

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД  
“ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
імені І. Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО”**

**ЄФРЕМОВА УЛЯНА ПЕТРІВНА**

УДК: 577.151.64+577.151.64

**ВЛАСТИВОСТІ АРГІНАЗИ ТА NO-СИНТАЗИ ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ  
КРОВІ ПРИ РЕВМАТИЧНИХ ЗАХВОРЮВАННЯХ**

**03.00.04 – біохімія**

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

**Тернопіль – 2015**

Дисертацією є рукопис.

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

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор  
**Воробець Зіновій Дмитрович**,  
Львівський національний медичний університет  
імені Данила Галицького МОЗ України,  
завідувач кафедри медичної біології

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,  
старший науковий співробітник  
**Данилович Юрій Володимирович**,  
Інститут біохімії імені О. В. Палладіна НАН України  
старший науковий співробітник відділу біохімії м'язів

доктор медичних наук, професор  
**Олещук Олександра Михайлівна**,  
ДВНЗ “Тернопільський державний медичний університет  
імені І. Я. Горбачевського МОЗ України”,  
завідувач кафедри фармакології з клінічною фармакологією

Захист відбудеться “ ” \_\_\_\_\_ 2015 року о \_\_\_\_ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 58.601.04 Державного вищого навчального закладу “Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України” за адресою: майдан Волі, 1, м. Тернопіль, 46001, в конференц-залі ректорату університету.

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці Державного вищого навчального закладу “Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України” (46001, м. Тернопіль, вул. Січових Стрільців, 8).

Автореферат розісланий “ ” \_\_\_\_\_ 2015 року.

Учений секретар  
спеціалізованої вченої ради К 58.601.04,  
кандидат біологічних наук, доцент

Т. Я. Ярошенко

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Проблема ревматичних захворювань (РЗ) розглядається як одна з найактуальніших не тільки в ревматології, але й в медицині в цілому, що зумовлено високими показниками поширеності, складністю ранньої діагностики та лікування, значним рівнем тимчасової непрацездатності та первинної інвалідності (Gabriel S. et al., 2009; Коваленко В.М., Корнацький В.М., 2010; Яременко О.Б., 2012; Синяченко О.В. та співавт., 2013). У структурі ревматичних захворювань провідне місце займають ревматоїдний артрит (РА) та анкілозивний спондилоартрит (АСА).

Ревматоїдний артрит належить до найтяжчих хронічних РЗ, а його фармакотерапія є одним з найскладніших проблем сучасної клінічної медицини (Verstappen S.M., 2013; Якименко О.О., 2014). Так як частота РА в популяції досягає 1% (Насонов Е.Л. та співавт., 2008; Carbonell J. et al., 2008; Scott D.L. et al., 2009), то дане захворювання є не тільки медичною, а й економічно-соціальною проблемою (Plenge R.M. 2009; Насонов Е.Л., Насонова В.А., 2010; Авраменко О.Н. і співавт., 2011; Rudan I. et al., 2015). Поліваріантність розвитку РА помітно ускладнюють точне встановлення діагнозу в перші місяці після появи ознак захворювання (Forslind K. et al., 2004). Анкілозивний спондилоартрит або хвороба Бехтерева, в свою чергу, привертає увагу дослідників тим, що соціальна значущість проблеми зумовлена насамперед захворюванням молодого контингенту (віком 20–40 років), поширеність якого широко варіює від 0,2 до 2% (Полулях М.В. та співавт., 2010; Echarhou et al., 2015).

З метою своєчасної діагностики та раннього патогенетично обґрунтованого лікування РЗ важливим є вивчення біохімічних механізмів розвитку даних захворювань та пошук нових маркерів для раннього їх виявлення. Так, на сучасному етапі розвитку діагностики РА та АСА важливим доповненням для їх верифікації можна розглядати систему NO-синтаза/аргіназа лімфоцитів крові.

В останні десятиріччя інтерес до аргінази викликаний її участю в метаболізмі нітроген оксиду (NO). Відомо, що обмін *L*-аргініну здійснюється, як мінімум, двома шляхами: окисним NO-синтазним (з генерацією нітроген оксиду) і неокисним аргіназним (з утворенням карбаміду та орнітину – субстрату для синтезу поліамінів). Аргіназа, як конкуруючий за субстрат ензим і метаболіти подальшого перетворення її продуктів – поліаміни – здатні істотно впливати на активність NO-синтазної реакції (Morris S.M. Jr., 2007; Mielczarek-Puta M. et al., 2008; Wu G. et al., 2009; Ференц І.В. та співавт., 2012; Склярова В.О., 2013).

При РЗ порушення імунітету супроводжуються до змінами у синтезі NO (Марков Х.М., 2000). За цих умов NO виявляє як цитотоксичні так і цитостатичні ефекти, які ведуть до ускладненого перебігу аутоімунного процесу (Ванин А.Ф., 2000), регулює численні фізіологічні функції, бере участь у розвитку багатьох патологічних станів, володіє широким спектром біологічної дії і характеризується поліфункціональністю проявів (Перепелиціна О.М. і співавт., 2010; Воробець З.Д. та співавт., 2013; Склярова В.О., 2013).

На сьогодні проведена велика кількість робіт, присвячена вивченню ензиматичного спектру лімфоцитів крові при різноманітних захворюваннях, однак дослідження функціональної активності як аргінази, так і NO-синтази власне при РА та АСА є незначними та обмеженими, а біохімічні механізми їх дисфункції остаточно нез'ясованими. Тому вивчення функціонування системи NO-синтаза/аргіназа лімфоцитів крові при РА та АСА та дослідження біохімічних механізмів їх дисфункції обумовлює актуальність даної роботи.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота є фрагментом планової науково-дослідної теми кафедри медичної біології та кафедри нормальної фізіології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького "Дослідження функціонально-метаболических резервів стрес-лімітуючих систем організму за екстремальних умов з метою виявлення ефективних способів їх корекції" (державний реєстраційний номер 011101U000121). Автор є співвиконавцем даної теми, ним особисто проведені лабораторні дослідження, представлені у дисертаційній роботі. Тема дисертації затверджена проблемною комісією з медико-біологічних дисциплін (протокол № 1 від 14.03.2011 року) та Вченою радою медичного факультету № 2 Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (протокол № 1 від 19.05.2011 р.).

**Мета дослідження:** з'ясування особливостей аргіназного та NO-синтазного шляхів метаболізму L-аргініну в лімфоцитах периферичної крові при ревматоїдному артриті та анкілозивному спондилоартриті.

Для досягнення поставленої мети у роботі було заплановано вирішення наступних завдань:

1. Дослідити морфологічні та ензиматичні особливості інтактних лімфоцитів периферичної крові та лімфоцитів пермеабілізованих детергентом сапоніном в практично здорових осіб і в пацієнтів з ревматоїдним артритом та анкілозивним спондилоартритом.
2. З'ясувати оптимальні умови для ідентифікації та дослідження ензиматичної активності аргінази та NO-синтази лімфоцитів периферичної крові.
3. Ідентифікувати та вивчити зміни ензиматичної активності аргінази лімфоцитів периферичної крові за розвитку ревматичної патології.
4. Ідентифікувати та вивчити зміни ензиматичної активності ендотеліальної та індукцйбельної ізоформ NO-синтази лімфоцитів периферичної крові за розвитку ревматичної патології.
5. Провести порівняльне дослідження кінетичних властивостей аргінази та NO-синтази лімфоцитів периферичної крові пацієнтів з ревматоїдним артритом та анкілозивним спондилоартритом та осіб групи контролю.

**Об'єкт дослідження:** функціонування системи NO-синтаза/аргіназа лімфоцитів периферичної крові пацієнтів з ревматоїдним артритом та анкілозивним спондилоартритом.

**Предмет дослідження:** активність аргінази та NO-синтази лімфоцитів периферичної крові за умов розвитку ревматичної патології; кінетичний аналіз властивостей досліджуваних ензимів.

**Методи дослідження.** У роботі були застосовані біохімічні методи дослідження (препаративна біохімія, ензимологія, спектрофотометрія, біохімічна кінетика), методи електронної мікроскопії та статистичного аналізу.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше проведено комплексне дослідження функціонування аргінази та окремих ізоформ NO-синтази лімфоцитів периферичної крові пацієнтів з ревматоїдним артритом та анкілозивним спондилоартритом.

Використовуючи пермеабілізацію мембран лімфоцитів крові детергентом сапоніном встановлено оптимальні умови, а також вдосконалено методичні підходи для ідентифікації та дослідження ензиматичної активності аргінази та NO-синтази лімфоцитів периферичної крові.

