогою калібрувальної кривої, побудованої з використанням NaNO_3 (х.ч.).

2.5.4 Визначення активності аргінази (КФ 3.5.3.1) у плазмі крові піддослідних щурів

Базальну аргіназну активність визначали методом [141] за утворенням сечовини в інкубаційній суміші (1 мл), що містила L-аргінін і аліквоти проб в трис- HCl (“Calbiochem”) буфері ($\text{pH}=8,0$). Інкубацію проводили при 37°C протягом 60 хв., реакцію зупиняли, додаючи 0,3 мл 2N HClO_4 . Осад видаляли центрифугуванням і в надосадовій визначали вміст сечовини, що утворилася.

2.5.5 Визначення вмісту H_2O_2 у плазмі крові щурів

Безпротеїнові аліквоти плазми крові (100-250 мкг протеїну) додавали в кварцеву кювету (1 см), що містила 2 мл 0,1 М розчину KJ (ч.д.а.), надлишку лактопероксидази (50 нМ) ("Sigma", США) в 0,05М фосфатному буфері рН = 7,33. Фіксували швидкі зміни екстинції проб при 353нм. Кількість H_2O_2 виражали в пмоль на мг протеїну проби, використовуючи коефіцієнт молярної екстинції $\epsilon = 26000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [142].

2.5.6 Визначення вмісту тіобарбітурової кислоти (ТБК-позитивних продуктів) у плазмі крові щурів

До аліквот проб додавали 0,5 мл 1% розчину тіобарбітурової кислоти в 50 мМ NaOH і 0,5 мл 2,8% розчину трихлоретанової кислоти. Отриману суміш витримували 20 хв на киплячій водяній бані, охолоджували і визначали величину екстинції при 532 нм [142].

2.5.7 Визначення швидкостей генерації $\text{O}_2^{\cdot-}$ та OH-радикалу в плазмі крові щурів

Швидкість генерації $\text{O}_2^{\cdot-}$ визначали по окисненню цитохрому С, фіксуючи зміни екстинції при 550 нм [143].

Визначення рівнів генерації OH-радикалу проводили в інкубаційній суміші за приростом малонового діальдегіду, який визначали за зміною поглинання при довжині хвилі 532нм і виражали в умовних одиницях поглинання за 1 год на 1 мг протеїну [144]. До аліквот проб додавали 0,5 мл 1% розчину тіобарбітурової кислоти в 50 мМ NaOH і 0,5 мл 2,8% розчину трихлоретанової кислоти. Отриману суміш витримували 20 хв на киплячій водяній бані, охолоджували і визначали величину екстинції при 532 нм [142].

2.5.8 Визначення вмісту сірководню у плазмі крові щурів

До аліквот проб додавали 0,5 мл 1% розчину цинку ацетату, інкубували при температурі 37,5°C протягом 10 хв, далі додавали 0,5 мл 20мМ розчин N,N-

діетил-Р-фениленедіаміну та 0,5 мл 30 мМ FeCl₃. Після 10 хв інкубації в темноті на холоді визначали оптичну густина при 670 нм [145].

2.6 Дослідження протеолітичної активності препаратів імуноглобулінів у експериментальних тварин та у пацієнтів з ревматоїдним артритом

2.6.1 Очистка препаратів IgG із сироватки крові

Імуноглобулін G виділяли із сироватки крові за описаною методикою [146]. Для цього 0,5 мл сироватки крові осаджували 50 % насиченням сульфату амонію, одержаний осад відділяли центрифугуванням при 12000 об/хв протягом 10 хв. Осад розчиняли в 250-ти мкл деіонізованої води. Осадження повторювали два рази. В подальшому АТ діалізували проти трис-сольового розчину (20 мМ Трис-НСl, 150 мМ NaCl, рН 7,5). Після 18-ти годин діалізу препарати АТ очищали методом афінної хроматографії на колонці, наповненій протеїну G-сефарозою (об'ємом 1 мл). Перед нанесенням препаратів сумарних АТ колонку стабілізували трис-сольовим буфером, рН 7,5. Неспецифічно зв'язані з афінним сорбентом АТ відмивали цим же буфером. IgG елюювали з колонки 1 мл 0,1 М гліцин-НСl, рН 2,6 і нейтралізували 1,5 М Трис-НСl, рН 8,8, після чого АТ діалізували у 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5 протягом 18 год. Концентрацію протеїну в зразках вимірювали за допомогою спектрофотометра NanoDrop ND-1000 («NanoDrop», США). Однорідність фракцій IgG аналізували електрофорезом у 12 % ПААГ у присутності 0,1 % Ds-Na (додецилсульфат натрію) (Lemmlу, 1970). Отримані препарати IgG перевіряли на здатність гідролізувати протеїнові антигени.

2.6.2 Електрофорез протеїнів у поліакриламідному гелі

Електрофорез протеїнів проводили у вертикальному 12-15 % ПААГ (поліакриламідному гелі) за присутності Ds-Na у трис-гліциновому буфері рН 8,3 (25 мМ Трис, 192 мМ гліцин, 0,1 % Ds-Na) у режимі 100 В протягом 2-2,5 год, використовуючи камеру для електрофорезу Mini-PROTEAN Tetra Cell

(«Bio-Rad», США). Для проведення електрофоретичного розділення препарати протеїнів прогрівали впродовж 3 хвилин при температурі + 95°C у буферній системі Леммлі (62,5 мМ Трис-НСl рН 6,8, 10 % гліцерол, 5 % β -меркаптоетанол, 2 % DS-Na). Для визначення молекулярної маси протеїнів на електрофореграмах використовували протеїнові стандарти фірми «Fermentas». Отримані гелі зафарбовали розчином Кумасі R-250 та/або використовували для подальшого Вестерн-блотингу.

2.6.3 Аналіз протеолітичної активності АТ

Аналіз протеолітичної активності препаратів IgG проводили як описано [147]. Субстратами протеолітичної реакції слугували комерційні препарати ОПМ мозку бика (Sigma, США) та гістону Н1 тимусу теляти (Аххога, Німеччина). Реакцію гідролізу проводили протягом 3 год при 37°C в 20 мкл інкубаційного середовища, яке містило 20 мМ Tris-НСl, рН 7,5, 1-3 мкг антитіл, 5-10 мкг протеїну. Реакцію зупиняли додаванням 5 мкл денатуруючого буферу (0,2 М Tris-НСl, рН 6,8, 4 % Ds-Na, 8% 2-меркаптоетанолу, 20% гліцеролу). Реакційну суміш нагрівали при 100°C протягом 3 хв і продукти гідролізу розділяли електрофорезом у 12% ПААГ за присутності 0,1 % Ds-Na. Протеїни на гелі фарбували розчином Кумасі-R-250. Гелі сканували і піддавали кількісному аналізу із використанням програми Gel-Pro.

2.7 Статистична обробка результатів

Результати дослідження обробляли із застосуванням персонального комп'ютера за допомогою статистичного пакету прикладних програм Statistica 6.0 for Windows. Обчислення основних статистичних показників проводили за безпосередніми кількісними даними, отриманими внаслідок досліджень (середнє арифметичне значення – M ; стандартна похибка середнього арифметичного – m). 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). Побудову графіків та

статистичну обробку даних здійснювали за допомогою комп'ютерних програм Origin 4.0 та Microsoft Excel (Microsoft Office, 2007). Вірогідними вважали відмінності, в яких імовірність статистичної похибки – $P < 0,05$. Обрахунок кінетичних параметрів протеолітичної реакції виконували за допомогою програми Enzyme Kinetics для SigmaPlot 9.0. Денситометричний аналіз електрофореграм здійснювали за допомогою програми GelPro Analyzer 4.0.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Морфологічні зміни в кінцівках щура за умов гострого (карагенінового) і хронічного (колагенового) запалення

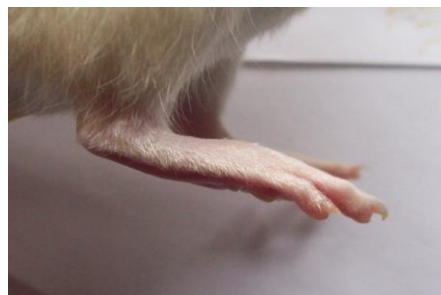
Гострий запальний процес, викликаний введенням карагеніну, як видно з рис. 3.1, призвів до розвитку місцевої запальної реакції, яка супроводжувалась незначним збільшенням об'єму задніх кінцівок, припухлістю та обмеженням руху в кінцівках.

Хронічний запальний процес, викликаний введенням колагену (див.рис. 3.1), призвів до розвитку запального процесу з посиленням некротичних явищ. Після закінчення латентного періоду (через 14 діб) у тварин розвинувся поліартрит задніх і передніх кінцівок – генералізований артрит, а саме, повторне посилення ексудації, гіперемія, порушення та обмеження рухливості кінцівок, зниження мязевого тонусу, зменшення апетиту та втрата ваги.

Контроль



Карагеніновий артрит



Колагеновий артрит



Рис. 3.1 Морфологічні зміни задньої кінцівки щура при різних станах запального артрити та у контролі

При мікро-магнітно-ядерному дослідженні колінного суглоба у щура при колагеновому артриті спостерігалися суглобові порушення остеогенезу з ерозіями, звуження суглобової щілини, втрата суглобового хряща (рис. 3.2). Деструктивні зміни в сухожиллях, зв'язках і капсулах суглобів призвели до деформації суглоба, в результаті чого спостерігалось обмеження мінімального діапазону руху.

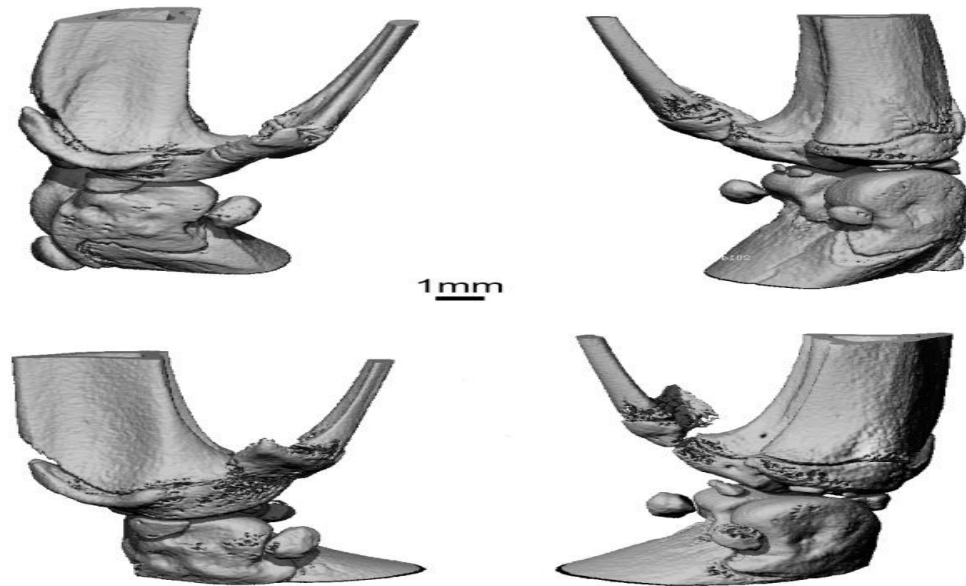


Рис. 3.2 Результат мікро-МРТ сканування колінного суглоба задньої кінцівки щура у здорової тварини (зверху) та при колагеновому артриті (знизу)

3.2 Характеристика біохімічних показників сироватки крові при експериментальному запаленні та у пацієнтів з ревматоїдним артритом

3.2.1 Зміна біохімічних показників сироватки крові щурів за умов гострого та хронічного запалення

Ензиматична активність в плазмі крові є важливим показником функціонального стану життєво важливих органів та інтенсивності перебігу процесів обміну речовин в організмі. Роль печінки в протеїновому обміні цілісного організму полягає в синтезі більшості протеїнів плазми крові, які виконують важливі біохімічні та фізіологічні функції регуляції розподілу

амінокислот між окремими органами і тканинами. Серед цих протеїнів є ензими та низка імунних протеїнів.

Тому, метою дослідження було визначення біохімічних показників сироватки крові в експериментальних тварин за умов індукованих карагенінового та колагенового артритів.

Лужна фосфатаза – гетерогенний ензим, що включає окремі ізоферменти, кожен з яких зосереджений у певному органі: печінці, кістковій тканині, кишках та плаценті.

У результаті наших досліджень встановлено достовірне ($P < 0,05$) зростання активності лужної фосфатази в сироватці крові у 2,5 рази при карагеніновому запаленні і у 2 рази при колагеновому артриті (таблиця 3.1). Однак, активність лужної фосфатази при карагеніновому запаленні була достовірно вищою, ніж при колагеновому ($P < 0,05$) [148].

Амінотрансферази є складними ензимами, які каталізують процеси трансамінування, забезпечуючи синтез окремих амінокислот в організмі. У результаті наших досліджень було встановлене достовірне збільшення ($P < 0,05$) активності аланінамінотрансферази у 1,4 рази лише в щурів на моделі хронічного запального процесу порівняно з показниками гострого запалення та контрольними значеннями.

Таблиця 3.1

Біохімічні показники індикаторних ензимів функціонального стану печінки у сироватці крові щурів із колагеновим та карагеніновим запаленням

($M \pm m, n=10$)

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* ^o	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,

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

Аспартатамінтрансфераза (АсАТ), на відміну від АлАТ, присутня в багатьох тканинах (міокарді, печінці, скелетних м'язах, нирках тощо) і відноситься до менш характерних показників функції печінки. На рівні гепатоцитів ізоферменти АсАТ знаходяться як в цитозолі, так і мітохондріях.

У результаті проведених досліджень, які відображені на рисунку 3.3, встановлено достовірне зростання ($P < 0,05$) активності АсАТ в сироватці крові щурів дослідних груп порівняно з інтактними щурами.

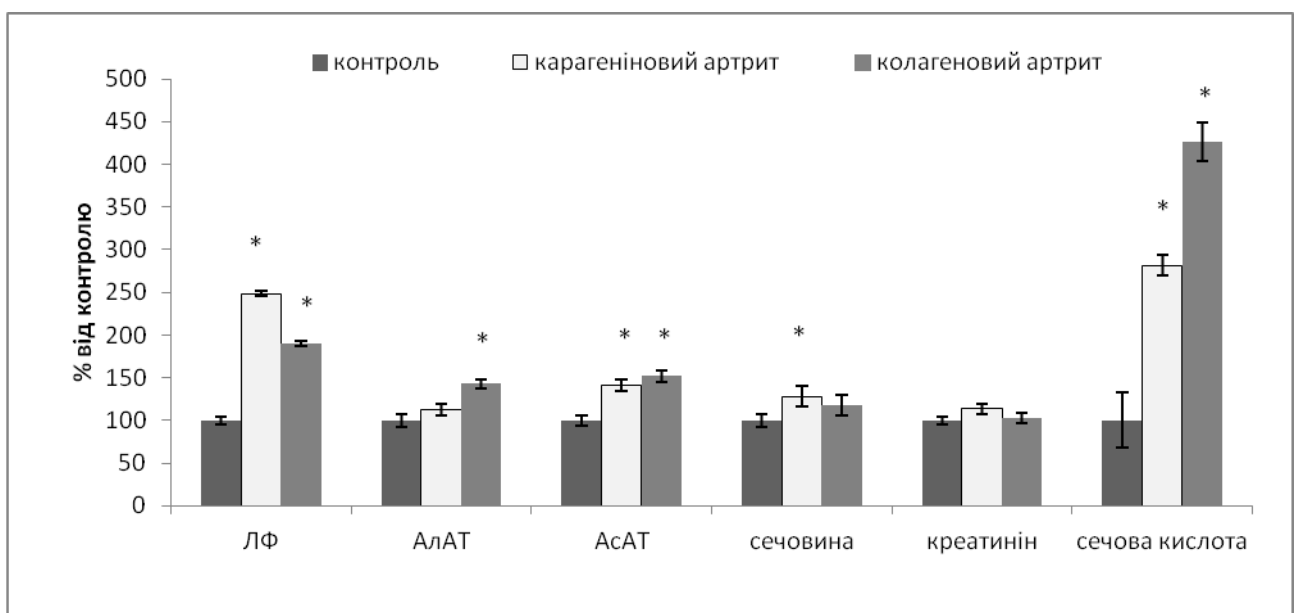


Рис. 3.3 Діаграма розподілу біохімічних показників сироватки крові щурів при експериментальному колаген- та карагенін-індукованому артриті. По осі ординат – значення концентрацій речовин

Так, АсАТ відповідно зростає у 1,4 рази при карагеніновому та у 1,5 рази при колагеновому артриті порівняно з контролем. Окрім цього, при колагеновому артриті активність АсАТ була майже на 8,0% вищою порівняно з щурами з карагеніновим запаленням, що може свідчити про можливе залучення в патологічний процес м'язової тканини при розвитку хронічного запального процесу. На моделі формування хронічного запального процесу показано

достовірне збільшення як АсАТ, так і АлАТ, що може вказувати на додаткове залучення в патологічний процес печінки із зміною її функціональної здатності.

Судячи з даних таблиці 3.2, рівень креатиніну, який є важливим компонентом залишкового азоту і необхідний для функціонування біоенергетичних молекулярних систем в організмі, не змінюється в дослідних групах, порівняно з контрольною ($P > 0,05$).

Таблиця 3.2

Біохімічні показники функціонального стану нирок у сироватці крові щурів із колагеновим та карагеніновим запаленням ($M \pm m$, $n=10$)

Група	Сечовина мм/л	Креатинін мкМ/л	Сечова кислота мкМ/л
Контроль	6,7±0,52	62,8±2,91	30,18±9,8
Карагеніновий артрит	8,6±1,01*	71,2±4,52	85,01±10,55*
Колагеновий артрит	7,9±0,98	64,3±3,71	128,68±28,55*°

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

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

Рівень сечовини (кінцевий продукт знешкодження аміаку), який утворюється в печінці, був у 1,3 рази вищий при карагеніновому артриті порівняно з колагеновим артритом та контрольною групою, що говорить про незначне порушення видільної функції нирок. Що стосується сечової кислоти, яка є кінцевим продуктом розпаду пуринових нуклеотидів, то при гострому запальному процесі, як і при хронічному спостерігалось достовірне ($P < 0,05$) зростання концентрації сечової кислоти у 2,8 рази за карагені нового запалення і у 4 рази за колагенового артрити, порівняно з контрольною групою тварин.

Зростання рівня амінотрансфераз у сироватці крові відображає патологічні зміни та пошкодження клітин печінки. Збільшення концентрації сечовини і сечової кислоти, які є проміжними продуктами протеїнового обміну,

а також і низькомолекулярними антиоксидантами, інактивує вільні радикали кисню.

Підсумок. Встановлено, що за гострого та хронічного запалення кінцівок у щурів спостерігається зростання рівня біохімічних маркерів запалення, яке відображає порушення метаболізму, які відбуваються загалом в організмі, а не лише в окремо взятому органі. Ці зміни більше виражені при колаген-індукованому артриті в щурів - аналогу ревматоїдного артриту в людини.

3.2.2 Кількісний та якісний склад протеїнів сироватки крові за умов гострого та хронічного запальних процесів у експериментальних тварин

Зміна концентрації протеїнів у біологічних рідинах відображає як загальний стан організму, так і характер запального процесу. Даний метод дослідження протеїнового складу використовується давно і достовірно відображає зміни у розподілі фракцій альбумінів та глобулінів, які є характерними для різних стадій запального процесу.

Тому, метою дослідження даного розділу було визначення складу протеїнових фракцій про колаген- та карагенін-індукованому артриті в експериментальних тварин та людини.

На створених тваринних моделях ми провели вивчення протеїнового складу крові щурів, дані яких подані в таблицях 3.3 та 3.4

Таблиця 3.3

Протеїновий склад сироватки крові щурів із колагеновим та карагеніновим запаленням ($M \pm m$)

	Заг протеїн, 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

Як видно з поданих даних таблиці 3.3, концентрація загального протеїну в сироватці крові щурів двох дослідних груп достовірно ($P > 0,05$) не відрізнялася від відповідних показників щурів контрольної групи. Що стосується розподілу протеїнових фракцій на альбуміни і глобуліни, то не спостерігалось достовірного ($P > 0,05$) зниження вмісту альбумінів, що свідчить про незначні порушення функціонального стану печінки.

У таблиці 3.4 відображено достовірні зміни ($P < 0,05$) глобулінової фракції у крові щурів двох дослідних моделей порівняно з контролем.

Таблиця 3.4

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

	$\alpha 1$ - глобуліни, %	$\alpha 2$ - глобуліни, %	β - глобуліни, %	γ - 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,

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

У щурів з карагеніновим артритом концентрація $\alpha 1$ -глобулінів достовірно ($P < 0,05$) підвищувалася у 1,5 рази порівняно з контрольною групою щурів та з колагеновим артритом (рис. 3.4).

До $\alpha 2$ -глобулінів належать гаптоглобін, $\alpha 2$ -макроглобулін, церулоплазмін. Відомо, що концентрація $\alpha 2$ -глобулінів є сигналом загострення хронічного захворювання, що співпадає з даними нашого дослідження. Так, при

гострому карагеніновому запаленні вміст $\alpha 2$ -глобулінів вірогідно збільшувався на 20%, а при хронічному колагеновому – на 28% ($P < 0,05$).

До складу β -глобулінів входять трансферин, гемопексин, $\beta 2$ -мікроглобулін, ліпопротеїди низької щільності, компоненти системи комплементу (C2-C9). Концентрація цієї фракції глобулінів у щурів двох дослідних груп достовірно ($P > 0,05$) не відрізнялася від показників інтактної групи щурів.

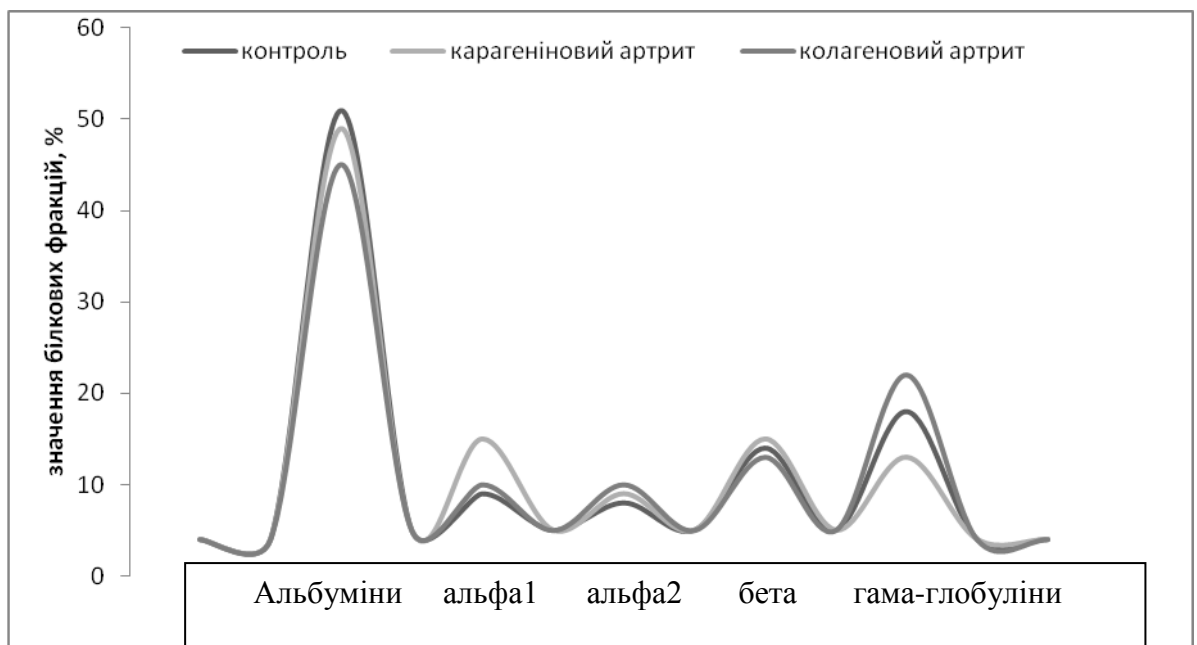


Рис. 3.4 Денситометрія електрофореграми протейнів сироватки крові експериментальних тварин

Гама-глобулінова фракція містить основну масу антитіл (імуноглобулінів), що забезпечують гуморальний захист організму. Ми спостерігали достовірне підвищення ($P < 0,05$) вмісту гама-глобулінів на 27% на моделі колагенового артрититу, що вказує на хронічний запальний процес, а на моделі з карагеніновим артритом спостерігалось статистично достовірне зниження ($P < 0,05$) на 26% цієї фракції порівняно з контролем, що характерно для гострого запального процесу.

Підсумок. На основі отриманих результатів можна зробити висновок, що при гострому запаленні, викликаному введенням карагеніну в кінцівку, спостерігалася гіперпродукція α_1 та α_2 -глобулінів, процеси запального характеру були більш вираженими, ніж при хронічному колагеновому артриті. При хронічному запальному процесі збільшення гама-глобулінової фракції вказувала на можливе залучення в патологічний процес гуморальної ланки імунної системи з ймовірною гіперпродукцією аутоантитіл.

3.2.3 Кількісний і якісний склад протеїнів сироватки крові у хворих на ревматоїдний артрит

Для досліджень складу протеїнових фракцій у пацієнтів з РА використовували сироватку крові. У дослідженні брали участь 60 пацієнтів і 15 здорових донорів. Серед пацієнтів були 43 (71,7%) жінки та 17 (28,3%) чоловіків. При аналізі розподілу протеїнових фракцій у пацієнтів з РА не спостерігалася статистично достовірних відмінностей (див. табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Протеїновий склад сироватки крові пацієнтів з ревматоїдним артритом

($M \pm m$)

	Загальний протеїн, г/л	Альбуміни, %	Глобуліни, %
контроль (n=15)	69,2±1,65	58,0±2,45	42,0±0,67
загострення РА (n=30)	72,4±2,07	51,7±2,09	48,3±1,12
ремісія РА (n=30)	70,5±1,89	52,7±2,19	47,3±1,05

Зміни рівня загального протеїну як на стадії загострення захворювання, так і на стадії ремісії РА виявилися статистично ($P > 0,05$) недостовірними порівняно з контролем.

Визначення вмісту глобулінів у сироватці крові пацієнтів з РА, яке відображено у таблиці 3.6, виявило достовірне зростання відносної кількості α 1-глобулінів у 1,5 рази при загостренні РА і у 1,39 рази на стадії ремісії захворювання порівняно з контрольною групою. Що стосується кількості α 2-глобулінів, спостерігалось статистично достовірне зростання ($P < 0,05$) на 54% та 50% при загостренні РА і при хронічному перебігу, відповідно при порівнянні з контрольною групою. Рівень β -глобулінів при загостренні РА був недостовірно ($P > 0,05$) нижчий. При хронічній стадії РА, спостерігалось статистично достовірне ($P < 0,05$) зниження концентрації фракції β -глобулінів на 25%, порівняно з контрольною групою здорових донорів. Вміст фракції γ -глобулінів при загостренні РА був на 28% достовірно вищим, і при ремісії захворювання - на 35%, порівняно з групою контролю.

Таблиця 3.6

Глобуліни сироватки крові пацієнтів з ревматоїдним артритом ($M \pm m$)

	α 1- глобуліни %	α 2- глобуліни %	β - глобуліни %	γ - глобуліни %
Контроль (n=15)	5,1 \pm 0,12	8,0 \pm 0,22	13,4 \pm 0,45	15,5 \pm 0,59
Загострення РА (n=30)	7,7 \pm 0,39*	12,3 \pm 0,48*	11,0 \pm 0,31	17,3 \pm 0,78
Ремісія РА (n=30)	7,1 \pm 0,27	12,0 \pm 0,38*	10,0 \pm 0,27*	18,2 \pm 0,87*

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

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

Підсумок. Було виявлено, що при загостренні РА спостерігається незначне зниження фракції альбумінів та зростання глобулінової фракції за рахунок α 1-та α 2-глобулінів, що свідчить про наявність гострого запального процесу. У стані ремісії захворювання РА спостерігається незначне зниження

фракції альбумінів та зростання глобулінової фракції за рахунок α_2 - та γ -глобулінів, що підтверджує розвиток хронічного запального процесу.

