

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«Воронежский государственный университет»

*На правах рукописи*



**Крыльский Евгений Дмитриевич**

**СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЙ ГОМЕОСТАЗ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ  
РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ И ВОЗДЕЙСТВИИ ТИОКТОВОЙ КИСЛОТЫ**

Специальность 03.01.04. - Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель  
доктор биологических наук,  
профессор Попова Т.Н.

**Воронеж 2016**

## СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	9
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	14
1.1. Ревматоидный артрит.....	14
1.1.1. Характеристика и этиология заболевания.....	14
1.1.2. Патогенез ревматоидного артрита.....	18
1.1.3. Клиническая картина и системные проявления ревматоидного артрита.....	25
1.1.4. Диагностика ревматоидного артрита .....	26
1.1.4.1. Ревматоидные факторы.....	27
1.1.4.2. Антитела к цитруллинированным белкам .....	28
1.1.4.2.1. Антитела к циклическому цитруллинсодержащему пептиду .....	29
1.1.4.2.2. Антитела к цитруллинированному виментину .....	29
1.1.4.2.3. Другие аутоантитела .....	30
1.1.4.3. Острофазовый ответ .....	31
1.1.4.4. Скорость оседания эритроцитов .....	32
1.1.4.5. Другие лабораторные маркеры острой фазы воспаления .....	32
1.1.4.6. Исследование состояния крови пациентов .....	33
1.1.4.7. Инструментальная диагностика .....	34
1.1.4.8. Диагностические критерии ревматоидного артрита.....	34
1.1.5. Методы терапии ревматоидного артрита .....	35
1.1.5.1. Базисные противовоспалительные препараты .....	35
1.1.5.2. Генно-инженерные биологические препараты.....	37
1.1.5.3. Глюкокортикостероиды .....	39
1.1.5.4. Нестероидные противовоспалительные препараты.....	39
1.1.5.5. Другие медикаментозные средства терапии РА.....	40

1.1.5.6. Немедикаментозные способы лечения ревматоидного артрита .....	42
1.2. Окислительный стресс и его роль в патогенезе ревматоидного артрита. ....	42
1.3. Антиоксидантная система организма .....	50
1.3.1. Ферментативное звено антиоксидантной системы.....	51
1.3.2. Неферментативное звено антиоксидантной системы .....	65
1.3.2.1. Жирорастворимые антиоксиданты .....	65
1.3.2.2. Водорастворимые антиоксиданты .....	67
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	71
ГЛАВА 2 ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	71
2.1. Объект исследования.....	71
2.2. Методы исследования .....	71
2.2.1. Создание модели ревматоидного артрита у крыс.....	71
2.2.2. Подготовка материала для исследования .....	72
2.2.3. Определение содержания ревматоидного фактора .....	72
2.2.4. Определение скорости оседания эритроцитов.....	73
2.2.5. Определение содержания циркулирующих иммунных комплексов .....	73
2.2.6. Определение содержания иммуноглобулинов.....	74
2.2.7. Измерение активности ферментов .....	74
2.2.7.1. Определение активности ферментов, сопряженных с окислительно-восстановительными превращениями НАД и НАДФ....	75
2.2.7.1.1. Определение активности глутатионпероксидазы .....	75
2.2.7.1.2. Определение активности глутатионредуктазы .....	76
2.2.7.1.3. Определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы .....	76
2.2.7.1.4. Определение активности НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы.....	76
2.2.7.2. Определение активности глутатионтрансферазы .....	77

2.2.7.3. Определение активности аконитатгидратазы.....	77
2.2.7.4. Определение активности супероксиддисмутазы.....	78
2.2.7.5. Определение активности каталазы .....	79
2.2.8. Определение содержания компонентов неферментативной антиоксидантной системы .....	80
2.2.8.1. Определение концентрации восстановленного глутатиона .....	80
2.2.8.2. Определение содержания цитрата .....	81
2.2.9. Оценка оксидативного статуса .....	82
2.2.9.1 Определение интенсивности биохемилюминесценции.....	82
2.2.9.2 Определение содержания диеновых конъюгатов.....	83
2.2.9.3. Определение степени фрагментации ДНК.....	84
2.2.9.3.1. Выделение тотальной ДНК .....	84
2.2.9.3.2. Электрофорез ДНК.....	84
2.2.9.4. Определение активности каспаз.....	85
2.2.10. Унифицированный метод определения содержания общего белка по биуретовой реакции .....	86
2.2.11. Определение уровня транскриптов генов антиоксидантных ферментов .....	87
2.2.11.1. Выделение тотальной РНК.....	87
2.2.11.2. Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция.....	88
2.3. Статистическая обработка экспериментальных данных .....	90
<b>ГЛАВА 3. ДИНАМИКА РАЗВИТИЯ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА И ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА ПРИ ИНДУКЦИИ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА.....</b>	<b>91</b>
3.1. Исследование динамики изменения маркерных показателей развития ревматоидного артрита.....	91
3.2. Динамика изменения интенсивности свободнорадикального окисления биосубстратов в тканях крыс при развитии ревматоидного артрита.....	93
3.3. Изменение активности каталазы в тканях крыс в динамике развития ревматоидного артрита.....	99

3.4. Изменение концентрации восстановленного глутатиона в тканях крыс в динамике развития ревматоидного артрита.....	100
ГЛАВА 4. ВОЗДЕЙСТВИЕ ТИОКТОВОЙ КИСЛОТЫ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ И АПОПТОТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ РАЗВИТИИ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА .....	103
4.1. Воздействие тиоктовой кислоты на маркерные показатели развития ревматоидного артрита.....	103
4.2. Влияние тиоктовой кислоты на интенсивность свободнорадикальных процессов в тканях крыс при ревматоидном артрите.....	108
4.3. Активность апоптотических процессов в тканях крыс при ревматоидном артрите и воздействии тиоктовой кислоты .....	118
ГЛАВА 5. ВОЗДЕЙСТВИЕ ТИОКТОВОЙ КИСЛОТЫ НА АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ РАЗВИТИИ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА .....	125
5.1. Воздействие тиоктовой кислоты на активность супероксиддисмутазы и каталазы в тканях крыс при ревматоидном артрите .....	125
5.2. Активность глутатионового звена антиоксидантной системы в тканях крыс при ревматоидном артрите и воздействии тиоктовой кислоты .....	130
5.3. Уровень транскриптов генов супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в тканях крыс при ревматоидном артрите и воздействии тиоктовой кислоты .....	140
5.4. Активность некоторых НАДФН-генерирующих ферментов в тканях крыс при ревматоидном артрите и воздействии тиоктовой кислоты .....	150
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	156
ВЫВОДЫ.....	161
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	163
ПРИЛОЖЕНИЕ .....	207

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- 3-НТ – 3-нитротирозин;
- $\alpha$ -КГДГ –  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназный комплекс;
- АГ – аконитатгидратаза;
- АКА – анти-кератин антитела;
- АОС – антиоксидантная система;
- АОЭ – антиоксидантные ответные элементы;
- АТ – антитела;
- АТФ – аденозинтрифосфат;
- АФА – анти-филаггрин аутоантитела;
- АФК – активные формы кислорода;
- АЦЦП – антитела к циклическому цитруллинированному пептиду;
- БПВП – базисные противовоспалительные препараты;
- Г6ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа;
- ГАФДН – глицеральдегидфосфатдегидрогеназа;
- ГИБП – генно-инженерные биологические препараты;
- ГК – гиалуроновая кислота;
- ГКС – глюкокортикостероиды;
- ДГЛК – дигидролипоевая кислота;
- ДК – диеновые конъюгаты;
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;
- ИК – иммунные комплексы;
- ИЛ – интерлейкины;
- ИФА – иммуноферментный анализ;
- ММП – матричные металлопротеиназы;
- НАД – никотинамидадениндинуклеотид;
- НАДН – никотинамидадениндинуклеотид восстановленный;
- НАДФ – никотинамидадениндинуклеотид фосфат;
- НАДФ-ИДГ – НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа;

НАДФН – никотинамидадениндинуклеотид фосфат фостановленный;  
НПВП – нестероидные противовоспалительные препараты;  
ОС – окислительный стресс;  
ПАД – пептидиларгининдеиминаза;  
ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты;  
ПОЛ – пероксидное окисление липидов;  
ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени;  
РА – ревматоидный артрит;  
РНК – рибонуклеиновая кислота;  
РФ – ревматоидные факторы;  
САА – сывороточный амилоидный белок А;  
СО – свободнорадикальное окисление;  
СОД – супероксиддисмутаза;  
СОЭ – скорость оседания эритроцитов;  
СРБ – С-реактивный белок;  
СЭФР – сосудистый эндотелиальный фактор роста;  
ТАЕ буфер – трис-ацетат-ЭДТА буфер;  
ТК – тиоктовая кислота;  
ТХУ – трихлоруксусная кислота;  
ФАД – флавинадениндинуклеотид;  
ФНО- $\alpha$  – фактор некроза опухоли альфа;  
ЦИК – циркулирующие иммунные комплексы;  
ЦОГ – циклооксигеназа;  
ЭДТА – этилендиаминтетраацетат;  
GPX – глутатионпероксидаза;  
GSH – восстановленный глутатион;  
GSR – глутатионредуктаза;  
GSSG – окисленный глутатион;  
GST – глутатионтрансфераза;  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – пероксид водорода;

$\text{HOCl}$  – хлорноватистая кислота;

$\text{Ig}$  – иммуноглобулины;

$I_{\max}$  – интенсивность вспышки хемилюминесценции;

$\text{Ncf1}$  - цитозольный фактор нейтрофилов 1;

$\text{NO}$  – оксид азота;

$\text{O}_2^{\cdot-}$  – супероксидный анион-радикал;

$\text{OH}^{\cdot}$  – гидроксильный радикал;

$\text{ONOO}^-$  – пероксинитрит;

$S$  – светосумма хемилюминесценции;

$\text{tg}\alpha_2$  – величина тангенса угла наклона касательной к кривой хемилюминесценции.



## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность работы.** В настоящее время одной из актуальных проблем медицинской биохимии является исследование и коррекция молекулярных механизмов патогенеза ревматоидного артрита (РА) – системного аутоиммунного заболевания, характеризующегося преимущественным поражением суставов с развитием эрозивно-деструктивного полиартрита [33]. Частота встречаемости данного патологического состояния, согласно данным ВОЗ, составляет от 0,6 до 1,3%, что позволяет его отнести к одному из достаточно распространенных воспалительных заболеваний. РА является причиной ранней инвалидизации и существенного снижения качества жизни пациентов. Так, почти 50% больных становятся инвалидами в течение 5 лет заболевания, а 10% – в течение первых 2 лет болезни. Согласно данным проспективных исследований, при РА уменьшается продолжительность жизни в связи с поражением различных органов и систем [377].

Значительный интерес в настоящее время вызывает изучение особенностей процессов свободнорадикального окисления (СО), протекающих при развитии РА. Некоторые данные свидетельствуют в пользу того, что в процессе патогенеза данного заболевания активизируется генерация активных форм кислорода (АФК) [313,413]. Однако результаты, касающиеся исследований активности антиоксидантной системы организма (АОС), весьма противоречивы. Так, в некоторых работах было показано увеличение, а в других – уменьшение активности ряда антиоксидантных ферментов, таких как супероксиддисмутаза (СОД), глутатионпероксидаза (GPX), каталаза, в крови больных, страдающих РА. Кроме того, в некоторых исследованиях было выявлено разнонаправленное изменение активности СОД и каталазы у пациентов [349,362,401].

Известно, что АФК, образовавшиеся в процессе патогенеза РА, могут оказывать разрушающее влияние на биологические молекулы, такие как

полисахариды, белки, ДНК, а также инициировать пероксидное окисление липидов (ПОЛ) [49]. Результатом чрезмерной генерации АФК являются морфо-функциональные нарушения клеточных структур, деградация коллагена, повреждение соединительной ткани. Повреждающему эффекту свободных радикалов противодействует АОС.

Высокую актуальность на данный момент имеют исследования, направленные на поиск потенциальных веществ – протекторов, обладающих антиоксидантными свойствами. В качестве такого соединения может выступать тиоктовая кислота (ТК) – биологически активное вещество, участвующее в регуляции обмена липидов, углеводов, холестерина, а также выступающее в роли кофактора при окислительном декарбоксилировании пирувата и 2-оксоглутарата. В большинстве тканей ТК способна быстро превращается в восстановленную форму – дигидролипоевую кислоту (ДГЛК), которая выполняет множество биологических функций, являясь мощным антиоксидантом, хелатором ионов металлов переменной валентности, сквенджером АФК, восстановителем окисленных форм других антиоксидантов. [172,187,244,361].

Таким образом, в связи с тяжестью протекания и широкой распространенностью РА актуальной задачей представляется анализ возможности применения препаратов на основе ТК в разработке новых лекарственных средств, применяемых при терапии данного заболевания.

***Цели и задачи исследования.*** Целью настоящей работы являлось исследование свободнорадикального гомеостаза при РА и воздействии ТК на фоне патологии в эксперименте на животных.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Анализ динамики развития РА на основе маркерных показателей и некоторых параметров окислительно-восстановительного гомеостаза.
2. Оценка воздействия ТК на маркерные показатели развития РА в крови лабораторных животных.

3. Исследование влияния ТК на интенсивность процессов СО, степень фрагментации ДНК и активность каспаз в тканях крыс при РА.

4. Изучение воздействия ТК на активность СОД и каталазы у крыс с индуцированным РА.

5. Анализ активности глутатионовой АОС, включающей GPX, глутатионредуктазу (GSR), глутатионтрансферазу (GST) и восстановленный глутатион (GSH), в условиях развития РА и введения ТК.

6. Оценка уровня транскриптов генов ферментов: СОД, каталазы, GPX и GSR, в тканях крыс при РА и введении ТК.

7. Исследование активности НАДФН-генерирующих ферментов – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ) и НАДФ-изоцитратдегидрогеназы (НАДФ-ИДГ), при развитии РА и воздействии ТК.

**Научная новизна.** Впервые проведено комплексное исследование интенсивности протекания СО, апоптотических процессов, активности ферментативного звена (СОД, каталаза, GPX, GSR, GST) и содержания неферментативных (GSH, цитрат) компонентов АОС, уровня транскриптов генов антиоксидантных ферментов, активности некоторых ферментов окислительного метаболизма (Г6ФДГ, НАДФ-ИДГ, аконитатгидратаза (АГ)), при развитии РА и воздействии ТК в эксперименте на животных. Показано, что введение протектора приводило к снижению интенсивности СО и нормализации функционирования антиоксидантных ферментов, выразившейся изменением показателей их активности и уровня транскриптов генов в сторону контрольных значений. Исследовано воздействие ТК на работу некоторых НАДФН-генерирующих ферментов, поставляющих восстановительные потенциалы для глутатионовой АОС. Предложена гипотетическая схема, отражающая роль ТК в регуляции свободнорадикального гомеостаза при развитии РА.

**Практическая значимость.** Результаты проведенного исследования могут выступать в качестве основы для разработки новых способов метаболической коррекции состояния окислительного стресса (ОС),

развивающегося при РА. Кроме этого, полученные в ходе работы данные способствуют углублению фундаментальных представлений о путях реализации протекторного и антиоксидантного действия ТК, а также пониманию механизмов, лежащих в основе нарушений метаболизма при развитии данного заболевания.

Материалы исследования применяются в учебной работе на медико-биологическом факультете Воронежского государственного университета при чтении курсов «Медико-биологические аспекты социально-значимых патологий», «Свободнорадикальные процессы в биосистемах», «Патобиохимия», «Молекулярные механизмы адаптации к стрессовым факторам», «Физико-химические основы патологических процессов». Кроме этого, полученные результаты используются при проведении практикумов, выполнении курсовых и выпускных квалификационных работ студентами Воронежского государственного университета.

**Апробация работы.** Основные результаты, полученные в ходе выполнения исследования, представлены на III Международной научно-практической конференции «Тенденции и инновации современной науки» (Краснодар, 2012), IX международной научно-практической телеконференции «Актуальные проблемы современной науки» (Томск, 2012), II Всероссийской заочной научно-практической конференции с международным участием «Медико-биологические и педагогические основы адаптации, спортивной деятельности и здорового образа жизни» (Воронеж, 2013), 5 международной научно-практической конференции «Современная наука: тенденции развития» (Краснодар, 2013), 10 международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы науки» (Москва, 2013), 5 международной научно-методической конференции «Создание новых физиологически активных веществ» (Воронеж, 2013), международной научно-практической конференции «Векторы развития современной науки» (Уфа, 2014), XII Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы науки» (Москва, 2014).

**Публикации.** Основные результаты диссертационной работы изложены в 14 публикациях, из них 5 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ и рецензируемых в системах Web of Science и Scopus.

***На защиту выносятся следующие положения:***

1. Реализация протекторных свойств тиоктовой кислоты при ревматоидном артрите сопровождается изменением маркерных показателей патологии, параметров интенсивности свободнорадикального окисления и активности апоптотических процессов в направлении контрольных значений.

2. Установлено корригирующее действие тиоктовой кислоты на основные компоненты антиоксидантной системы, мобилизованные в условиях окислительного стресса, развивающегося на фоне ревматоидного артрита.

3. Под воздействием тиоктовой кислоты происходило уменьшение уровней транскриптов генов ферментов антиоксидантной системы, возраставших в условиях развития ревматоидного артрита.

4. Воздействие тиоктовой кислоты приводило к нормализации активности ряда ферментов окислительного метаболизма, изменяющейся при развитии ревматоидного артрита.

***Структура и объем работы.*** Диссертация изложена на 216 страницах текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов (3 главы), заключения, выводов, списка литературы (420 источников). Иллюстративный материал включает 9 таблиц, 1 схему и 37 рисунков, а также 10 рисунков в Приложении.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Ревматоидный артрит

#### 1.1.1. Характеристика и этиология заболевания

РА представляет собой хроническое системное аутоиммунное заболевание соединительной ткани, сопровождающееся преимущественным поражением периферических суставов с развитием в них эрозивно-деструктивных изменений и анкилозирования. [33].