Виявлено відмінності у функціонуванні аргінази та ізоформ NO-синтази, які полягають у зростанні ензиматичної активності аргінази та індукбельної ізоформи NO-синтази та зниженні активності ендотеліальної ізоформи ензиму лімфоцитів крові пацієнтів з ревматоїдним артритом та анкілозивним спондилоартритом порівняно з практично здоровими особами.

Вперше комплексно вивчено кінетичні характеристики аргіназної та ізоформ NO-синтазної реакції лімфоцитів крові ( $V_0$ ,  $P_{\max}$ ,  $\tau$ ,  $V_{\max}$ ,  $K_m$ ) та біохімічні механізми їх модуляції за розвитку ревматичної патології.

**Практичне значення отриманих результатів.** Результати проведених досліджень розкривають раніше невідомі біохімічні механізми змін активностей аргінази та ізоформ NO-синтази у лімфоцитах крові за умов розвитку ревматичної патології, доповнюють відомості про патогенез ревматичних захворювань, а також можуть бути використані для оцінки ефективності фармакотерапії.

Отримані дані також сприятимуть розробці нових додаткових методів і підходів до діагностування та лікування пацієнтів з ревматоїдним артритом та анкілозивним спондилоартритом.

Результати дисертаційної роботи можуть бути впроваджені у навчальний процес з курсу біохімії, медичної біології та патологічної фізіології для студентів медичних спеціальностей вищих медичних (фармацевтичних) навчальних закладів.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертаційна робота є самостійною завершеною науковою працею. Дисертантом особисто здійснено патентно-інформаційний пошук, аналіз науково-медичної інформації за темою дисертаційної роботи, самостійно проведено виконання лабораторних досліджень, статистичну обробку даних та аналіз отриманих результатів, сформульовано висновки дисертації. Разом із науковим керівником, д.б.н., проф. З. Д. Воробцем розроблена програма, визначені мета і завдання дослідження, методичні підходи до проведення досліджень. В міжфакультетській лабораторії електронної мікроскопії Львівського національного

університету імені Івана Франка проведено електронно-мікроскопічні дослідження лімфоцитів крові. У працях, опублікованих одноосібно та у співавторстві, дисертанту належить фактичний матеріал і основний творчий доробок: результати власних досліджень, участь в аналізі та узагальненні отриманих даних, підготовлено праці до друку.

**Апробація результатів дисертації.** Дисертаційну роботу апробовано на розширеному засіданні кафедри медичної біології, кафедри біохімії, кафедри гістології, цитології та ембріології та кафедри біофізики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (протокол № 21 від 21 квітня 2015 р.).

Результати досліджень та основні положення дисертації були представлені на наукових семінарах кафедри медичної біології (Львів, 2011, 2012, 2013), науково-практичній конференції «Механізми фізіологічних функцій в експерименті та клініці» (Львів, 2011), науково-практичній конференції "Біохімічні основи патогенезу ураження внутрішніх органів різної етіології та способи їх фармакологічної корекції" (Тернопіль, 2011), 11<sup>th</sup> International Congress of Medical Sciences for medical students and young doctors, 12<sup>th</sup> International Congress of Medical Sciences for medical students and young doctors (Sofia, Bulgaria, 2012, 2013), III з'їзді Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом (Ялта, 2012), IV Всеукраїнській науково-практичній інтернет-конференції "Український науково-інтелектуальний простір: реалії та перспективи розвитку" (м. Переяслав-Хмельницький, 2012), XIV Конгресі Світової Федерації Українських Лікарських Товариств (Донецьк, 2012), IV Конгресі патофізіологів України "Від експериментальних досліджень до клінічної патофізіології" (Крим, 2012), X Міжрегіональній науковій конференції "Актуальні питання біології та медицини" (Луганськ, 2012), 74-му міжнародному медичному конгресі молодих учених "Актуальні проблеми клінічної, теоретичної, профілактичної медицини, стоматології та фармації" (Донецьк, 2012), II Міжнародній конференції молодих вчених "Фізіологія: від молекул до організму" (Київ, 2012), IX Міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених "Актуальні питання сучасної медицини" (Харків, 2013), XI Міжнародній науковій міждисциплінарній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених "Шевченківська весна 2013: біологічні науки" (Київ, 2013).

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 24 роботи, з яких 11 статей у наукових фахових виданнях, рекомендованих МОН України та 13 тез доповідей у матеріалах наукових з'їздів, міжнародних і вітчизняних конференцій та конгресів.

**Структура дисертації.** Дисертація викладена на 138 сторінках друкованого тексту та включає вступ, огляд літератури, опис матеріалів і методів досліджень, власні дослідження, аналіз та узагальнення одержаних результатів, висновки, список використаної літератури, який містить 255 джерел (106 кирилицею і 149 латиницею). Дисертація ілюстрована 9 таблицями та 19 рисунками.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У розділі “Огляд літератури” описано морфо-функціональні властивості лімфоцитів крові, подано загальну характеристику метаболічних порушень в патогенезі РА та АСА, охарактеризовано та узагальнено сучасні уявлення стосовно функціонування аргінази та NO-синтази лімфоцитів крові. Особлива увага відводиться змінам функціональної активності аргінази та NO-синтази в організмі людини при розвитку патологічних процесів.

**Матеріали і методи досліджень.** Загальна кількість пацієнтів, залучених у дослідження, складала 82 особи, зокрема 50 пацієнтів з РА (74 % жінки, 26 % чоловіки) та 32 пацієнти з АСА (29 % жінки, 71 % чоловіки) віком від 18 до 56 років (середній вік –  $38,6 \pm 3,2$  років), які перебували на стаціонарному лікуванні у ревматологічному відділенні Львівської обласної клінічної лікарні. У дослідження залучали осіб зі встановленим діагнозом РА або АСА без наявності супутніх уражень сполучної тканини запального характеру, інших запальних захворювань, онкологічної патології на момент початку дослідження. Групу порівняння (контролю) становили практично (клінічно) здорові особи ( $n = 30$ ), репрезентативні за віком (44 % жінки, 56 % чоловіки, середній вік –  $34,6 \pm 4,4$  роки).

Комісією з питань біоетики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького порушень морально-етичних норм при виконанні дисертаційної роботи не виявлено (протокол № 1 від 20 січня 2015 р.).

Моноядерні лімфоцити периферичної крові (ЛПК) людини виділяли з гепаринізованої свіжоотриманої крові у градієнті густини фікол-тріумбразу (Boyum A, 1968). Життєздатність лімфоцитів, яка в усіх дослідах складала не менше 95 %, оцінювали за забарвленням трипановим синім. Для перфорації мембран лімфоцитів крові та розкриття латентної активності аргінази та NO-синтази лімфоцити пермеабілізували сапоніном у концентрації 0,2 %, приймаючи за основу дані, отримані раніше (Коноварт О.В., 2008; Воробець Д.З., 2011; Фафула Р.В., 2012).

Визначення активності аргінази ЛПК проводили за утворенням сечовини, вміст якої визначали за допомогою діагностичного набору відповідно до інструкції фірми-виробника (Сімко, Україна). Ензиматичну реакцію ініціювали внесенням аліквоти пермеабілізованих сапоніном лімфоцитів в інкубаційне середовище наступного складу (мМ): трис-НСІ – 20 (рН = 9,5), L-аргінін – 100,  $MnCl_2$  – 2,0. Кількість протеїну у пробі була в межах 50 – 100 мкг/мл. Інкубацію здійснювали 30 хв при температурі  $37^{\circ}C$ . Ензиматичну реакцію зупиняли внесенням в інкубаційне середовище 40 мкл «стоп-розчину» 50 % трихлороцтової кислоти, центрифугували і в одержаному супернатанті визначали загальний вміст сечовини (Davis R.H., Mora J., 1968).

Усі зразки спектрофотометрували проти контрольної проби при 520 нм. Активність аргінази виражали у нмолях сечовини/хв·мг загального протеїну.

Для тестування активності NO-синтази аліквоти пермеабілізованих сапоніном лімфоцитів інкубували в субстратній суміші наступного складу (мМ): трис-НСІ – 80 (рН = 7,4),  $CaCl_2$  – 5, L-аргінін – 0,15,  $NADPH(H^+)$  – 0,12. Кількість протеїну в пробі

була в межах 50 – 100 мкг/мл. Дослідні проби спектрофотометрували проти контрольних і безсубстратних зразків. Активність NO-синтази виражали в наномолях окисненого NADPH(H<sup>+</sup>)/хв·мг загального протеїну (Сагач В., 2005).

Активність іNO-синтази визначали аналогічно, додаючи в інкубаційне середовище хелатор Ca<sup>2+</sup> ЕГТА (4 мМ) замість CaCl<sub>2</sub>. Активність eNO-синтази розраховували як різницю між загальною активністю NO-синтази і активністю Ca<sup>2+</sup>-незалежної ізоформи NO-синтази.