Тому, наступним етапом даної роботи було вивчення активності імунокомпетентних клітин при різних стадіях запального процесу в експериментальних тварин.

3.3 Фагоцитарна активність нейтрофілів та моноцитів у крові експериментальних тварин та пацієнтів з ревматоїдним артритом

3.3.1 Фагоцитарна здатність нейтрофілів і моноцитів та рівень циркулюючих імунних комплексів у крові експериментальних тварин

Нейтрофіли відносяться до імунокомпетентних клітин, які присутні в суглобах пацієнтів із РА та вивільняють прозапальні чинники, що залучені в процес пошкодження тканини кістки та хряща [106]. Мігруючи у синовіальну рідину, нейтрофіли фагоцитують імунні комплекси та виділяють реакційно активні форми кисню.

Утворення імунних комплексів за участю імуноглобулінів класів М та G, антигенами та компонентами комплементу є стимулом для хемотаксису лейкоцитів (рис. 3.5).

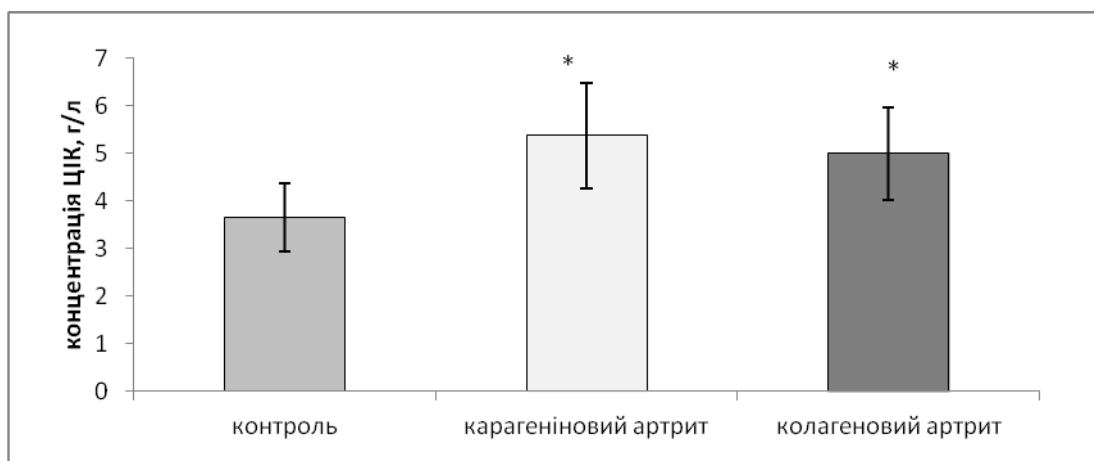


Рис. 3.5 Рівень циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові експериментальних тварин

Було встановлено статистично достовірне ($P < 0,05$) зростання концентрації циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) у сироватці крові експериментальних тварин. Так, при карагеніновому запаленні спостерігалось зростання рівня ЦІК у 1,47 рази, а при колагеновому в 1,37 рази порівняно з контрольною групою тварин.

Утворення імунних комплексів у тканинах суглоба призводить до подальшого антитілоутворення та хронізації запального процесу. Фагоцитоз надлишкових ЦІК викликає і посилює запалення не лише у синовіальній оболонці і суглобі, а також спостерігається їх відкладання у різних органах (нирки, шкіра, судинна стінка тощо), що призводить до запальних процесів в уражених органах.

Нейтрофіли є першою лінією захисту імунної системи при гострому запальному процесі, який виникає при РА. Неактивовані нейтрофіли периферичної крові відносяться до короткоживучих і швидко підлягають апоптозу. Натомість активовані нейтрофіли в тканинах зазнають молекулярних змін, які збільшують тривалість їхнього життя і змінюють їх властивості, що дозволяє їм здійснювати різні функції (рисунки 3.6-3.8).

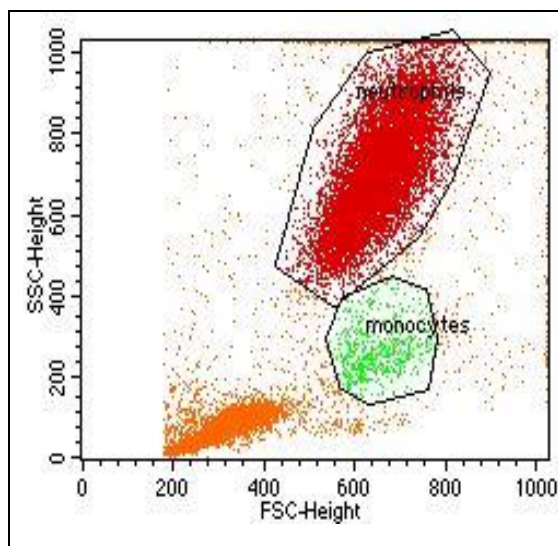


Рис. 3.6 Результати проточної цитофлуориметрії. Dot plot - ідентифікація популяції нейтрофілів та моноцитів цільної крові на двох каналах світлорозсіювання – FSC (Forward Scatter Channel - вісь абсцис, відн. од) та SSC (Side Scatter Channel – вісь ординат, відн. од) (розмір та гранулярність клітин).

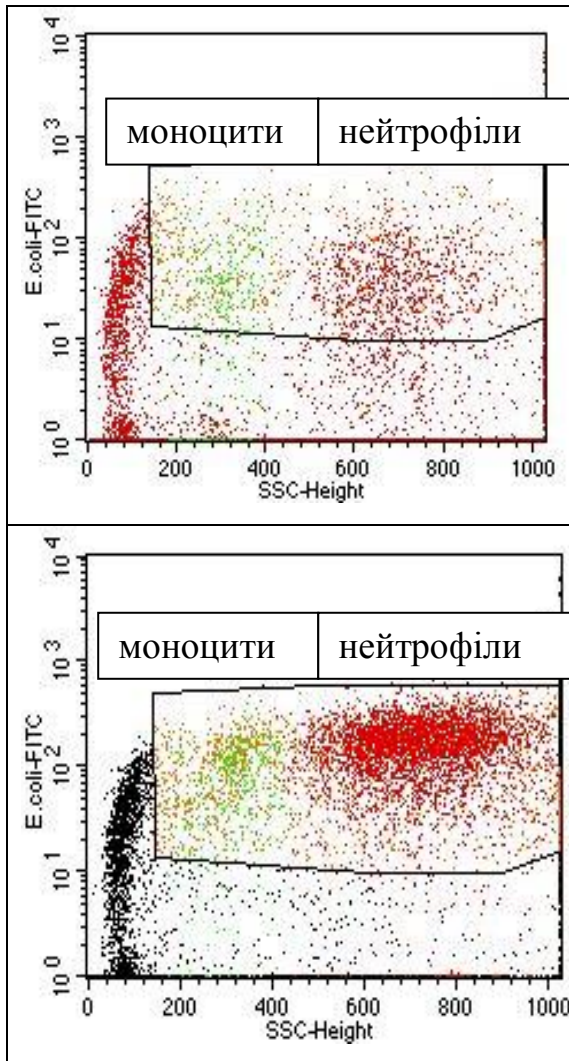


Рис. 3.7 Результати проточної цитофлуориметрії. Dot plot – ідентифікація популяції клітин нейтрофілів та моноцитів без стимуляції на двох каналах світлорозсіювання – (*E.coli* – вісь ординат, інтенсивність, відн.од) та SSC (вісь абсцис, відн. од, гранулярність клітин)

Рис. 3.8 Результати проточної цитофлуориметрії. Dot plot – ідентифікація популяції клітин нейтрофілів та моноцитів за дії *E.coli* – на двох каналах світлорозсіювання – (*E.coli* – вісь ординат, інтенсивність, відн.од) та SSC (вісь абсцис, відн. од, гранулярність клітин)

Встановлено достовірне ($P < 0,05$) зростання спонтанної фагоцитарної здатності нейтрофілів при карагеніновому артриті у 1,8 рази та при колагеновому артриті в 1,4 рази порівняно з контрольними значеннями, які відображені у таблиці 3.7 [149].

Що стосується показників стимульованого *E. coli* фагоцитозу нейтрофілів (який відображає фізіологічну здатність організму (рисунок 3.9)), то спостерігалось достовірне ($P < 0,05$) зниження поглинання як при карагеніновому у 1,6 рази, так і при колагеновому артриті у 1,4 рази, порівняно з щурами контрольної групи [150]. Зниження фагоцитарної здатності нейтрофілів може сприяти зниженню кліренсу імунних комплексів [151].

Таблиця 3.7

Фагоцитарна активність нейтрофілів крові щурів із колагеновим та карагеніновим артритом ($M \pm m$)

	Фагоцитоз нейтрофілів	
	Спонтанний, %	Стимульований, %
Контроль (n=10)	9,2±1.02	96,4±3.17
Карагеніновий артрит (n=10)	16,9±2.21*	60,1±2.13*
Колагеновий артрит (n=10)	12,9±2.11*	69,9±2.88*

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

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

Моноцити і макрофаги з'являються у синовіальній оболонці при запаленні на ранніх стадіях хвороби.

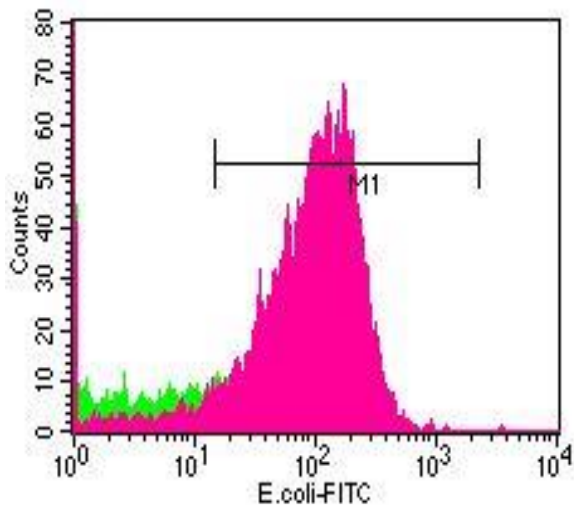


Рис. 3.9. Результати проточної цитофлуориметрії інтактних нейтрофілів при спонтанній (зелена лінія) та стимульованій *E. coli* (рожева лінія) за інтенсивністю флюоресценції на каналі FL1 (вісь ординат – число клітин, вісь абсцис – інтенсивність, відн. од). Маркер M1 відображає інтенсивність стимуляції.

Під впливом різноманітних стимулів, вони активуються LPS, пептидоглікани та флагеліни через зв'язування із TLRs на поверхні макрофагів, які розпізнають мікробні компоненти. Після активації клітини проявляють більшу фагоцитарну активність, підвищену здатність до клінінгу захоплених мікроорганізмів і секреції медіаторів запалення (рисунки 3.10 та 3.11).

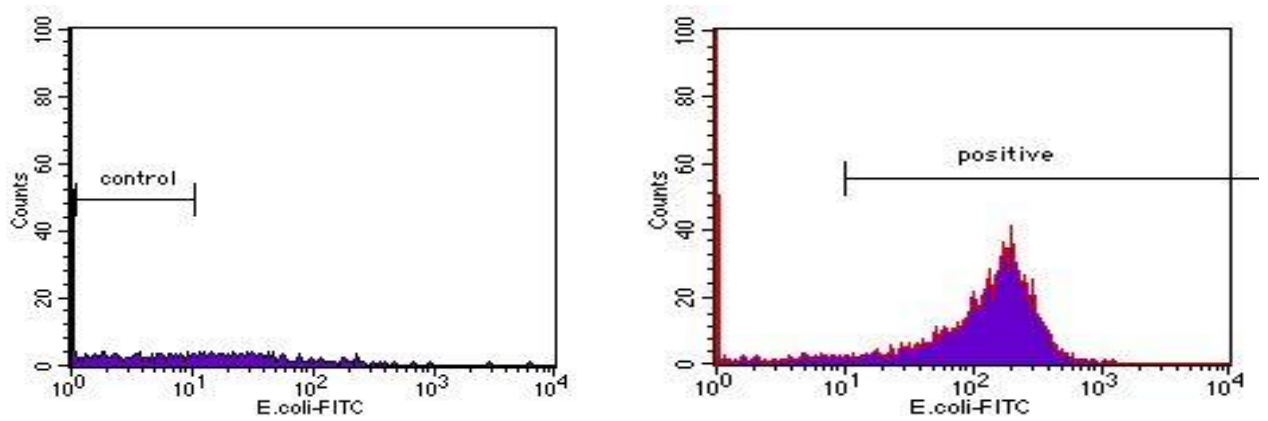
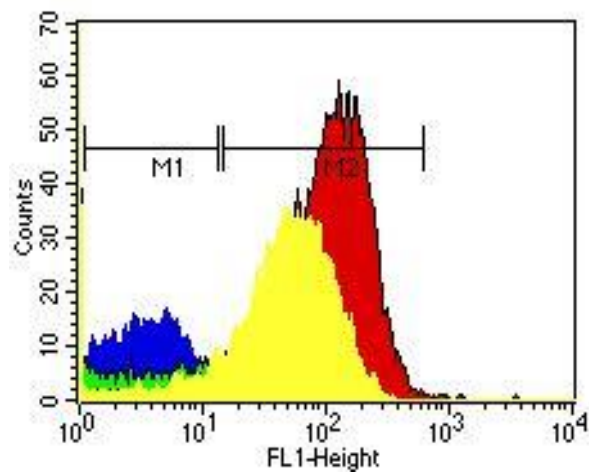


Рис. 3.10. Результати проточної цитофлуориметрії моноцитів при спонтанній (control (зліва)) та стимульованій *E. coli* (positive (справа)) фагоцитарній активності за інтенсивністю флюоресценції на каналі FL1 (вісь ординат – число клітин, вісь абсцис – інтенсивність, відн. од).



Маркер M1 відображає інтенсивність флюоресценції без стимуляції, маркер M2 – зі стимуляцією.

Рис. 3.11. Результати проточної цитофлуориметрії моноцитів без стимуляції (синя лінія) та стимульованій *E. coli* (жовта лінія) фагоцитарній активності на колагеновій моделі порівняно з контролем (без стимуляції – зелена лінія, зі стимуляцією – червона лінія) за інтенсивністю флюоресценції на каналі FL1 (вісь ординат – число клітин, вісь абсцис – інтенсивність флюоресценції, відн. од).

Отримані нами результати дослідження на моделі гострого і хронічного артритів свідчать про зміни фагоцитарної здатності моноцитів, які відображені у таблиці 3.8.

Таблиця 3.8

Фагоцитарна активність моноцитів крові щурів із колагеновим та карагеніновим артритом ($M \pm m$)

	Фагоцитоз моноцитів	
	Спонтанний, %	Стимульований, %
Контроль (n=10)	2,4±0,32	57,4±1,9
Карагеніновий артрит (n=10)	7,1±0,71* ^o	36,0±1,12*
Колагеновий артрит (n=10)	2,3±0,3	31,9±1,09*

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

^o -- різниця достовірна ($P < 0,05$) між групами експериментальних артритів

Так, при карагеніновому запальному процесі спостерігалось достовірне зростання ($P < 0,05$) спонтанної (фізіологічної) фагоцитарної здатності моноцитів у 3 рази порівняно з колагеновою моделлю та інтактними щурами. А при стимульованій *E.coli* фагоцитарній здатності моноцитів спостерігалось достовірне ($P < 0,05$) зниження у 1,4 рази при карагеніновому і у 1,8 рази при колагеновому запальному процесові, порівняно з контрольною групою тварин.

Підсумок. Результати досліджень за експериментальних карагеніновому та колагеновому артритих у щурів свідчать про зміни функціональних характеристик нейтрофілів. Так, при карагеніновому імунозапальному артриті спостерігалась значна активація фагоцитарних клітин, яка після стимуляції незначно зростала. При колагеновому експериментальному артриті фагоцити посилювали поглинальну здатність лише після стимуляції. Ці дані відображають незначну поглинальну здатність фагоцитарних клітин у тварин на обидвох моделях імунозапального артрити.

Наступним завданням було визначити фагоцитарну здатність імунокомпетентних клітин у периферичній крові хворих на РА.

3.3.2 Фагоцитарна здатність нейтрофілів і моноцитів та рівень циркулюючих імунних комплексів у крові хворих на ревматоїдний артрит

Фагоцитарна активність імунокомпетентних клітин в організмі людини залежить від загального стану організму і стадії розвитку хвороби. При РА спостерігається зростання рівня циркулюючих імунних комплексів у відповідь на невідомі антигени, які фагоцитуються нейтрофілами і моноцитами/макрофагами.

Згідно наших досліджень було виявлено зростання ЦІК у сироватці крові хворих на РА. На рисунку 3.12 відображені зміни рівня ЦІК залежно від стадії хвороби. При загостренні РА спостерігалось достовірне зростання ($P < 0,05$) ЦІК у 2 рази і за ремісії хвороби - у 1,6 рази, порівняно з контрольною групою здорових людей.

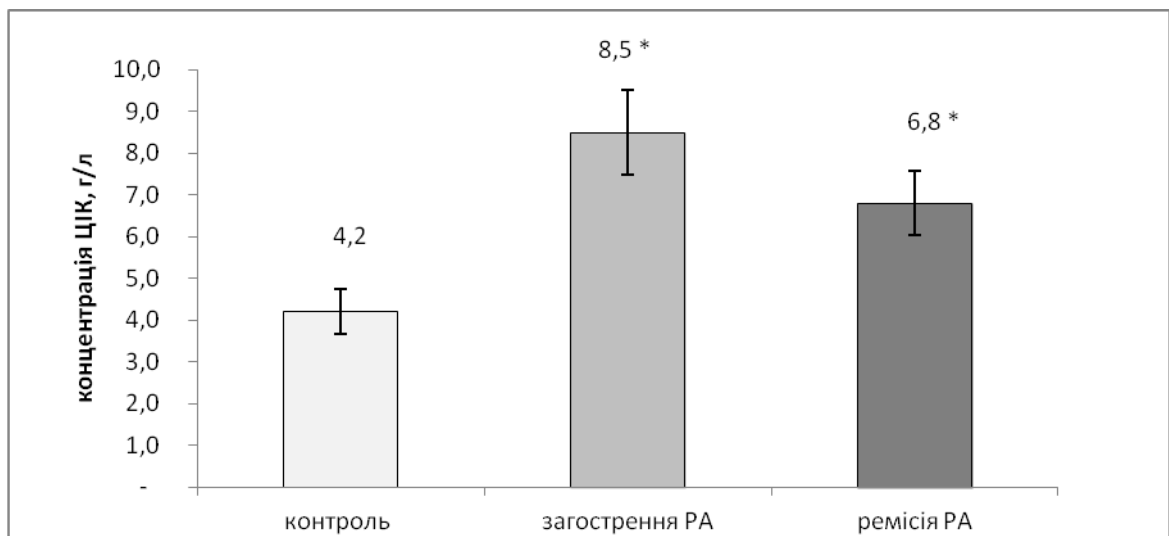


Рис. 3.12. Рівень циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові хворих на ревматоїдний артрит

Відкладення імунних комплексів у тканинах (які не були еліміновані фагоцитами) сприяє агрегації тромбоцитів з формуванням мікротромбів, що посилюють накопичення медіаторів запалення, результатом якого стають деструкція судин і заміщення їх сполучною тканиною.

У пацієнтів із РА спостерігаються наступні зміни фагоцитарної здатності (рисунок 3.13): статистично достовірне ($P < 0,05$) зростання спонтанної (фізіологічної) захоплюючої здатності нейтрофілів у 4,2 рази при загостренні РА та у 1,8 рази при ремісії хвороби, порівняно з донорами. Також відмічалася достовірна ($P < 0,05$) різниця у спонтанному фагоцитозі при загостренні та ремісії РА: поглинальна здатність нейтрофілів у 2,2 рази більша при загостренні РА, ніж у стадії ремісії.

Показники стимульованого *E. coli* фагоцитозу нейтрофілів (резервна здатність фагоцитів), достовірно не відрізнялася ($P > 0,05$) від даних контрольної групи, стадії загострення та ремісії.

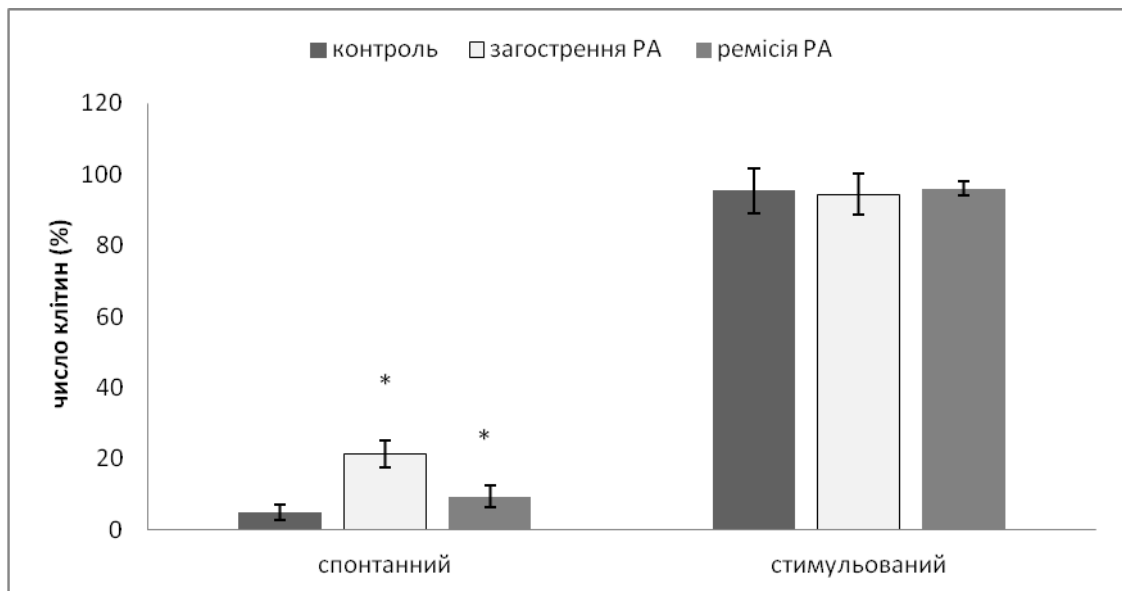


Рис. 3.13. Фагоцитарна активність нейтрофілів периферичної крові пацієнтів з ревматоїдним артритом.

При дослідженні фагоцитарної активності моноцитів периферичної крові пацієнтів з РА спостерігалися зміни, які відображені на рисунку 3.14. Спонтанна фагоцитарна активність моноцитів при загостренні РА, як і в стані ремісії була статистично достовірно ($P < 0,05$) вищою у 2,2 і 1,8 рази, порівняно із практично здоровими пацієнтами.

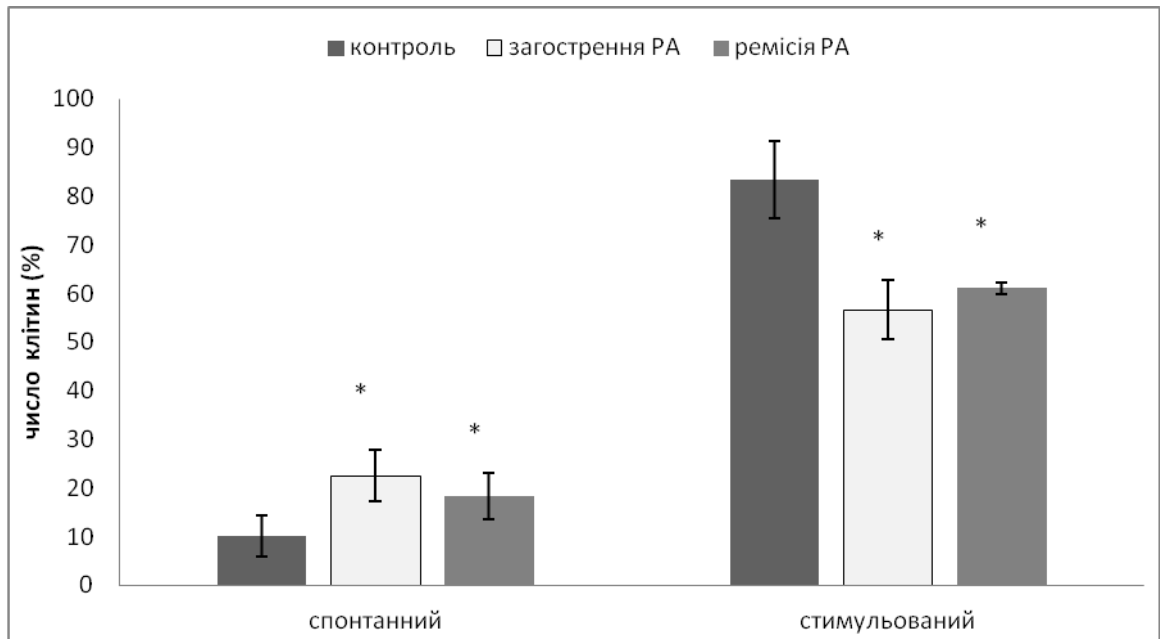


Рис. 3.14. Фагоцитарна активність моноцитів периферичної крові пацієнтів з ревматоїдним артритом.

При стимуляції *E. coli* фагоцитарна активність моноцитів статистично достовірно знижувалася. При загостренні РА, як і у стадії ремісії фагоцитарна здатність моноцитів була відповідно у 1,5 рази та 1,4 рази нижчою, порівняно з групою здорових осіб.

Підсумок. У пацієнтів з РА спостерігали значні зміни фагоцитарної здатності фагоцитів, як при загостренні РА, так і в хронічній стадії захворювання. Виявлено значне посилення спонтанної фагоцитарної здатності нейтрофілів та моноцитів, причому більшою мірою при загостренні РА. Після стимуляції нейтрофіли, як клітини першої лінії імунного захисту, виявляли фагоцитарну здатність, аналогічну як у осіб контрольної групи. Що стосується фагоцитарної здатності моноцитів, то при загостренні РА вона була достовірно вищою, ніж у контролі та в стадії ремісії, а їх резервна здатність до поглинання була суттєво зниженою. Зниження фагоцитарної здатності фагоцитів корелює з підвищеною концентрацією ЦК, особливо у хворих на РА при загостренні та у щурів із колагеновим артритом. Нейтрофіли при РА, поглинаючи імунні комплекси, виділяють вільні радикали кисню та гідролітичні ферменти, які активно знищують хрящ. Моноцити/макрофаги підтримують запальні процеси

не тільки в синовіальній оболонці суглоба, і у периферичних органах, сприяючи розвитку позасуглобових ушкоджень.

Тому тваринні експериментальні моделі гострого запалення, спричиненого карагеніном при дослідженні фагоцитарної (поглинальної) здатності відповідають загостренню РА у людини, а артрит спричинений колагеном у щурів, відображає фагоцитарну активність при хронізації захворювання РА.

Наступним завданням було визначити рівень оксидативних процесів фагоцитуючих клітин при різних типах запалення у експериментальних щурів та у людей із РА.

3.3.3 Рівень оксидативних процесів нейтрофілів і моноцитів у крові експериментальних тварин

Взаємодія чужорідних частинок з поверхнею фагоцита викликає його активацію, що проявляється перебудовою метаболізму клітини: відбувається збільшення іонної проникності клітинної мембрани, посилюється окиснення глюкози і різко (в десятки разів) зростає споживання кисню. Це явище отримало назву «оксидативний вибух». Активні форми кисню (АФО), які вивільняються нейтрофілами у синовіальну рідину та тканини пацієнтів із РА спричинюють пошкодження хряща суглоба, синовіальної оболонки та екстрацелюлярного колагену [152].

За допомогою кисеньзалежного механізму генеруються АФО - супероксид-радикал, гідроген пероксид, гіпохлоритна кислота, гідроксид-радикал та хлораміни, які володіють мікроцидними властивостями [153].

Метою даного розділу дослідження було виявлення рівня оксидативних процесів у фагоцитуючих клітинах експериментальних тварин за умов карагенін- та колаген-індукованого артриту.

Проведені нами дослідження відображають статистично достовірні зміни інтенсивності оксидативних процесів у дослідних моделях експериментальних тварин, які відображені на рисунках 3.15 та 3.16.