Общее количество больных с РА в настоящее время, по данным Министерства здравоохранения Российской Федерации, составляет более 800 тыс. человек. Однако, официальные цифры не способны в полной мере отразить картину распространенности РА, составляющей по оценкам специалистов до 1% от общей численности населения, следовательно, количество больных в Российской Федерации может оказаться более одного миллиона. Данное несоответствие можно объяснить как трудностью установления диагноза в дебюте заболевания, особенно врачами первого звена, не имеющими специальной подготовки по ревматологии, так и достаточно поздним обращением пациентов в клинику. Количество заболевших РА увеличивается на 3–4% ежегодно, а с учетом процесса старения населения очевидно, что в общей численности граждан Российской Федерации доля больных будет возрастать [16]. При этом в течение первых 5 лет заболевания инвалидами становятся до 50% больных. Стойкая ремиссия, сохранение трудоспособности и относительно благоприятный прогноз наблюдается не более чем у 5–6% пациентов, что, однако, не исключает возникновения обострения с прогрессирующей деструкцией суставов, приводящего к инвалидизации [399].

К настоящему времени этиология РА остается невыясненной. По-видимому, некоторую роль в патогенезе заболевания могут играть вирусы, такие как вирус Эпштейна - Барр, человеческий парвовирус В19, лимфотропный Т-клеточный вирус, и др., что может быть связано с их

способностью запускать процесс поликлональной В-клеточной активации, приводящей к синтезу ревматоидных факторов (РФ). К этиологическим факторам возникновения РА относят также генетическую предрасположенность, ассоциированную с генами второго класса главного комплекса гистосовместимости HLA. Известно, что примерно у 90% пациентов выявляется ген HLA-DR1, либо один из трех вариантов локуса HLA-DR4 [33], который более характерен для серопозитивного варианта течения РА. Кроме того, различные подтипы HLA-DR4 связаны с тяжестью заболевания и особенностями его клинических проявлений. Например, подтип HLA-DRB1\*0401 характерен для больных с быстрым развитием эрозии кости и системными проявлениями, тогда как у пациентов с HLA-DRB1\*01 подтипом течение болезни менее острое. Носители же HLA-DRB1\*0401/0404 имеют повышенный риск развития синдрома Фелти, представляющего собой одну из наиболее тяжелых форм протекания РА. Помимо этого, выявлена взаимосвязь между аминокислотами в полипептидных последовательностях HLA-DRB1 и продукцией РФ: у пациентов с серопозитивным РА в 71 позиции находится лизин, в то время как у больных с серонегативным вариантом течения заболевания данное положение занято аргинином [191,231]. Механизмы патогенетической роли так называемого РА-эпитопа (общие аминокислотные последовательности в HLA-DRB1 цепи) в прогрессировании заболевания окончательно не установлены. Возможно, данный эпитоп имеет высокую степень аффинности к пептиду из суставных тканей, связывание с которым предрасполагает возникновение аутоиммунного артрита. И хотя для патогенеза РА ни один аутоантиген окончательно не выявлен, пептиды большинства гипотетических «возбудителей» данного заболевания (бактерий и вирусов) содержат фрагменты, способные связываться с HLA-DR молекулами, имеющими РА-эпитоп. Для данной генетической ассоциации можно найти и другие объяснения. Например, HLA тип способен изменять репертуар Т-клеток, производимых в тимусе, и РА-эпитоп отбирает Т-клетки со специфической

аффинностью к суставным антигенам. Непосредственно сам РА-эпитоп также может выступать в роли аутоантигена. Ряд микроорганизмов содержит идентичную цепь аминокислот в структуре одного из своих белков. Развивающийся иммунный ответ на микроорганизм в таком случае мог бы вызвать аутоиммунную реакцию против клеток, экспрессирующих HLA-DR. Однако, в настоящее время надежные доказательства наличия артритогенного антигена отсутствуют, что в совокупности с выявлением полиморфизма ассоциирующегося с РА набора HLA генов привело к формированию точки зрения о связи HLA типа с особенностями течения заболевания, а не его возникновением. Вместе с тем, характер патогенеза РА отражает тип иммунорегуляции, который формируется HLA системой [116,252]. Кроме того, имеется ряд литературных данных, свидетельствующих о вовлечении в развитие данного заболевания и других генов - регуляторов иммунного ответа, таких как ген фактора некроза опухоли-альфа (ФНО- $\alpha$ ), входящего в состав главного комплекса гистосовместимости, или специфические гены иммуноглобулинов, в том числе иммуноглобулина, связывающего Fc-рецепторы. Имеются также сведения об ассоциации патогенеза РА с рядом других локусов цитокинов – интерлейкина-1 (ИЛ-1), ИЛ-3, ИЛ-4 ИЛ-10, а также кортикотропин-рилизинг фактором, белковый продукт которого играет важную роль в гипоталамо-питуитарно-адреналовой системе, участвующей в развитии местной воспалительной реакции в суставе [231,252].

В последнее время растет количество доказательств, подтверждающих развитие РА у лиц с наследственной предрасположенностью, подвергающихся воздействию ряда факторов окружающей среды. Исследования состояния иммунной системы, проводимые задолго до постановки диагноза РА, позволили концептуализировать патогенез заболевания и выделить несколько фаз его развития [81,131,381,394]. Согласно этой модели, существует период генетического риска, на фоне которого в процессе воздействия факторов окружающей среды наступает



следующая стадия с бессимптомной активацией иммунной системы, выявлением аутоантител и факторов воспаления. За ней идёт фаза суставных нарушений, переходящая в фазу воспалительного артрита. Со временем воспалительный артрит эволюционирует до того момента, когда по ряду клинических критериев состояние классифицируют как РА [319].

Одним из сильнейших рисков факторов патогенеза РА является курение [72,107,344,393]. Однако, точные механизмы, посредством которых сигаретный дым инициирует аутоиммунные процессы, не выяснены. Известно, что курение ассоциировано с повышением уровня цитруллинированных белков и экспрессии в клетках лёгкого пептидиларгининдеиминазы 2 (ПАД-2) – фермента, вызывающего локальное цитруллинирование белков синовиальной оболочки при РА [343]. Особенно высокий риск возникновения серопозитивного варианта заболевания на фоне курения выявляется у носителей HLA-DRB1 эпитопа [70,71]. Показано, что ряд аллелей DRB1, в частности 0401 и 0404, ассоциированы с сильным иммунитетом к цитруллинированным пептидам, таким как виментин или енолаза [170,212,271]. Кроме того, курение вызывает ряд общих иммунных нарушений, включающих изменения функционирования Т-клеток, сокращение популяции натуральных киллеров, ослабление гуморального иммунитета, повышение уровня воспалительных цитокинов, таких как ИЛ-6 и С-реактивный белок (СРБ), а также повышение содержания РФ даже в отсутствие РА [105,216,121]. Таким образом, курение вызывает изменения иммунного статуса, приводящие на фоне генетической предрасположенности к возникновению РА-зависимой аутоиммунной реакции.

Помимо курения, серьезным фактором риска РА является вдыхание с воздухом кремниевой пыли, что характерно для рабочих горнодобывающей промышленности [350,391]. Высокое содержание кремния приводит к хроническому воспалению и фиброзу в легких и других органах, что может вызвать гуморальный иммунный ответ, сопряженный с риском возникновения серопозитивного РА [95].

Ещё одним фактором возникновения РА является меняющийся гормональный фон. Известно, что женщины в 2-4 раза более подвержены данному заболеванию, РА у них может развиваться в периоды колебания уровня стероидных половых гормонов, например, в послеродовой период или перименопаузу [340,411,412]. В связи с этим, был проведен ряд исследований, показавших, что применение гормональных препаратов и оральных контрацептивов на ранней стадии дисрегуляции иммунной системы уменьшает риск формирования аутоантител [155,284,285,372].

Вероятность развития РА можно снизить, если в рационе содержится достаточное количество витамина D, антиоксидантов, рыбной продукции [137,308,403,404,405]. Витамин D оказывает плейотропное действие на иммунную систему, ингибируя провоспалительные цитокины, повышая содержание противовоспалительных цитокинов, и регулируя врожденную и адаптивную иммунную систему через рецепторы витамина D [67,92]. Также на коллаген-индуцированной модели РА было показано, что данный витамин предотвращает развитие воспалительного артрита [113]. Морские омега-3 жирные кислоты способны ослаблять симптоматику больных РА, оказывая воздействие через пути лейкотриена и простагландина, что приводит к уменьшению количества провоспалительных медиаторов [230,341,347]. В ходе ряда исследований было показано, что антиоксиданты также имеют способность снижать риск развития РА, однако результаты оценки различных соединений, таких как  $\beta$ -криптоксантин, витамин E и витамин C, оказались противоречивы [86,137,334,337].

### 1.1.2. Патогенез ревматоидного артрита

При РА развивается процесс разрушения суставного хряща и субхондральной кости эктопической гиперплазированной синовиальной тканью, в который вовлекаются практически все компоненты иммунной

системы под воздействием пока не установленного этиологического фактора и влиянием предрасполагающих факторов.