Вміст протеїну у лімфоцитарній суміші для визначення активності аргінази та NO-синтази ЛПК визначали за методом Лоурі та ін. (Lowry O. et al., 1951).

Дослідження кінетичних властивостей ензиматичної реакції аргінази та NO-синтази проводили в стандартному середовищі інкубації, що було модифіковане за фізико-хімічними характеристиками чи складом відповідних компонентів (час інкубації, кількість протеїну лімфоцитарної суміші у пробі, концентрація субстрату (*L*-аргінін), активатора (Mn<sup>2+</sup>), детергента (сапонін)).

Всі дослідження з вивчення властивостей аргіназної та NO-синтазної реакції проводили в режимі початкової швидкості  $V_0$  (лінійність накопичення продукту ( $P$ ) у часі).

Уявні кінетичні параметри реакції аргінази та NO-синтази, такі як початкова швидкість реакції  $V_0$ , максимальна (платова) кількість утворення продукту реакції  $P_{\max}$  та характеристичний час реакції  $\tau$  визначали шляхом лінеаризації у координатах  $\{P/t$  від  $P\}$ , де  $P$  – кількість продукту реакції, а  $t$  – час інкубації (Костерін С.О., 1987).

Уявні кінетичні параметри, властиві для ензиматичної реакції аргінази та NO-синтази – константу активації йонами Mn<sup>2+</sup> ( $K_{Mn^{2+}}$  – для аргінази), константу спорідненості ( $K_{mL-arg}$  – для аргінази та NO-синтази), максимальну швидкість аргіназної та NO-синтазної реакції, визначену за *L*-аргініном ( $V_{\max}$ ) та Mn<sup>2+</sup> (для аргінази) визначали в координатах Лайнуївера-Берка (Келети Т., 1990).

Одержані концентраційні залежності швидкості ензиматичної реакції аргінази від досліджуваних реагентів (*L*-аргінін, Mn<sup>2+</sup>) та NO-синтази (*L*-аргінін) будували в координатах:  $\{1/V$  від  $1/S\}$ , де  $S$  – задана концентрація реагенту (*L*-аргінін, Mn<sup>2+</sup>), а  $V$  – швидкість ензиматичної реакції аргінази (при заданій концентрації *L*-аргініну і Mn<sup>2+</sup>) та NO-синтази (при заданій концентрації *L*-аргініну).

Для електронної мікроскопії фіксацію свіжовиділених лімфоцитів крові проводили з використанням 1,0 % розчину OsO<sub>4</sub> у какодилатному буфері 90 хв при 0 °С. Ультратонкі зрізи отримували на ультрамікротомі УМТП-6 і контрастували цитратом свинцю за Рейнольдсом (Reynolds E., 1963). Перегляд і фотографування зразків проводили на електронному трансмісійному мікроскопі ПЕМ-100.

Варіаційно-статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням програмного пакета для персональних комп'ютерів *Microsoft Excel*. Достовірність змін встановлювали за  $t$ -критерієм Ст'юдента. Критичні рівні достовірності при перевірці статистичних гіпотез у дослідженнях брали рівними 0,95, 0,99 та 0,999. Рівняння прямої лінії, яке найкраще апроксимує дані, розраховували із використанням метода найменших



квадратів. Абсолютне значення коефіцієнта кореляції  $r$  становило 0,85 – 0,98. Достовірність розрахованих параметрів прямої перевіряли за  $F$ -критерієм Фішера: достовірною вважали апроксимацію за якої  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

**Ультраструктурні зміни лімфоцитів крові пермеабілізованих детергентом сапоніном.** Лімфоцити займають вагому частину у загальній популяції імункомпетентних клітин, що мають різну форму і функції. Аналіз електронно-мікроскопічних досліджень показав, що як за фізіологічного стану організму, так і при розвитку ревматичної патології основна частина лімфоцитів крові характеризується типовою будовою. Виявлено, що лімфоцити крові мають чітко окреслені цитоплазматичні та ядерні мембрани. Плазматична мембрана суцільна та утворює незначні вигини та вирости. Лімфоцити крові мають велике, овальне ядро, локалізоване здебільшого ексцентрично.

При електронно-мікроскопічному дослідженні лімфоцитів крові, інкубованих з детергентом сапоніном, відмічено, що клітини в цілому зберігають свою форму, однак, виявлені значні зміни їх ультраструктури. Ці зміни охоплюють майже всі структурні компоненти лімфоцита, а головним чином його цитоплазматичну мембрану. Плазматична мембрана лімфоцита не є суцільною, спостерігаються ділянки розпушеності мембран і цитоплазматичний простір вільно контактує із зовнішньоклітинним середовищем.

Отже, за умов інкубації лімфоцитів крові сапоніном зберігається нативність, природне співвідношення об'ємів і стабільність внутрішньоклітинних депо, а каталітичні центри ензимів стають доступними для субстратів.

**Залежність активності аргінази та NO-синтази лімфоцитів крові від концентрації сапоніну.** Дослідження на пермеабілізованих сапоніном лімфоцитах крові проводили як за фізіологічного стану організму, так і при ревматичній патології.

Метою даного етапу роботи був добір оптимальних умов для визначення активності аргінази та NO-синтази у ЛПК з використанням сапоніну як пермеабілізуючого агента. Сапонін використовували в діапазоні концентрацій від 0,02 до 0,3 %.

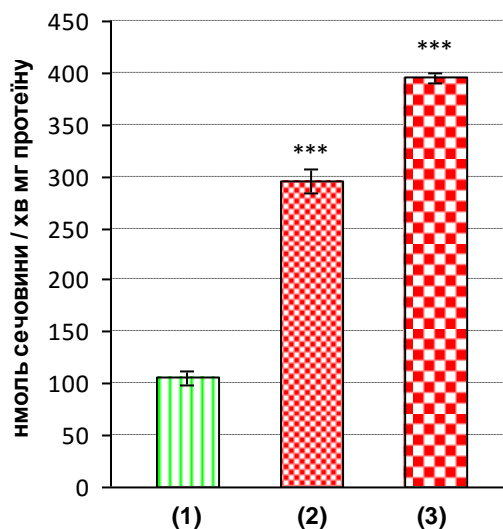
Виявлено, що низькі концентрації детергенту (0,02-0,04 %) є недостатніми для розкриття латентної активності досліджуваних ензимів. Максимальне значення активності аргінази та NO-синтази спостерігається за концентрації 0,2 %. Таким чином, саме цей діапазон концентрації сапоніну можна вважати найоптимальнішим для практичного використання в дослідженнях з вивчення кінетичних та каталітичних властивостей ензиматичної реакції аргінази та NO-синтази.

**Зміни ензиматичної активності аргінази лімфоцитів крові пацієнтів з ревматоїдним артритом та анкілозивним спондилоартритом.** Вивчення змін активності аргінази при патологічних процесах і з'ясування біохімічних механізмів цих

змін, може, певною мірою, розкривати патофізіологічні механізми зі сторони імунної системи.

В результаті проведених досліджень встановлено, що активність аргінази в лімфоцитах крові практично здорових осіб становить  $106,0 \pm 6,7$  нмоль сечовини/хв·мг протеїну ( $n=30$ ).

У пацієнтів з РА активність аргінази лімфоцитів крові істотно відрізняється від контрольної групи і становить  $295,0 \pm 11,6$  нмоль сечовини/хв·мг протеїну ( $n=43$ ). У пацієнтів з АСА, що становили другу досліджувану групу ензиматична активність аргінази зростає ще стрімкіше і складає  $395,0 \pm 3,9$  нмоль сечовини/хв·мг протеїну ( $n=35$ ) (рис. 1). Отже, у першій досліджуваній групі (пацієнти з РА) відмічається зростання активності ензиму в 2,7 рази, а в другій групі (пацієнти з АСА) – в 3,7 рази.