Так, при фізіологічному «оксидативному вибуху» спостерігалось достовірне ($P < 0,05$) зростання інтенсивності у 2 рази на моделі карагенінового запалення і у 2,75 рази на моделі колагенового артриту, порівняно з контрольною групою тварин.

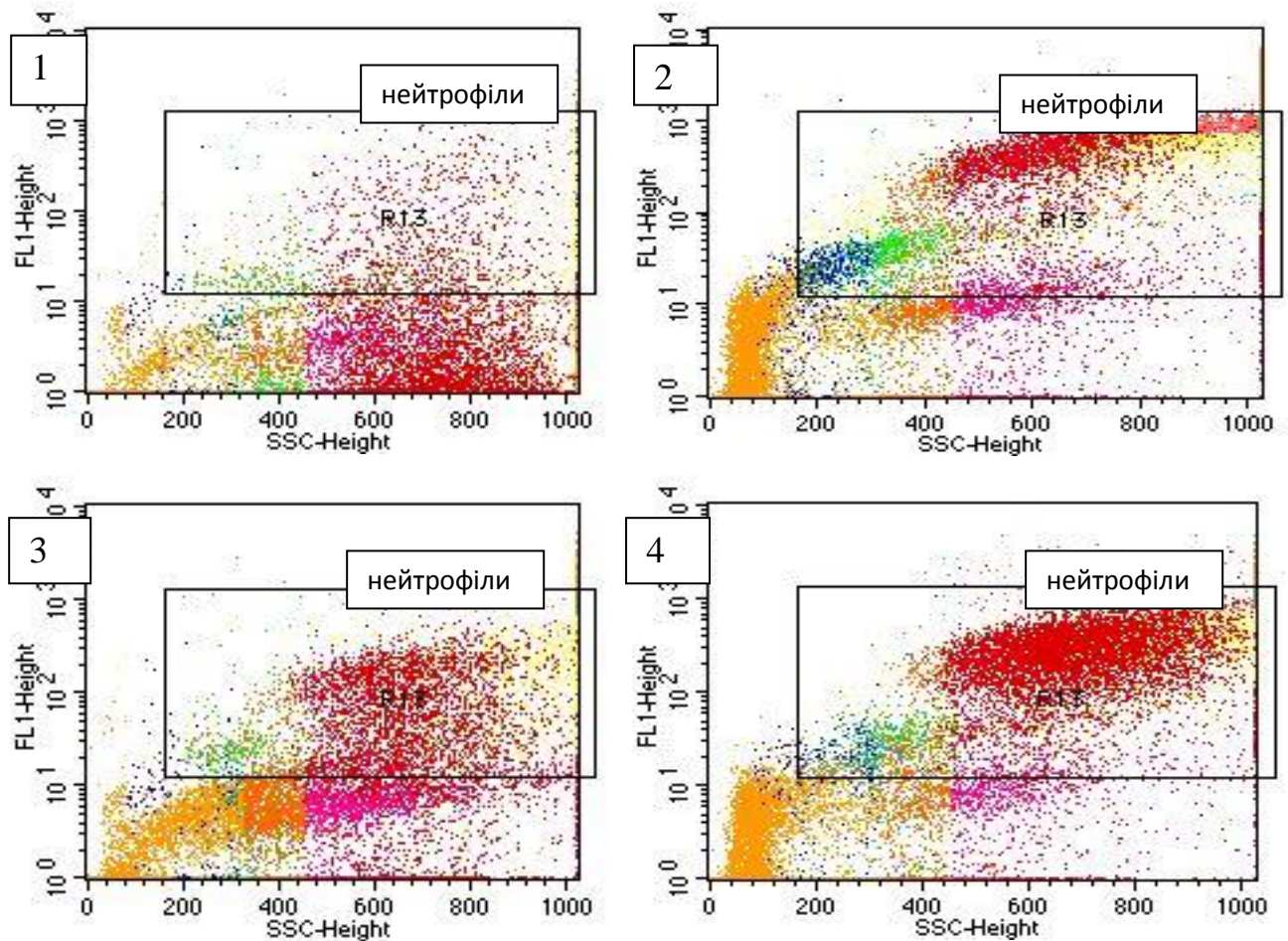


Рис. 3.15. Результати проточної цитофлуориметрії інтенсивності оксидативних процесів у нейтрофілах при колагеновому артриті. 1 – без стимуляції, 2 – стимуляція *E. coli*, 3 – стимуляція хемотаксичним пептидом fMLP, 4 – активатор протеїнкінази C PMA на двох каналах світлорозсіювання – (FL1 – вісь ординат, інтенсивність, відн. од) та SSC (вісь абсцис, відн. од, гранулярність клітин).

При використанні стимулятора *E. coli* були відсутні достовірні ($P>0,05$) зміни рівня оксидативних процесів як при карагеніновій моделі, так і при колагеновій моделі РА, порівняно з групою інтактних тварин.

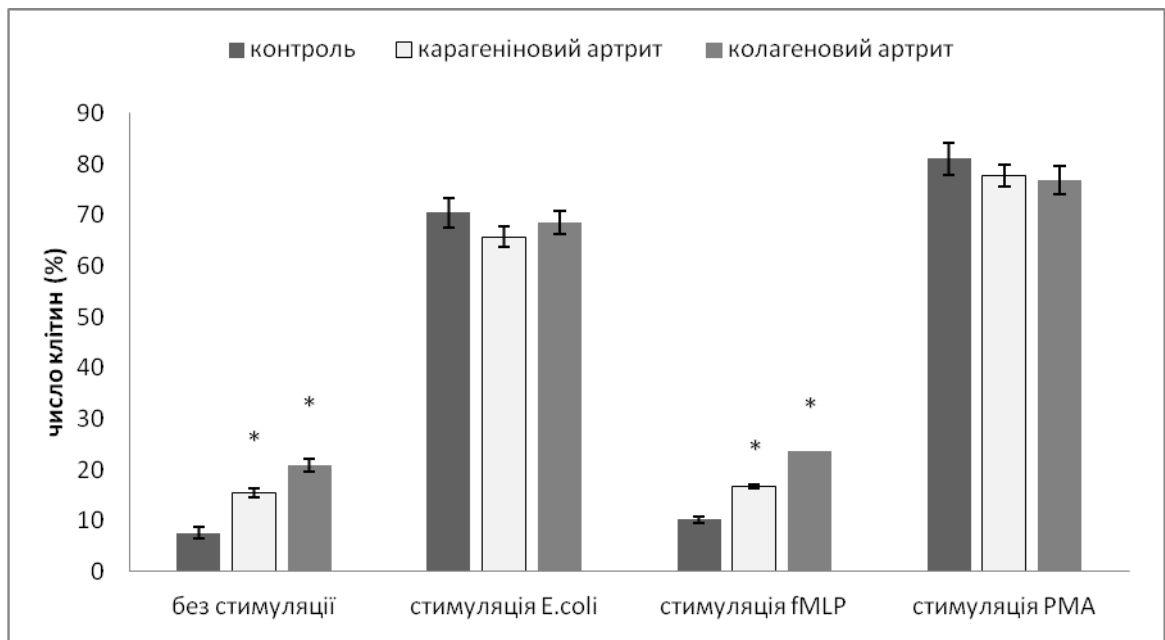


Рисунок 3.16. Кількість нейтрофілів із зміненими морфофункціональними властивостями в результаті «оксидативного вибуху» у периферичній крові щурів із карагеніновим та колагеновим артритом

Що стосується хемоатрактичних стимуляторів, то на експериментальних моделях спостерігалися наступні зміни. При використанні fMLP за карагенінового артрити, як і за колагенового артрити, спостерігалось достовірне ($P<0,05$) зростання у 1,6 рази та у 2,3 рази відповідно, порівняно з контрольною групою тварин. Спостерігалися також достовірні зміни ($P<0,05$) і між експериментальними дослідними групами тварин, а саме збільшена інтенсивність оксидативних процесів на моделі хронічного запального запалення.

При використанні стимулятора РМА ми не спостерігали достовірних ($P>0,05$) змін ступеню оксидативних процесів у нейтрофілах як при карагеніновому, так і при колагеновому запаленні, порівняно з інтактною групою тварин.

Оксидативні процеси у моноцитах відображали зміни, які висвітлені на рисунку 3.17. При карагеніновому запальному процесі без стимуляції відмічалось достовірне ($P < 0,05$) зростання інтенсивності у 4,4 рази, а при колагеновому запальному процесі - у 3,9 рази, порівняно з контрольною групою тварин. Після стимуляції *E.coli* при карагеніновому артриті, як і при колагеновому спостерігалось достовірне зниження ($P < 0,05$) перетравлюючої здатності у 1,6 рази порівняно з контрольною групою тварин.

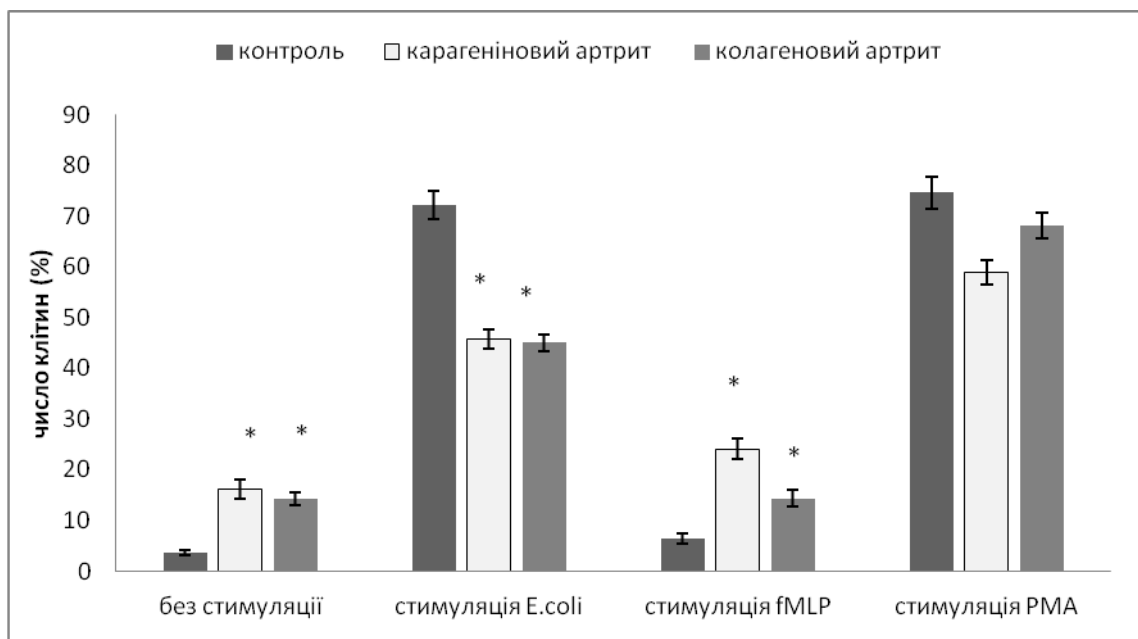


Рис. 3.17. Кількість моноцитів із зміненими морфо-функціональними властивостями в результаті «оксидативного вибуху» у периферичній крові щурів із карагеніновим та колагеновим артритом

При використанні стимулятора fMLP при карагеніновому запальному процесі, як і при колагеновому, спостерігали достовірне ($P < 0,05$) зростання інтенсивності у 3,8 рази та у 2,2 рази, відповідно, порівняно з контрольною групою тварин. Також спостерігали достовірне ($P < 0,05$) зростання у 1,7 рази інтенсивності оксидативних процесів при карагеніновому артриті, порівняно з колагеновим артритом.

При використанні сильного стимулятора PMA при карагеніновому імунозапальному артриті, так і при колагеновому, спостерігали недостовірне

($P > 0,05$) зниження рівня оксидативних процесів, порівняно з контрольною групою тварин.

Підсумок. У експериментальних тварин оксидативні процеси відображали наступні зміни. Як при карагеніновому, так і при колагеновому артритам спостерігалось зростання рівня нестимульованих нейтрофілів і моноцитів. Після стимуляції клітин інтенсивність оксидативного вибуху нейтрофілів досягала контрольних значень, а моноцитів залишалася низькою. При використанні слабого стимулятора fMLP активність ензиматичної системи нейтрофілів і моноцитів була підвищеною, а при використанні сильного стимулятора РМА ці показники досягали контрольних значень.

3.3.4 Рівень оксидативних процесів у фагоцитах периферичної крові пацієнтів з ревматоїдним артритом

Метою даного підрозділу є дослідження інтенсивності оксидативних процесів у нейтрофілах і моноцитах пацієнтів при загостренні та в хронічній стадії РА.

Зміни оксидативних процесів у нейтрофілах крові пацієнтів з РА відображені на рисунку 3.18. Рівень оксидативних процесів у нейтрофілах без стимуляції був достовірно ($P < 0,05$) вищим у 1,7 рази на стадії загострення РА і у 1,5 рази на стадії ремісії захворювання, порівняно з контрольною групою здорових осіб.

При стимуляції *E. coli* оксидативні процеси нейтрофілів був достовірно ($P < 0,05$) слабшими в 1,4 рази лише при загостренні РА, порівняно з стадією ремісії та здоровими донорами. При стимуляції нейтрофілів хемотаксичним пептидом fMLP, спостерігалось достовірне ($P < 0,05$) зростання рівня нейтрофілів лише при загостренні хвороби порівняно з стадією ремісії та здоровими донорами.

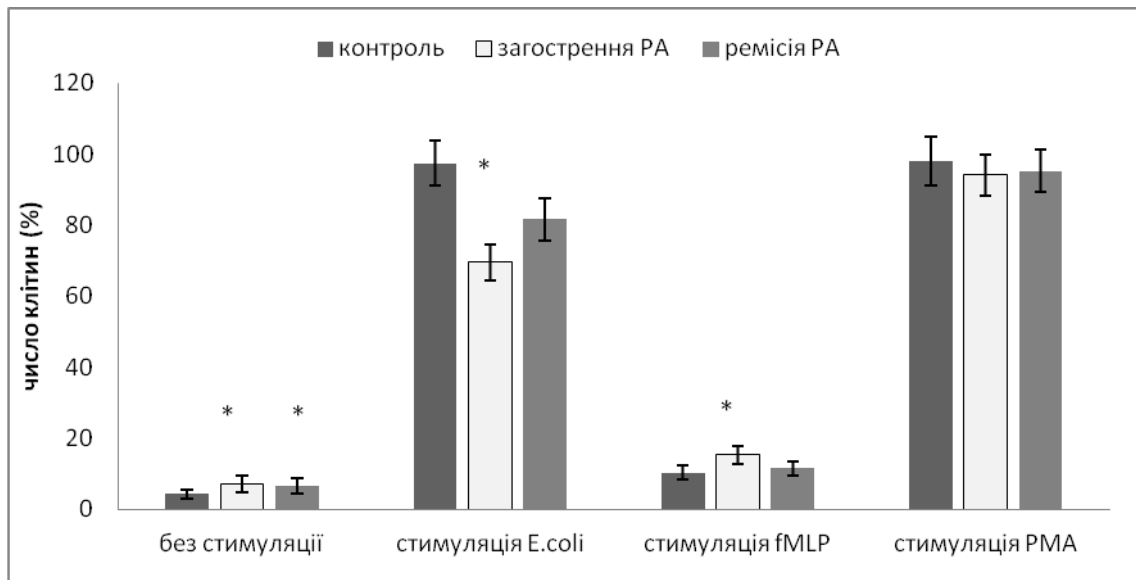


Рис. 3.18. Кількість нейтрофілів із зміненими морфо-функціональними властивостями в результаті «оксидативного вибуху» у периферичній крові пацієнтів із РА

Рівень оксидативних процесів у нейтрофілах при використанні активатора протеїнкінази PMA достовірно ($P > 0,05$) не відрізнявся як при загостренні РА, так і в стадії ремісії РА, порівняно з здоровими донорами.

Що стосується моноцитів, то активація цих клітин не обмежується лише резидентними (синовіальними) макрофагами, а поширюється на циркулюючі моноцити та інші клітини системи мононуклеарних фагоцитів. При дослідженні інтенсивності оксидативних процесів моноцитів спостерігалися зміни, які зображені на рисунках 3.19 та 3.20.

Рівень оксидативних процесів моноцитів без стимуляції був достовірно ($P < 0,05$) вищим як на стадії загострення РА, так і за ремісії захворювання відповідно у 1,6 та 1,36 рази порівняно з контрольною групою здорових донорів. Після стимуляції оксидативні процеси у моноцитах достовірно ($P < 0,05$) знизилися у 2,25 та 1,5 рази як при загостренні хвороби, так і при ремісії порівняно зі здоровими донорами.

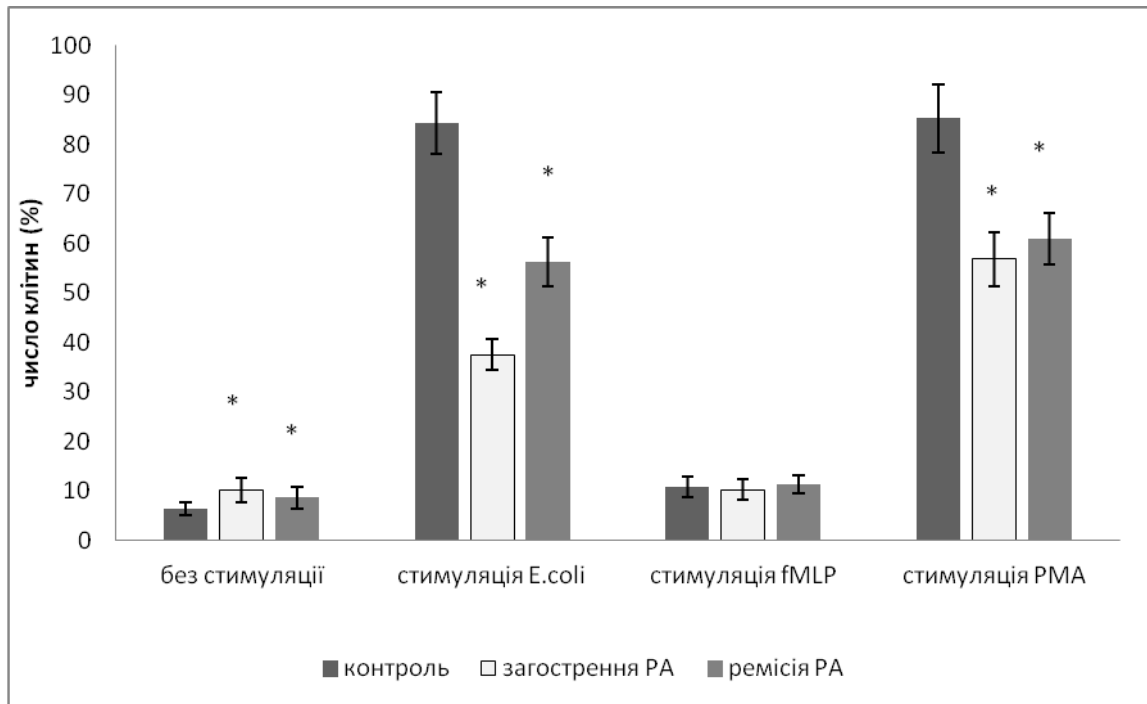


Рис. 3.19. Кількість моноцитів із зміненими морфо-функціональними властивостями в результаті «оксидативного вибуху» у периферичній крові пацієнтів із РА

При стимуляції моноцитів хемотаксичним пептидом fMLP не спостерігалось достовірних змін зі сторони цих клітин як при загостренні хвороби, порівняно з стадією ремісії та здоровими донорами. Інтенсивність оксидативних процесів моноцитів при використанні PMA достовірно ($P < 0,05$) зменшувалася у 1,5 рази при загостренні РА та у 1,4 рази в стадії ремісії РА порівняно з здоровими донорами.

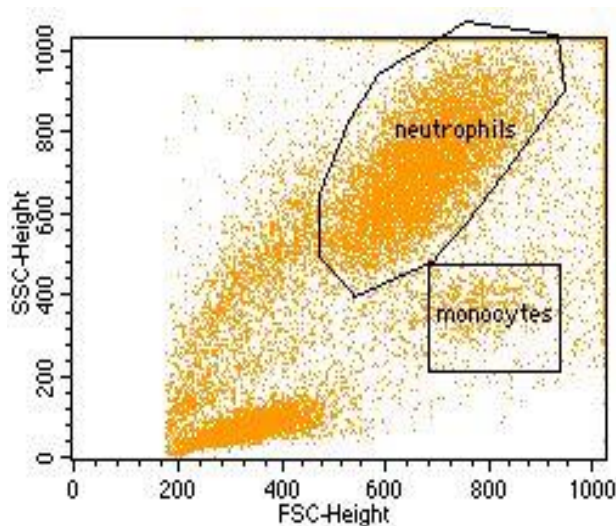
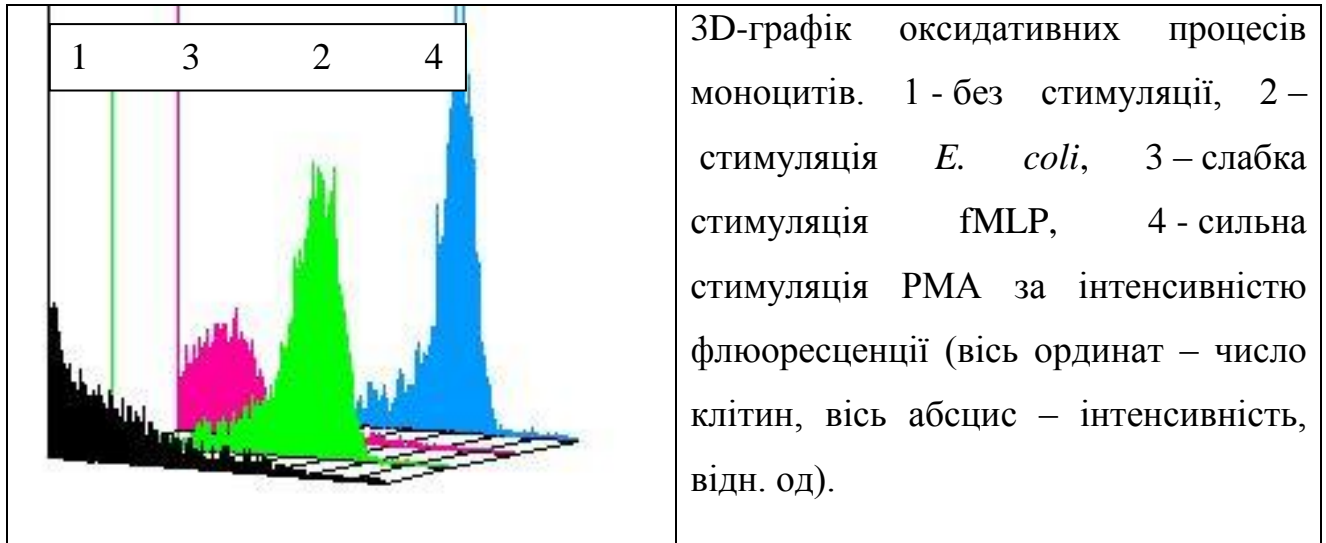


Рис. 3.20. Результати проточної цитофлуориметрії. Dot plot - ідентифікація популяції нейтрофілів та моноцитів цільної крові на двох каналах світлорозсіювання – FSC (вісь абсцис, відн. од, розмір клітин) та SSC (вісь ординат, відн. од, гранулярність клітин).



Таким чином, у пацієнтів з РА спостерігаються наступні зміни. При загостренні РА кисеньзалежні процеси нейтрофілів без стимуляції виявляють значну ступінь активації, яка після стимуляції клітин *E. coli* достовірно знижувалася, не досягаючи значень контрольної групи ($P < 0,05$). При використанні слабого стимулятора fMLP інтенсивність кисеньзалежних процесів нейтрофілів достовірно зростала, а при використанні сильного стимулятора PMA поверталася до значень контрольної групи ($P > 0,05$). На стадії ремісії нейтрофіли без стимуляції виявляли достовірну активацію, решта показників суттєво не відрізнялися від контрольних значень.

Як при загостренні РА, так і в стадії ремісії моноцити хворих виявляли подібну активність. Моноцити спонтанно були вже стимульовані *in vivo* (можливо, антигенами інфекційного походження) на різних стадіях хвороби, причому більш інтенсивно в стадії загострення. Після стимуляції *E. coli* інтенсивність оксидативних процесів моноцитів достовірно знижувалася при загостренні і достовірно підвищувалася при ремісії ($P < 0,05$), не досягаючи контрольних значень. При використанні слабого стимулятора fMLP моноцитарна активність не відрізнялася від значень контрольної групи, а використання сильного стимулятора PMA призводило до достовірного зниження оксигензалежної активності моноцитів, як в стадії загострення, так і в

стадії ремісії РА. Ці дані можуть свідчити про виснаження ензиматичної системи «оксидативного вибуху» більшою мірою моноцитів, ніж нейтрофілів.

Підсумок. Підсумовуючи результати досліджень попередніх розділів, можна спрогнозувати можливий розвиток захворювання РА на експериментальних моделях. Так, фізіологічні оксидативні процеси у нейтрофілах при карагеніновому та колагеновому запаленні були підвищеними, як і при загостренні РА, так і при ремісії. Після стимуляції *E.coli* спостерігалось повернення до рівня контрольних значень на обох стадіях запалення у експериментальних тварин і у пацієнтів на стадії ремісії РА. При дослідженні оксигензалежних оксидативних процесів у моноцитах без стимуляції, відмічалася посилена активація як в експериментальних моделях і в пацієнтів з РА, незалежно від стадії захворювання. При стимуляції рівень моноцитів залишався достовірно зниженим ($P < 0,05$) в експериментальних моделях і в пацієнтів з РА, незалежно від стадії захворювання. Використання хемотаксичного стимулятора fMLP виявляло достовірно ($P < 0,05$) підвищену активації лише в експериментальних моделях, а у пацієнтів з РА не спостерігалися достовірні зміни ($P > 0,05$). І, навпаки, використання сильного стимулятора протеїнкінази С (PMA), у експериментальних тварин достовірно ($P > 0,05$) не змінювало показників від контрольних значень, а у пацієнтів з РА вони були достовірно знижені ($P < 0,05$).

Наступним етапом було дослідження показників оксидативного та нітрозативного стресу, який спостерігається після активації клітин імунної системи.

3.4 Зміна показників оксидативного та нітрозативного стресу у крові щурів при експериментальному гострому та хронічному артритам

Взаємодія чужорідних антигенів з поверхневими рецепторами фагоциту викликає його активацію. При цьому відбувається перебудова метаболізму клітини: збільшується іонна проникність клітинної мембрани, посилюється

окиснення глюкози і різко (в десятки разів) збільшується використання кисню, яке призводить до «оксидативного» стресу.

Метою даного розділу є наступне: дослідити вплив чинників оксидативного та нітративного стресу, вивчаючи швидкість генерації супероксидного ($O_2^{\bullet-}$) та гідроксильного ($\bullet OH$) радикалів, гідроген пероксиду (H_2O_2) конститутивної та індукційної NO-синтази, оксидів азоту (IV, VI) (NO_2^- та NO_3^-), аргіназної активності та взаємодії продуктів з тіобарбітуровою кислотою (ТБК-активних продуктів) у плазмі крові експериментальних тварин.

У табл. 3.9 вказані біохімічні показники, які підтверджують розвиток оксидативного стресу в щурів за умов експериментальних запальних процесів, індукованих карагенином чи колагеном.

Таблиця 3.9

Швидкість генерацій гідроксильних і супероксидних радикалів та гідроген пероксиду у 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 , нмоль/мл
Контроль	98,6±17,73	1,62±0,46	127,4±11,91
Карагениновий артрит	370,33±54,46*	3,81±1,64*	232,1±97,33*
Колагеновий артрит	450,14±79,59*	14,93±2,52* [°]	1005,1±66,5* [°]

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

[°] -- різниця достовірна ($P < 0,05$) між групами експериментальних артритів

ΔE – швидкість генерації

При дослідженні змін окисного метаболізму в плазмі крові обох груп щурів (рисунок 3.21) достовірно ($P < 0,05$) зростала швидкість генерації

гідроксильного та супероксидного радикалів порівняно з контрольною групою тварин. Так, при карагеніновому артриті рівень $\bullet\text{OH}$, який є маркером вільнорадикального розпаду пероксинітриту (на $\bullet\text{OH}$ та NO_2) зріс у 3,8 рази порівняно з групою контрольних тварин.