Инициация воспаления происходит посредством действия иммунокомпетентных клеток, рекрутируемых в синовиальную оболочку и продуцирующих антитела к компонентам синовии и провоспалительные цитокины. Повышение в полости сустава содержания веществ с аутоантигенными свойствами усиливает иммунновоспалительную реакцию, что приводит к повреждению тканей сустава. При этом, модуляторами активности и пролиферации синовиальных клеток, а также суставных макрофагов могут являться различные колониестимулирующие факторы (КСФ-ГМ, КСФ-Г), цитокины, продукты метаболизма арахидоновой кислоты и другие медиаторные субстанции. В частности, для РА характерна антиген-специфическая активация CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов посредством Т-хелперов I типа, приводящая к гиперпродукции ИЛ-2, ИЛ-17, интерферона- $\gamma$ , а также нарушению баланса между провоспалительными (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- $\alpha$  и др.) и противовоспалительными цитокинами (ИЛ-4, ИЛ-10, растворимый антагонист ИЛ-1 $\beta$  и др.) с превалированием секреции первых над вторыми. Повышение функциональной активности нейтрофилов, происходящей под влиянием ИЛ-8, а также при фагоцитозе иммунных комплексов и продуктов деградации, приводит к продуцированию АФК, секреции простагландинов и лейкотриенов, высвобождению лизосомальных ферментов. Накопление токсичных АФК, помимо этого, происходит при реперфузии тканей, ишемизированных в условиях хронически повышенного внутрисуставного давления [365,416].

Не исключено, что существенную роль в запуске Т-клеточного звена иммунитета может играть  $\gamma$ -интерферон, секреция которого возрастает в ответ на вирусную инфекцию. Активированные Т-хелперы I типа, в свою очередь, запускают пролиферацию В-лимфоцитов и продукцию антител, синтезируя ряд провоспалительных цитокинов, в том числе ИЛ-2. Помимо этого, при воздействии некоего биологического агента происходит активация

системы комплемента и значительное повышение содержания  $C_{3b}$  и  $C_{5b}$  её компонентов, что может привести к стимуляции Т-лимфоцитов I типа. Активация же Т-хелперов III типа происходит при увеличении продукции макрофагами трансформирующего фактора роста  $\beta$ , причем данный процесс способен протекать и без наличия антигена.

Особую роль в патогенезе РА отводят ФНО- $\alpha$ . Считается, что на начальных этапах заболевания преобладает синтез именно этого цитокина, обладающего способностью инициировать каскад иммунопатологических реакций и активировать секрецию других провоспалительных цитокинов. Кроме того, неконтролируемый синтез ФНО- $\alpha$  является одним из ключевых факторов хронизации патологического процесса и прогрессирующей деструкции костной ткани. В частности, данный цитокин принимает участие в развитии клинических проявлений воспаления (лихорадка, боль, снижение массы тела и др.), активирует экспрессию молекул адгезии, усиливает неангиогенез и пролиферацию фибробластов, что приводит к формированию ревматоидного паннуса, и др.

Возникшие нарушения в иммунном ответе приводят продуцированию В-лимфоцитами агрегированного иммуноглобулина G (IgG), способного вступать в иммунную реакцию по типу антиген – антитело. В результате плазматические клетки синовии секретируют антитела классов IgG и IgM к агрегированному IgG, называемые РФ. Взаимодействие Т-, В-лимфоцитов и макрофагов приводит к выработке антител, образующих иммунные комплексы с антигеном, циркулирующие в периферической крови и способные откладываться в различных тканях, инициируя их повреждение. Кроме этого, важную роль в патогенезе РА могут играть не только РФ, но и аутоантитела другой специфичности (антиперинуклеарный фактор, антикератиновые антитела, и др.) [33].

Характерным для патогенеза РА является наличие аутоантител к цитруллинированным белкам. Цитруллинирование представляет собой пост-трансляционную модификацию белков по превращению остатков аргинина в

цитруллин (рис. 1). Данный процесс катализируется  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой ПАД, 5 изоформ которой (1, 2, 3, 4 и 6) были найдены на хромосоме 1p36 человека, области, восприимчивой для патогенеза РА [291,406].



Рис. 1. Цитруллинирование белков по остатку аргинина.

У пациентов с РА была выявлена широкая распространенность фермента ПАД-4 в синовиальной мембране [249], а также интенсивная экспрессия ПАД-2 и ПАД-4 в макрофагах из синовиальной жидкости [167]. Наиболее специфическими аутоантителами для данной патологии выступают анти-филаггрин аутоантитела (АФА), первоначально названные как «анти-кератин антитела» (АКА). Было показано, что АФА, синтезированные плазмócитами паннуса, выявляются до появления клинических симптомов, а их титр связан с активностью и тяжестью заболевания. Мишенями АФА являются цитруллинированные формы  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей фибрина синовиальной мембраны, накопление которого в суставах больных РА происходит, по-видимому, в результате изменения соотношения между его коагуляцией и фибринолизом. Этот процесс способствует хронизации и прогрессированию болезни посредством индуцирования воспаления и деструкции тканей, происходящих при формировании и ликвидации фибрина, а также его действия в роли антигена после цитруллинирования [379].

Помимо фибрина, накапливаться и подвергаться цитруллинированию в суставах может фибронектин – гликопротеид, выполняющий ключевую роль

в ряде физиологических процессов, таких как клеточная адгезия, миграция, пролиферация и дифференцировка клеток, заживление ран, фиброз, гемостаз [296,328,378]. Фибронектин, подвергшийся цитруллинированию, имеет большее сродство и эффективнее связывается с сосудистым эндотелиальным фактором роста (СЭФР), усиливая его сигнал. СЭФР, в свою очередь, является основным медиатором, стимулирующим через воздействие на рецепторы эндотелиальных клеток ангиогенез и васкулогенез, чрезмерная интенсивность которых является одним из патогенетических факторов РА [124,126]. Накапливающийся фибронектин способен также вызывать продукцию нитроксида и матриксных металлопротеиназ, активирующих процесс воспаления и усиливающих деструкцию тканей суставов. Также фибронектин вызывает деградацию коллагена 2 посредством ИЛ-1 опосредованного пути, взаимодействия с ФНО- $\alpha$  и гиалуроновой кислотой (ГК), что приводит к повышению экспрессии гранулоцито-макрофагального колониестимулирующего фактора, ингибирующего апоптоз эозинофилов [136,225,256,418].

Непосредственно разрушающее действие на ткани сустава оказывает паннус, который формируется из активированных синовиоцитов и других типов клеток, а также благодаря ангиогенезу, обеспечивающему приток новых клеток и питательных веществ. Клеточно-соединительнотканый массив паннуса имеет ряд особенностей, находящих свое отражение в механизмах патогенеза РА. Так, по своей массе конгломерат паннуса во много раз превышает нормальную синовиальную оболочку, для него характерен опухолеподобный рост, а также способность пенетрировать в хрящ, субхондральную кость и связочный аппарат. По-видимому, опухолеподобные свойства паннуса, такие как длительно поддерживаемая высокая активность клеток даже в отсутствие стимулов, неконтролируемое деление, отсутствие контактного торможения роста, обусловлены наличием генотипически измененных фибробластоподобных синовиоцитов в его составе. Синовиоциты, составляющие большую часть клеток паннуса,

секретируют множество лизирующих ферментов, среди которых наибольшее значение имеют цистеиновые и сериновые протеазы, металлопротеиназы (коллагеназа, стромелизин, желатиназа). Эти ферменты разрушают основное вещество суставного хряща посредством своего действия на коллаген и протеогликановый матрикс. В данном процессе участвуют также ИЛ-1 и ФНО- $\alpha$ , вызывая повышение продукции хондроцитами матричных металлопротеиназ и активацию остеокластов, приводящую к резорбции кости. Помимо этого, ИЛ-1 активизирует биосинтез индуцибельной NO-синтетазы, что приводит к повышению содержания оксида азота, высокое содержание которого способствует гибели хондроцитов – клеток, отвечающих за реконструирование хряща. Найдены также и другие важные медиаторы деградации хряща и резорбции кости, такие как активатор рецептора транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B и фактор дифференцировки остеокластов, которые экспрессируются в стромальных клетках и остеобластах, а также секретируются в растворимом виде активированными Т-клетками. Совместное воздействие данных медиаторов, ИЛ-1 и ФНО- $\alpha$  играет одну из ключевых ролей в развитии свойственного для РА периартикулярного и системного остеопороза [188].

Одними из ключевых медиаторов неоваскуляризации и пролиферации фибробластов выступают ростовые факторы фибробластов, эндотелиоцитов и тромбоцитов, секретируемые макрофагоподобными и фибробластоподобными синовиоцитами. Помимо этого, стимулами роста эндотелиоцитов и ангиогенеза могут являться также молекулы адгезии сосудистой клетки и гипоксия. На поверхности эндотелия сосудов представлено также множество других молекул клеточной адгезии, включая E-селектин и межклеточные молекулы адгезии, экспрессия которых индуцируется ИЛ-1, ФНО- $\alpha$  и ИЛ-8, что приводит к адгезии нейтрофилов и моноцитов к активированному эндотелию, происходящей с участием интегринов – лейкоцитарных рецепторных белков. Дальнейшая миграция иммунокомпетентных клеток через эндотелий в сустав осуществляется при

помощи хемокинов – регуляторных пептидов типа моноцитарных хемотаксических белков с малой молекулярной массой, широко представленных в воспаленной синовии. Сквозь сосудистую стенку транспорт лейкоцитов происходит по градиенту концентрации хемокинов и регулируется взаимодействием интегринов с лигандами соединительной ткани [295,364,365].