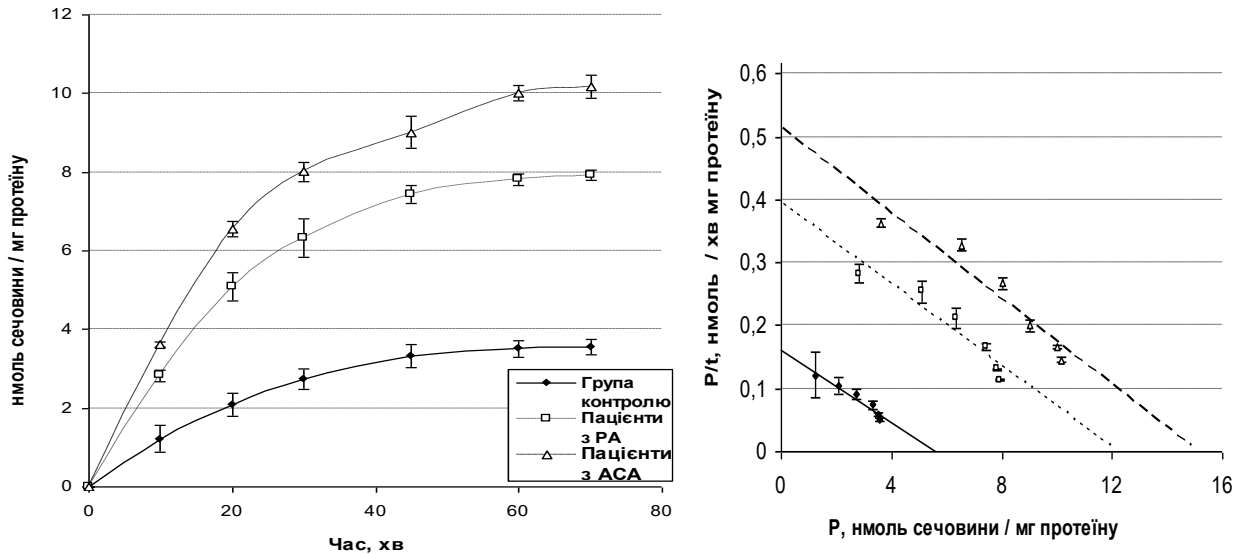


**Рис. 1.** Активність аргінази лімфоцитів периферичної крові у пацієнтів з ревматоїдним артритом ( $n=43$ ) (2) та анкілозивним спондилоартритом ( $n=35$ ) (3) та осіб групи контролю ( $n=30$ ) (1),  $M \pm m$ . \*\*\* $p < 0,001$  стосовно величин в осіб групи контролю.

*Кінетичний аналіз реакції гідролізу L-аргініну лімфоцитів периферичної крові.* Зміни ензиматичної активності аргінази імунокомпетентних клітин виявлені у пацієнтів з різними захворюваннями (Воробець Д.З., 2010; Мельник О.В., 2013; Якубець О.І., 2013; Склярова В.О., 2013). Однак біохімічні механізми, що ведуть до змін функціональної активності як аргінази, так і NO-синтази остаточно не досліджені. Для з'ясування можливих механізмів, які лежать в основі цих змін, проведено кінетичний аналіз аргіназної реакції лімфоцитів крові пацієнтів з ревматичною патологією.

З метою вивчення особливостей і механізму роботи аргінази визначали початкову швидкість реакції ( $V_0$ ), максимальну (платову) кількість утворення продукту реакції ( $P_{max}$ ) та характеристичний час реакції ( $\tau$ ). Для встановлення цих кінетичних параметрів реакції аргінази лімфоцитів досліджували динаміку утворення сечовини.

Аналіз отриманих результатів дозволяє дійти до висновку, що кінетика реакції гідролізу *L*-аргініну, каталізованого лімфоцитами, узгоджується із закономірностями реакції першого порядку в діапазоні 0 - 30 хв (рис. 2). Примітно, що у всьому діапазоні фактора часу кількість утвореної сечовини за участю аргінази лімфоцитів пацієнтів з РЗ значно вища порівняно з цією величиною у практично здорових осіб.



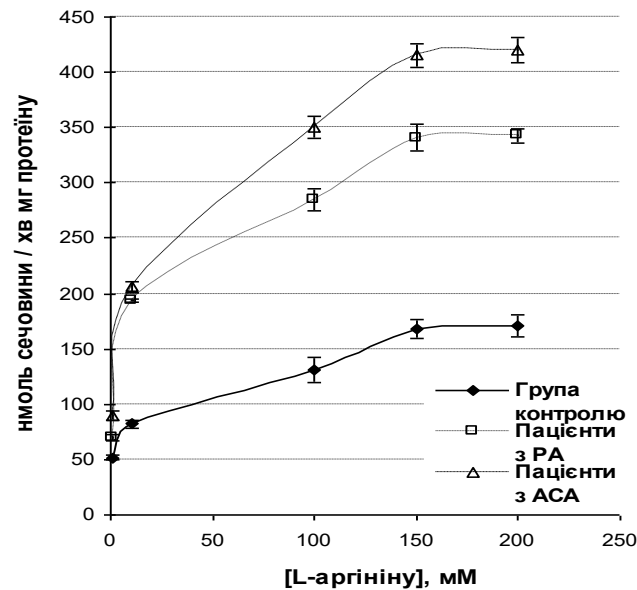
**Рис. 2.** Динаміка утворення сечовини лімфоцитами крові в осіб групи контролю та в пацієнтів з ревматоїдним артритом та анкілозивним спондилоартритом і лінеаризація кривих накопичення сечовини у координатах  $\{P/t; P\}$ .  $M \pm m$ ,  $n = 6$ ;  $(r > 0,9; F < 0,02)$ .

За відсутності статистично достовірної різниці величини  $\tau$  гідролізу *L*-аргініну лімфоцитами крові, виділеними у пацієнтів з РА та АСА й осіб групи контролю, нами показано, що початкова швидкість аргіназної реакції ( $V_0$ ) і максимальна кількість утворення продукту реакції ( $P_{max}$ ) у пацієнтів з РА та АСА істотно відрізняються від цих величин у контрольній групі осіб. Так, встановлено, що величина  $V_0$  реакції гідролізу *L*-аргініну лімфоцитами крові в пацієнтів з РА зростає в 2,5 рази, а в пацієнтів з АСА – в 3,2 рази порівняно з практично здоровими особами. Величина  $P_{max}$  реакції гідролізу *L*-аргініну лімфоцитами крові пацієнтів з РА та АСА також перевищує цю величину в практично здорових осіб в 2,1 рази та в 2,7 рази відповідно.

Таким чином, в ЛПК пацієнтів з РА та АСА накопичення сечовини аргіназної реакції відбувається швидше і більш активно. Водночас характеристичний час реакції в нормі і при ревматичній патології суттєво не відрізняється

*Залежність активності аргінази лімфоцитів крові від концентрації L-аргініну.* На сьогоднішній час проведена значна кількість досліджень, присвячена вивченню ролі *L*-аргініну і його метаболіту NO в функціонуванні нервової, імунної, серцево-судинної та інших систем організму (Бабушкіна А.В., 2009; Склярова В.О., 2013; Morris C.R., 2005; Sarban S., 2007; Nomelini R., 2008; Wu G., 2009). Враховуючи

поліфункціональний характер біологічних впливів цієї амінокислоти, безсумнівно, що ефект *L*-аргініну залежить від коливань його концентрації в крові. Відповідно, зміни концентрації субстрату у клітині та позаклітинному середовищі ведуть до порушення функціонування ряду ензиматичних систем клітини. Оскільки аргіназа використовує *L*-аргінін в якості субстрату, безсумнівно, концентрація останнього в інкубаційному середовищі повинна впливати на швидкість аргіназної реакції. При збільшенні концентрації *L*-аргініну в інкубаційному середовищі спостерігається лінійне зростання активності аргінази з наступним виходом на плато за наявності 150 мМ *L*-аргініну (рис. 3).



**Рис. 3.** Концентраційна залежність впливу *L*-аргініну на активність аргінази лімфоцитів осіб групи контролю, пацієнтів з ревматоїдним артритом та анкілозивним спондилоартритом,  $M \pm m$ ,  $n = 6$ .

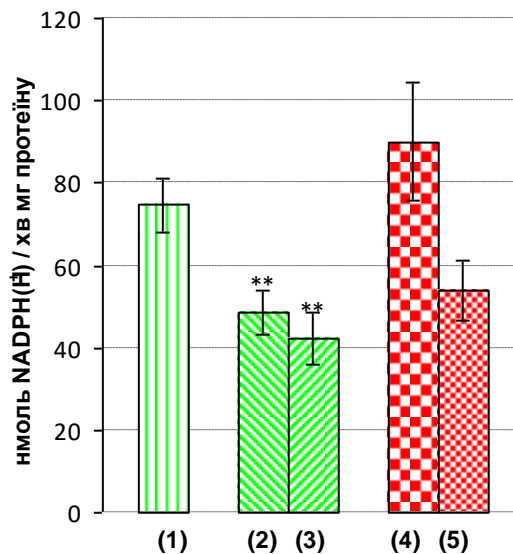
Як впливає з рис. 3, у всьому діапазоні досліджуваних концентрацій *L*-аргініну активність аргінази пацієнтів з РЗ підвищена порівняно з цією величиною у практично здорових осіб. Водночас, значення активності аргінази лімфоцитів крові пацієнтів обох досліджуваних груп достовірно відрізняються порівняно з величинами за фізіологічного стану організму. Так, максимальна швидкість гідролізу *L*-аргініну ЛПК пацієнтів з РА та АСА, визначена за *L*-аргініном ( $V_{max}$ ) відрізняється від такої у практично здорових осіб в 2,3 та в 2,7 рази відповідно. Константа спорідненості до *L*-аргініну у ЛПК хворих на РА та АСА ( $K_{L-arg}$ ) також зростає в 1,8 та 2,1 рази відповідно порівняно з практично здоровими особами.