Швидкість генерації $\text{O}_2^{\bullet-}$, який є маркером активності нуклеотидних ксантин- і НАДФН-оксидаз, ліпідних циклооксигенази і ліпоксигенази (генераторів супероксиду) при карагеніновому артриті достовірно зросла ($P < 0,05$) у 2 рази, і вміст H_2O_2 достовірно ($P < 0,05$) збільшився у 2 рази порівняно з контролем.

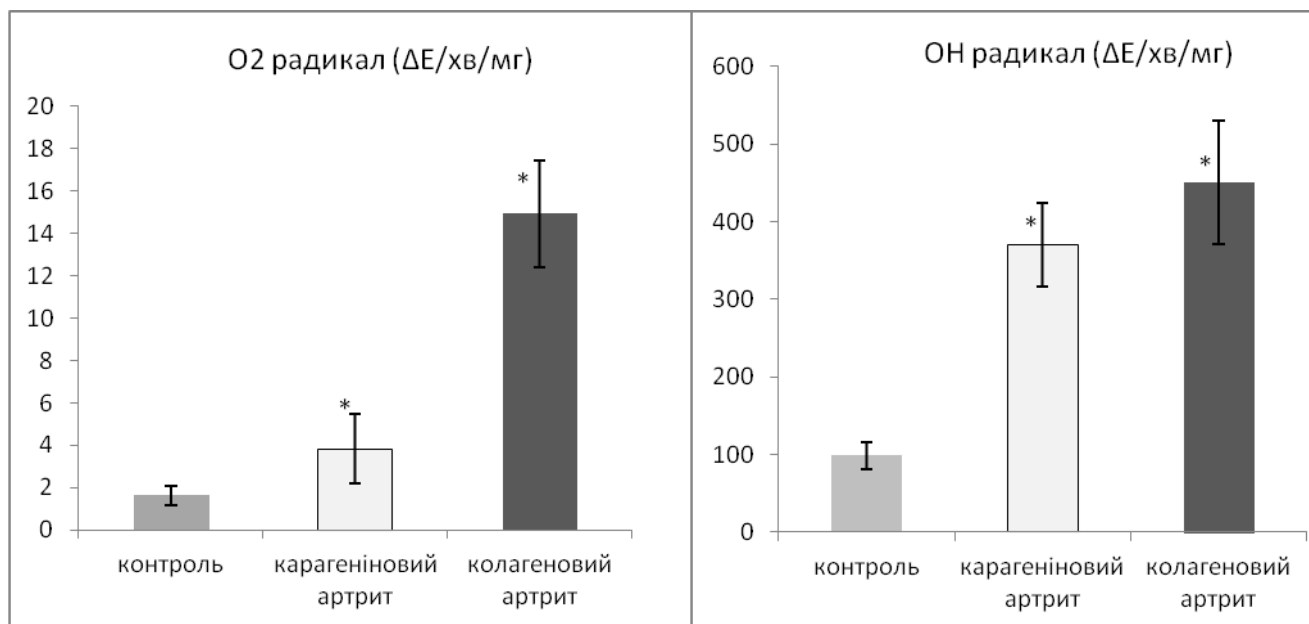


Рис. 3.21. Швидкість генерації супероксидного та гідроксильного радикалів у крові експериментальних щурів

Що стосується хронічного запального процесу, то при колагеновому артриті спостерігалися наступні зміни: швидкість генерації $\bullet\text{OH}$ достовірно зросла у 4,5 рази, а активність $\text{O}_2^{\bullet-}$ – у 9 разів порівняно з контролем. Вміст H_2O_2 при колагеновому артриті достовірно зріс у 8 разів порівняно з інтактною групою тварин.

При аналізі розвитку нітративного стресу в експериментальних тварин (таблиця 3.10, рисунок 3.22) при карагеніновому артриті не спостерігалось достовірних ($P > 0,05$) змін активності сумарної NO-синтази (NOS), порівняно із

контролем. Активність конститутивної NO-синтази достовірно не змінювалася в обох дослідних групах ($P>0,05$) порівняно з контролем.

При карагеніновому артриті спостерігалось достовірно ($P<0,05$) зниження у 1,6 рази частки конститутивної NOS, порівняно з вмістом частки конститутивної NOS у контрольних тварин.

Активність індукцибельної NO-синтази (iNOS) достовірно ($P<0,05$) зросла за умов гострого запального артрит у 1,6 рази, порівняно з контрольною групою тварин [154].

Таблиця 3.10

Показники активності NO-синтази в крові щурів ($M\pm m$, $n=10$)

Умови досліджу	Сумарна активність NOS, пмоль/хв/мг	Активність конститутивної NOS, пмоль/хв/мг	Активність індукцибельної NOS, пмоль/хв/мг	Частка конститутивної NOS, %
Контроль	34,00±2,69	16,93±1,2	17,07±1,49	49,8±4,46
Карагеніновий артрит	41,48±4,56	13,08±3,51	28,4±1,05*	31,3±7,7*
Колагеновий артрит	58,87±14,18*	13,71±3,09	45,16±11,09* ^o	23,3±2,2*

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

^o - різниця достовірна ($P<0,05$) між групами експериментальних артритів

При хронічному запальному процесові сумарна активність ізоформ NOS, яка є маркером окисного метаболізму L-аргініну достовірно ($P<0,05$) зросла у 1,7 рази порівняно з контрольною групою тварин. Активність (Ca-незалежної) індукцибельної синтази оксиду азоту достовірно ($P<0,05$) зростала у 2,6 рази порівняно з контрольною групою тварин. Також спостерігалась достовірна різниця між дослідними групами щодо вказаних показників: при колагеновому

артриті рівень активності iNOS достовірно зростав у 1,6 рази порівняно із карагеніновим артритом.

При колагеновому артриті спостерігалось достовірне ($P < 0,05$) зниження частки конститутивної NOS у 2,1 рази, порівняно з вмістом її частки у контрольних тварин.

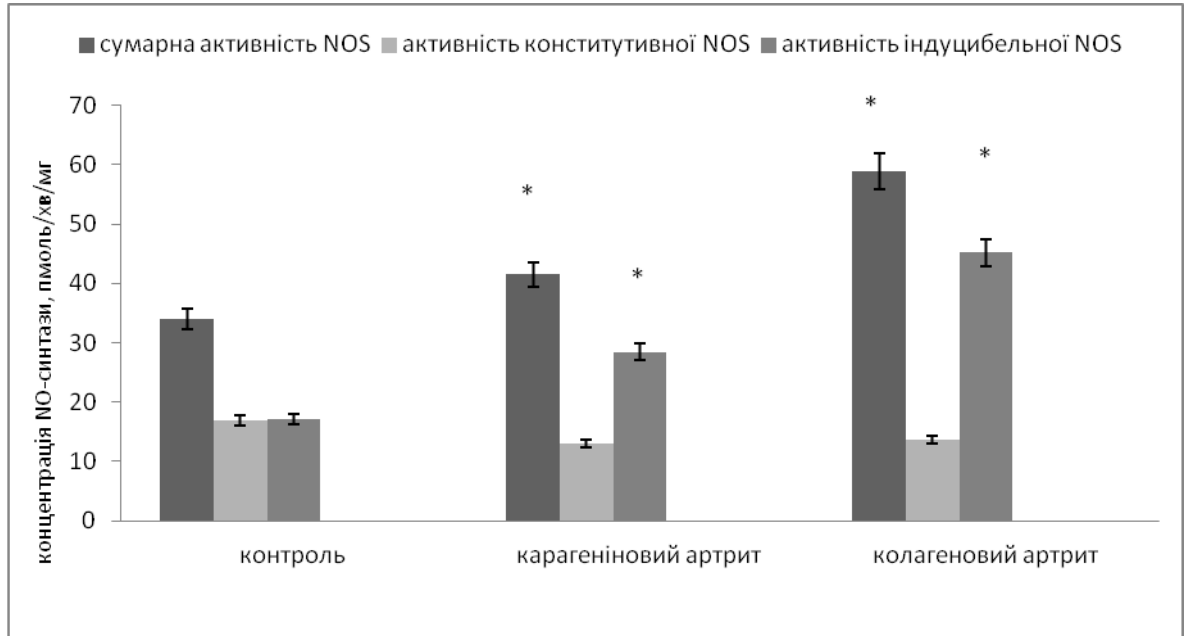


Рис. 3.22. Показники активності NO-синтази в експериментальних та контрольних тварин.

Оксид азоту (NO), як продукт окисного перетворення L-аргініну, конститутивними та неконститутивною ізоформами NOS, надалі зазнає окисно-відновних перетворень ензиматичним і неензиматичним шляхами, з наступним відновленням NO (таблиця 3.11). Основними ланками циклу перетворень NO є окиснення NO до нітриту (NO_2^-) та нітрату (NO_3^-), розклад нітрозотіолів, утворення пероксинітриту (ONOO^-), який викликає нітрозилування протеїнів, а також відновлення NO_2^- та NO_3^- нітрит- та нітратредуктазами, відповідно [155].

Цитотоксична дія NO залежить від утворення ONOO^- , NO_2^- та NO_3^- , які є сильними окисниками. Токсичність стабільних метаболітів зростає при низьких значеннях pH та під впливом мієлопероксидази лейкоцитів.

Таблиця 3.11

Вміст стабільних метаболітів NO_2^- та NO_3^- у крові щурів

(M±m, n=10)

Умови досліджу	Вміст NO_2^- , пмоль/мл	Вміст NO_3^- , нмоль/мл
Контроль	30,41±6,38	348,25±89,95
Карагеніновий артрит	49,43±3,52*	706,18±50,39*
Колагеновий артрит	134,04±22,61* [°]	2867,3±185,1* [°]

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

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

Були отримані наступні результати: статистично достовірно (P<0,05) зросла концентрація стабільних метаболітів: NO_2^- при карагеніновому артриті у 1,6 рази, а при колагеновому артриті - у 4,5 рази порівняно з контрольною групою тварин. Активність NO_3^- - при карагеніновому артриті достовірно (P<0,05) зросла у 2 рази, а утворення NO_3^- на хронічній моделі запального процесу - у 8,2 рази порівняно з контрольною групою тварин.

Аналіз одержаних результатів показує, що при гострому запаленні, а, особливо, при хронічному запальному процесові помірно зріс вміст NO_2^- , який утворюється за прямого окиснення NO в оксигенованих водних розчинах та стрімко зростає вміст NO_3^- , який утворюється, головним чином, під час нерадикального розпаду пероксинітриту. Це свідчить, з одного боку, про значне утворення та розпад токсичного пероксинітриту при гострому та хронічному запаленні, з іншого про індукцію як оксидативного, так і нітративного стресу (на тлі високої активності iNOS) при хронічному запаленні та корелює зі збільшенням продукції АФО (особливо H_2O_2 та $\text{O}_2^{\bullet-}$).

Ми також оцінювали неокисний метаболізм L-аргініну, який забезпечується активністю ензиму аргінази. Аргіназа перетворює L-аргінін до сечовини та орнітину. В таблиці 3.12 відображено достовірне (P<0,05)

зростання аргіназної активності 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.

Виявлено достовірне ($P < 0,05$) зростання співвідношення рівня неокисного та окисного метаболізму L-аргініну (аргіназа/NOS) за умов карагенінового артриту в 5,9 рази і за умов колаген-індукованого артриту - в 4,9 рази, порівняно з його величиною у контрольній групі тварин.

Таблиця 3.12

Активність аргінази та величина співвідношення неокисного та окисного (аргіназа/NOS) метаболізму аргініну в крові щурів ($M \pm m$, $n=10$)

Умови досліджу	Активність аргінази, 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

Відомо, що під час оксидативного стресу внаслідок інтенсифікації перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), у т.ч. поліненасичених жирних кислот, має місце значне пошкодження цілісності клітинних мембран. Маркером інтенсивності процесів ПОЛ у плазмі крові є ТБК-позитивні продукти, визначення концентрації яких показано на рисунку 3.23. Спостерігалось достовірне ($P < 0,05$) зростання концентрації цих сполук у 2 рази і за карагенінового і за колагенового артриту порівняно з концентрацією у контрольній групі тварин.

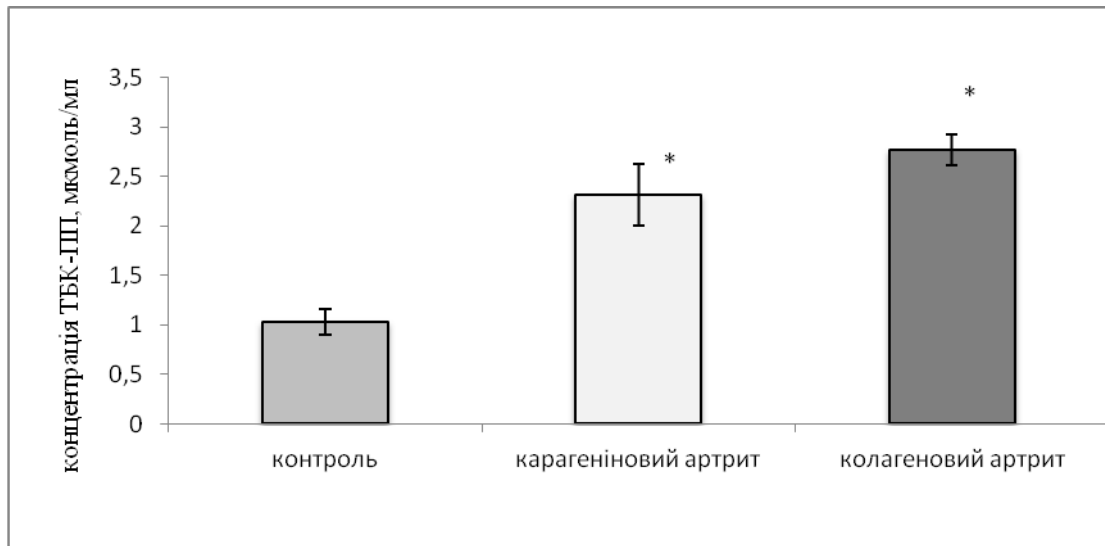


Рис. 3.23. Концентрація ТБК-позитивних продуктів у крові експериментальних тварин.

Підсумок. При гострому та хронічному запальному процесу спостерігали підвищені концентрації біохімічних маркерів оксидативного та нітративного стресу. Активність кальцій-залежної NOS виявилася низькою. Натомість висока активність констатована кальцій-незалежної індукцибельної NOS (особливо при хронічному запаленні).

Наступним завданням було дослідити вплив іншої сигнальної молекули сірководню на розвиток гострого та хронічного запалення.

3.4.1 Вміст сірководню в плазмі крові експериментальних тварин за умов карагенінового та колагенового артритів

Сірководень, як і оксид азоту, є важливим регулятором біологічних сигнальних функцій у клітинах організму. Він бере участь у передачі сигналів між нейронами та впливає на судинний тонус, регулює імунні функції, процеси апоптозу та клітинної проліферації.

При дослідженні рівня сірководню, який відображений на рисунку 3.24, важливого посередника міжклітинної взаємодії, спостерігали достовірне ($P < 0,05$) підвищення концентрації в плазмі крові піддослідних щурів порівняно з контрольними щурами. При карагеніновому запаленні концентрація H_2S була

в 2 рази ($207,34 \pm 37,48$ нмоль/мл), а при колагеновому у 2,3 рази вищою ($225,21 \pm 34,94$ нмоль/мл) порівняно із контрольною групою тварин ($97,11 \pm 5,51$ нмоль/мл) [156].

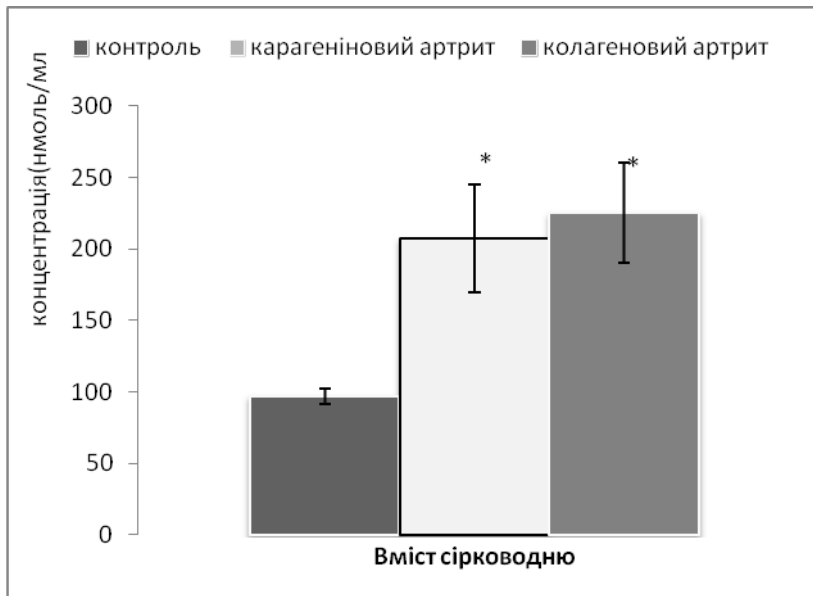


Рис. 3.24. Вміст сірководню у плазмі крові експериментальних тварин за умов карагенінового та колагенового артритів

Підсумок. Вміст сірководню при гострому та хронічному запаленні суглобів був значно вищим, ніж у контрольної групи щурів, причому при колагеновому артриті його концентрація була в 1,1 рази вищою, ніж при карагеніновому запаленні. Визначення вмісту сірководню в плазмі крові є перспективним показником при прогнозуванні стану запалення та розвитку ускладнень при РА.

Оскільки сірководень впливає на проліферацію клітин та процеси апоптозу, доцільним було дослідити розвиток процесів апоптозу в експерименті та у хворих з РА.

3.5 Вміст апоптичних лімфоцитів у крові експериментальних тварин при розвитку карагенінового та колагенового артритів та у пацієнтів з ревматоїдним артритом

3.5.1 Характеристика апоптотичних клітин у експериментальних тварин з індукованим гострим та хронічним запаленням

Ролі апоптозу в ініціації та розвитку аутоімунних захворювань надається важливе значення. При РА спостерігається порушення балансу між проліферацією та апоптозом лімфоцитів. Тому, метою даного розділу було вивчення апоптотичних змін лімфоцитів у крові експериментальних тварин (рисунок 3.25).

Встановлено, що за гострого (карагенінового) артриту спостерігається достовірне зниження ($P < 0,05$) майже у 1,4 рази кількості (AnV^+) апоптотичних лімфоцитів ($3,74 \pm 0,41\%$) відносно контрольних (неімунізованих) щурів ($5,1 \pm 0,67\%$). При хронічному (колагеновому) артриті спостерігалось достовірне зростання ($P < 0,05$) майже у 1,8 рази рівня апоптотичних лімфоцитів ($9,40 \pm 0,95\%$).

При колагеновому артриті ($78,29 \pm 3,27\%$), спостерігалось достовірне ($P < 0,05$) зростання кількості живих клітин (AnV^-/PI^-), а при карагеніновому артриті ($56,36 \pm 2,64\%$) зниження кількості живих клітин порівняно з групою контрольних тварин ($63,28 \pm 3,02\%$) без достовірної різниці ($P > 0,05$) [157].

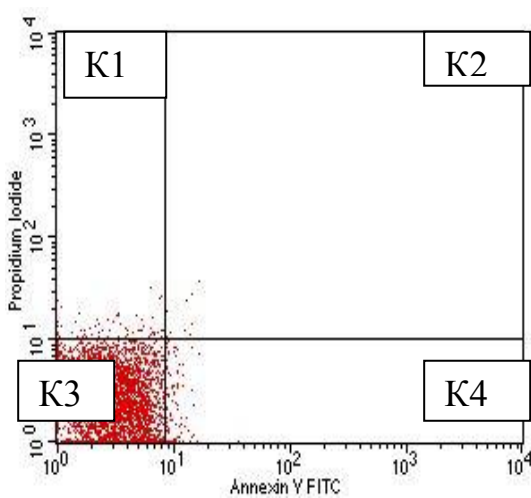
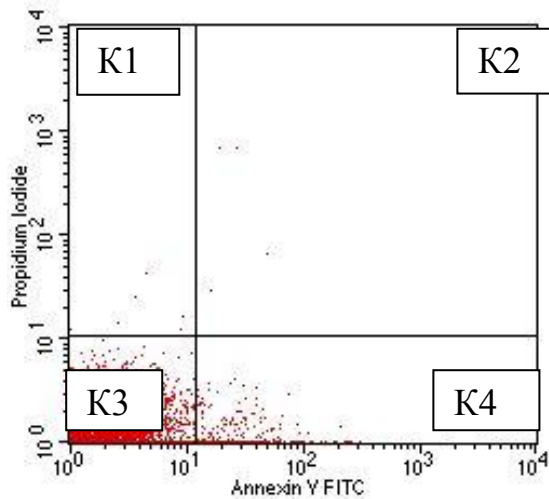
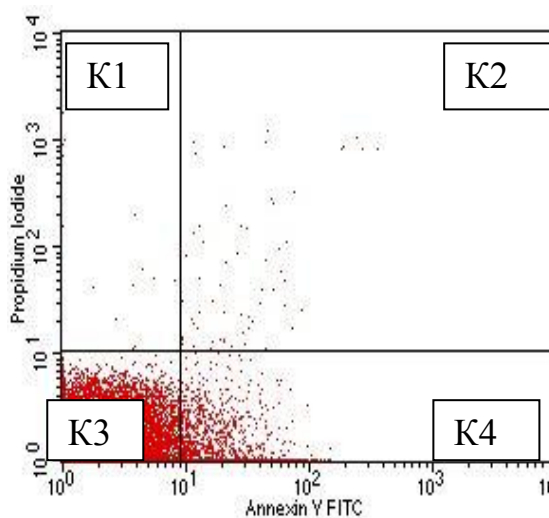


Рис. 3.25. Гістограма розподілу лімфоцитів за ступенем апоптозу при карагеніновому артриті: квадрант K3 – живі клітини (AnV^-/PI^-), квадранти K2 і K4 – стадія апоптозу (AnV^+) і квадрант K1 – мертві клітини (AnV^-/PI^+). Канали флюоресценції FL1 (Annexin V, вісь абсцис, відн.од) та FL3 (пропідію йодид, вісь ординат, відн.од)



Гістограма розподілу лімфоцитів за ступенем апоптозу в контролі: квадрант K3 – живі клітини (AnV^-/PI^-), квадранти K2 і K4 – стадія апоптозу (AnV^+) і квадрант K1 – мертві клітини (AnV^-/PI^+). Канали флюоресценції FL1 (Annexin V, вісь абсцис, відн.од) та FL3 (пропідію йодид, вісь ординат, відн.од)



Гістограма розподілу лімфоцитів за ступенем апоптозу при колагеновому артриті: квадрант K3 – живі клітини (AnV^-/PI^-), квадранти K2 і K4 (AnV^+/PI^- , AnV^+/PI^+) – стадія апоптозу і квадрант K1 – мертві клітини (AnV^-/PI^+). Канали флюоресценції FL1 (Annexin V, вісь абсцис, відн.од) та FL3 (пропідію йодид, вісь ординат, відн. од)

Кількість мертвих клітин (AnV^-/PI^+) достовірно не відрізнялася ($P>0,05$) від контрольної групи тварин (рисунок 3.26). Так, при карагеніновій моделі ($0,27\pm 0,14\%$) гострого запального процесу, як і при колагеновій моделі ($0,36\pm 0,22\%$) не спостерігалися достовірні зміни порівняно з контрольною групою тварин ($0,30\pm 0,19\%$).

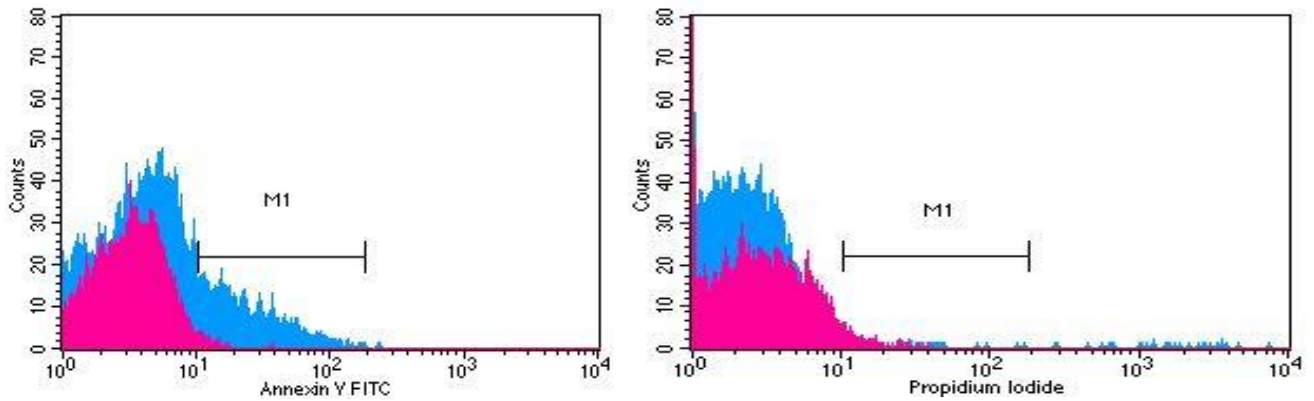


Рис. 3.26. Результати проточної цитофлуориметрії розподілу лімфоцитів у контролі (фіолетова лінія) і на моделі колагенового артриту (синя лінія). Зліва – клітини у стадії апоптозу, справа – мертві клітини. Канали флюоресценції FL1 та FL3 (анексин V та пропідій йодид відповідно, вісь абсцис - відн. од, вісь ординат - число клітин). Маркер M1 – відображає інтенсивність флюоресценції каналу

Підсумок. За гострого артриту спостерігали достовірне зниження ($P < 0,05$) майже у 1,4 рази кількості апоптичних лімфоцитів відносно лімфоцитів контрольних (неімунізованих) щурів. При хронічному (колагеновому) артриті спостерігалось достовірне зростання ($P < 0,05$) майже у 1,8 рази кількості апоптотичних лімфоцитів. При гострому запаленні спостерігалось підвищення кількості живих клітин, а при хронічному запаленні – збільшення кількості мертвих клітин.

3.5.2 Рівень апоптотичних лімфоцитів у крові пацієнтів з ревматоїдним артритом

При дослідженні апоптотичних змін лімфоцитів периферичної крові хворих на РА в стадії загострення та ремісії спостерігалися наступні зміни, які відображені на рисунках 3.27 та 3.28. Встановлено, що при загостренні РА відбувається достовірне зниження ($P < 0,05$) майже у 1,5 рази кількості (AnV^+)

апоптичних змін лімфоцитів ($2,33 \pm 0,27\%$) відносно групи контролю ($3,5 \pm 0,57\%$). При хронічному артриті (стан ремісії) спостерігалось достовірне зростання ($P < 0,05$) майже у 2 рази кількості апоптичних лімфоцитів ($6,8 \pm 0,87\%$). Також спостерігалось зростання кількості живих клітин (AnV^-/PI^-) при загостренні РА ($79,12 \pm 3,14\%$), а у стані ремісії РА ($68,45 \pm 2,97\%$) - зниження кількості живих клітин без достовірної різниці ($P > 0,05$) порівняно з групою контрольних тварин ($73,11 \pm 2,12\%$).