Как правило, блокатором чрезмерного накопления клеток при физиологической гиперплазии ткани и пролиферации лимфоцитов в процессе иммунного ответа является апоптоз. Однако, не смотря на присутствие таких стимулов клеточной смерти, как гипоксия и ФНО- $\alpha$ , в синовиальной оболочке при РА присутствует относительно небольшое количество клеток в состоянии апоптоза. Активное ингибирование апоптоза происходит благодаря продукции синовиоцитами и синовиальными лимфоцитами большого количества антиапоптотических молекул, таких как секретируемый фибробластами интерферон- $\gamma$ , предотвращающий Т-клеточный апоптоз. Кроме этого, важнейшее значение в патогенезе РА может иметь мутация гена p53, ответственного за подавление опухолевого роста, что выражается в виде нарушения апоптоза синовиоцитов. По-видимому, генные мутации данных клеток происходят вследствие деструктивного влияния АФК и других патологических факторов микроокружения воспаленного сустава на клеточную ДНК [116].

Таким образом, основу патогенеза РА составляют глубокие нарушения иммунного ответа с дисбалансом количественного и качественного состава иммунокомпетентных клеток, нарушением их физиологической активности и клеточной кооперации. Наиболее активный процесс воспаления на начальных стадиях заболевания индуцируется при этом, резидентными синовиальными клетками (синовиоцитами А, фибробластами, дендритными клетками, Т- и В-лимфоцитами) в синовиальной оболочке суставов, что стимулирует ее гиперплазию и быстрое увеличение массы (паннус), приводящее к деструкции суставного хряща и подлежащей субхондральной



кости. При прогрессировании патогенеза РА развивается типичная клиническая картина заболевания с нарушениями во многих органах и системах организма [33].

### 1.1.3. Клиническая картина и системные проявления ревматоидного артрита

Для РА характерно симметричное поражение пястно-фаланговых и межфаланговых суставов с дальнейшим вовлечением в патологический процесс лучезапястных, коленных, локтевых, тазобедренных и других суставов, к нарушению их функционирования которых приводят деструктивные процессы, происходящие в сухожилиях, суставных сумках, мышцах и костях. Прогрессирующий воспалительный процесс, характерный для патогенеза данного заболевания, является причиной возникновения девиаций, деформаций и анкилозов в пораженных суставах.

Патогенез РА носит системный характер. У больных с первых недель заболевания наблюдается потеря массы тела, повышение температуры, недомогание, адинамия, лихорадка, сопряженная с тахикардией и лабильностью пульса. Помимо суставов, для данного заболевания характерно поражение мышц, проявляющееся миалгиями, с последующим развитием миозита с очагами некроза и атрофией. Поражение кожи у больных РА проявляется нарушением трофики, подкожными кровоизлияниями, мелкоочаговым некрозом. Характерным является также появление ревматоидных узелков – безболезненных округлых плотных образований, ассоциированных с высоким титром РФ в сыворотке крови. До 20% больных РА имеют признаки ревматоидного васкулита, проявляющегося кожными изменениями, носовыми и маточными кровотечениями, поражением внутренних органов (коронарит, пневмонит, альвеолит, гепатит), а также абдоминальным синдромом (инфаркт кишечника и др.). Помимо этого, примерно у трети больных выявляется спленомегалия, а более чем у половины – периферическая лимфаденопатия и анемический синдром.

Поражения легких, выражающиеся плевритом, хроническим интерстициальным пневмонитом, ревматоидными узелками в легочной ткани и альвеолитом, развиваются у 30-60% больных РА.

Одной из причин повышенной летальности среди больных РА является поражение сердечно-сосудистой системы, причем патологические изменения могут быть вызваны как иммуновоспалительным процессом, так и проводимым лечением. Поражения почек, связанные с основным заболеванием (иммунокомплексный гломерулонефрит, амилоидоз), и ятрогенного генеза (острый и хронический интерстициальный нефрит), встречаются в 10-25% случаев при РА. Более половины больных страдает от нарушений желудочно-кишечного тракта, таких как индуцированные применением нестероидных противовоспалительных препаратов гастропатии с развитием отстрой язвы желудка или двенадцатиперстной кишки, поражения печени по типу аутоиммунного гепатита. Также для данного заболевания характерны поражения глаз (иридоциклит, ирит), нервной системы (периферическая полиневропатия и полиневрит, церебральный васкулит) и эндокринной системы (аутоиммунный тиреоидит). Таким образом, РА, называемый также «ревматоидной болезнью», является тяжелой системной патологией соединительной ткани [33].

#### 1.1.4. Диагностика ревматоидного артрита

В настоящее время благодаря прогрессу в области экспериментальной и клинической иммунологии возможно осуществлять лабораторную диагностику РА с высокой эффективностью. Используемые методы позволяют получить объективные данные о динамике иммунологических изменений для осуществления оценки характера течения заболевания, определения прогноза, подбора методов терапии и мониторинга эффективности лечения [1,46,195]. В основе современной лабораторной диагностики РА лежат принципы доказательной медицины, обеспечивающие

выбор оптимальных методов, наиболее информативными среди которых являются исследования циркулирующих аутоантител и маркеров острой фазы воспаления [24,41,228].

К основным диагностическим маркерам РА относят антитела к цитруллинированным белкам и РФ. Помимо этого, существуют и другие аутоантитела, в том числе антитела к иммуноглобулин-связывающему белку (анти-BiP), RA33 (анти-hnRNP-A2), кальпастатину и  $\alpha$ -энолазе, детекция которых не получила широкого применения в лабораторной практике. Аутоантитела, являющиеся маркером РА, играют также непосредственную роль в патогенезе данного заболевания [150,162,273,397].

#### 1.1.4.1. Ревматоидные факторы

Стандартным иммунологическим маркером развития РА на протяжении последних 70 лет является титр РФ – показатель с высокой чувствительностью, обладающий, однако, недостаточно высокой специфичностью, так как выявляется в сыворотке крови при ряде других ревматических заболеваний, а также хронических инфекциях, легочных заболеваниях, злокачественных новообразованиях, первичном билиарном циррозе и в пожилом возрасте [338,407]. РФ представляют собой аутоантитела классов IgM, IgA и IgG, взаимодействующие с Fc-фрагментом агрегированного IgG. Наибольшее значение для диагностирования РА в клинической практике имеет определение содержания в сыворотке крови РФ класса IgM [369]. Однако, необходимо иметь в виду, что существуют и серонегативные по РФ варианты течения заболевания, чаще встречающихся у женщин и больных с дебютом РА в пожилом возрасте [1]. РФ класса IgA часто выявляются при РА с полиартикулярным вариантом начала заболевания и системными проявлениями, синдроме Шегрена, IgA-нефропатии, инфекционном эндокардите, пурпуре Шенлейна–Геноха, а также имеют прогностическую ценность по отношению к развитию

серьезных деструктивных процессов в суставах. Кроме того, высокое содержание IgA РФ может свидетельствовать об отсутствии положительного клинического эффекта при использовании ингибиторов ФНО- $\alpha$  [97,127]. РФ класса IgG выявляются при различных заболеваниях человека, клиническое значение данных антител к настоящему времени окончательно не выяснено [1]. К стандартным способам определения содержания РФ относится реакция агглютинации с сенсibilизированными IgG частицами латекса (латекс-тест) или эритроцитов барана (реакция Ваалера-Розе), метод иммуноферментного анализа (ИФА) и нефелометрия. ИФА позволяет определять РФ классов IgM, IgA и IgG одновременно, что делает его наиболее чувствительным и специфичным по сравнению с другими методами выявления данных антител [1,51].

#### 1.1.4.2. Антитела к цитруллинированным белкам

Среди антител к цитруллинсодержащим белкам выделяют антиперинуклеарный фактор, антитела к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП), антитела к Sa-антигену/цитруллинированному виментину, АКА, АФА и антитела к цитруллинированному фибриногену. Известно, что в воспаленной синовии цитруллинированию подвергается виментин, а также  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи фибрина [123,125,222,379]. Содержание АЦЦП в синовиальной жидкости пациентов с РА практически в 1,5 раза выше, чем в сыворотке крови, что является следствием секреции данных антител клетками синовии [304]. Однако, положительная реакция на наличие цитруллинированных пептидов наблюдалась в синовиальной ткани и при других артропатиях, из чего можно сделать вывод, что присутствие цитруллинированных белков в синовии неспецифично для РА, а высокая диагностическая специфичность данного показателя связана с возникновением дефектного иммунного ответа на эти белки [123,160,320,383].

#### 1.1.4.2.1. Антитела к циклическому цитруллинсодержащему пептиду

На настоящий момент считается, что среди маркеров РА наибольшей диагностической эффективностью обладают АЦЦП. Так, чувствительность метода определения АЦЦП первого поколения оказалась весьма переменной и составляла от 41 до 68%. Однако, внедрение ИФА с применением синтетического цитруллинированного пептида второго поколения обеспечило увеличение чувствительности метода до сравнимой с оценкой содержания РФ, которая составляла от 49 до 91%, и сохранение специфичности на том же уровне – более 98% [83,101]. Кроме этого, диагностическая ценность АЦЦП второго поколения объясняется их обнаружением у 34–69,3% пациентов с серонегативным вариантом протекания РА [101]. В последнее время в лабораторной диагностике начали применять наборы для ИФА с АЦЦП третьего поколения, которые, согласно результатам ряда исследований, обладая высокой диагностической эффективностью, показывают схожую чувствительность с АЦЦП второго поколения и уступают им в специфичности [98,99,367,376].