*Залежність активності аргінази лімфоцитів крові від концентрації йонів  $Mn^{2+}$ .* Аргіназа – металоензим, який активується двовалентними йонами  $Mn^{2+}$ , що відіграють важливу роль у формуванні ензим-субстратного комплексу. Оскільки  $Mn^{2+}$  є активною складовою ензиму і діє як кофактор, раціональним є дослідження функціонування аргінази в залежності від концентрації йонів  $Mn^{2+}$ .

Криві, які віддзеркалюють залежність активності аргінази ЛПК практично здорових осіб та пацієнтів з РА та АСА від вмісту йонів  $Mn^{2+}$  в інкубаційному середовищі мають характерний куполоподібний вигляд. Початкова максимальна швидкість гідролізу *L*-аргініну ( $V_{max}$ ) у пацієнтів з РА перевищує таку в 1,7 рази, а в пацієнтів з АСА в 2,4 рази порівняно з практично здоровими особами. Уявна константа активації йонами  $Mn^{2+}$  ( $K_{Mn^{2+}}$ ) практично однакова як за фізіологічного стану організму, так і при ревматичній патології.

*Залежність початкової швидкості аргіназної реакції лімфоцитів крові від концентрації протеїну у лімфоцитарній суміші.* Досліджено, що поступове підвищення концентрації лімфоцитарного протеїну в середовищі інкубації веде до зростання початкової швидкості ( $V_0$ ) аргіназної реакції. Проте, у пацієнтів з РА та АСА величина  $V_0$  аргіназної реакції істотно перевищує таку в 3,1 та в 4,0 рази порівняно з практично здоровими особами.

**Зміни ензиматичної активності NO-синтази лімфоцитів крові пацієнтів з ревматоїдним артритом та анкілозивним спондилоартритом.** В результаті проведених досліджень з вивчення активності NO-синтази встановлено, що в ЛПК практично здорових осіб вона становить  $74,6 \pm 6,4$  нмоль NADPH( $H^+$ )/хв·мг протеїну ( $n=30$ ) (рис. 4). Враховуючи те, що іNO-синтаза за фізіологічної норми в лімфоцитах крові практично відсутня, оскільки за нашими даними вона складала  $1,32 \pm 0,18$  нмоль NADPH( $H^+$ )/хв·мг протеїну, що було в межах похибки, можна стверджувати, що в ЛПК практично здорових осіб функціонувала тільки eNO-синтаза.



**Рис. 4.** Зміни активності eNO-синтази та iNO-синтази лімфоцитів крові пацієнтів з ревматоїдним артритом ( $n=40$ ) та анкілозивним спондилоартритом ( $n=32$ ),  $M \pm m$ .

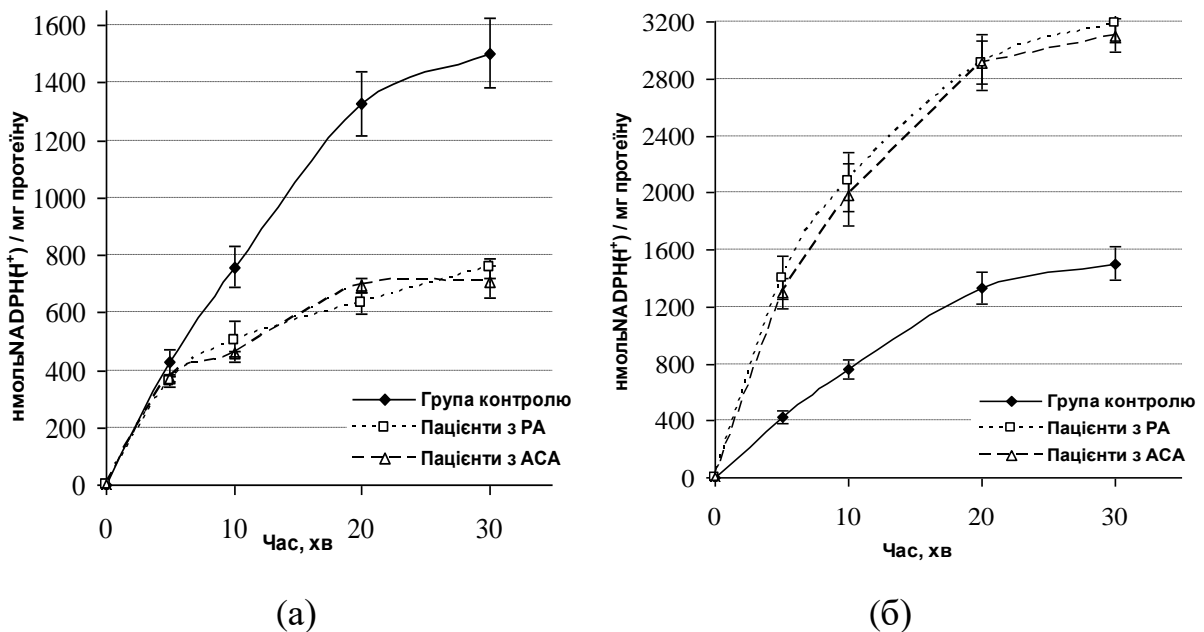
(1) – активність eNO-синтази осіб групи контролю; (2) – активність eNO-синтази пацієнтів з РА; (3) – активність eNO-синтази пацієнтів з АСА; (4) – активність iNO-синтази пацієнтів з РА; (5) – активність iNO-синтази пацієнтів з АСА.

\*\*  $p < 0,01$  стосовно величин в осіб групи контролю.

У пацієнтів з РА активність eNO-синтази ЛПК знижується в 2,7 рази порівняно з контрольною групою осіб і становить  $48,6 \pm 8,3$  нмоль NADPH(H<sup>+</sup>)/хв·мг протеїну (n=40). В той час активується iNO-синтаза і в даній групі осіб сягає  $90,1 \pm 14,3$  нмоль NADPH(H<sup>+</sup>)/хв·мг протеїну (рис. 4). У пацієнтів з АСА активність eNO-синтази також знижується в 1,8 рази порівняно з особами групи контролю і становить  $42,2 \pm 4,4$  нмоль NADPH(H<sup>+</sup>)/хв·мг протеїну (n=32). Одночасно iNO-синтаза зростає до  $54,2 \pm 7,2$  нмоль NADPH(H<sup>+</sup>)/хв·мг протеїну (рис. 4).

*Кінетичний аналіз NO-синтазної реакції лімфоцитів крові.* Дані досліджень показали, що кінетику NO-синтазної реакції лімфоцитами крові віддзеркалюють криві, які мають тенденцію до насичення (рис. 5). Аналіз отриманих результатів показує, що швидкість окиснення NADPH(H<sup>+</sup>) за участю eNO-синтази та iNO-синтази узгоджується із закономірностями реакції першого порядку в діапазоні 0 - 20 хв.

Як впливає з рис. 5 (а) у всьому діапазоні фактора часу швидкість окиснення NADPH(H<sup>+</sup>) за участю eNOS лімфоцитів крові пацієнтів з ревматичною патологією значно нижча порівняно з величиною в осіб групи контролю. Водночас, швидкість окиснення NADPH(H<sup>+</sup>) за участю iNOS (рис. 5 (б)) лімфоцитів крові пацієнтів з РА та АСА перевищує ці величини порівняно з контрольною групою осіб.



**Рис. 5.** Швидкість окиснення NADPH(H<sup>+</sup>) у процесі NO-синтазної реакції лімфоцитів крові за участю eNO-синтази (а) та iNO-синтази (б) у пацієнтів з ревматоїдним артритом та анкілозивним спондилоартритом та осіб групи контролю,  $M \pm m$ ,  $n = 6$ .

Значення кінетичних параметрів окиснення NADPH(H<sup>+</sup>) за участю eNOS лімфоцитів крові пацієнтів з РЗ й осіб групи контролю істотно відрізняються між собою. Так, початкова швидкість ( $V_0$ ) eNOS в пацієнтів з РА та АСА нижча в 3 рази порівняно з цією величиною контрольної групи осіб. Максимальна кількість утворення продукту

реакції ( $P_{\max}$ ) eNOS також знижується в пацієнтів з РА в 5,1 рази та в пацієнтів з АСА в 4,2 рази порівняно з величиною контрольної групи осіб.