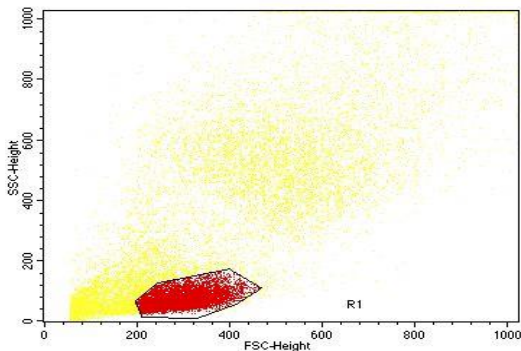
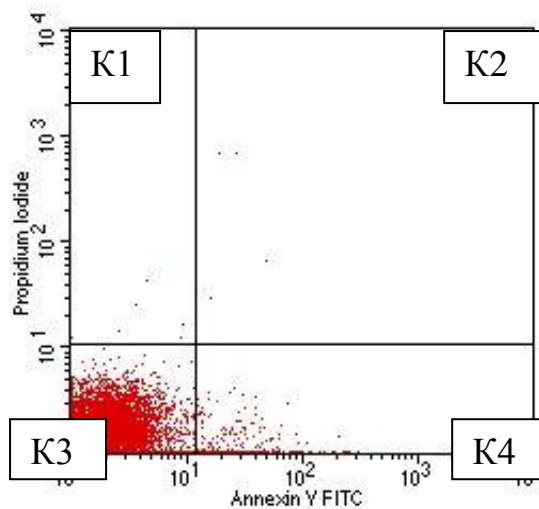
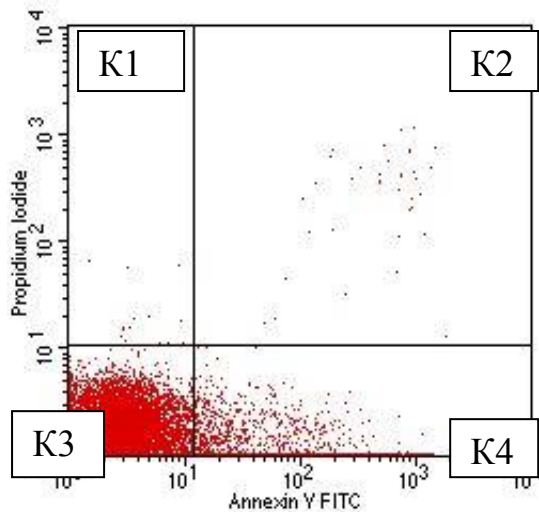


Рис. 3.27. Результати проточної цитофлуориметрії популяції лімфоцитів цільної крові на двох каналах світлорозсіювання – FSC (вісь абсцис, відн. од) та SSC (вісь ординат, відн. од) (розмір та гранулярність клітин)



Гістограма розподілу лімфоцитів за ступенем апоптозу при ремісії РА: квадрант K3 – живі клітини (AnV^-/PI^-), квадранти K2 і K4 – апоптотичні зміни (AnV^+) і квадрант K1 – мертві клітини (AnV^-/PI^+). Канали флуоресценції FL1 (Анексин V, вісь абсцис, відн. од) та FL3 (пропідій йодид, вісь ординат, відн. од)



Гістограма розподілу лімфоцитів за ступенем апоптозу при загостренні РА: квадрант K3 – живі клітини (AnV⁻/PI⁻), квадранти K2 і K4 – апоптотичні зміни (AnV⁺) і квадрант K1 – мертві клітини (AnV⁻/PI⁺). Канали флуоресценції FL1 (Анексин V, вісь абсцис, відн. од) та FL3 (пропідій йодид, вісь ординат, відн. од)

Не спостерігалось також статистично достовірних ($P > 0,05$) змін щодо кількості мертвих клітин (AnV⁻/PI⁺) при загостренні РА ($0,30 \pm 0,14\%$) та стадії ремісії ($0,26 \pm 0,12\%$), порівняно з контрольною групою осіб ($0,24 \pm 0,11\%$).

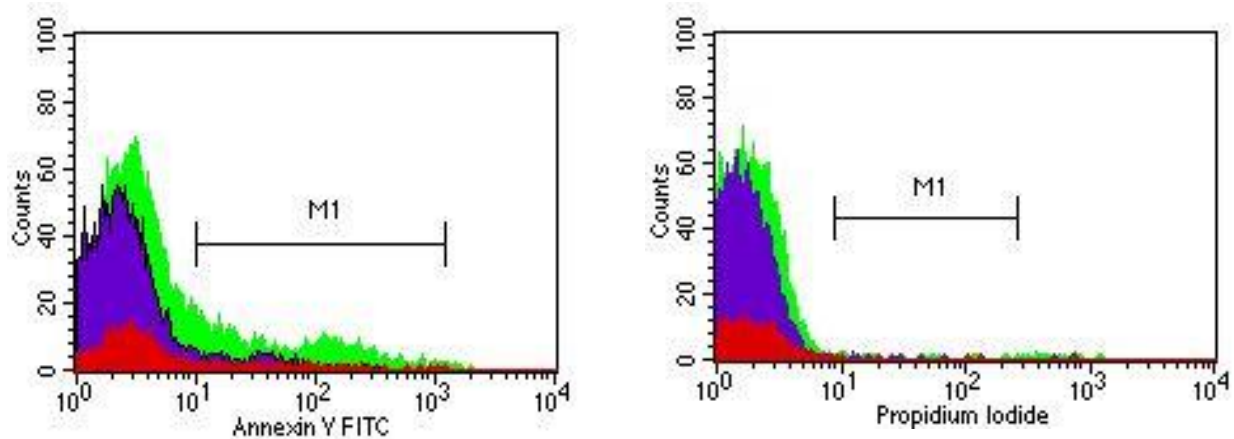


Рис. 3.28. Результати проточної цитофлуориметрії. Гістограми розподілу лімфоцитів у контролі (червона лінія), при загостренні РА (зелена лінія) та у стані ремісії (фіолетова лінія). Зліва – клітини у стадії апоптозу, справа – мертві клітини. Канали флуоресценції FL1 та FL3 (алексин V та пропідій йодид відповідно, вісь абсцис - відн. од, вісь ординат - число клітин). Маркер M1 – відображає інтенсивність флуоресценції.

Підсумок. У експериментальних тварин при гострому запаленні аналогічно як і у пацієнтів із загостренням РА спостерігалось зниження рівня апоптичних клітин у 1,5 рази, а при хронічному запаленні та у хворих в стадії ремісії РА – зростання рівня апоптичних клітин практично в 2 рази.

Розвиток клітини відбувається через основні фази клітинного циклу: пресинтетичний (активного росту) G0/G1, синтетичний S (синтез ДНК), премітотичний G2 і M (мітозу), які відносяться до висококонсервативних процесів. Використання пропідій йодиду, який має високу спорідненість до нуклеїнових кислот, робить можливим виявлення фрагментацій ДНК у апоптотичних клітинах (популяція pre-G1). При дослідженні клітинного циклу лімфоцитів периферичної крові 38 пацієнтів з РА та 10 здорових донорів були виявлені статистично достовірні зміни (рисунок 3.29). Спостерігалось достовірне ($P \leq 0,05$) зростання кількості фази пре-G1 в 5 разів у пацієнтів з РА ($3,43 \pm 0,52\%$) порівняно з групою здорових осіб ($0,68 \pm 0,11\%$), що свідчить про порушення балансу між клітинною проліферацією та клітинною смертю [158].

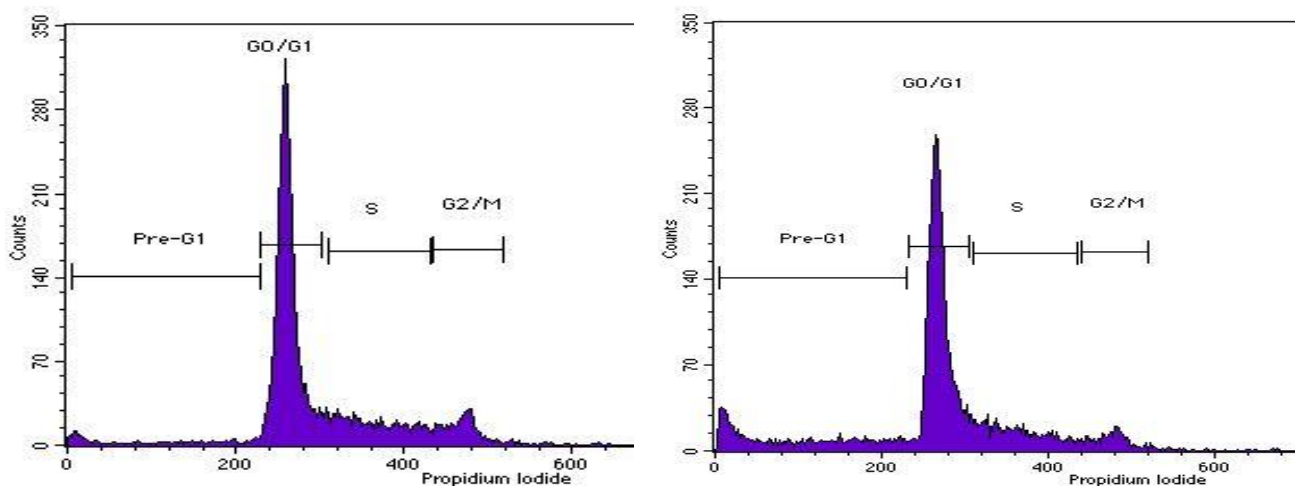


Рис. 3.29. Результати проточної цитофлуориметрії клітинного циклу лімфоцитів периферичної крові людини у контролі (зліва) та при загостренні РА (справа). Канал флуоресценції FL3 (пропідій йодид, вісь абсцис - відн.од, вісь ординат - число клітин). G0/G1, S, G2/M – фази клітинного циклу, Pre-G1 – апоптотичні

клітини.

При цьому продукти деградації апоптичних клітин (апоптичні тільця) окиснюються з утворенням “вторинного некротичного матеріалу”, який виявляє антигенні властивості щодо власного організму. Це призводить до порушення толерантності (аутоімунізації) та хронічної персистенції запального процесу при РА.

Р. Білий та співавтори виявили нові біохімічні маркери запрограмованої смерті клітини (апоптозу), які стали доступними для аналізу без необхідності руйнування цілісності клітини. Дане дослідження дозволяє виявити ранні стадії апоптозу, оскільки відображає зміни плазматичної мембрани у хворих на РА [158].

При проведенні лектин-індукованої аглютинації лімфоцитів периферичної крові 23 пацієнтів з РА та 19 здорових осіб спостерігалися достовірні позитивні кореляції між класом аглютинації (величина обернена до концентрації лектину, необхідної для аглютинації, і пропорційна до кількості апоптичних клітин у популяції) та важкістю хвороби. Так, у пацієнтів з РА із загостренням хвороби спостерігалася та мінімальна концентрація лектину (7,8 мкг/мл), яка необхідна для аглютинації апоптичних клітин, що відповідає найвищому класу аглютинації. При досягненні ремісії хвороби ступінь аглютинації зменшувалася і, відповідно, зростала концентрація лектину, необхідного для зв'язування апоптичних клітин [159].

Даний тест (рисунок 3.30) характеризує цитотоксичну імунопатологічну реакцію, яка може передувати розвиткові антитіло-залежної реакції в патогенезі РА. Визначення апоптозу імунокомпетентних клітин у хворих із аутоімуними хворобами сполучної тканини сприятиме визначенню ступеня активності та стадії тяжкості захворювання.

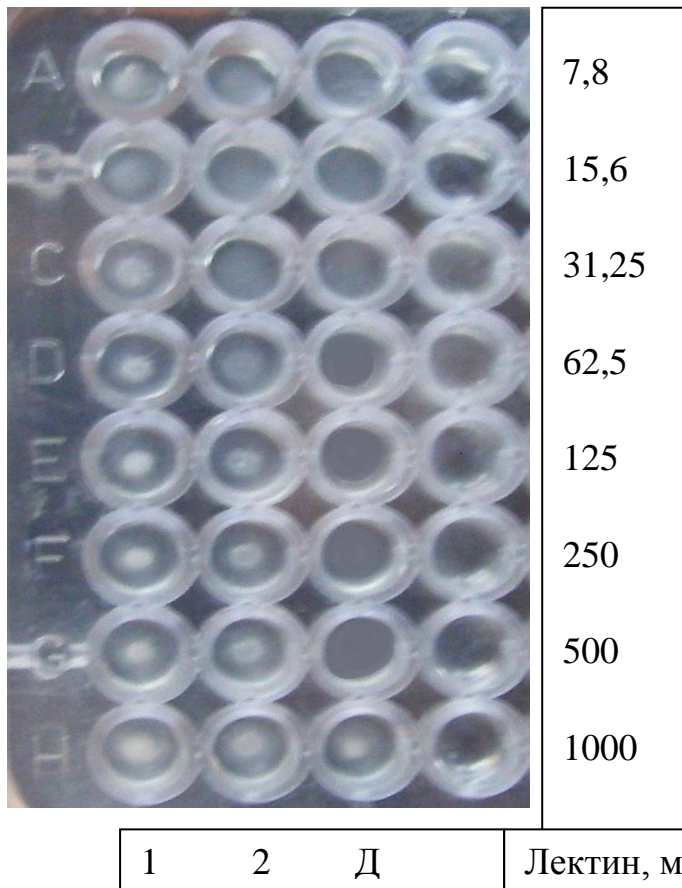


Рис. 3.30. Лектин-індукована аглютинація периферичної крові лімфоцитів людини для визначення апоптотичних клітин: 1 – лімфоцити периферичної крові пацієнта при загостренні РА, 2 - лімфоцити периферичної крові пацієнта у стадії ремісії РА, Д – здоровий донор. (Наявність клітинного матеріалу в центрі лунки свідчить про аглютинацію лімфоцитів).

Підсумок. Залежно від стадії запального процесу спостерігалися зміни рівня апоптозу. На тваринних моделях гострого імунозапального артрити спостерігалось гальмування процесу апоптозу.

При хронічному артриті у експериментальних тварин зростала кількість апоптотичних клітин, що корелювала із дослідженнями процесів апоптозу у хворих на РА, які були підтверджені різними методами.

3.6 Протеолітична (каталітична) активність препаратів імуноглобулінів за умов хронічного запалення

Метою даного дослідження було виявлення протеолітичної активності IgG сироватки крові щурів з експериментальним колаген-індукованим артритом.

Першим завданням було виділити IgG з сироватки крові імунізованих і контрольних тварин та перевірити на присутність протеолітичної активності до

можливих протеїнових антигенів. У сироватці крові імунізованих і контрольних тварин була відсутня протеолітична активність до колагену бика II типу, яка відображена на рис. 3.31А.

З іншого боку, IgG очищені з сироватки крові щурів з експериментальним колагеновим артритом здатні розщеплювати гістон H1, складову частину загальних гістонів тимусу теляти (рис.3.31Б).

IgG ізольовані з неімунізованих тварин не виявляли такої активності. Не спостерігалася також деструкція кірових гістонів IgG в імунізованих і контрольних тварин [160].

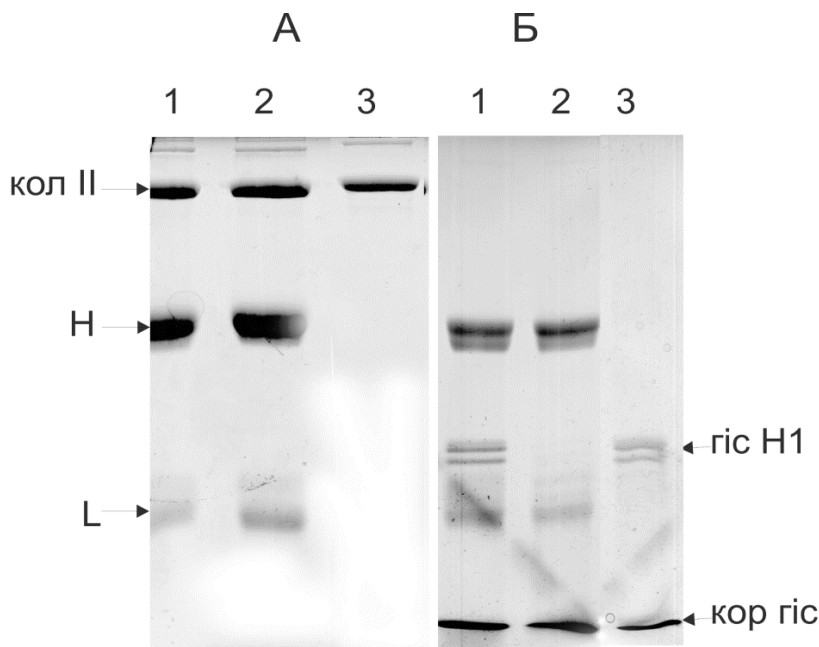


Рис. 3.31. Електрофореграма аналізу протеолітичної активності щодо бичачого колагену II типу (А) і гістонів тимусу теляти (Б) у препаратів Ig G, очищених із сироватки крові імунізованих та неімуноізованих (контрольних) щурів. Доріжки 1 – неімунізовані (контрольні) тварини. Доріжки 2 – тварини на 36-й день після імунізації. Доріжки 3 – контрольні препарати колагену II (А) і загальної фракції гістонів (Б) за відсутності доданих препаратів Ig G. Зліва на рисунку вказано положення на гелі колагену II типу (кол II), а також важких (Н)

і легких (L) ланцюгів IgG. Справа вказано положення на гелі гістона H1 і кіркових гістонів тимусу теляти (кор гіс).

Наступним кроком було дослідження здатності IgG розщеплювати гістон H1 та гідролізуючої активності до інших протеїнових субстратів. Було виявлено, що IgG сироватки крові експериментальних тварин розщеплює гістон H1 (рис. 3.32, лінії 5, 5'). Серед інших пептидних продуктів спостерігалася висока гідролітична активність основного протеїну мієліну (ОПМ) (рис. 3.32, лінії 4, 4'). В той же час не спостерігалася гідролізуюча активність до альбуміну сироватки бика (БСА) та казеїну (рис. 3.32, лінії 2, 2', 3, 3') [161].

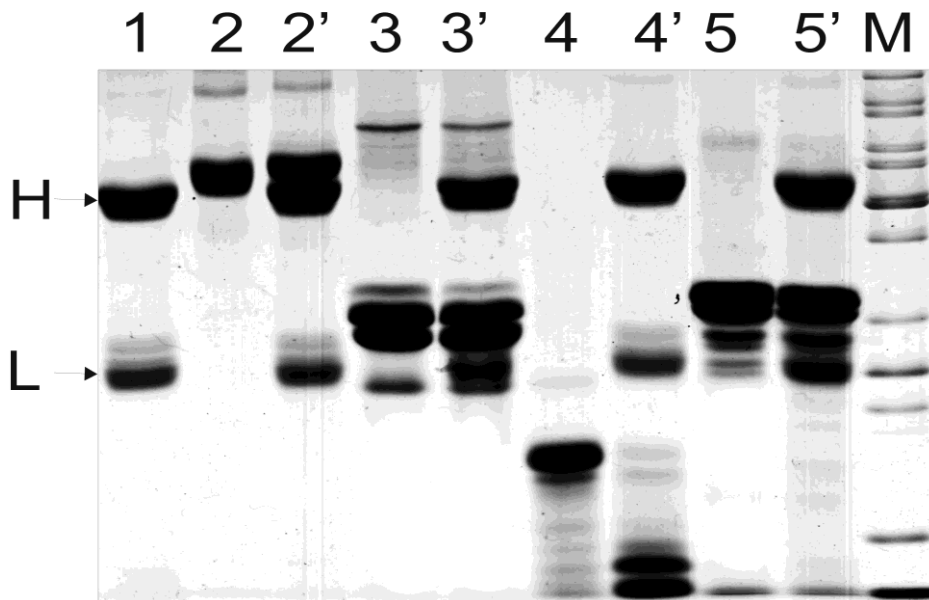


Рис. 3.32. Електрофореграма аналізу протеолітичної активності препаратів IgG, очищених із сироватки крові імунізованих щурів. Доріжка 1 – препарат IgG; 2, 2' – бичачий сироватковий альбумін; доріжка 3, 3' – казеїн коров'ячого молока; 4, 4' – основний протеїн мієліну бика; 5, 5' – гістон H1 бика. Доріжки 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 до низу - 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.

Отримані результати вказують на те, що при хронічному запаленні в організмі утворюються антитіла із селективною протеолітичною активністю. Вище вказане припущення підтверджується в іншій тваринній моделі, де хронічне запалення у мишей лінії BALB/c індукуються імунізацією гістонами тимуса теляти. Результати імунізації представлені на рис. 3.33 та вказують на те, що ці антитіла характеризуються вузькою специфічністю до нативних (не денатурованих) і поліреактивністю до денатурованих протеїнів. У першому випадку спостерігали здатність IgG-антитіл зв'язуватися із гістонами тимуса теляти, а у другому – було виявлено ширшу антигенну специфічність антитіл, оскільки вони зв'язувалися з лізоцимом, гістонами та ОПМ. Ці дані свідчать про те, що імунізація мишей препаратом тотальних гістонів тимуса теляти може спричинити синтез антитіл з антигенною специфічністю щодо широкого спектру позитивно заряджених протеїнів [162].

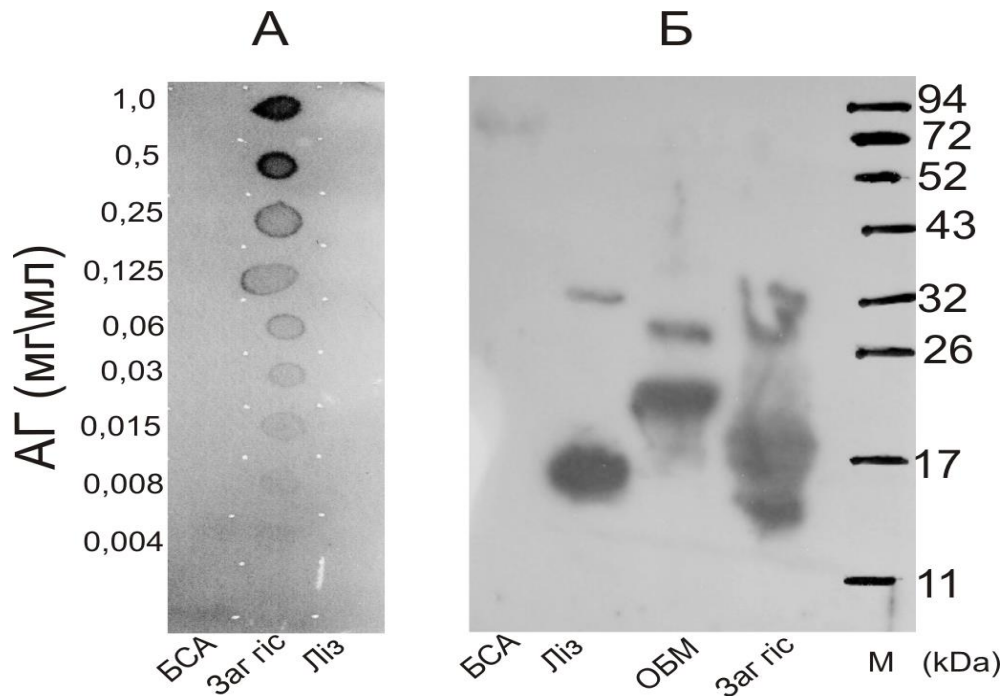


Рис. 3.33. Дот-блот- (А) і Вестерн-блот-аналіз (Б) антигенної специфічності Ig G-антитіл сироватки крові імунізованих мишей. Зліва зазначено кількість антигену, нанесеного на нітроцелюлозну мембрану. БСА – бичачий сироватковий альбумін, Заг.гіс. – фракція сумарних гістонів тимусу

теляти, Ліз. – лізоцим курячого яйця, ОПМ – основний протеїн мієліну. М – маркери молекулярної маси протеїнів.

Після очистки антитіл із сироватки крові провели аналіз їх протеолітичної активності щодо різних протеїнових субстратів. Протеїновими субстратами протеолітичної реакції слугували ОПМ, лізоцим, цитохром С, макроглобулін, казеїн, овальбумін, БСА, гістон Н1 і препарат загальних гістонів (містять гістон Н1 і кóрові гістони). Встановлено, що очищені IgG-антитіла (рис. 3.34 А) з високою ефективністю руйнують гістон Н1, ОПМ і кóрові гістони тимуса теляти з утворенням низькомолекулярних продуктів реакції (рис. 3.34 Б). У той самий час ці ж антитіла були неактивні щодо гідролізу решти протеїнових субстратів (лізоцим, цитохром С, макроглобулін, казеїн, овальбумін, БСА).

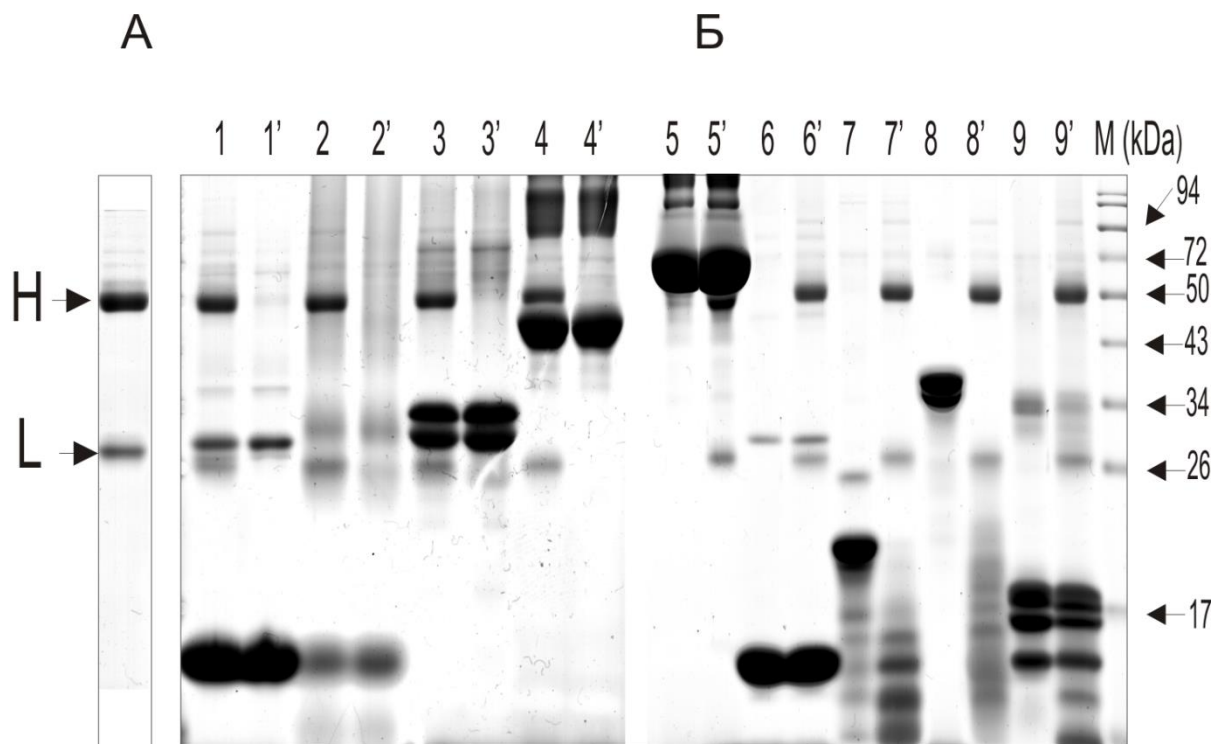


Рис. 3.34. Визначення протеолітичної активності IgG-антитіл сироватки крові імунізованих мишей. А – DS-Na-електрофорез в 15%-му ПААГ IgG-антитіл, очищених хроматографією на протеїн G-сефарозі. Стрілками вказано положення важких (H) і легких ланцюгів (L) IgG на гелі. Б – електрофоретичний аналіз продуктів гідролізу протеїнів: 1, 1' – цитохром с; 2,

2' – макроглобулін; 3, 3' – казеїн; 4, 4' – овальбумін; 5, 5' – бичачий сироватковий альбумін; 6, 6' – лізоцим; 7, 7' – основний протеїн мієліну; 8, 8' – гістон Н1, 9, 9' – фракція загальних гістонів. 1–9 – протеїни інкубували із IgG-антитілами, 1'–9' – протеїни інкубували за відсутності антитіл (контроль). М – маркери молекулярних мас протеїнів.

Для визначення кінетичних параметрів протеолітичної реакції додатково провели гель-фільтрацію за умов ВЕРХ. Аналізували хроматографічний пік, який за молекулярною масою відповідав IgG (рис. 3.35, А), встановлено, що хроматографічно очищені IgG-антитіла гідролізують корові гістони тимуся теляти (рис. 3.35, Б), а кінетичні параметри цієї реакції становлять: $K_m = 1,4$ і $V_{max} = 0,11$. Одержані дані вказують на те, що протеолітичну активність щодо корових гістонів мають антитіла із низькою афінністю до протеїнових субстратів.