#### 1.1.4.2.2. Антитела к цитруллинированному виментину

Виментин – белок, обнаруживающийся в синовиальной ткани, фибробластоподобных синовиоцитах, макрофагах и мезенхимальных клетках [75,118,167,261]. Цитруллинирование данного пептида может происходить при апоптозе эпителиоцитов и синовиоцитов и сопровождается трансформацией собственных белков организма, выражающейся обнаружением «скрытых» или образованием новых эпитопов, что становится причиной потери иммунологической толерантности и секреции аутоантител к виментину активированными В-лимфоцитами [75]. Содержание антител к цитруллинированному виментину в качестве маркера исследуют у больных РА методом иммуноэлектрофореза, данный показатель обладает весьма

высокой чувствительностью и специфичностью (20-75% и 95% соответственно) [90,318,331]. Однако, в последнее время все более широкое применение получает метод определения антител к модифицированному цитруллинированному виментину с помощью ИФА, что обусловлено его высокой чувствительностью, специфичностью и эффективностью по отношению к диагностике РА [12,150,273,397]. Исследование антител к модифицированному цитруллинированному виментину является ценным методом диагностики заболевания на ранних стадиях, дифференциальной диагностики, а также предиктором интенсивности деструктивных процессов в суставах.

#### 1.1.4.2.3. Другие аутоантитела

Антитела к аутоантигену RA33 вырабатываются против гетерогенного нуклеарного рибонуклеопротеина hnRNPA2, играющего определенную роль в сплайсинге и транспорте мРНК [351]. Их секреция при РА осуществляется вследствие существенного усиления экспрессии RA33 в клетках синовии, приводящего к развитию аутоиммунного ответа [100].

Антитела к иммуноглобулин-связывающему белку (Vip) вырабатываются к белку теплового шока grp78 (glucoseregulated protein of 78 kD), находящегося в эндоплазматическом ретикулуме [386]. Данные антитела могут выявляться при различных ревматических заболеваниях, специфичность их определения для диагностики РА составляет примерно 60% [82]. Vip интенсивно экспрессируется в клетках синовии, имеются сведения о его опосредованном участии в патогенезе РА [93,386]. Кроме этого, имеются литературные данные о возможности активированных с помощью Vip Т-клеток проявлять иммуномодуляторные свойства [221].

Антитела к  $\alpha$ -энолазе выявляются при многих патологиях, в том числе аутоиммунных. Тем не менее, была показана их польза для диагностики РА, поскольку примерно у 50% больных с высоким титром данных антител не

обнаруживаются РФ и АКА. Существуют, помимо этого, данные, свидетельствующие о корреляции титра антител к  $\alpha$ -энолазе со степенью деструкции суставов и их роли в качестве предиктора неблагоприятного прогноза [306].

#### 1.1.4.3. Острофазовый ответ

Естественной защитной реакцией организма на тканевое повреждение является воспаление, носящее острый или хронический характер, в основе которого лежит каскад биохимических и иммунологических процессов, направленных на элиминацию патогенного фактора и восстановление физиологических функций тканей и органов [43]. Патогенез РА сопровождается развитием системного хронического воспаления с повышением скорости оседания эритроцитов (СОЭ) и содержания ряда белков острой фазы, таких как СРБ, сывороточный амилоидный белок А (САА), фибриноген и матричная металлопротеиназа 3 (ММП3). Классическим белком острой фазы в плазме крови, обладающим наибольшей чувствительностью в качестве маркера инфекции, воспаления и тканевого повреждения, выступает СРБ [300]. Данный белок относится к семейству пентраксинов с молекулярной массой 115-135 кДа и представляет собой гомопентамер, негликолизированные полипептидные субъединицы которого имеют молекулярную массу 23,027 кДа, и образуют вместе циклическую дискообразную пентамерную структуру. Биосинтез СРБ осуществляется в гепатоцитах и регулируется провоспалительными цитокинами – ИЛ-6, ИЛ-1 и ФНО- $\alpha$ . Содержание СРБ может быстро увеличиваться более, чем в 100 раз и достигать уровня свыше 5 мг/л спустя 6 ч после индуцирования его образования на фоне воспаления, инфекции или травмы [400].

#### 1.1.4.4. Скорость оседания эритроцитов

Факторами, определяющими СОЭ, являются степень агрегации эритроцитов, зависящая от электростатического заряда их мембран, изменяющегося под действием острофазных белков плазмы, и свойств самих эритроцитов. СОЭ может повышаться в условиях анемии, гиперхолестеринемии, беременности, воспалении, а понижаться при серповидноклеточной анемии, сфероцитозе, акантоцитозе, полицитемии, лейкоцитозе, микроцитозе, гипофибриногенемии, гипербилирубинемии, застойной сердечной недостаточности, кахексии. Увеличение СОЭ может также происходить при злокачественных новообразованиях, инфекциях, ревматических и других воспалительных заболеваниях [108,345]. Таким образом, данный показатель обладает высокой чувствительностью, но малой специфичностью, и его определение может применяться для мониторинга течения РА, однако изменение СОЭ не обязательно будет коррелировать с активностью заболевания [275,303].

#### 1.1.4.5. Другие лабораторные маркеры острой фазы воспаления

САА представляет собой аполипопротеид с молекулярной массой 12,5 кДа, тесно ассоциированный с липопротеидами низкой плотности и отвечающий за усиление транспорта холестерина из макрофагов в зону воспаления, выполняет функцию предшественника амилоидного белка А – основного компонента амилоидных отложений при вторичном амилоидозе [253,307]. Кроме того, данный белок обладает свойствами лимфоцитарного хемоаттрактанта, стимулятора ангиогенеза и экспрессии матричных металлопротеиназ, при воспалении его содержание может увеличиваться более чем в 1000 раз [76,243,387]. В ходе ряда исследований было показано, что САА отражает уровень острого воспаления лучше, чем СРБ, и является более чувствительным маркером активности РА [142,332].



Фибриноген (фактор I) – белок, синтезирующийся в гепатоцитах и находящийся в крови в растворенном состоянии, но под воздействием тромбина и фактора XIIIa способный трансформироваться в нерастворимый фибрин [42]. Повышение уровня фибриногена при РА коррелирует с активностью заболевания, концентрацией фибрина в суставной жидкости и выраженностью его артикулярных отложений [102,169].

ММПЗ представляет собой фермент, осуществляющий деградацию ряда составляющих экстрацеллюлярного матрикса. Высокое содержание данного белка при РА выявляется как в суставной жидкости, так и в плазме крови. Уровень ММПЗ связан с характером и активностью течения заболевания, суставными изменениями, параметрами СОЭ и концентрацией СРБ. Однако, возрастание ММПЗ наблюдается при различных ревматических заболеваниях и не является специфичным показателем РА [336,363]. В последнее время обсуждается роль ММПЗ как маркера, позволяющего осуществлять мониторинг эффективности терапии данного заболевания [142].

#### 1.1.4.6. Исследование состояния крови пациентов

Причиной гематологических нарушений, выявляемых при РА, является иммуновоспалительный процесс, лежащий в основе патогенеза данного заболевания. Количество эритроцитов у больных обычно находится в пределах нормы или несколько снижено, содержание гемоглобина чаще оказывается сниженным. Количество ретикулоцитов и лейкоцитов чаще находится в пределах нормы, редко наблюдается умеренный лейкоцитоз. Возможно развитие эозинофилии и тромбоцитоза, степень которого сопряжена с активностью заболевания.

Исследование состояния Т-системы иммунитета у больных РА проводят с помощью оценки количества Т-лимфоцитов и их субпопуляций, анализа пролиферативного ответа лимфоцитов на аллергены или

нспецифические митогены, определение чувствительности лимфоцитов к иммуномодуляторам и др.

Помимо этого, определяют содержание циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), высокая концентрация которых в крови является показателем активности заболевания [33].

#### 1.1.4.7. Инструментальная диагностика

При диагностике РА, оценке тяжести заболевания и динамики изменений в суставах применяют такие методы, как рентгенологическое исследование, артроскопия, компьютерная и магнитно-резонансная томография, ультразвуковое сканирование суставов [33].

#### 1.1.4.8. Диагностические критерии ревматоидного артрита

Помимо лабораторной и инструментальной диагностики, существует ряд диагностических критериев, разработанных Американской коллегией ревматологов, которые позволяют дифференцировать РА среди других заболеваний. К этим критериям относятся:

- 1) утренняя скованность;
- 2) поражение трех или большего количества суставов;
- 3) артрит кистевых суставов;
- 4) симметричное поражение суставов;
- 5) наличие ревматоидных узелков;
- 6) обнаружение РФ в сыворотке крови;
- 7) рентгенологические изменения суставов.

Наличие 4 из 7 критериев является причиной для постановки диагноза РА, причем критерии 1-4 должны присутствовать у больного не менее 6 недель [33].

### 1.1.5. Методы терапии ревматоидного артрита

В терапии РА в настоящее время выделяют две основные группы препаратов. К первой группе относят симптоммодифицирующие средства, в число которых входят нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) и глюкокортикостероиды (ГКС). Вторая группа средств включает в себя болезнемодифицирующие базисные противовоспалительные препараты (БПВП), среди которых отдельно можно выделить генно-инженерные биологические препараты (ГИБП) [57,45,48].