Результати кінетичного аналізу свідчать, що окиснення NADPH( $H^+$ ) лімфоцитами крові за участю iNOS в пацієнтів з РЗ відбувається значно інтенсивніше, ніж за участю eNOS, а, в свою чергу, окиснення NADPH( $H^+$ ) за участю eNOS в контрольної групи осіб проходить швидше і більш активно, ніж при ревматичних патологіях. Величина  $\tau$  для iNOS та eNOS при ревматичній патології є нижчою порівняно з практично здоровими особами.

*Залежність активності NO-синтази лімфоцитів крові від концентрації L-аргініну.* При збільшенні концентрації L-аргініну в середовищі інкубації відбувається монотонне зростання ензиматичної активності двох ізоформ NO-синтази з наступним виходом на плато.

У всьому діапазоні досліджуваних концентрацій L-аргініну активність eNO-синтази пацієнтів з РА є зниженою порівняно з величиною в осіб групи контролю. Зниження ендотеліальної форми ензиму супроводжується різким зростанням активності його індукційної форми.

Максимальна швидкість ендотеліальної NO-синтазної реакції ( $V_{\max}$ ) лімфоцитів крові пацієнтів з РА та АСА є нижчою в 2,5 і 2,2 рази, відповідно, порівняно з контрольною групою осіб. Водночас, константа спорідненості до L-аргініну ( $K_{L-Arg}$ ) для всіх досліджуваних груп істотно не відрізняється

*Залежність початкової швидкості NO-синтазної реакції лімфоцитів крові від концентрації протеїну у лімфоцитарній суміші.* Досліджено, що поступове підвищення концентрації лімфоцитарного протеїну у середовищі інкубації веде до зростання початкової швидкості ( $V_0$ ) NO-синтазної реакції. Залежність окиснення NADPH( $H^+$ ) від вмісту протеїну в середовищі інкубації має однаковий характер як за участю eNO-синтази, так і за участю iNO-синтази. Проте, отримані дані свідчать, що величина  $V_0$  окиснення NADPH( $H^+$ ) за участю eNO-синтази у пацієнтів з РА та АСА знижена порівняно з контрольною групою осіб у 3 рази.

Таким чином, можна констатувати дисрегуляторні зміни в лімфоцитах крові пацієнтів з ревматичною патологією. Ці зміни проявляються у порушенні окисного (NO-синтазного) й неокисного (аргіназного) шляхів метаболізму L-аргініну, дисбалансу конститутивної (ендотеліальної) та індукційної NO-синтази в пацієнтів з ревматоїдним артритом та анкілозивним спондилоартритом.

Отримані нами результати дають можливість рекомендувати використання визначення активності аргінази та NO-синтази лімфоцитів крові як додаткового біохімічного теста на наявність ревматичної патології. Визначення ензиматичної активності досліджуваних ензимів лімфоцитів крові доцільне у комплексній діагностиці в пацієнтів з ревматичними захворюваннями, так як зміна активності аргінази та iNO-синтази дає якісну інформаційну оцінку функціонування імунотетентних клітин, відображає процеси метаболізму NO, а також може мати практичне значення для оцінки ефективності фармакотерапії.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення та нове вирішення актуального наукового завдання щодо з'ясування особливостей аргіназного та NO-синтазного шляхів метаболізму *L*-аргініну в лімфоцитах периферичної крові при ревматоїдному артриті та анкілозивному спондилоартриті.

В результаті вирішення наукового завдання зроблені наступні висновки:

1. На основі проведеного електронно-мікроскопічного дослідження пермеабілізованих детергентом сапоніном лімфоцитів периферичної крові та аналізу ензиматичної активності аргінази та NO-синтази показано, що для розкриття латентної ензиматичної активності вказаних ензимів як за фізіологічного стану організму, так і при ревматичній патології доцільно використовувати 0,2 % концентрацію сапоніну.
2. У пацієнтів з ревматоїдним артритом та анкілозивним спондилоартритом виявлено достовірне зростання активності аргінази лімфоцитів крові в 2,7 рази та 3,7 рази ( $p < 0,001$ ), відповідно, порівняно з практично здоровими особами.
3. Встановлено достовірне зниження активності кальцій-залежної ендотеліальної ізоформи NO-синтази лімфоцитів крові пацієнтів з ревматоїдним артритом в 1,5 рази ( $p < 0,001$ ) та в пацієнтів з анкілозивним спондилоартритом 1,8 рази ( $p < 0,001$ ) порівняно з практично здоровими особами.
4. Показано, що на фоні зниження кальцій-залежної ендотеліальної ізоформи NO-синтази лімфоцитів крові відбувається різке зростання кальцій-незалежної індукцйбельної ізоформи NO-синтази. Досліджено, що підвищення активності іNO-синтази має більш виражений характер в пацієнтів з ревматоїдним артритом, ніж в пацієнтів з анкілозивним спондилоартритом (в 1,6 рази).
5. Досліджено, що у лімфоцитах крові пацієнтів з ревматоїдним артритом та анкілозивним спондилоартритом накопичення сечовини аргіназної реакції відбувається швидше і більш активно (величина  $V_0$  в пацієнтів з РА та АСА зростає в 2,5 і в 3,2 рази ( $p < 0,001$ ) відповідно порівняно з контрольною групою осіб. Зростання активності аргінази відбувається за рахунок збільшення числа обертів ензиму (величина  $V_{max}$  в пацієнтів з РА та АСА зростає в 2,3 та в 2,7 рази ( $p < 0,001$ ) відповідно порівняно з контрольною групою осіб). Характеристичний час реакції в нормі і при ревматичній патології суттєво не відрізняється. Максимальна швидкість гідролізу *L*-аргініну аргіназної реакції, визначена за концентрацією йонів  $Mn^{2+}$  у пацієнтів з ревматичною патологією вища, ніж у донорів. Константа активації йонами  $Mn^{2+}$  не змінюється.
6. Встановлено, що за умов розвитку ревматичної патології в імунокомпетентних клітинах спорідненість еNO-синтази до *L*-аргініну не змінюється. Водночас інгібування активності еNO-синтази відбувається за рахунок зниження числа обертів ензиму (величина  $V_{max}$  знижується в 2,5 та в 2,2 рази ( $p < 0,001$ ) в пацієнтів з РА та з АСА відповідно порівняно з контрольною групою осіб).



7. Синтез NO в лімфоцитах крові пацієнтів з ревматичними захворюваннями здійснюється, головним чином, індукцибельною формою NO-синтази, а за нормальних фізіологічних умов за участю ендотеліальної форми ензиму. Початкова максимальна швидкість окиснення NADPH(H<sup>+</sup>) за участю eNO-синтази у пацієнтів з ревматичною патологією знижена порівняно з контрольною групою осіб в 3 рази ( $p < 0,001$ ).

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Активність аргінази в лімфоцитах периферичної крові у хворих на ревматоїдний артрит та анкілозивний спондилоартрит / Н. Е. Личковська, Р. В. Фафула, **У. П. Єфремова**, З. Д. Воробець // Світ біології та медицини. – 2011. – № 2. – С. 125–129. *(Дисертантом особисто проведено лабораторні дослідження; аналіз літературних джерел, статистичний аналіз отриманих результатів, написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*
2. A study of Na, K - ATPase and arginase activity in peripheral blood lymphocytes in patients with rheumatic diseases / N. Lychkovska, R. Fafula, **U. Efremova**, Z. Vorobets // Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska, Lublin-Polonia. – 2011. – Vol. XXIV, № 1 (20), Sectio DDD. – P. 171–177. *(Дисертантом проведено частину лабораторних досліджень; аналіз літературних джерел, статистичний аналіз отриманих результатів, написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*
3. Роль NO-синтазної системи в організмі людини при розвитку патологічних процесів / **У. П. Єфремова**, Н. Е. Личковська, Р. В. Фафула, З. Д. Воробець // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2012. – № 1. – С. 68–73. *(Фрагмент статті присвячений власним дослідженням та аналіз літературних джерел виконано дисертантом особисто; написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*
4. Фафула Р.В. Стан Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-АТР-азної та NO-синтазної системи в лімфоцитах периферичної крові хворих на ревматоїдний артрит та анкілозивний спондилоартрит / Р. В. Фафула, **У. П. Єфремова**, З. Д. Воробець // Біологія тварин. – 2012. – Т. 14, № 1–2. – С. 440–445. *(Дисертантом проведено частину лабораторних досліджень та статистичного аналізу отриманих результатів; аналіз літературних джерел, написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*
5. Воробець З.Д. Аргіназна система в організмі людини при розвитку патологічних процесів / З. Д. Воробець, **У. П. Єфремова**, О. І. Якубець // Клінічна та експериментальна патологія. – 2012. – № 2. – С. 153–160. *(Фрагмент статті присвячений власним дослідженням та аналіз літературних джерел виконано дисертантом особисто; написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*