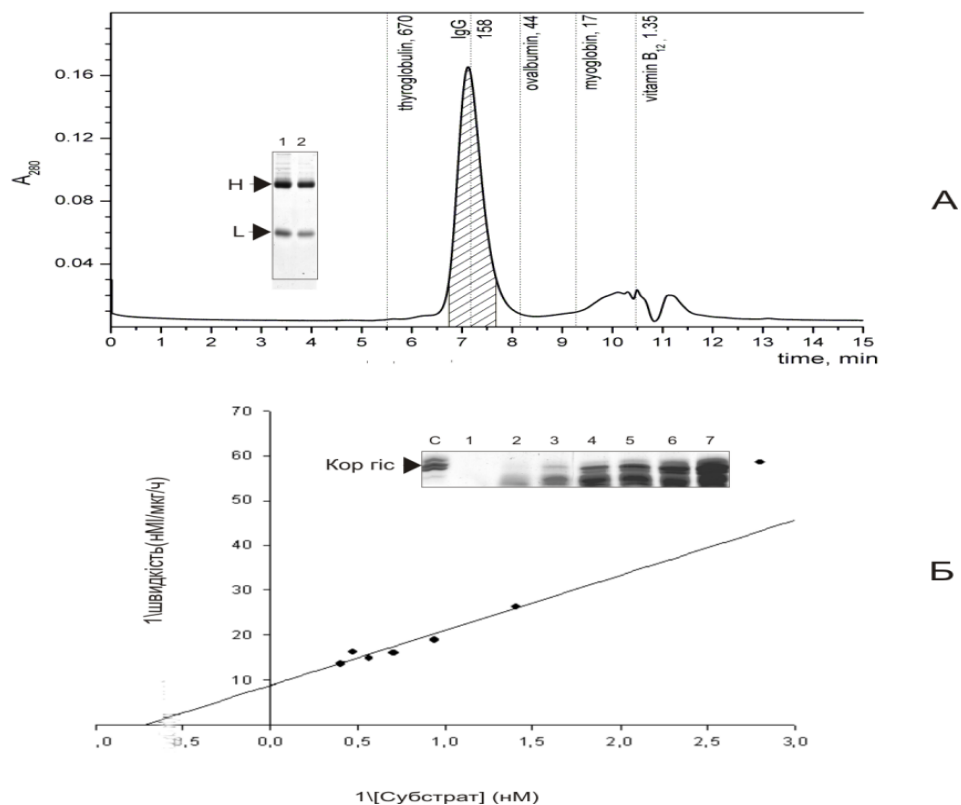


Рис. 3.35. Аналіз протеолітичної активності IgG-антитіл сироватки крові імунізованих мишей щодо корових гістонів. А – гель-фільтрація IgG-антитіл на

колонці Bio-Sil SEC 250 методом ВЕРХ. Фракція, що відповідає піку IgG була використана для дослідження протеолітичної активності. На вставці показано електрофореграму препаратів IgG, очищених хроматографією на протеїн G-сефарозі (доріжка 1) і наступною гель-фільтрацією (доріжка 2). В – кінетичні параметри гідролізу корових гістонів препаратом IgG в координатах Лайнуївера-Берка. На вставці наведено електрофорез продуктів гідролізу у 15%-му ПААГ за присутності 0,1% ДДС-Na. С – гістони за відсутності антитіл (контроль). 1–7 – гістони в концентрації 0,5–3,0 нМ, інкубовані впродовж 6 год із IgG-антитілами.

Як контроль використовували сироватку крові неімунізованих мишей лінії BALB/c (рис. 3.36). Вивчення одержаних препаратів показало відсутність протеолітичної активності щодо ОПМ, а також гістону H1 і корових гістонів тимусу теляти.

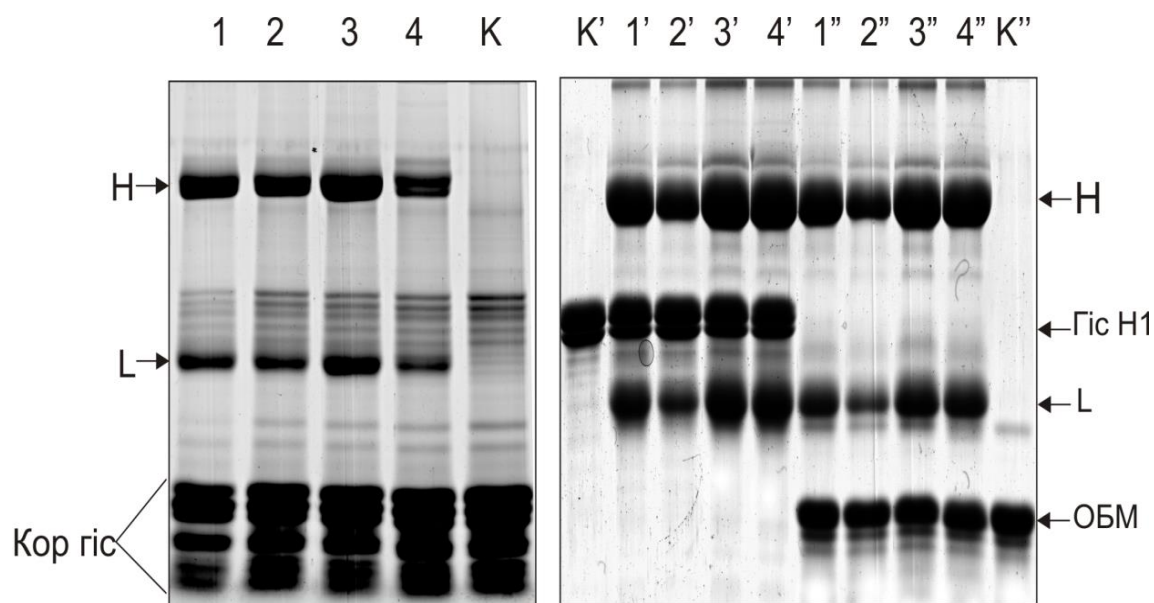


Рис. 3.36. Результати електрофоретичного визначення протеолітичної активності препаратів IgG-антитіл, очищених хроматографією на протеїн G-сефарозі із сироватки крові контрольних (неімунізованих) мишей щодо корових гістонів (1–4), гістону H1 (1'–4') та основного протеїну мієліну (1''–4''). К, К', К''

– загальні гістони, гістон H1 і ОПМ (контроль). Стрілками вказано положення на гелі важких (H) і легких (L) ланцюгів, кóрових гістонів (кор. гіс), гістону H1 і основного протеїну мієліну (ОБМ)

Нами встановлено, що імунізація мишей лінії BALB/c призводить до появи у сироватці крові цих тварин IgG-антитіл із протеолітичною активністю. Ці дані свідчать про те, що імунізація тварин призводить до індукції протабзимів в організмі мишей.

Відомо, що гістони і антигістонові антитіла можуть брати участь у розвитку запальних та аутоімунних процесів [163, 164].

Також провели порівняння 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 руйнувати кóрові гістони тимуса теляти (рис. 3.37 А). При цьому жоден із 8 препаратів IgG-антитіл сироватки крові здорових донорів не мав протеолітичної активності щодо цих протеїнів (рис. 3.37 Б).

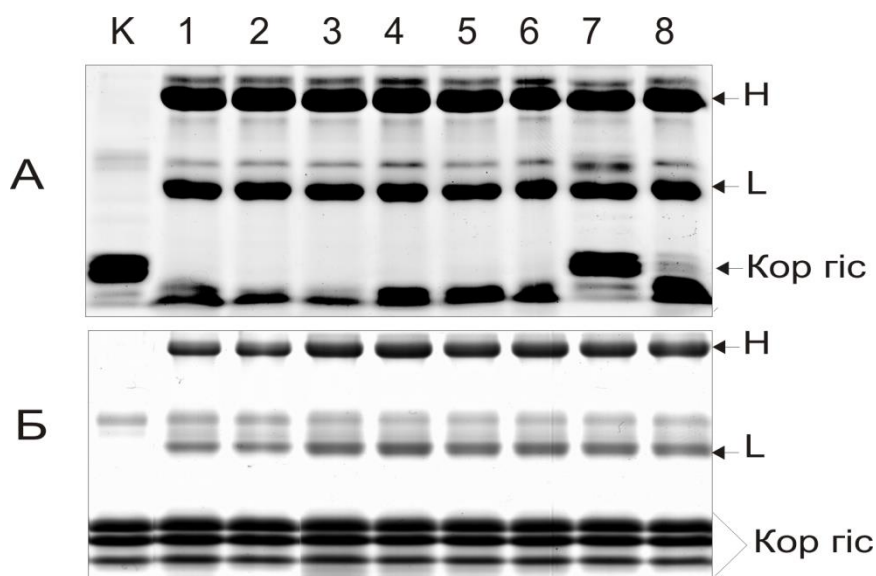


Рис. 3.37. Результати електрофоретичного визначення протеолітичної активності щодо загальних гістонів тимуса теляти препаратів IgG-антитіл,

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 (Н) і легких (L) ланцюгів IgG, а також корових гістонів. К – загальні гістони тимуса теляти за відсутності IgG-антитіл

В результаті проведених досліджень було встановлено, що в сироватці крові колаген-індукованих щурів присутні антитіла, які здатні руйнувати гістон H1 та ОПМ. Протеолітично активні антитіла із подібною субстатною специфічністю були виявлені у сироватці крові імунізованих гістонами мишей та у сироватці крові хворих на РА.

Підсумок. Вперше показано, що IgG, очищені з сироватки крові щурів з експериментальним РА, здатні розщеплювати гістон H1, складову частину загальних гістонів тимусу теляти. Спостерігалась також протеолітична активність препаратів IgG-антитіл, очищених хроматографічно на протеїн G-сефарозі із сироватки крові мишей щодо корових гістонів, гістону H1 та основного протеїну мієліну. Препарати IgG-антитіл сироватки крові хворих на ревматоїдний артрит здатні руйнувати корові гістони тимуса теляти. При проведенні досліджень методом проточної цитометрії встановлені значні зміни фагоцитарної здатності моноцитів та нейтрофілів та їх оксидативної активності. При оксидативному вибуху в експериментальних тварин відмічалось значне зростання швидкості генерації гідроксильного на супероксидного радикалів, вмісту гідроген пероксиду, аргіназної активності, малонового діальдегіду, рівня сигнальних молекул гідроген сульфід та синтази нітроген (II) оксиду. Зміни процесів апоптозу при різних стадіях запальних процесів відображали розвиток захворювання РА.

РОЗДІЛ 4

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Ревматоїдний артрит (РА) належить до найбільш розповсюджених і важких хронічних захворювань суглобів і характеризується хронічним ерозивним артритом (синовіїтом) і системним ураженням внутрішніх органів [18]. Відомо, що характер клінічних варіантів перебігу РА певною мірою зумовлений особливостями імунозапальних реакцій, але механізм виникнення та розвитку їх у хворих на РА залишається остаточно нез'ясованим [165]. Хронізація запального процесу вказує, що в даному організмі має місце порушення імунної регуляції – збою імунних механізмів контролю над запаленням [164, 166] на тлі супресії імунної відповіді [167]. На сьогоднішній день первинно хронічний запальний процес часто розцінюють як гострий через тривалий скритий безсимптомний перебіг. Хронічне запалення може також розвиватися у відповідь на змінений «власний», або аутологічний антиген, який формується під впливом пошкоджувального фактора. Останнє особливо характерно для ревматоїдних захворювань, особливістю яких є порушення елімінаційної здатності імунних механізмів щодо потенційно патогенних агентів [5]. Цей збій механізмів імунного захисту провокує наступний розвиток аутоімунних реакцій [168].

Тваринні моделі ревматоїдного артриту широко використовують при дослідженні патогенезу запальних артритів. Більшість моделей РА мають певні патологічні особливості, подібні до тих, які є у хворих людей. Важливі відмінності включають: 1) розвиток хвороби у тваринних моделей РА є швидшим, ніж у людини і характеризується гострою запальною відповіддю; 2) у гризунів спостерігають потужну кісткову резорбцію і формування кісткової тканини (особливо періостальна/ендостальна) у відповідь на запалення суглобів. Використання тваринних моделей РА вносить значний вклад в загальні знання процесів/медіаторів розвитку запалення, деструкції хряща і

резорбції кістки [15]. За останніми даними літератури, експериментальну модель колагенового [10-13], та ад'ювант-індукованого [14], артритів дедалі частіше використовують для вивчення нових механізмів формування аутоімунного процесу. Зокрема, в експерименті показано, що, крім клітинних та молекулярних механізмів реалізації запалення та дисрегуляції імунної відповіді, у його формуванні значну роль відіграють метаболічні процеси. Зокрема, у щурів знайдено гени, які, окрім детермінації функції Т-хелперів чи В-лімфоцитів, відповідають за зміни факторів природженого (неспецифічного) імунітету (ензими, гострофазові протеїни), які також призводять до розвитку хронічного запалення суглобів [13].

Нами були використані моделі гострого (карагенінового) та хронічного (колагенового) запальних процесів у щурів, поряд із дослідженням загострення та хронічної стадії ревматоїдного артрити в людини. Активність ензимів плазми крові є важливим показником функціонального стану життєво важливих органів та інтенсивності перебігу процесів обміну речовин в організмі. Активність ензимів печінки відображає інтенсивність процесів у тканинах організму. Амінотрансферази каталізують процеси трансамінування, забезпечуючи синтез окремих амінокислот в організмі. АлАТ є показником цитолізу і найбільш чутливим показником мінімального ураження печінки. Результати наших досліджень свідчать про достовірне ($p < 0,05$) підвищення активності АлАТ у 1,4 рази лише у щурів на моделі хронічного запального процесу, порівняно з показниками гострого запалення і контрольними значеннями. Встановлено також достовірне зростання активності АсАТ в крові щурів дослідних груп порівняно з інтактними щурами, а також її зростання у 1,5 і 1,4 рази при колагеновому і карагеніновому артриті, відповідно, порівняно з контролем ($p < 0,05$).

Рівень креатиніну, який є важливим компонентом залишкового азоту і необхідний для функціонування біоенергетичних молекулярних систем в організмі, не змінювався в дослідних групах, порівняно з контрольною ($p > 0,05$). Рівень сечовини (кінцевий продукт знешкодження аміаку), який утворюється в

печінці, був у 1,3 рази більший при карагеніновому артриті порівняно з колагеновим артритом та контрольною групою, що вказує на незначне порушення видільної функції нирок. Що стосується сечової кислоти, яка є кінцевим продуктом розпаду пуринових нуклеотидів, то при гострому запальному процесі, як і при хронічному спостерігалось достовірне ($p < 0,05$) зростання концентрації сечової кислоти у 2,8 і 4 рази відповідно порівняно з контрольною групою тварин.

Зростання рівня активності амінотрансфераз у сироватці крові відображає патологічні зміни і пошкодження клітин печінки. Збільшення активності сечовини і сечової кислоти, які є проміжними продуктами протеїнового обміну, а також і низькомолекулярними антиоксидантами, сприяють інактивації вільних кисневих радикалів.

Отже обидві використані в роботі експериментальні моделі виявилися придатними для демонстрації гострого і хронічного запальних процесів в організмі. Зростання значення біохімічних маркерів запалення відображає порушення метаболізму, які відбуваються загалом в організмі, а не лише в окремо взятому органі. Ці зміни більше виражені при колаген-індукованому артриті в щурів - аналогу ревматоїдного артрити (РА) у людини.

Використовуючи створені тваринні моделі, ми вивчили протеїновий склад крові щурів. Характер запального процесу, як і загальний стан організму, відображає зміна концентрації протеїнів у біологічних рідинах. Вміст альбумінів у використаних моделях мав лише тенденцію до зниження. При дослідженні гама-фракції при карагеніновому артриті достовірно підвищувався вміст $\alpha 1$ - та $\alpha 2$ -фракції, відповідно, у 1,6 та 1,3 рази, а при колагеновому артриті – тільки γ -фракція у 1,3 рази порівняно з контролем. Отримані нами дані вказують, що у щурів, імунізованих карагеніном, розвинувся артрит, який, згідно з даними ензиматичного статусу (підвищені рівні ЛФ, АсАТ, сечовини і сечової кислоти) та змінами у протеїнограмі (зростання фракцій $\alpha 1$ - та $\alpha 2$ -глобулінів, зниження γ -фракції) характеризувався як гострий запальний процес. У щурів, імунізованих колагеном, розвинулося запалення суглобів, що

характеризувалося підвищеними рівнями ЛФ, АлАТ, АсАТ і сечової кислоти та змінами у протеїнограмі (зростання вмісту $\alpha 2$ -глобулінів та γ -фракції), що відповідало хронічній стадії запального процесу.

Логічно було дослідити зміни, які відбуваються у пацієнтів з РА. При дослідженні протеїнових фракцій ми відмічали подібні зміни: при загостренні РА було незначне зниження фракції альбумінів та зростання глобулінової фракції за рахунок $\alpha 1$ та $\alpha 2$ -глобулінів, а на стадії ремісії захворювання – зростання $\alpha 2$ -глобулінів та γ -фракції. Тому наступним етапом було вивчити вплив імунних клітин при різних стадіях запального процесу. Ми припустили, що при різних моделях запального процесу відбуваються відмінні функціональні зміни у імунокомпетентних клітинах. Якщо при гострому запальному процесу має місце акумуляція нейтрофілів, то хронічне запалення характеризувалося інфільтрацією мононуклеарних імунних клітин – моноцитів/макрофагів, а також тканинною деструкцією і фіброзом.

Використовуючи метод проточної цитометрії, ми визначали поглинальну здатність нейтрофілів в експериментальних тварин у тестах спонтанного і стимульованого фагоцитозу, а також активність «оксидативного вибуху» (спонтанного та стимульованого). Встановлено достовірне ($p < 0,05$) зростання спонтанної фагоцитарної здатності нейтрофілів при карагеніновому артриті в 1,8 рази та при колагеновому артриті в 1,4 рази порівняно з контрольними значеннями, що відповідає результатам досліджень інших науковців [153]. Що стосується показників стимульованої *E. coli* поглинальної здатності нейтрофілів (який відображає їх фізіологічну здатність), достовірне ($p < 0,05$) зниження їх здатності до поглинання як при карагеніновому у 1,6 рази, так і при колагеновому артриті у 1,4 рази, порівняно з інтактними щурами, що відповідало результатам інших досліджень. Зниження фагоцитарної здатності нейтрофілів сприяло зниженню кліренсу імунних комплексів [152]. За даними наших досліджень була підвищена концентрація циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) у крові. При карагеніновому запаленні спостерігалось

зростання рівня ЦІК у 1,5 рази, а при колагеновому в 1,4 рази порівняно з контрольною групою тварин.

Утворення імунних комплексів у тканинах суглоба призводить до подальшого утворення антитіл і хронізації запального процесу. Фагоцитоз надлишкових ЦІК викликає і посилює запалення не лише у синовіальній оболонці і суглобі, а також спостерігається їх відкладання у різних органах (нирки, шкіра, судинна стінка тощо), що призводить до запальних процесів в уражених органах. Зростання спонтанної і зниження стимульованої фагоцитарної здатності нейтрофілів в обох експериментальних моделях запального процесу вказувало на значну активацію клітин в місці виникнення запального процесу та ослаблений кліренс імунних комплексів [152]. Нейтрофіли вносять важливий внесок в активацію макрофагів та їх міграцію у місце запального процесу. При активації вони генерують різні хемотактичні чинники, які впливають на моноцити/макрофаги.

Що стосується фагоцитарної здатності моноцитів, то зростання спонтанної (фізіологічної) їх здатності спостерігалось лише при гострому запальному процесі в 3 рази, а після стимуляції ця здатність моноцитів залишалася низькою, що свідчило про низьку резервну здатність цих клітин. При дослідженні оксидативних процесів нейтрофілів та моноцитів периферичної крові експериментальних тварин як при карагеніновому, так і при колагеновому артриті спостерігали значну активацію фізіологічної здатності, що свідчило про значні патологічні порушення в місці запалення. При вивченні спонтанної оксигензалежної активації нейтрофілів виявлено повернення до норми, а моноцитарна активність залишалася низькою. Ці результати досліджень доводять, що ослаблення фагоцитарних процесів у нейтрофілах, свідчать про підвищений ризик розвитку бактерійних інфекцій, що в подальшому призведе до розвитку інфекційних процесів та хронізації аутоімунного запалення.

У пацієнтів з РА спостерігали значні зміни фагоцитарної активності, як при загостренні РА, так і в хронічній стадії захворювання. Виявлено значне

посилення спонтанної фагоцитарної здатності нейтрофілів та моноцитів, причому більшою мірою при загостренні РА. Після стимуляції нейтрофіли, як клітини першої лінії імунного захисту, виявляли фагоцитарну здатність, аналогічну до осіб контрольної групи. Що стосується фагоцитарної здатності моноцитів, то при загостренні РА вона була вірогідно вищою, ніж у контролі та в стадії ремісії, а резервна їх здатність до поглинання була суттєво зниженою. Зниження фагоцитарної здатності фагоцитів корелює з підвищеною концентрацією ЦІК, особливо у хворих на РА при загостренні та у щурів із колагеновим артритом. Нейтрофіли при РА, поглинаючи імунні комплекси, виділяють вільні радикали кисню та гідролітичні ензими, які активно знищують хрящ. Моноцити і макрофаги підтримують запальні процеси не тільки в синовіальній оболонці суглоба, і у периферичних органах, сприяючи розвитку позасуглобових ушкоджень.

Тому тваринна експериментальна модель гострого запалення, спричиненого карагеніном при дослідженні фагоцитарної (поглинальної) здатності відповідає загостренню РА у людини, а артрит, спричинений колагеном у щурів, відображає фагоцитарну активність при хронізації захворювання РА.

Процес активації імунокомпетентних клітин супроводжується посиленням вільнорадикального окиснення. Циркуючі нейтрофіли містять невелику кількість мітохондрій, і у фазі спокою використовують незначний об'єм кисню. Однак, стимуляція поверхневих мембран фагоцитів призводить до різкого збільшення використання кисню, продукції активованих кисневих метаболітів (O_2^{\cdot} , H_2O_2 , $\cdot OH$, O_2^* , NO , NO_2 , NO_3 та ін.), активації гексозомонофосфатного шунта [62]. При хронічному запаленні спостерігалася висока продукція активних форм кисню та нітрогену. В експериментальній групі тварин нами виявлено значне підвищення концентрації вільних радикалів кисню, порівняно з інтактною групою тварин. Наведені нами дані свідчать про підвищену генерацію гідроксильного ($\cdot OH$) і супероксидного ($\cdot O_2^-$)

радикалів, а також нітроген (II) оксиду (NO), що відбувається внаслідок утворення і розщеплення пероксинітриту (ONOO⁻) (табл. 13).

Таблиця 13

Порівняння деяких біохімічних показників крові щурів, імунізованих карагеніном і колагеном

Дослідження	Гостре запалення, викликане карагеніном		Хронічне запалення, викликане колагеном	
	показник	% від контролю	показник	% від контролю
Сечова кислота	85,01±10,55	282	128,68±28,55	426
Фагоцитарна активність моноцитів без стимуляції	7,1±0,71	295	2,3±0,3	100
Апоптоз лімфоцитів	3,43±0,45	67	9,19±0,97	180
Швидкість генерації •ОН	370,33±154,46	376	450,14±79,59	457
Швидкість генерації O ₂ [•]	3,81±1,64	235	14,93±2,52	922
Вміст H ₂ O ₂	232,1±97,33	182	1005,1±66,5	789
Вміст NO ₂	49,43±3,52	163	134,04±72,61	441
Вміст NO ₃	706,18±50,39	203	2867,3±1185,1	823
Концентрація аргінази	11,91±3,45	722	13,89±3,86	842
Співвідношення неокисного/окисного метаболізму ARG\NOS	287,13±75,66	592	235,94±27,22	486

Швидкість генерації O₂[•], який є маркером активності прооксидазних нуклеотидних ксантин- і НАДФН-оксидаз, ліпідних циклооксигенази і ліпоксигенази (генераторів супероксиду) при карагеніновому артриті достовірно (P<0,05) зросла у 2 рази, як і вміст H₂O₂ порівняно з контролем. Що стосується хронічного запального процесу, то при колагеновому артриті

спостерігалися наступні зміни: швидкість генерації $\bullet\text{OH}$ достовірно зросла у 4,5 рази, а активність $\text{O}_2^{\bullet-}$ – у 9 разів, порівняно з контролем. Вміст H_2O_2 при колагеновому артриті достовірно зріс у 8 разів, порівняно з інтактною групою тварин. При карагеніновому артриті спостерігали достовірне ($p < 0,05$) зниження у 1,6 рази частки фізіологічної cNOS, порівняно з контрольною групою тварин.

Активність індукбельної *de novo* синтази нітроген (II) оксиду (iNOS) достовірно зростала за умов гострого запального артрити у 1,6 рази ($p < 0,05$) порівняно з контрольною групою тварин [154]. При хронічному запальному процесі сумарна активність NOS, який є маркером окисного метаболізму L-аргініну достовірно ($p < 0,05$) зростала у 1,7 рази порівняно з контрольною групою тварин. Активність (Ca-незалежного) індукбельної *de novo* синтази нітроген (II) оксиду достовірно зростала у 2,6 рази, порівняно з контрольною групою тварин. Також спостерігали достовірну різницю між дослідними групами щодо вказаних показників: при колагеновому артриті рівень iNOS достовірно зріс у 1,6 рази, порівняно із карагеніновим артритом. При колагеновому артриті спостерігали достовірне ($p < 0,05$) зниження у 2,1 рази частки cNOS, порівняно з часткою фізіологічного cNOS у контрольних тварин.

Цитотоксична дія NO залежить від утворення NO_2^- та NO_3^- , які є сильними окисниками. Токсичність NO_2^- та NO_3^- зростає при низьких значеннях рН і під впливом мієлопероксидази фагоцитів. Нами виявлено достовірне зростання концентрації стабільних метаболітів NO_2^- при карагеніновому артриті у 1,6 рази, а NO_3^- - у 2 рази, порівняно з контрольною групою тварин. При колагеновому артриті активність NO_2^- достовірно зросла у 4,5 рази, а утворення NO_3^- на хронічній моделі запального процесу у 8,2 рази порівняно з контрольною групою тварин.

Оскільки під час «оксидативного вибуху» утворюються вільні радикали кисню, вони можуть пошкоджувати плазматичну мембрану клітин і сприяти втраті чинників антиоксидантного захисту. АФО виявляють шкідливу дію на проникаючі в організм мікробні та інші сторонні клітини (антитіла, вторинний некротичний матеріал тощо), здійснюючи таким чином захисну функцію [169].

Однак, ця захисна функція виявляється значною мірою умовною, оскільки при запальному процесі під час РА це стає причиною різного роду патологічних реакцій. Надмірне утворення $\bullet\text{OH}$ і пероксинітриту, як при карагеніновому, так і при колагеновому запаленні, безпосередньо корелювало з підвищеним вмістом H_2O_2 (особливо при хронічному запаленні), що може вказувати на деградацію поліамінів, які утворюються при метаболізмі аргініну за участі аргінази з утворенням сечовини та орнітину. Останній за допомогою орнітинамінотрансферази перетворюється у пролін, що бере участь у синтезі колагену та клітинній проліферації. Наявність такої кореляції вказує на те, що аргіназа може конкурувати із іNOS, оскільки лише вона здатна забезпечувати продукування значної кількості NO, необхідного для утворення пероксинітриту, та його деградацію з утворенням $\bullet\text{OH}$. Аргіназа конкурує за спільний субстрат – аргінін із конститутивними NOS, причому й сама аргіназа активується при підвищенні пулів H_2O_2 [170, 171]. Це доводить, що збільшення активності аргінази (у 7 разів при карагеніновому та у 8 разів при колагеновому запаленні) сприяє зниженню рівня синтезу NO індукційною NO-синтазою і виснаженню запасів аргініну в клітині, що ще більше посилює токсичний вплив активних метаболітів в організмі. Аргіназа, збільшуючи свою активність за умов запалення, обмежує використання аргініну для синтезу NO і збільшує доступність аргініну для утворення проліну, необхідного для синтезу колагену. Крім цього, при різних патологічних станах збільшується кількість інгібітора NO-синтази асиметричного диметиларгініну, що також порушує утворення NO [172].