#### 1.1.5.1. Базисные противовоспалительные препараты

Главной целью применения БПВП является достижение ремиссии или, по крайней мере, снижение активности заболевания. На сегодняшний день полагают, что базисная терапия обладает способностью останавливать прогрессирование патологии и приводить к устойчивой ремиссии, особенно если лечение началось при проявлении симптомов в течение менее 12 недель. Если назначение базисных препаратов отсрочено на срок более 3 месяцев, то существует вероятность, что терапевтическое средство может не «успеть» проявить свою активность. Эффект применения БПВП обратно пропорционален длительности заболевания до момента их назначения. Причиной для срочной консультации ревматолога и решения вопроса о постановке соответствующего диагноза с последующим назначением базисных препаратов является наличие у больного критериев раннего РА [50].

Благоприятный прогноз при РА будет обусловлен своевременным началом и достаточной продолжительностью базисной терапии [44,56]. К БПВП относят следующие группы средств: цитостатики (метотрексат, циклоспорин, лефлуномид), а также аминохиноловые производные (сульфасалазин, хлорохин, плаквенил, D-пеницилламин, препараты золота).

В последнее время так называемые биологические агенты, такие как адалимумаб, ритуксимаб или инфликсимаб, также стали относить к базисным препаратам терапии РА. Среди БПВП средством первого выбора является метотрексат, обладающий по сравнению с другими препаратами наиболее оптимальным соотношением эффективности и токсичности [56,28]. По своей природе данное средство относится к группе антиметаболитов, антипролиферативная активность и противовоспалительный эффект которого достигается благодаря его способности выступать в роли антагониста фолиевой кислоты (ингибитора дигидрофолатредуктазы) [28].

В последние годы, помимо этого, начали появляться данные о высокой эффективности терапии лефлуномидом на ранней стадии развития РА. Лефлуномид обладает способностью тормозить пролиферацию активированных Т-лимфоцитов, макрофагов, моноцитов, влияет на секрецию антител и ряда цитокинов (ФНО- $\alpha$ , интерферон- $\alpha$ ), а также на процессы клеточной адгезии, блокируя инициацию ими ревматоидного процесса [56].

Сульфасалазин назначают, как правило, лишь при нетяжелых формах течения РА, проявление его клинического эффекта наступает в среднем через 1,5-2 месяца. Данный препарат используют в случае наличия противопоказаний лечения метотрексатом, либо в качестве важного компонента комбинированной терапии такими средствами, как метотрексат, лефлуномид [50].

Циклоспорин представляет собой средство, обладающее обратимым антицитокиновым действием, однако он не является препаратом первого выбора при РА. D-пеницилламин (купренил), а также другие аминохинолиновые производные и соли золота на сегодняшний день теряют свое значение БПВП терапии данного заболевания.

### 1.1.5.2. Генно-инженерные биологические препараты

К одним из наиболее серьезных достижений в фармакотерапии РА относится разработка и применение ГИБП. К такого рода биопрепаратам относятся моноклональные антитела (АТ), влияющие непосредственно на ключевые звенья в развитии аутоиммунного воспаления - ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1, ИЛ-6, Т- и В-лимфоциты и представленные следующими классами: ингибиторы ФНО и ИЛ, поверхностных антигенов лимфоцитов, рекомбинантные молекулы - рецепторы цитокинов, аналоги молекул-активаторов Т- и В-лимфоцитов. Таким образом, ряд ГИБП являются селективными ингибиторами синтеза провоспалительных цитокинов и активности лимфоцитов [35].

Главным достоинством генно-инженерной биологической терапии является максимальная избирательность воздействия на механизмы иммунной системы без влияния на клетки других органов и систем [65].

Применение препаратов антицитокинового ряда (инфликсимаб, адалимумаб и др.) особенно показано при устойчивости к предшествующей терапии БПВП. Их использование позволяет снизить активность аутоиммунного воспаления, замедлить прогрессирование РА [35]. Достоверно установлено дозозависимое торможение костной деструкции у больных РА при назначении ингибиторов ФНО- $\alpha$  [18]. Торможение процесса эрозии кости у пациентов при применении моноклональных АТ к ФНО- $\alpha$  обусловлено тем, что при блокировании данного цитокина происходит снижение функционирования и пролиферации остеокластов в присутствии лиганда рецептора-активатора ядерного фактора NF- $\kappa$ B [232].

Ингибиторам ФНО- $\alpha$  свойственно достижение клинического эффекта в течение первых 12-24 недель терапии, а нередко и в первые дни лечения. Эффект сохраняется на протяжении 12 месяцев и далее [32]. Наиболее выраженный эффект препаратов группы ГИБП выявляется при их раннем назначении, а также комбинации с компонентами стандартной терапии (в

частности, с метотрексатом). Комбинация метотрексата с инфликсимабом более эффективна, чем монотерапия метотрексатом.

У части больных отмечается первичная неэффективность ингибиторов ФНО- $\alpha$ , что связывают с появлением к ним антител. Избежать этого осложнения можно путем назначения другого ГИБП с иным механизмом действия [31,63].

Первым ГИБП, зарегистрированным к применению при РА, был этанерцепт (энбрел), который представляет собой рекомбинантный растворимый ФНО- $\alpha$ -рецептор, связанный с Fc-фрагментом Ig G для подкожного применения [366,390]. На сегодняшний день группа анти-ФНО представлена большим количеством моноклональных АТ к ФНО- $\alpha$ : инфликсимаб (ремикеид) – химерное АТ, содержащее мышинный фрагмент Ig, для внутривенного введения, адалимумаб (хумира), голимумаб (симпони) – полностью человеческие АТ для подкожного введения и сертолизумаб пэгол (симзия) – Fab-фрагмент молекулы человеческого АТ, соединенный с полиэтиленгликолем, также для подкожного введения [158,199,339].

В результате проведения большого числа исследований получен достаточный объем данных, показывающих, что применение ГИБП позволяет снизить интенсивность иммунопатологического процесса и добиться значительного ослабления клинических проявлений РА, повысить качество жизни и замедлить прогрессирующую деструкцию суставов даже у пациентов, устойчивых к предшествующей терапии стандартными БПВП [80,158,374]. Все ГИБП обладают высокой эффективностью в комбинированной терапии с метотрексатом у пациентов с резистентностью к стандартной терапии, а также при раннем РА, что обеспечивает достижение длительных ремиссий [129,156,325].

### 1.1.5.3. Глюкокортикостероиды

В терапии РА достаточно широко используются ГКС, применение которых обеспечивает быстрое достижение клинических улучшений. Препараты ГКС до сих пор являются наиболее эффективными противовоспалительными средствами и обладают потенциалом тормозить большинство механизмов, обуславливающих процесс ревматического воспаления.

К основным позитивным эффектам применения ГКС относятся следующие: ослабление болевых ощущений в суставах, улучшение функциональной активности, торможение прогрессирования разрушения суставов, сохраняющееся и после остановки приема препаратов, уменьшение необходимости применения НПВП. После достижения первоначального терапевтического эффекта проводят постепенное снижение стартовой дозы, обеспечивающей стабильное состояние пациента и течение болезни, что осуществляется строго индивидуально.

### 1.1.5.4. Нестероидные противовоспалительные препараты

Механизм действия НПВП заключается в ингибировании циклооксигеназы (ЦОГ-1 и ЦОГ-2), следствием чего является уменьшение болевого синдрома, припухлости суставов и утренней скованности. Назначают НПВП с учетом факторов риска побочных эффектов, таких как кардиоваскулярные, гастроинтестинальные и почечные нарушения [22]. Неселективные НПВП назначают, как правило, больным, не имеющим факторов риска НПВП-зависимой гастропатии и клинически выраженной патологии сердечно-сосудистой системы. Наиболее оптимальным препаратом среди НПВП считается диклофенак, имеющий наилучшее соотношение эффективности и безопасности [22].

В случае наличия у пациента факторов риска возникновения побочных эффектов НПВП, назначают предпочтительно селективные ингибиторы ЦОГ-2 (коксибы, немисулид, мелоксикам), применение которых благодаря отсутствию воздействия на водно-солевой обмен через простагландиновые механизмы целесообразно у больных РА с артериальной гипертензией и сердечной недостаточностью. Однако, применение селективных НПВП пациентам с тяжелыми нарушениями желудочно-кишечного тракта, или принимающим низкие дозы ацетилсалициловой кислоты, варфарин и глюкокортикоиды, допустимо только в сочетании с ингибиторами протонной помпы [22]. При острых болевых ощущениях назначают препараты с максимальной анальгетической активностью: кетопрофен, диклофенак, лорноксикам, нимесулид, целекоксиб.

#### 1.1.5.5. Другие медикаментозные средства терапии РА

Известно, что модифицировать патогенез РА способны антиоксиданты, которые представляют интерес в качестве потенциальных средств терапии данного заболевания. Защищают подобные соединения от развития РА путем ингибирования оксидативного стресса [205]. В связи с этим в настоящее время активно исследуются возможности применения различных антиоксидантов для лечения РА [87,329].

Так, селен, который входит в состав GPX, способен предотвращать окисление липидов, и его дефицит ассоциирован с развитием РА. Выяснено, что применение селена существенно уменьшает в суставах пациентов выраженность болевого синдрома [73], а также снижает количество воспаленных суставов [77]. Также прием препаратов селена уменьшает у больных потребность в глюкокортикоидах и НПВП [329].