6. Кінетичні особливості ензиматичної активності аргінази лімфоцитів периферичної крові у хворих на ревматичні захворювання / **У. П. Єфремова**, Р. В. Фафула, Н. Е. Личковська, З. Д. Воробець // Вісник проблем біології і медицини. – 2012. – Т. 2, Вип. 2. – С. 26–31. *(Дисертантом особисто проаналізовано літературні джерела, проведено лабораторні дослідження та здійснено статистичний аналіз отриманих результатів; написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*
7. Порушення метаболізму оксиду азоту при ревматоїдному артриті та його корекція / **У. П. Єфремова**, Н. Е. Личковська, Р. В. Фафула, З. Д. Воробець // Вісник Луганського національного університету імені Тараса Шевченка. – 2012. № 17. – С. 52–58. *(Дисертантом особисто проаналізовано літературні джерела, проведено лабораторні дослідження та статистичний аналіз отриманих результатів; написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*
8. Особливості нітрооксидсинтазної активності лімфоцитів периферичної крові при анкілозивному спондилоартриті / **У. П. Єфремова**, Н. Е. Личковська, Р. В. Фафула, З. Д. Воробець // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія. – 2012. – № 3 (52). – С. 103–107. *(Дисертантом особисто проаналізовано літературні джерела, проведено лабораторні дослідження та статистичний аналіз отриманих результатів; написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*
9. Методологічний підхід до вивчення ензиматичного спектру лімфоцитів при патологічних станах з використанням детергента сапоніну (ультраструктурне дослідження) / Р. В. Фафула, **У. П. Єфремова**, Н. Е. Личковська, О. В. Мельник, З. Д. Воробець, О. Р. Кулачковський // Вісник проблем біології та медицини. – 2012. – Вип. 4, Т. 1 (96). – С. 163–166. *(Аналіз літературних даних, проведення електронно-мікроскопічних досліджень, написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*
10. Characteristic of NO-synthase of peripheral blood lymphocytes of patients with rheumatic pathology / **U. Iefremova**, N. Lychkovska, R. Fafula, Z. Vorobets // Journal of Medical Science. – 2015. – N. 1 (84). – P. 81–96. *(Дисертантом особисто проаналізовано літературні джерела, проведено лабораторні дослідження та статистичний аналіз отриманих результатів; написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*
11. Функціонування NO-синтази лімфоцитів периферичної крові пацієнтів з ревматичною патологією / М. В. Купчак, **У. П. Єфремова**, П. П. Ковальський, Р. В. Фафула, З. Д. Воробець // Медицина транспорту України. – 2015. – № 2 (54). – С. 5–11. *(Дисертантом особисто проаналізовано літературні джерела, проведено лабораторні дослідження та статистичний аналіз отриманих результатів; написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*

12. Аргіназна активність в лімфоцитах периферичної крові у хворих на ревматичні захворювання / Н. Е. Личковська, **У. П. Єфремова**, Р. В. Фафула, З. Д. Воробець // Матеріали конференції “Механізми фізіологічних функцій в експерименті та клініці” 23–24 вересня 2011 р., ЛНМУ імені Д. Галицького. – С. 43–44. *(Дисертантом особисто проведено лабораторні дослідження, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).*
13. NO-синтазна активність лімфоцитів периферичної крові у хворих на ревматоїдний артрит та анкілозивний спондилоартрит / **У. П. Єфремова**, Р. В. Фафула, Н. Е. Личковська, З. Д. Воробець // Матеріали науково-практичної конференції “Біохімічні основи патогенезу ураження внутрішніх органів різної етіології та способи їх фармакологічної корекції”, 3–4 листопада 2011 р., м. Тернопіль. – Медична хімія. – Т. 13, № 4 (49). – С. 190. *(Дисертантом особисто проведено лабораторні дослідження, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).*
14. **Єфремова У. П.** Динаміка рівня аргінази та NO-синтази лімфоцитів периферичної крові у хворих на ревматоїдний артрит та анкілозивний спондилоартрит / У. П. Єфремова // Матеріали 74-го міжнародного медичного конгресу молодих учених “Актуальні проблеми клінічної, теоретичної, профілактичної медицини, стоматології та фармації”, 25–27 квітня 2012 р., м. Донецьк, ДНМУ імені М. Горького. – С. 15–16. *(Дисертантом особисто проведено лабораторні дослідження, підготовлено матеріали до друку).*
15. **Єфремова У.** Методичні підходи до розкриття латентної аргіназної активності лімфоцитів периферичної крові донорів і хворих на ревматичні захворювання / **У. Єфремова**, Н. Личковська // Матеріали IV Всеукраїнської науково-практичної інтернет-конференції “Український науково-інтелектуальний простір: реалії та перспективи розвитку”, 28–30 квітня 2012 р., ДВНЗ “Переяслав-Хмельницький державний педагогічний університет імені Г. Сковороди”. – С. 7–9. *(Дисертантом особисто проведено лабораторні дослідження, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).*
16. **Efremova U.** Alteration of arginase and NO-synthase activity of peripheral blood lymphocytes in patient with rheumatoid arthritis / U. Efremova // XI International Congress of Medical Sciences, Medical University Sofia, Bulgaria, May 3–5, 2012. – Abstract book. – 2012. – P. 19. *(Дисертантом особисто проведено лабораторні дослідження, підготовлено матеріали до друку).*
17. Порушення  $\text{Ca}^{2+}$  та NO-гомеостазу в лімфоцитах периферичної крові хворих на ревматоїдний артрит / Р. В. Фафула, **У. П. Єфремова**, Н. Е. Личковська, З. Д. Воробець // Матеріали 3-го з’їзду Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом, 16–20 травня 2012 р., м. Ялта. – С. 19. *(Дисертантом проведено частину лабораторних досліджень, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).*

18. **Єфремова У.П.** Залежність аргіназної активності лімфоцитів периферичної крові від концентрації йонів  $Mn^{2+}$  у хворих на ревматичні захворювання / **У. П. Єфремова**, З. Д. Воробець // Збірник наукових праць за матеріалами X Міжрегіональної наукової конференції, 17–18 травня 2012 р., м. Луганськ. Луганськ: Вид-во ДЗ «ЛНУ імені Тараса Шевченка» 2012. – С. 44–45. *(Дисертантом особисто проведено лабораторні дослідження, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).*
19. Активність аргінази та нітрооксидсинтази в лімфоцитах периферичної крові при ревматичних захворюваннях / **У. П. Єфремова**, Р. В. Фафула, Н. Е. Личковська, О. В. Мельник, З. Д. Воробець // Матеріали 6 Конгресу патофізіологів України, 3–5 жовтня 2012 року, Крим. Таврический медико-биологический вестник. – 2012. – Т. 15, № 3, Ч. 2. – С. 327. *(Дисертантом особисто проведено лабораторні дослідження, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).*
20. **Єфремова У.П.** Клініко-діагностичне значення визначення нітрооксидсинтази в лімфоцитах периферичної крові у хворих на ревматичні захворювання / **У. П. Єфремова**, Н. Е. Личковська, З. Д. Воробець // Матеріали XIV Конгресу Світової Федерації Українських Лікарських Товариств, 04–06 жовтня 2012 р., м. Донецьк. – С. 122–123. *(Дисертантом особисто проведено лабораторні дослідження, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).*
21. **Єфремова У. П.** Ензиматична активність аргінази та NO-синтази лімфоцитів периферичної крові у хворих на ревматоїдний артрит / **У. П. Єфремова** // Матеріали II наукової конференції молодих вчених “Фізіологія: від молекул до організму”, 8-9 жовтня 2012 р., Київ. – Фізіол. журн. – 2012. – Т. 58, № 6. – С. 101–102. *(Дисертантом особисто проведено лабораторні дослідження, підготовлено матеріали до друку).*
22. **Єфремова У. П.** Кінетичний аналіз гідролізу L-аргініну аргіназою лімфоцитів периферичної крові хворих на ревматичні захворювання / **У. П. Єфремова**, О. Е. Мельник // Матеріали XI Міжнародної науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених “Шевченківська весна 2013: біологічні науки”, 18–22 березня 2013 р., м. Київ, КНУ імені Тараса Шевченка, 2013. – С. .. *(Дисертантом особисто проведено частину лабораторних досліджень, підготовлено матеріали до друку).*
23. **Єфремова У. П.** Аналіз аргіназної реакції лімфоцитів периферичної крові хворих на ревматичні захворювання / **У. П. Єфремова**, О. Е. Мельник // Матеріали міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених “Актуальні питання сучасної медицини”, 18–19 квітня 2013 р., Харків, ХНУ імені В.Н. Каразіна, 2013. – С.100–101. *(Дисертантом особисто проведено частину лабораторних досліджень, підготовлено матеріали до друку).*
24. **Iefremova U.** Kinetic peculiarities of arginase in peripheral blood lymphocytes in patient with rheumatic diseases / **U. Iefremova** // XII International Congress of Medical Sciences, Sofia, Bulgaria, May 9–12, 2013. – Abstract book. – 2013. – P. 72.