За умов оксидативного стресу, коли NO взаємодіє з супероксид-аніоном і гідроксил-радикалом, залучається нітритредуктазний шлях утворення ендогенного синтезу NO, утворюються стабільні метаболіти NO_2^- та NO_3^- , які беруть участь у циклі оксиду азоту ($\text{NO} \rightarrow \text{NO}_2 \rightarrow \text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2 \rightarrow \text{NO}$) [173]. У нашому дослідженні вони були підвищеними, особливо при хронічному запаленні, що дає нам підстави говорити або про гальмування процесів окиснення NO (на тлі достатньо високої активності іNOS), або про більш

активне використання NO в інших реакціях метаболізму. Також відомо, що продукування NO в процесі нітритредуктазної реакції в 1000 разів вище інтенсивності NO-синтазної реакції [174].

Під час окисдатовного стресу усі ці зміни зумовлюють посилення процесів перекисного окиснення ліпідів. Інтенсифікація процесів вільнорадикального окиснення під дією АФО призводить до посилення пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), оксигеназної модифікації протеїнів, деструкції нуклеїнових кислот, вуглеводів, що спричиняє метаболічні порушення у клітинах. Однак, ПОЛ має важливе значення для оновлення біологічних мембран, зміни їх протеїнового та клітинного компонентів, регуляції фізико-хімічних властивостей мембран клітин та субклітинних структур [175].

При запальному процесі спостерігали підвищені концентрації біохімічних маркерів оксидатовного стресу (залежного від АФО) і нітрозатовного, що викликається активними формами нітрогену (АФН) – нітрогену (II) оксидом (NO), пероксинітрит-аніоном (ONOO^-) і продуктом його деградації NO_2^- , що спричиняли значні пошкодження не лише в місці запалення (суглобі), а й позасуглобовими змінами. Активність кальцій-залежних NOS виявилася низькою. Натомість спостерігалася висока активність кальцій-незалежної індубибельної NOS (особливо при хронічному запаленні). Вказаний процес значно підсилюється супероксидом. У цьому разі надлишковий нітроген (II) оксид, що продукується клітинами в ділянці запальних суглобів, активує процеси перекисного окиснення ліпідів з наступним пошкодженням клітинних мембран, формуванням фіброзних змін, що призводить до втрати функції суглоба і кістки.

Цікавими виявилися результати дослідження біологічно активного регуляторного медіатора – сірководню. Поруч із NO, гідроген сульфід (H_2S) належить до родини ендогенних сигнальних медіаторів – газотрансмітерів, що модулює більшість клітинних процесів, залучається у фізіологічні та патологічні процеси. Як відомо, H_2S впливає на запалення, оксидатовний стрес

через АФО, змінює судинний тонус та передачу нервових імпульсів [88]. H_2S може проявляти як прозапальні, так і антизапальні властивості. Ми припустили, що така ж дія буде відбуватися і на різних моделях імунного запалення. H_2S при надмірному синтезу, гіперполяризує мембрану клітини, сприяє розширенню судин і при гострих системних запаленнях посилює некротичні зміни у тканинах [87], зменшує експресію багатьох прозапальних цитокінів. H_2S блокує підвищення експресії iNOS та продукцію NO [88]. Виявлено, що H_2S у мілімолярних концентраціях може запускати запрограмовану загибель тканин із залученням мітохондріального шляху індукції апоптозу, активацією каспази 3 та родини MAP-кіназ [83]. Проведені нами дослідження виявили підвищення рівня гідроген сульфід у експериментальних груп тварин у 2 і 2,5 рази відповідно при гострому і хронічному запаленні. Спостерігали позитивну кореляцію між зростанням індукцибельної NOS, стабільних метаболітів NO_2 і NO_3 та рівнем гідроген сульфід. Зростання концентрації гідроген сульфід посилювало прозапальну відповідь, сприяючи порушенню в органах, пов'язаних з суглобом. Гідроген сульфід у мікромолярних концентраціях виявляє цитопротекторні властивості, які можуть бути пов'язані з його здатністю нейтралізувати активні форми молекул (наприклад, пероксинітриди, гіпохлоритну кислоту і гомоцистеїн) [83]. Збільшена продукція NO, опосередкована індукцибельною NO-синтазою, сприяє розширенню судин у місці запалення. Окрім цього, підвищення рівня гідроген сульфід збільшує активність нейтрофілів і рівень прозапальних цитокінів у тканинах. Таким чином, у нашому дослідженні доведено, що як і NO, так і H_2S , діючи синергічно, сприяють посиленню запальних процесів при розвитку запального процесу як гострого, так і хронічного, на що вказували посилення оксигензалежного пошкодження тканин як при карагеніновому, так і при колагеновому артриті.

Оскільки NO і H_2S впливають на процеси проліферації клітин та апоптозу, проведено дослідження апоптотичних явищ на різних стадіях запалення в щурів та в пацієнтів на РА. Як відомо, апоптоз підтримує баланс

клітин, порушення якого призводять до розвитку патологічних станів. Невиправдано низький рівень апоптозу здатний забезпечити виживання і нагромадження аномальних клітин, а підвищення активності запрограмованої клітинної смерті призводить до розвитку дегенеративних станів [176]. За гострого артриту спостерігали достовірне зниження ($P \leq 0,05$) майже у 1,5 рази кількості апоптичних лімфоцитів відносно лімфоцитів контрольних (неімунізованих) щурів. При хронічному (колагеновому) артриті спостерігалось достовірне зростання ($P \leq 0,05$) майже у 1,8 рази кількості апоптотичних лімфоцитів. При гострому запаленні спостерігалось підвищення кількості живих клітин, а при хронічному запаленні – збільшення кількості мертвих клітин. Вказані результати виявляли пряму кореляційну залежність від рівня оксиду азоту та вільних радикалів кисню. Таким чином, спостерігалися зміни рівня апоптозу залежно від стадії запального процесу. На тваринних моделях гострого імунзапального артриту спостерігалось гальмування процесу апоптозу. При хронічному артриті у експериментальних тварин зростала кількість апоптотичних клітин, що корелювала з дослідженнями процесів апоптозу в хворих на РА, які були підтверджені різними методами.

Відомо, що при аутоімунних захворюваннях апоптоз здійснюється за допомогою рецептор-опосередкованого шляху з використанням системи Fas-APО, екстерналізації фосфатидилсерину, і зміни глікопротеїнів плазматичної мембрани [158, 177, 178]. Оскільки основою аутоімунних захворювань є втрата толерантності до власних антигенів, відбувається синтез антитіл і апоптоз стає джерелом власних антигенів. Спостерігається гальмування процесів апоптозу за рахунок накопичення аномально змінених клітин та гіперплазії тканин. При накопиченні продуктів деградації апоптотичних клітин спостерігається окиснення їхніх компонентів з утворенням «вторинного некротичного матеріалу», який виявляє антигенні властивості щодо власного організму. Патологічні зміни апоптотичних клітин сприяють продукції аутоантитіл у організмі, що корелювало з виявленою гіперімунореакцією. Активовані нейтрофіли і моноцити з дефектами фагоцитозу не можуть видалити напр.

імунні комплекси чи невідомі антигени, і, утворюючи вільні радикали кисню в місці запалення, сприяють виживанню потенційно аутореактивних прозапальних клітин. У результаті втрати здатності імунної системи елімінувати активовані клітини, спостерігається їх тривала персистенція з утворенням аутоантитіл та прозапальних цитокінів, що ще більше підтримує хронічне запалення. Вказані дані підтверджуються результатами нашого дослідження, а саме зниженням активності фагоцитозу нейтрофілів та моноцитів при карагеніновому та колагеновому артриті.

Оскільки виникають проблеми із видаленням імунних комплексів при РА, логічним було дослідження функціонування антитіл, які самі можуть нейтралізувати антигени. Взаємодія антитіл із антигенами може призвести не лише до зв'язування, а й до руйнування або модифікації цих антигенів. Антитіла, які виявляють каталітичну активність, одержали назву каталітично активних антитіл або абзимів [161]. Важливою ознакою дослідження є те, що протеолітично активні АТ (протабзими) володіють вузькою субстратною специфічністю щодо протеїнів. Найбільш важливим результатом роботи було виявлення протеолітичної активності анти-гістон Н1 IgG, очищених з сироватки крові щурів з колагеновим артритом, мишей лінії BALB/c, імунізованих гістонами тимуса теляти і пацієнтів з РА [162]. Двохсубстратна каталітична активність ауто-АТ є відомою властивістю анти-ДНК-абзимів, очищених із сироватки крові хворих на РА, які можуть гідролізувати як ДНК, так і РНК [110]. Нами було встановлено, що препарати IgG сироватки крові щурів із колагеновим артритом здатні розщеплювати гістон Н1, складову частину загальних гістонів тимусу теляти, проте були каталітично неактивними щодо колагену II типу, казеїну, БСА (альбуміну сироватки бика) та корових гістонів. IgG сироватки крові неімунізованих щурів не виявляли протеолітичної активності щодо жодного з цих протеїнів. Серед інших пептидних продуктів спостерігалася висока гідролітична активність щодо основного протеїну мієліну (ОПМ). Досліджували сироватку крові імунізованих гістонами тимусу теляти мишей лінії BALB/c, щодо індукції в організмі тварин протеолітично

активних антитіл з широкою субстратною специфічністю. У сироватці крові містилися IgG-антитіла, які були здатні зв'язуватися із позитивно зарядженими протеїнами. Ці дані свідчать про те, що імунізація мишей препаратом тотальних гістонів тимуса теляти спричиняє продукцію антитіл з антигенною специфічністю щодо широкого спектру позитивно заряджених протеїнів. Дослідження протеолітичної активності антитіл щодо кóрових гістонів виявило антитіла з низькою афінністю до протеїнових субстратів. Отримані нами дані свідчать, що позаклітинні гістони здатні індукувати появу протабзимів в організмі мишей.

Біологічна активність протабзимів, які гідролізують гістон H1 та ОПМ, скоріше за все, пов'язана з важливими функціями їх протеїнових субстратів. Відомо, що функції гістона H1 не обмежуються його участю у структурній реорганізації хроматину ядра еукаріотичних клітин. Гістон H1 також присутній на зовнішній поверхні плазматичної мембрани моноцитів, нейронів і астроцитів людини, де він діє як рецептор ліпополісахаридів грам-негативних бактерій. Синтез позахроматинового гістона H1 у нейронах головного мозку відбувається конститутивно, але вміст його у цих клітинах зростає під час пріонних інфекцій та хвороби Альцгеймера [160]. Ці протабзими можуть виявляти захисну (протекторну) дію. На користь цього вказують дані про наявність у сироватці крові людей із сепсисом високого рівня протеолітично активних IgG-антитіл, здатних гідролізувати, подібно до IgM-антитіл сироватки крові хворих на РА [121], синтетичний пептид Pro-Phe-Arg-4-метил-кумаринімід [122]. При цьому титр протабзимів і рівень їхньої каталітичної активності позитивно корелював із сприятливим прогнозом клінічного розвитку сепсису в людей. Зважаючи на функціональну активність позаклітинних гістонів за умов запалення [179-181], ми припускаємо, що імунізація мишей лінії BALB/c загальними гістонами тимуса теляти зумовлює продукцію протабзимів із протективною функцією, спрямованих на елімінацію цих протеїнів, що попереджає розвиток генералізованого запалення [162].

Відомо, що гістони й антигістонові АТ можуть брати участь у розвитку запальних та аутоімунних процесів [182]. Ми порівняли протеолітичну активність до гістонів тимусу теляти у препаратів IgG-антитіл, очищених із сироватки крові хворих на РА і клінічно здорових донорів. Встановлено, що 7 із 8 препаратів IgG-антитіл сироватки крові хворих на РА здатні руйнувати кóрові гістони тимуса теляти. При цьому жоден із 8 препаратів IgG-антитіл сироватки крові здорових донорів не мав протеолітичної активності щодо цих протеїнів. На сьогодні не можна однозначно сказати, що висока протеолітична активність до гістонів у препаратах IgG-антитіл сироватки крові хворих на РА безпосередньо пов'язана з дією протабзимів [162].

Узагальнюючи отримані результати проведених нами досліджень, можна сказати, що при експериментальному ревматоїдному артриті на тлі зниженої перетравлюючої здатності фагоцитуючих клітин, виявлено значну генерацію активних форм кисню та активних форм нітрогену із накопиченням стабільних метаболітів, тобто формування і NO-синтазного та нітритредуктазного шляху метаболізму. Спостерігалось переважання NO-синтазного шляху метаболізму над аргіназним (окисним шлях переважає над неокисний). У місці запалення формуються аномальні процеси, які на фоні підвищеної активності апоптозу, призводять до розвитку дегенеративних станів, внаслідок чого синтезуються антитіла і апоптоз стає джерелом власних антигенів. Взаємодія антитіл із антигенами призводить не лише до зв'язування, але й до руйнування або модифікації цих антигенів, наявність яких ми вперше виявили при РА. Нами було встановлено, що IgG сироватки крові щурів із колагеновим артритом здатні гідролізувати гістон H1 та ОПМ, але були каталітично неактивні щодо колагену II типу, казеїну тощо. Препарати Ig G сироватки крові хворих на РА здатні руйнувати кóрові гістони теляти. Вперше встановлено, що антигістон H1 володіє протеолітичною активністю як щодо гістону H1, так і щодо ОПМ.

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 α 1- і α 2-глобулінів і зниження вмісту фракції γ -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 α 2-глобулінів і γ -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 ($O_2\cdot$ – у 9,2 разів, $\cdot OH$ – 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 ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Study of advanced rheumatoid arthritis / C. S. Carvalho, L. C. Andrade, S. P. Keusseyan [et al.] // Bras. Eng. Bioméd. – 2014. - Vol. 30, N. 1. - P. 54-63.
2. Нейко Є. М. Ревматоїдний артрит: сучасний погляд на проблему / Є.М. Нейко, Р.І. Яцишин, О.В. Штефюк // Український ревматологічний журнал. – 2009. - № 2 (36). – С. 35-39.
3. Свінцицький А.С. Ревматоїдний артрит: вчора, сьогодні, завтра / А.С. Свінцицький // Здоров'я України. – 2007. - №12/1. – С. 81-83.
4. Малей М. Сучасні підходи до лікування ревматоїдного артриту / М. Малей // Медицинские аспекты здоровья женщины. – 2010. - №8 (37). – С. 57-66.
5. Firestein G. S. Immunologic Mechanisms in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis / Journal of Clinical Rheumatology. – 2005. - Vol 11, N 3 (Suppl 5). – P. S.39-S.44.
6. Генно-инженерные биологические препараты в лечении ревматоидного артрита / гл. ред. акад. Е.Л. Насонов. – 2013. – М.: ИМА-ПРЕСС. – 552 с.
7. Запалення – типовий патологічний процес / М.С. Регада, Т.С. Бойчук, Ю.І. Бондаренко, М.М. Регада. Вид.друге, доп. та перер. – Львів, 2013. – 148 с.
8. Шуба Н.М. Ранній ревматоїдний артрит. Клініко-патофізіологічні аспекти / Н.М. Шуба // Мистецтво лікування. – 2004. – № 3. – С. 12-15.
9. Сибірна Н. О. Молекулярні механізми депонування оксиду азоту в еритроцитах / Н. О. Сибірна, М. Я. Люта, Н. І. Климишин // Біологічні Студії – 2010. – №1. – С. 143-160.
10. Leonaviciene L. Collagen-induced arthritis and pro-/antioxidant status in Wistar and Lewis rats / L. Leonaviciene, R. Bradunaitt, D. Vaitkiene [et al.] // Biologija. – 2008. – Vol.54, No.4. – P.290–300.

11. Amelioration of Collagen-Induced Arthritis in Female Dark Agouti Rats by Glucosamine Treatment / N. Haleagrahara, D. Tudawe, S. Chakravarthi, A. K. Radhakrishnan // *ISRN Pharmacology*. – 2013. - № 4. – P. 22-28.
12. Evaluation of Therapeutic Targets in Animal Models of Arthritis / L. Bevaart, M. J. Vervoordeldonk, P. P. Tak // *Arthritis & Rheumatism*. – 2010. – Vol. 62, No.8. – P. 2192-2205.
13. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis / M. Hegen, J. C. Keith, M. Collins, C. L. Nickerson-Nutter // *Ann Rheum Dis*. – 2008. – N 67. – P.1505-1515.
14. Kim E. Y. The determinants of susceptibility/resistance to adjuvant arthritis in rats / E. Y. Kim, K.D. Moudgil // *Arthritis Research & Therapy*. – 2009. - № 11. – C. 239-247.
15. Bendele A.M. Animal models of rheumatoid arthritis / A.M. Bendele // *J Musculoskel Neuron Interact*. – 2001. – № 1(4). – P. 377-385.
16. Autoimmunity's next top models / H. Wekerle, A. Flügel, L. Fugger [et al.] // *Nature medicine*/ - 2012. – Vol. 18, N 1. – P. 66-70.
17. Efficacy of treatment with glycosaminoglycans on experimental collagen-induced arthritis in rats / G. M. Campo, A. Avenoso, S. Campo [et al.] // *Arthritis Research & Therapy*. -2003. - Vol 5, No 3. – P. R122-R131.
18. Ревматология. Клинические рекомендации / Под. заг. ред. проф. Насонова Е.Л. // Москва. – 2008. – 264 с.
19. Системні хвороби сполучної тканини: досвід роботи / В.В. Чоп'як, Г.О. Потьомкіна, Я.Ф. Толстяк [та ін.] // *Український ревматологічний журнал*. – 2009. – №2. – С.15–20.
20. Animal models for arthritis / H. Vashist, A. Gupta, A. Jindal, S. Jalhan // *Int J Recent Adv Pharm Res*. – 2012. – N 2(1). – P. 20-25.
21. Pandey Sh. Various techniques for the evaluation of anti arthritic activity in animal models / Sh. Pandey // *J. Adv. Pharm. Tech. Res*. – 2010. - Vol. 1, N 2. – P. 164-171.

22. Billiau A. Collagen-induced arthritis and related animal models: How much of their pathogenesis is auto-immune, how much is auto-inflammatory? / A. Billiau, P. Matthys // *Cytokine & Growth Factor Reviews*. – 2011. - № 22. – P.339-344.
23. Mapping pathogenesis of arthritis through small animal models / T. L. Vincent, R. O. Williams, R. Maciewicz [at al.] // *Rheumatology*. – 2012. – N 51(11). – P. 1931-41.
24. Вплив нового комбінованого рослинного препарату капсул «Гепафісан» на розвиток запальної реакції / О. В. Геруш, Л. В. Яковлева, О. Б. Леницька, Є. М. Горбань // *Фармакологія та лікарська токсикологія*. – 2012. - № 6 (31). – С. 42-26.
25. Anti-inflammation effects of hydrogen saline in LPS activated macrophages and carrageenan-induced paw oedema / Zh. Xu, J. Zhou, J. Cai [at al.] // *Journal of Inflammation*. – 2012. - № 9. – P. 2-10.
26. Дослідження деяких фармакологічних властивостей олії з кісточок винограду / Л. М. Вороніна, А. Л. Загайко, Л. В. Галузінська, Б. М. Назен // *Клінічна фармація*. – 2009. – Т. 13, №3. – С.50-53.
27. Вивчення спектру фармакологічної активності нової мазі з антисептиком для лікування ран в першій фазі ранового процесу / Л.Б. Іванцик, Я.О. Бутко, Н.А. Гербіна, Т.П. Осолодченко // *Український біофармацевтичний журнал*. – 2012. - №3 (20). – С. 10-14.
28. Effects of hydroxytyrosol-20 on carrageenan-induced acute inflammation and hyperalgesia in rats / D. Gong, C.Geng, L. Jiang [at al.] // *Phytother Res* – 2009. - № 23(5). – P. 646-650.
29. Шуба Н.М. Нові дані патогенезу й визначення тактики лікування ревматоїдного артриту / Н.М. Шуба, О.П. Борткевич, Ю.В. Білявська // *Український ревматологічний журнал*. – 2006. – № 3. – С. 17-26.
30. Яременко О.Б. Этиология и иммунопатогенез ревматоидного артрита / О.Б. Яременко // *Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія*. - 2005. - N1. - С. 48-51.

- 31.Ревматичні хвороби та синдроми / Свінцицький А.С., Яременко О.Б., Пузанова О.Г., Хомченкова Н.І. // Довідник. – Київ: Вид-во Книга Плюс 2006. – С.13–47.
- 32.Ребров Б.О. нові можливості у діагностиці та лікування раннього ревматоїдного артриту / Б. О. Ребров, С. С. Касинець, О. Б. Комарова // Український ревматологічний журнал. – 2013. – № 3 (53). – С. 35-39.
- 33.Fishman P. Rheumatoid Arthritis: History, Molecular Mechanisms and Therapeutic Applications / P. Fishman, S. Bar-Yehuda // Springer Science + Business Media. – 2010. - №10. – P. 291-298.
- 34.Williams R. O. What have we learned about the pathogenesis of rheumatoid arthritis from TNF-targeted therapy? / R. O.Williams // ISRN Immunology. – 2012. – N 3. – P. 4-18.
- 35.Smolen J. S. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: new insights from old clinical data? / J. S. Smolen, D. Aletaha, K. Redlich // Nat. Rev. Rheumatol.- 2012. – N 8. – P. 235-243.
- 36.Smolen J. S. The science of rheumatoid arthritis: prelude / J. S. Smolen // Arthritis Research & Therapy. – 2005. – N. 7(Suppl 2). – P. S1-S3.
- 37.Eiglmeier S. The role of CD4 T helper cells and sialylated antigen-specific IgG antibodies in rheumatic autoimmune diseases: dis. ... Doktor der Naturwissenschaften: D83 / Susanne Eiglmeier. – Berlin, 2011. – 141p.
- 38.Firestein G. S. Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis / Gary S. Firestein // Journal of Clinical Rheumatology. – 2005. – V. 11, N 3. – P. 39-44.
- 39.Imboden J. B. The Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis / J. B. Imboden // Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. – 2009. – N. 4. – P.417-34.
- 40.Kelley's textbook of rheumatology / [edited by Gary S. Firestein]. –Elsevier Health Sciences, 8th ed. – 2009. – V.2. – P. 1035-1086.
- 41.Клінічна імунологія та алергологія. Підручник. / Г.М. Драннік, О.С. Прилуцький, Ю.І. Бажора. – К.: Здоров'я, 2006. – 888с.

42. Kumar V. Neutrophils: Cinderella of innate immune system / V. Kumar, A. Sharma // *International Immunopharmacology*. - 2010. - № 10. - P. 1325-1334.
43. Сосунов А.А. Оксид азота как межклеточный посредник / А.А. Сосунов // *Соросовский образовательный журнал*. - 2000. - том 6, № 12. - С 27-34.
44. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases / H. L. Wright, R. J. Moots, R. C. Bucknall [et al.] // *Rheumatology*. - 2010. - N 49. P. 1618-1631.
45. Immune complexes from rheumatoid arthritis synovial fluid induce FcγRIIa dependent and rheumatoid factor correlated production of tumour necrosis factor-α by peripheral blood mononuclear cells / L. Mathsson, J. Lampa, M. Mullazehi, J. Rönnelid // *Arthritis Research & Therapy*. - 2006. - N3, V.8. - P.64-73.
46. Mayadas T. N. Mechanisms of Immune Complex-Mediated Neutrophil Recruitment and Tissue Injury / T. N. Mayadas, G. C. Tsokos, N. Tsuboi // *Circulation*. - 2009. - N 120. - P. 2012-2024.
47. Macrophages in rheumatoid arthritis / R. W. Kinne, R. Bräuer, B. Stuhlmüller [et al.] // *Arthritis Res*. - 2000. - N2. - P.189-202.
48. Differential expression of gelatinase B (MMP-9) and stromelysin-1 (MMP- 3) by rheumatoid synovial cells in vitro and in vivo / L. C. Tetlow, M. Lees, Y. Ogata [et al.] // *Rheumatol Int*. - 1993. -№ 13. - P. 53-59.
49. Вплив препарату поліфенольного комплексу з червоного виноградного вина на показники системи L-аргінін/NO у крові щурів за малих доз іонізуючого опромінення / М. В. Сабадашка, А. Р. Гнатуш, Л. О. Дацюк [та ін.] // *Ukr. Biochem. J*. - 2014. - Vol. 86, № 1. - С. 117-123.
50. Targeting monocytes/macrophages in the treatment of rheumatoid arthritis / J.-L. Davignon, M. Hayder, M. Baron, J.-F. Boyer [et al.] // *Rheumatology*. - 2013. - N 52. - P.590-598. *Ukr. Biochem. J.*, 2014, Vol. 86, N 1
51. Choy E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis / E. Choy // *Rheumatology*. - 2012. - N 51. - P. 3-11.

52. Мельникова Н. М. Інтеграція метаболічних та ензимологічних пок азників крові щурів, отруєних кадмію сульфатом / Н. М. Мельникова, Н. М. Ворошилова // *Лабораторна діагностика*. – 2010. – 3 (53). – С.17-20.
53. Oxidative state of the liver of rats with adjuvant-induced arthritis / J. F. Comar, A.B. Sa-Nakanishi, A. L.Oliveira [et al.] // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2013. – 58. – P. 144–153.
54. Albumin as a Delivery Carrier for Rheumatoid Arthritis / K. Ren, A. Dusad, R. Dong [et al.] // *Nanomedicine & Nanotechnology*. – 2013. – N4. – P. 176-178.
55. Nicholson J. P. The role of albumin in critical illness / J. P Nicholson., M.R. Wolmarans., G.R. Park // *British Journal of Anaesthesia*. – 2000. – N 85. – P. 599-610.
56. Alpha-1 antitrypsin protein and gene therapies decrease autoimmunity and delay arthritis development in mouse model / C. Grimstein, Yo. Choi, C. Wasserfall [et al.] // *Journal of Translational Medicine*. - 2011. – N 9. – P. 21-34.
57. Мельникова Н.М. Електрофоретичне дослідження білків крові щурів за дії макродисперсної та наноформи свинцю / Н.М.Мельникова, І.А.Лазаренко // *Актуальные проблемы транспортной медицины*. – 2012. – № 3 (29). – С.90-94.
58. Neto N. The use of inflammatory laboratory tests in rheumatology / N. Neto, J. Carvalho // *Bras J Rheumatol*. - 2009. – N 49(4). – P. 413-430.
59. Plasma proteins present in osteoarthritic synovial fluid can stimulate cytokine production via Tolllike receptor / D. H. Sohn, J. Sokolove, O. Sharpe [et al.] // *Arthritis Research & Therapy*. – 2012. – N 14. – P.7-19.
60. Immunology Kuby / R. Goldsby, B. Osborne, T. Kindt // W.H. Freeman and Company. – 2007. – 6 ed. – 574p.
61. Bala A. Free radical biology in cellular inflammation related to rheumatoid arthritis / A. Bala, P.Haldar // *OA Arthritis*. – 2013. – N 01. – P. 15-21.
62. Активные метаболиты кислорода при фагоцитозе / Ю.А. Брудастов, О.С. Журлов, Е. В. Колинченко [и др.] // *Вестник ОГУ*. – 2008. – № 12. – С. 148-151.