*(Дисертантом особисто проведено лабораторні дослідження, підготовлено матеріали до друку).*

## **АНОТАЦІЯ**

**Єфремової У.П. Властивості аргінази та NO-синтази лімфоцитів периферичної крові при ревматичних захворюваннях. – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Державний вищий навчальний заклад “Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України”. Тернопіль, 2015.

Дисертація присвячена дослідженню системи NO-синтаза/аргіназа лімфоцитів крові пацієнтів з ревматоїдним артритом та анкілозивним спондилоартритом. Встановлено достовірне зростання активності аргінази, порушення балансу конститутивної (ендотеліальної) та індукцибельної NO-синтази лімфоцитів крові в пацієнтів з ревматичною патологією порівняно з практично здоровими особами.

Досліджено, що у лімфоцитах крові пацієнтів з ревматоїдним артритом та анкілозивним спондилоартритом накопичення сечовини аргіназної реакції відбувається швидше і більш активно. Зростання активності аргінази відбувається за рахунок збільшення числа обертів ензиму. Максимальна швидкість гідролізу *L*-аргініну, визначена за концентрацією йонів  $Mn^{2+}$  у пацієнтів з ревматичною патологією вища, порівняно з особами групи контролю.

Встановлено, що за умов розвитку ревматичної патології в імунокомпетентних клітинах спорідненість eNO-синтази до *L*-аргініну не змінюється. Водночас інгібування активності eNO-синтази відбувається за рахунок зниження числа обертів ензиму. Синтез NO в лімфоцитах крові пацієнтів з ревматичними захворюваннями здійснюється, головним чином, iNO-синтазою, а за нормальних фізіологічних умов за участю eNO-синтази. Початкова максимальна швидкість окиснення NADPH( $H^+$ ) за участю eNO-синтази у пацієнтів з ревматичною патологією знижена, порівняно з контрольною групою осіб.

**Ключові слова:** аргіназа, NO-синтаза, нітроген оксид, лімфоцити, ревматоїдний артрит, анкілозивний спондилоартрит.

## **АННОТАЦИЯ**

**Єфремової У.П. Свойства аргиназы та NO-синтазы лимфоцитов периферической крови при ревматических заболеваниях. – Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 – биохимия. – Государственное высшее учебное заведение “Тернопольский государственный медицинский университет имени И.Я. Горбачевского МОЗ Украины”. Тернополь, 2015.

Диссертация посвящена исследованию системы NO-синтаза/аргиназа лимфоцитов крови пациентов с ревматоидным артритом и анкилозирующим спондилоартритом. Выявлено достоверное повышение активности аргиназы, нарушение баланса конститутивной (эндотелиальной) и индуцибельной NO-синтазы лимфоцитов крови у пациентов с ревматической патологией по сравнению с практически здоровыми лицами.

Доказано, что в лимфоцитах крови пациентов с ревматоидным артритом и анкилозирующим спондилоартритом накопление мочевины аргиназной реакции происходит быстрее и более активно. Рост активности аргиназы происходит за счет увеличения числа оборотов энзима. Максимальная скорость гидролиза *L*-аргинина, определенная по концентрации ионов  $Mn^{2+}$  у пациентов с ревматической патологией выше, чем у лиц группы контроля.

Установлено, что в условиях развития ревматической патологии в иммунокомпетентных клетках родство eNO-синтазы к *L*-аргинину не изменяется. В то же время ингибирование активности eNO-синтазы происходит за счет снижения числа оборотов энзима. Синтез NO в лимфоцитах крови пациентов с ревматическими заболеваниями осуществляется, главным образом, iNO-синтазой, а при нормальных физиологических условиях с участием eNO-синтазы. Начальная скорость окисления NADPH( $H^+$ ) с участием eNO-синтазы у пациентов с ревматической патологией снижена по сравнению с лицами группы контроля.

**Ключевые слова:** аргиназа, NO-синтаза, азот оксид, лимфоциты, ревматоидный артрит, анкилозирующий спондилоартрит

## SUMMARY

**Iefremova U.P. The properties of arginase and NO-synthase of peripheral blood lymphocytes in rheumatic diseases. – Manuscript.**

Dissertation for the scientific degree of PhD in Biology (specialty 03.00.04 – Biochemistry). – Ternopil State Medical University, Ternopil, 2015.

The dissertation is devoted to the research of NO-synthase/arginase system of blood lymphocytes of patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. The significant increase in arginase activity, an imbalance of constitutive (endothelial) and inducible NO-synthase of blood lymphocytes of patients with rheumatic disorders in comparison with practically healthy persons has been shown.

The comparative analysis of the kinetic properties of arginase and NO-synthase of saponin-perforated peripheral blood lymphocytes of patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis and practically healthy persons has been carried out.

It has been found that kinetics of *L*-arginine hydrolysis corresponds to the first-order reaction in the range 0-30 min. It has been shown that in peripheral blood lymphocytes of patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis the accumulation of urea in arginase reaction is faster and more active than in healthy persons. It has been found that the maximum speed of *L*-arginine hydrolysis in peripheral blood lymphocytes of patients with

rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis in 2.3 and 2,7 times higher respectively than in practically healthy persons. Affinity constant to *L*-arginine in peripheral blood lymphocytes in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis is greater in 1.8 and 2.1 times respectively in comparison to healthy persons. It has been found that in conditions of rheumatic pathology the increase of arginase activity in immunocompetent cells is related to the increase of maximum reaction rate. The maximum speed of *L*-arginine hydrolysis (determined by  $[Mn^{2+}]$ ) in peripheral blood lymphocytes in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis is greater in 1.7 and 2.4 times respectively in comparison to healthy persons. However, activation constant for  $Mn^{2+}$  was not altered in patient with rheumatic diseases.

It has been found that the development of rheumatic pathology is associated with an imbalance in the NO synthesis and changes of kinetic parameters of NO-synthase. It has been shown that reduction in eNO-synthase activity is accompanied by a sharp increase in activity of its inducible form. It has been found that kinetics of NADPH( $H^+$ ) oxidation with eNO-synthase and iNO-synthase corresponds to the first-order reaction in the range 0-20 min. It has been found that eNO-synthase activity in patients with rheumatic diseases was reduced in comparison with the value in healthy persons in the whole range of *L*-arginine concentration. It has been established that inhibition of eNO-synthase occurs by reducing the speed of the enzyme reaction. The maximum speed of NO-synthase reaction in peripheral blood lymphocytes of patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis in 2.5 and 2,2 times lower respectively than in practically healthy persons. Affinity constant to *L*-arginine in peripheral blood lymphocytes for all the studied groups is not significantly different. NO production in lymphocytes of patients with rheumatic diseases is mainly realized by iNO-synthase, whereas under normal physiological conditions endothelial form of the enzyme is being involved. The initial rate of NADPH( $H^+$ ) oxidation by eNO-synthase in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis in 3.0 times lower respectively than in practically healthy persons.

It was found that optimal saponin concentration for evaluation of latent arginase and NO-synthase activity is 0,2-0,3 %.

The ultrastructural changes in peripheral blood lymphocytes of patients with rheumatic pathology after lymphocyte incubation with detergent saponin have been studied. It has been shown that the addition of saponin is mainly leads to in the disintegration and disturbance of the plasma membrane integrity. It has been confirmed that such experimental approach to the studying of arginase and NO-synthase activity of lymphocytes, using perforated by saponin whole cell is perspective in biomedical research.

**Key words:** arginase, NO-synthase, nitric oxide, lymphocytes, rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis.

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

**АСА** – анкілозивний спондилоартрит

**ЛПК** – лімфоцити периферичної крові

**РА** – ревматоїдний артрит

**РЗ** – ревматичні захворювання

**NADPH** – нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат

**NO** – нітроген (II) оксид

Підписано до друку: 25.10.15 р. Формат 60x90/16.

Гарнітура Times New Roman. Папір офсетний.

Умов. друк. арк. 0,9 Тираж 100 прим.

ЛНМУ ім. Данила Галицького

вул. Пекарська, 69 м. Львів 79010