63. Пособие по клинической биохимии: учебное пособие. Никулин Б.А. / Под ред. Л.В. Акуленко // Москва: ГЭОТАР-Медиа. – 2007. – 256 с.
64. Mahajan A. Antioxidants and rheumatoid arthritis / A. Mahajan, V. Tandon // J Indian Rheumatol Assoc. – 2004. – № 12. – С. 139-142.
65. Двудликий янус биохимии: мочевая кислота – оксидант или антиоксидант? / Б. Галунска, Д. Паскалев, Т. Янкова, П. Чанкова // Нефрология. – 2004. – Т 8, № 4. – С. 25-31.
66. Чеснокова Н.П. Молекулярно-клеточные механизмы инактивации свободных радикалов в биологических системах / Н.П. Чеснокова, Е.В. Понукалина, М.Н. Бизенкова // Успехи современного естествознания. – 2006. – № 7. – С. 29-36.
67. Myeloperoxidase and oxidative stress in rheumatoid arthritis / L. Stamp, I. Khalilova, J. Tarr [et al.] // Rheumatology. – 2012. – N. 51. – P. 1796-1803.
68. Mirshafiey A. The Role of Reactive Oxygen Species in Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis / A. Mirshafiey, M. Mohsenzadegan // Iran J Allergy Asthma Immunol. – 2008. – N. 7(4). – P. 195- 202.
69. Oxidative Stress and Diseases / Edited by Dr. Volodymyr Lushchak // Intech. – 2012. – 610p.
70. Chandankhede M. Oxidative stress and antioxidant status in patients with rheumatoid arthritis/ M. Chandankhede, M. Gupta // Int J Biol Med Res. – 2013. – N. 4(2). – P. 3088-3090.
71. Мельник О.В. Активність аргінази в лімфоцитах периферичної крові хворих на реактивний артрит / О.В.Мельник, О.П.Корнійчук, З.Д.Воробець // Медична та клінічна хімія. - 2013. - т. 15, № 1. - С. 111-115.
72. Бондарь Т.Н. Система L-аргинин/оксид азота и иммунитет / Т.Н Бондарь // Экспериментальна і клінічна медицина. - 2009. - № 3. – С. 4-8.
73. Перетятко Ю. В. Особливості аргіназного та NO-синтазного шляхів метаболізму L-аргініну в лейкоцитах периферичної крові щурів за хронічного рентгенівського опромінення / Ю. В. Перетятко, Н. О. Сибірна // Укр. біохім. журнал. – 2009. – Т. 81, № 2. – С. 40-48.

74. Arginase levels are increased in patients with rheumatoid arthritis / L. Huang, K. Chang, C. Chen [et al.] // *Kaohsiung J. Med. Sci.* – 2001. – 17, N 7. – P. 358-363.
75. Comparison of serum nitric oxide levels in active juvenile rheumatoid arthritis with those of patients with remission / A. Beri, S. Singh, A. Gupta, M. Khullar // *Rheumatol Int.* – 2004. - № 24. – P. 264-266.
76. Al-Nimer M. Serum nitric oxide and peroxynitrite levels in adult sero-positive rheumatoid arthritis treated with disease modifying antirheumatic drugs: a preliminary report / M. Al-Nimer, S. Al-Obaid, K. Al-Dulaim // *Turk J Med Sci.* – 2010. – N 40 (2). – P 191-197.
77. Corralisa I. Increased expression of arginase II in patients with different forms of arthritis. Implications of the regulation of nitric oxide / I. Corralisa , S. Moncada // *J. Rheumatol.* – 2002. – 29, N 11. – P. 2261-2265.
78. Relationship between synovial fluid and plasma manganese, arginase, and nitric oxide in patients with rheumatoid arthritis / S Sarban, U.E. Iskan, Y. Kocabey [et al.] // *Bid. Trace Elem. Res.* – 2007. – 115, N 2. – P. 97-106.
79. Nitric oxide-derived species in synovial fluid from patients with juvenile idiopathic arthritis / A.P. Lotito, M.N. Muscara, M.H. Kiss [et al.] // *J Rheumatol.* – 2004. - № 31. – P. 992-997.
80. Measurement and meaning of markers of reactive species of oxygen, nitrogen and sulfur in healthy human subjects and patients with inflammatory joint disease / P. G. Winyard, B. Ryan, P. Eggleton [et al.] // *Biochemical Society Transactions.* – 2011. – V. 39. – P. 1226–1232.
81. Сірководень пригнічує кальцій індукване відкриття мітохондріальної пори у серці дорослих і старих щурів / Н. А. Струтинська, О. М. Семенихіна, С. В. Чорна [та ін.] // *Фізіологічний журнал.* – 2011. – Т. 57, № 6. – С. 3-14.
82. Механізми впливу сірководню на скоротливу активність гладеньких мязів судин щурів / О. М. Семенихіна, О. В. Базілюк, Ю. П. Коркач, В. Ф. Сагач // *Фізіологічний журнал.* – 2011. – Т. 57, № 4. – С. 3-11.

- 83.Березовський В.Я. Роль ендogenous сірководню в регуляції фізіологічних функцій організму / В.Я. Березовський, Л.М. Плотнікова // Медична гідрологія та реабілітація. - 2013. - 11, №1. – С. 117-122.
- 84.Hydrogen sulfide induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats / Y.Cheng, J. F. Ndisang, G.Tang [et al.] // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2004. – V. 287. – P. 2316-2323.
- 85.Elsey D.J. Regulation of cardiovascular cell function by hydrogen sulfide (H₂S) / D.J. Elsey, R.C. Fowkes, G.F. Baxter // Cell Biochemistry and Function. – 2010. – V.28. – P. 95-106.
- 86.The emerging roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver / S.Fiorucci, E. Distrutti, G. Cirino, J. L.Wallace // J. Gastroenterol. – 2006. – V. 131. – P. 259-271.
- 87.Wang R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed / R.Wang // Physiol Rev. – 2012. - №92. – P. 791-896.
- 88.Sulfur compounds block MCP-1 production by Mycoplasma fermentans-infected macrophages through NF-κB inhibition / F. Benedetti, S. Davinelli, S. Krishnan [et al.] // Journal of Translational Medicine. – 2014. - № 12. – P. 145-155.
- 89.A comparative study on the anti-inflammatory effects of single oral doses of naproxen and its hydrogen sulfide (H₂S)-releasing derivative ATB-346 in rats with carrageenan-induced synovitis / E. Ekundi-Valentim, F. Mesquita, K. T. Santos [et al.] //Medical Gas Research. – 2013. - № 3. P.24-32.
- 90..Li Q. Chemical foundations of hydrogen sulfide biology / Q. Li, J. R. Lancaster // Nitric Oxide. – 2013. - № 35. – P. 21-34.
- 91.Hydrogen sulfide prevents apoptosis of human PMN via inhibition of p38 and caspase 3 / L. Rinaldi, G. Gobbi, M. Pambianco [et al.] // Laboratory Investigation. – 2006. – Vol. 86, N. 4. – P. 391-397.
- 92.Bhatia M. Role of Hydrogen Sulfide in the Pathology of Inflammation / M. Bhatia // Scientifica. – 2012. – N10. – P. 60-72.
- 93.Якобисяк М. Імунологія (підручник) / Під редакцією Чоп'як В.В. (переклад) // Нова Книга. - Вінниця. - 2004. - 672 с.

94. Дубиков А.И. Апоптоз клеток синовиальной оболочки у больных ревматоидным артритом / А.И. Дубиков // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2008. – №4. – С.20-23.
95. Фільченков О.О. Апоптоз і рак: від теорії до практики / О.О. Фільченков., Р.С. Стойка // – Тернопіль: ТДМУ, – 2006. – 524 с.
96. Taatjes D. Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis / D. J. Taatjes, B. E. Sobel, R. C. Budd // *Histochem Cell Biol.* – 2008. – N 129. – P.33-43.
97. After strinkade apoptotic cells expose internal membrane-derived epitopes on their plasma membranes / M.Hermann, J.Kalden, H.Jack [et.al]. // *Cell. Death. Differ.* – 2007. – Vol.14. – P.733-742.
98. Bilyy R. Search for novel cells surface markers of apoptotic cells / R.Bilyy, R.Stoika. // *Autoimmunity.* – 2007. – Vol.40. – P.249–253.
99. AMID, new insights on its intracellular localization and expression at apoptosis / R.Bilyy, Y.Kit, U.Hellman, [et.al]. // *Apoptosis.* – 2008. – Vol. 13 – P.729–732.
100. In vivo expression and characteristics of novel alpha-D-mannose-rich glycoprotein markers of apoptotic cells / R.Bilyy, Y.Kit, U.Hellman, [et.al]. // *Cell Biol. Int.* – 2005. – Vol.29. – P. 920–928.
101. Модифікація гліклсфінголіпідів гранулоцитів людини під час апоптозу / А. М. Томін, Р. О. Білий, Ю. я, Кіт [та ін.] // *Біологічні Студії* – 2012. – №2. – С. 45-54.
102. Apoptosis-related changes in plasma membrane glycoconjugates of perypheral blood lymphocytes at rheumatoid arthritis / R. Bilyy, L. Nemesh, V. Antonyuk [et al.] // *Autoimmunity.* – 2009. – N 42 (4). – P. 334-336.
103. Andersson A. K. Recent developments in the immunobiology of rheumatoid arthritis / A. K. Andersson, Ch. Li, F. M. Brennan // *Arthritis Research & Therapy.* – 2008. – V 10, N 2. – P. 204-213.
104. Synovial fluid leukocyte apoptosis is inhibited in patients with very early rheumatoid arthritis / K. Raza, D. Scheel-Toellner, C. Lee [et al.] // *Arthritis Research & Therapy.* – 2006. – V.8, N 4. – P 120-126:

105. Programmed Cell Death in Rheumatoid Arthritis Peripheral Blood T-Cell Subpopulations Determined by Laser Scanning Cytometry / P. Szodoray, S. Jellestad, B. Nakken [et al.] // *Laboratory Investigation*. – 2003. – Vol. 83, N 12. – P. 1839-1848.
106. Neutrophil apoptosis in rheumatoid arthritis is regulated by local oxygen tensions within joints / A. Cross, T. Barnes, R. C. Bucknall [et al.] // *Journal of Leukocyte Biology*. - 2006. - V. 80. P.521-528.
107. Human antibodies induce arthritis in mice deficient in the low-affinity inhibitory IgG receptor FcγRIIB / S.B. Petkova, K.N. Konstantinov, T.J. Sproule [et al.] // *J Exp Med*. – 2006. - № 203. – P. 275-280.
108. Наградова Н.К. Каталитические антитела / Н.К.Наградова // *Соросовский образовательный журнал*. – 1996. – том 4, № 8. – С 23-31.
109. Пальцев М.А. "Функциональность"антител и ее клиническое значение / Пальцев М.А., Габибов А.Г., Сучков С.В. // *Аллергология и иммунология*. – 2008. – Т.9. – С.453–456.
110. ДНК-абзимы при ревматоидном артрите: патогенетическое и клиническое значение / А.Н. Хитров, Н.Б. Ромоданова, Е.А. Огнева [и др.] // *Тер.архив*. - 2005. - № 11. – С.75-80.
111. Каталитические аутоантитела как новый молекулярный инструмент в ревматологической практике [Текст] / А.Н. Хитров, К.А. Мальцев, О.Ю. Введенская [и др.] // *Терапевтический архив*. - 2006. – № 6. – С.59-66.
112. Генералов И.И. Абзимы (каталитические антитела): применение в медицине / И.И.Генералов, Е.В. Кундер, А.М. Моисеева // *Иммунология*. - 2009. – №2. – С.123–128.
113. Suchkov SV. Introduction to medical abzymology; the present and the prospect. / Suchkov S.V., Gabibov A.V. // *Vestn. Ross Acad Med Nauk*. – 2005. – Vol.10.–P.44-53.
114. Theory of proteolytic antibody occurrence / S.Paul, Y Nishiyama, S.Planque, H.Taguchi // *Immunol. Lett*. – 2006. – 103, № 4. – P. 8–16.

115. Catalytic activity of anti-thyroglobulin antibodies / L. Li, S. Paul, S. Tyutyulkov, M. Kazatchkine, S.Kaveri // *J. Immunol.* – 1995. - № 8. – P. 3328–3332.
116. Catalytic antibodies in clinical and experimental pathology: human and mouse models / Ponomarenko N.A., Durova O.M., Vorobiev I.I., et al. // *J Immunol Methods.* –2002. – 269, № 4. – P. 197–211.
117. Autoantibodies to myelin basic protein catalyze site-specific degradation of their antigen / Ponomarenko N.A., Durova O.M., Vorobiev I.I., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – 103, № 1. –P. 281–286.
118. Pathophysiology of catalytic antibodies / Lacroix-Desmazes S., Wootla B., Delignat S., Dasgupta S., et al // *Immunology Letters.* – 2006. – 103, № 1. – P. 3–7.
119. Каталітичні протеолітично активні антитіла та їх роль у розвитку системного червоного вовчаку / Я.Ф. Толстяк, І.Б. Магорівська, Р.О.Білий [та інші] // *Укр. ревматол. журнал.* - К., 2010. - N 3. - С.25.
120. Біохімічні властивості антитіл у хворих на системний червоний вовчак / Ю.Я.Кіт, І.Р.Магорівська, Я.Ф.Толстяк, [та інші]. // *Імунологія та алергологія.* – 2008. – №3 (додаток) с. 66–71.
121. Proteolysis activity of IgM antibodies from rheumatoid arthritis patients' sera: evidence of atypical catalytic site / A.Kamalanathan, C.Goulvestre, B.Weill, M. Vijayalakshmi // *J. Mol. Recognit.* – 2010. – 23, № 4. – P. 577–582.
122. Anti-histones antibodies in systemic lupus erythematosus: prevalence and frequency in neuropsychiatric lupus / Sun X.Y., Shi J., Han L., et al. // *J. Clin. Lab. Anal.* – 2008. – 22, № 6. – P. 271–277.
123. High levels of catalytic antibodies correlate with favorable outcome in sepsis / Lacroix-Desmazes S., Bayry J, Kaveri S.V., et al. // *Proc Nat Acad Sci USA.* – 2005. – 102, № 11. – P. 4109–4113.
124. Протеолітична активність IgG сироватки крові щурів за експериментального ревматоїдного артриту / С.Мироновський, І.Кріль, Ю

- Кіт, Я.Чайка // Матеріали X Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів: тези доп. - Львів, 2014. – С.34-35.
125. Протеолітична активність IgG сироватки крові хворих на системний червоний вовчак / Ю.Я.Кіт, І.Р. Магорівська, А.М. Гаврилюк [та інші]. // Укр. біохім. журн. – 2009. – Т.81, № 3.– С.78–84.
126. Fehrenbacher J. Models of inflammation: Carrageenan- or complete Freund's Adjuvant (CFA)-induced edema and hypersensitivity in the rat / J.Fehrenbacher, M. Vasko, D. Duarte // *Curr Protoc Pharmacol.* – 2012. – Chapter 5. – Unit 5.4. doi: 10.1002/0471141755. ph 0504s56.
127. Antibodies against citrullinated proteins enhance tissue injury in experimental autoimmune arthritis / K.A. Kuhn, L. Kulik, B. Tomooka [et al.] // *J Clin Invest.* – 2006. – N 116. – P. 961-973.
128. Rheumatoid peripheral blood phagocytes are primed for activation but have impaired Fc-mediated generation of reactive oxygen species / A-M. Fairhurst, P. K. Wallace, A. S. Jawad and N. J. Goulding // *Arthritis Research & Therapy.* – 2007. – Vol 9, N2. – P. 29-39.
129. Gorman C. L. Immune-mediated pathways in chronic inflammatory arthritis / C.L. Gorman, A. P. Cope // *Best Practice & Research Clinical Rheumatology.* – 2008. - Vol. 22, No. 2. - P.221–238.
130. Immunogenicity and adjuvant properties of novel biocompatible nanoparticles. In: *Biocompatible Nanomaterials: Synthesis, Characterization and Applications* / Y.Kit, R.Bilyu, R.Stoika, N.Mitina, A. Zaichenko [et al.] // Nova Sci. Publ., Inc., Hauppauge – NY. – 2010. – P. 209–223.
131. Камышников В.С. Справочник по клинико-биологическим исследованиям и лабораторной диагностике / В.С.Камышников. – М.: МЕДпрес-информ, 2004. – 920с.
132. Горячковский А. М. Клиническая биохимия / А. М. Горячковский. - 2-е изд., испр. и доп. – О.: Астропринт, 1998. – 607с.

133. Lun A. Phagocytosis and Oxidative Burst: Reference Values for Flow Cytometric Assays Independent of Age / A. Lun, M. Schmitt, H. Renz // *Clinical Chemistry*. – 2000. - Vol. 46, No. 11. – P. 1836-1839.
134. Осипов С.Г. Методы определения иммунных комплексов / С.Г. Осипов, В.В. Еремеев, В.И. Руднев // *Лаб. дело*. – 1983. – №11. – С. 3-7.
135. Иммунология: практикум: учеб.пособие / [Ковальчук Л. В. и др.]; под ред. Л. В. Ковальчука, Г. А. Игнатъевой, Л. В. Ганковской. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 176 с.
136. 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.
137. Сибірна Н.О. Дослідження окремих біохімічних показників за умов оксидативного стресу / Н.О. Сибірна, О.М. Маєвська, М.Л. Барська. – Л.: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2006. – 60с.
138. Меньщикова Е.Б. Оксид азота и NO-синтазы в организме млекопитающих при различных функциональных состояниях / Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков, В.П. Реутов // *Биохимия*. – 2000. – Т. 65. – В.4. – С. 485-503.
139. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids / L.L. Green, D.A. Wagner, J. Glogowski [et al.] // *Anal. Biochem.* – 1982. – № 1. – P.131-138.
140. Jsukahara H. Effect of NOS inhibitions on bone metabolism in growing rats / H. Jsukahara // *Am. J. Physiol.* – 1996. – №5. – P. 840-845.
141. Шугалей В.С. Содержание мочевины и активность аргиназы в органах крыс при акклиматизации к холоду / В.С. Шугалей, А.С. Козина // *Физиол. журн. СССР*. – 1977. – № 8. – С. 1199-1202.
142. Conte D. In vivo and in vitro iron replaced zinc finger generates free radicals and causes DNA damage / D.Conte, K. S. Narindrasorasa, B. Sarkar // *Eur. J. Biochem.* - 1996. – №9. – P. 5125-5130.

143. Kuthan H.A. A quantitative test for superoxide radicals produced in biological systems / H. Kuthan, U. Ullrich, R.W. Estabrook // *Biochem. J.* – 1982. – Vol. 203, №3. – P. 551 – 558.
144. Humphries K.M. Inhibition of NADH-linked mitochondrial respiration by 4-hydroxy-2-nonenal / K.M. Humphries, Y. Yoo, L.I. Szveda // *Bioch.* – 1998. – Vol. 37, №2. – P. 552-557.
145. Svenson A. A rapid and sensitive spectrophotometric method for determination of hydrogen sulfide with 2,2-dipyridyl disulfide / A. Svenson // *Anal. Biochem.* - 1980. – N 107. - P. 51–55.
146. Collagen type II (CII)-specific antibodies induce arthritis in the absence of T or B cells but the arthritis progression is enhanced by CII-reactive T cells / R. Holmdahl, K.S. Nandakumar, J. Bäcklund, M. Vestberg // *Arthritis Research & Therapy.* -2004. - № 6. – P. R544-R550.
147. Anti-histone H1 IgGs from blood serum of systemic lupus erythematosus patients are capable of hydrolyzing histone H1 and myelin basic protein / I.B. Magorivska, R.O. Bilyy, A.M. Havrylyuk [et al.] // *J. Mol. Recognit.* – 2010. – V. 23, № 5. – P. 495-502.
148. Характеристика ензиматичної активності та білкового складу сироватки крові за умов індукованого імунізацією запалення суглобів / І.Й. Кріль, А.М. Гаврилюк, Р.С. Стойка [та ін.] // *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія.* – 2014. - № 2. – С.15-23.
149. Зміни функціональної активності нейтрофілів щурів за умов експериментального колагенового артриту / І.Й. Кріль, А.М. Гаврилюк, В. В. Чопяк [та ін.] // *Біологія тварин.* – 2014. – Т. 16, № 3. – С. 60-67.
150. Кріль І. Й. Зміни функціональної активності нейтрофілів щурів за умов гострого та хронічного експериментальних артритів / І. Й. Кріль, Ю. Я. Кіт // *Матеріали XI Українського біохімічного конгресу: тези доп.* – Київ, 2014. – С. 91-92.
151. *Immunologia* / J.Golob, M. Jakobisiak, W. Lasek [et al.] – Warszawa: wydawnictwo naukowe PWN. – 2007. – 511s.

152. Activation of Complement Alternative Pathway in Rheumatoid Arthritis: Implications in Peripheral Neutrophils Functions / A.B. Paoliello-Paschoalato, M.R. Moreira, A.E. Azzolini [et al.] // *The Open Autoimmunity Journal*. – 2011. - № 3. – P. 1-9.
153. Neutrophils in the innate immune response / S. D. Kobayashi, J. M. Voyich, C. Burlak and F. R. DeLeo // *Arch Immunol Ther Exp*. – 2005. - № 53. – P. 505–517.
154. Кріль І. Й. Активність конститутивної та індукцибельної NO-синтази та аргінази у щурів за умов експериментального колагенового і карагенінового індукovanого артрити / І. Й. Кріль, А. В. Коцюруба, Ю. Я. Кіт // *Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини»: тези доп.* – Львів, 2014. – С. 182.
155. Метаболізм активних форм азоту та кисню в мітохондріях міокарда щурів за умов введення донора оксиду азоту / О.В. Аكوпова, Ю.П. Коркач, А.В. Коцюруба [та ін.] // *Фізіологічний журнал*. – 2012. – Т. 58, № 2. – С. 3-15.
156. Вміст сірководню у сироватці крові щурів за гострого і хронічного експериментального артрити/ Ю. Я. Кіт, І. Й. Кріль, А. М. Гаврилюк [та ін.] // *Матеріали XI Українського біохімічного конгресу: тези доп.* – Київ, 2014. – С. 84.
157. Рівень апоптичних лімфоцитів у крові щурів за умов гострого та хронічного артрити / І. Кріль, А. Гаврилюк, В. Чопяк [та ін.] // *Матеріали 4-го з'їзду Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом: тези доп.* – Ужгород, 2014. – С. 116.
158. Evaluation of immunological criteria for rheumatoid arthritis / A. Navryluk, R. Bilyu, J. Tolstiak, I. Kril [et al.] // *Central European Journal of Immunology*. – 2009. - № 34(3). – P. 176-181.
159. Оцінка апоптозу та автоантитіл у хворих на ревматоїдний артрит / В.В. Чопяк, Р.С. Стойка, А.М. Гаврилюк [та ін.] // *Матеріали XII Конгресу*

- світової федерації українських лікарських товариств: тези доп. – Івано-Франківськ-Київ-Чикаго, 2008. – С. 285.
160. Магорівська І.Б. Антигенна специфічність і протеолітична активність антигістонових антитіл та їх вплив на проліферацію і життєздатність пухлинних клітин: дис. ... канд. біол. наук: 03.00.11 / Магорівська Ірина Богданівна. – Л., 2013. – 142 с.
161. Proteolytic activity of IgGs from blood serum of wistar rats at experimental rheumatoid arthritis / Yu. Ya. Kit, S. L. Myronovsky, I. I. Kril [et al.] // Ukr. Biochem. J. – 2014. – Vol. 86, № 5. – С. 95-101.
162. Протеолітична активність IgG-антитіл мишей, імунізованих гістонами тимуса теляти / Ю. Я. Кіт, Н. Корній, І. Й. Кріль [та ін.] // Ukr. Biochem. J. – 2014. - Vol. 86, № 2. – С. 80-89.
163. Characterisation of cellular and humoral autoimmune responses to histone H1 and core histones in human systemic lupus erythaematosus. / G. H. Stummvoll, R. D. Fritsch, B.Meyer [et al.] // Ann. Reum. Dis. – 2009. – N 11. – P. 110–106.
164. Catalytic antibodies and severe sepsis / S.Lacroix-Desmazes, V.Mallet, B.Wootla, S. V. Kaveri // Discov. Med. – 2005. – 5, N 26. – P. 209-212.
165. Cordova K.N. A citrullinated fibrinogen-specific T cell line enhances autoimmune arthritis in a mouse model of rheumatoid arthritis / K.N. Cordova, V.C. Willis, K. Haskins // Hollers Journal of Immunology. – 2013. – №190(4). – P. 1457–1465.
166. Modulation of IL-17 and Foxp3 expression in the prevention of autoimmune arthritis in mice / J. Duarte, A. Agua-Doce, V.G. Oliviera [et al.] // PloS One. – 2010. – N 5 – e 10558.
167. Frisenda S. Cartilage as a target of autoimmunity: a thin layer / S.Frisenda, C. Perricone, G. Valensini // Autoimmunity Reviews. – 2013. – №12. – P. 591–598.
168. Гавриленко Т.І. Особливості імунної відповіді у пацієнтів з ревматоїдним артритом залежно від клінічного перебігу захворювання / Т.І. Гавриленко,

- Г.Ф. Клубова, О.М. Корніліна // Український медичний часопис. – 2002. – №1 (27). – С. 139–142.
169. Марков Х.М. О биорегуляторной системе «L-аргинин – окись азота» / Х.М. Марков // Пат. физ. exper. терапия. – 2000. – № 1. – С. 34-39.
170. Пригнічення оксидативного та нітрозативного стресу як механізм кардіо-і вазо протекторної дії екдистерону за умов експериментального цекрового діабету I типу / В. Ф. Сагач, Ю. П. Коркач, А. В. Коцюруба, О. Д. Присяжна // Фізіологічний журнал. – 2008. – Т. 54, № 5. – С. 46-28.
171. Активні форми кисню та нітрогену в сироватці крові щурів за умов гострого і хронічного експериментального артрити / І. Й. Кріль, А. М. Гаврилюк, А. В. Коцюруба, [та ін.] // Біологічні Студії – 2014. – Т. 8, №3-4. – С. 31-40.
172. Бабушкина А.В. L-аргинин с точки зрения доказательной медицины / А.В. Бабушкина // Український медичний часопис. – 2009. - №6, (74). – С. 1-6.
173. Кургалюк Н. М. Модифікація продукції оксиду азоту за умов гострої гіпоксії під впливом екзогенних інтермедіатів циклу Кребса / Н.М.Кургалюк, А.В. Коцюруба, В.Ф. Сагач // Фізіологічний журнал. – 2005. – Т. 51, № 4. – С. 20-28.
174. Реутов В. NO-синтазная и нитритредуктазная компоненты цикла оксида азота / В.Реутов, Е.Сорокина // Биохимия. – 1998. – № 7. – С. 1029-1040.
175. Активні форми кисню та їх роль у метаболізмі клітин / М.І. Колісник, Г.В. Колісник, Є. Нідзюлка, В.В. Влізло // Біологія тварин. – 2009. – Т. 11, № 1-2. – С. 59-67.
176. Low levels of apoptosis and high FLIP expression in early rheumatoid arthritis synovium / A. I. Catrina, A. K. Ulfgren, S. Lindblad [et al.] // Ann Rheum Dis. – 2002. – N 61. – P. 934-936.
177. TRAIL-R2 (DR5) Mediates Apoptosis of Synovial Fibroblasts in Rheumatoid Arthritis / K. Ichikawa, W. Liu, M. Fleck [et al.] // J. Immunol. – 2003. - № 171. – P. 1061-1069.

178. Susceptibility of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts to FasL and TRAIL-induced apoptosis is cell cycle-dependent / N. Pundt, M. A. Peters, C. Wunrau [et al.] // *Arthritis Research & Therapy*. – 2009. - № 11. – P. 16-26.
179. Kanai Y. The role of non-chromosomal histones in the host defense system / Y. Kanai // *Microbiol. Immunol.* – 2003. – V. 47, № 8. – P.553-556. 186
180. Humoral immunity in brain aging and Alzheimer's disease / C. Bouras, B.M. Riederer, E. Kovari [et al.] // *Brain Res. Rev.* – 2005. – V. 48, № 3. – P. 477-487. 194
181. Non-nuclear histone H1 is upregulated in neurones and astrocytes in prion and Alzheimer's diseases but not in acute neurodegeneration / S.J. Bolton, M. Russelakis-Carneiro, S. Betmouni, V.H. Perry // *Neuropathol Appl. Neurobiol.* – 1999. – V. 25, № 5. – P. 425-432. 195.
182. Біохімічні властивості антитіл у хворих на системний червоний вовчак / Ю.Я.Кіт, І.Р.Магорівська, Я.Ф.Толстяк, [та ін.]. // *Імунологія та алергологія*. – 2008. – №3 (додток). - С. 66-71.