Фуллерен C<sub>60</sub> представляет собой гидрофильное сферическое углеродсодержащее соединение, характеризующееся высокой аффинностью к АФК [408]. Внутрисуставные инъекции фуллерена, как было показано на



адьювантной модели РА у крыс, уменьшали выраженность синовита, костной резорбции и суставных деструкций по сравнению с контрольной группой [408]. Помимо этого, фуллерен C60 тормозит клеточные иммунные реакции, а также ингибирует гуморальный иммунитет при адьювантном артрите.

Витамин С обезвреживает такие АФК, как супероксидный ( $O_2^{\cdot-}$ ), пероксидный ( $H_2O_2$ ) и гидроксильный ( $OH^{\cdot}$ ) радикалы [205]. Уменьшение уровня аскорбиновой кислоты у больных с РА коррелирует с тяжестью и продолжительностью заболевания [396]. Было показано, что применение витамина С приводит к уменьшению уровня оксида азота и простагландина G2, а также увеличению активности супероксиддисмутазы и содержания глутатиона в крови животных с экспериментальным РА [260].

Витамин Е представляет собой липофильный антиоксидант, который показал свою эффективность в рандомизированных контролируемых исследованиях. При РА данное соединение оказывает преимущественно анальгезирующее действие [346], а по эффективности в отношении утренней скованности и болевого синдрома оно сравнимо с диклофенаком натрия [207].

Омега-3-полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) способны образовывать противовоспалительные эйкозаноиды, в то время как метаболиты омега-6-ПНЖК стимулируют выработку провоспалительных интерлейкинов  $1\beta$  и 6 [293]. При этом, увеличение отношения содержания омега-6-ПНЖК к омега-3-ПНЖК вносит определенный вклад в рост распространенности РА и ряда других патологий [265].

Димефосфон – оригинальный отечественный препарат, обладающий разнообразными свойствами. На модели адьювантного артрита крыс показана его способность снижать интенсивность ПОЛ, при этом по антиоксидантной эффективности данное средство сопоставимо с дибунолом – эталонным антиоксидантом [8].

На модели адьювантного артрита доказано также наличие противовоспалительных свойств у отечественного антиоксиданта мексидола [40].

#### 1.1.5.6. Немедикаментозные способы лечения ревматоидного артрита

К немедикаментозным способам лечения РА, представляющим собой дополнительные подходы к улучшению самочувствия и функционального статуса пациента, относят физиотерапию, бальнеотерапию, диетотерапию, акупунктуру, и др. В то же время, данные методы не способны купировать симптоматику и достоверно воздействовать на деструкцию суставов.

Ортопедическое лечение, к которому относят ортезирование и хирургическую коррекцию деформаций суставов, а также реабилитационные процедуры (лечебная физкультура и др.), имеет высокое значение преимущественно на поздних стадиях патологии для поддержания функциональной способности и улучшения качества жизни больного [161].

### 1.2. Окислительный стресс и его роль в патогенезе ревматоидного артрита.

ОС представляет собой состояние, при котором образование организмом оксидантов превышает его способность к их нейтрализации. Результатом такого дисбаланса являются повреждения клеточных мембран, липидов, нуклеиновых кислот, белков и компонентов внеклеточного матрикса, таких как протеогликаны и коллагены. Как было выявлено в ходе исследований, ОС играет существенную роль в патогенезе РА [236,258,355]. Рядом авторов показана обратная связь между потреблением антиоксидантов с пищей и заболеваемостью РА [96,218,305], а также состоянием компонентов антиоксидантной системы и интенсивностью воспаления [223,227].

АФК – это высокоактивные молекулы, содержащие кислород, либо естественные побочные продукты его метаболизма, и имеющие на внешнем электронном уровне неспаренные электроны. АФК способны окислять различные аминокислоты, в соответствии с их окислительным потенциалом, играют важную физиологическую роль в клеточной сигнализации, апоптозе, системах ионного транспорта, заживления ран и гомеостаза крови, а также индукции иммунной защиты (респираторный взрыв), экспрессии генов и регуляции воспалительных реакций. Однако, возрастание их уровня до значения, вредного для клеток, может иметь пагубные последствия. Это особенно характерно в случаях, когда резервов антиоксидантной системы не хватает для поддержания нормального гомеостаза при чрезмерной генерации АФК [299].

Окислительные модификации, вызванные АФК, могут выступать в роли триггера аутоиммунной реакции, включающей процесс потери толерантности к окислительным посттрансляционным модификациям, результирующийся в первичном ответе В-клеток против посттрансляционно модифицированного аутоантигена [148]. Содержание антител к карбонильно-модифицированным белкам, выработка которых была индуцирована под воздействием окислительного стресса, также коррелирует с тяжестью хронической обструктивной болезни легких [289] и системной красной волчанкой [211].

ОС, возникающий во время воспаления, приводит к повреждению белков АФК, основным источником которых в суставах является NADPH-оксидаза. Этот фермент восстанавливает  $O_2$ , генерируя большое количество  $O_2^{\bullet-}$ , который является первичным радикалом и может быть восстановлен до  $H_2O_2$ , способной превратиться в высоко реакционноспособный  $OH^{\bullet}$ , либо вступить в реакцию с  $Cl^-$  с образованием  $HOCl$  (в реакции, катализируемой миелопероксидазой). NO-синтаза иммунных клеток также генерирует NO, который преобразуется в пероксинитрит ( $ONOO^-$ ) путем взаимодействия с  $O_2^{\bullet-}$  [119]. Кроме того, в условиях окислительного стресса, такие виды

радикалов, как  $\text{ONOO}^-$ , могут быть получены в результате нитрования остатков тирозина с образованием 3-нитротирозина (3-НТ) [153,235]. Действительно, антитела, распознающие 3-НТ были идентифицированы в синовии больных РА и их содержание коррелирует с активностью заболевания [235].

Оксид азота (NO) выступает в качестве важного посредника при развитии коллаген-индуцированного артрита и воспаления синовии. Известно, что NO в повышенных концентрациях присутствует в синовиальной жидкости больных РА, а также опосредует множество различных клеточных функций в районе синовиального воспаления, таких как продукция цитокинов, сигнальная трансдукция, функционирование митохондрий и апоптоз [74,117,140].

Продукция  $\text{ONOO}^-$  связана с редукцией коллагена 2 типа и агреккана и со снижением ответа хондроцитов на фактор роста IGF-1 *in vitro*. Кроме того,  $\text{ONOO}^-$  повышает экспрессию MMP-3 и MMP-13 и уменьшает продукцию и активность тканевых ингибиторов MMP, что приводит к нарушению матрикса. Чрезмерная секреция ФНО- $\alpha$ , как полагают, является основным фактором увеличения генерации АФК у пациентов с РА [103,197].

Помимо этого, АФК генерируют вторичные свободные радикалы, такие как продукты ПОЛ. Неферментативное окисление сахарами может происходить непосредственно или вследствие генерации реакционноспособных продуктов – глиоксаля и метилглиоксаля, которые способны подвергаться реакции Майяра с образованием Шиффовых оснований с аминогруппой аминокислот, таких как лизин или аргинин. Данное промежуточное соединение может затем подвергнуться перегруппировке Амадори, приводящей к формированию конечных продуктов гликозилирования, таких как карбоксиметиларгинин, или инициированию пептидных сшивок с образованием пентозидина [78]. Присутствие этих посттрансляционных модификаций белковых молекул увеличивает и модифицирует их естественную антигенность, а антитела

против нативных и модифицированных форм данных полипептидов обнаруживаются при РА, несмотря на отсутствие гипергликемии [245,324]. Конечные продукты гликозилирования, помимо этого, могут оказывать негативное воздействие на коллаген путем необратимого формирования поперечных связей между волокнами в тройной спирали [134,213,214].

Другая потенциальная реакция – хлорирование ароматических аминокислот в полипептидной цепи [274]. В условиях окислительного стресса взаимодействие коллагена с  $\text{ONOO}^-$  приводит к нитрованию тирозиновых остатков и формированию посттрансляционно модифицированного нитротирозина. Воздействие АФК на пептиды, нуклеиновые кислоты, клеточную мембрану или свободные липиды модифицирует аминокислоты, создавая посттрансляционно модифицированные белки и липиды путем инициации перекисного окисления [251]. Окислению при РА могут подвергаться такие белки, как коллагены I, II, IX и XI, а также протеогликаны и ГК. Усиленное окисление липидов с появлением характерных пенистых клеточно-подобных структур в синовиальной ткани также является признаком данной патологии [165,192].

Иммуноглобулины, помимо этого, могут подвергнуться гликозилированию. Аутоантитела к таким модифицированным молекулам IgG были выявлены при РА, однако фактическое их образование было непосредственно связано с интенсивностью воспалительного ответа [205]. Аналогичным образом, модификация IgG с помощью  $\text{HOCl}$  или  $\text{ONOO}^-$  может индуцировать Т-клеточный ответ [193].

В свою очередь, антиоксиданты способны уменьшать повреждение тканей, вызванное АФК, и проявлять протекторные свойства при РА посредством инактивации свободных радикалов, генерируемых активированными макрофагами, моноцитами, гранулоцитами [120] и подавления активности цитокинов, включая ФНО- $\alpha$  [88]. На мышинных моделях системной красной волчанки применение антиоксидантов, таких как  $\beta$ -каротин,  $\alpha$ -токоферол, аскорбиновая кислота и селен, приводило к

снижению производства аутоантител и увеличению выживаемости [89,409]. Недавно было также показано, что ретиноевая кислота – производное витамина А, ингибирует образование провоспалительных Т-хелперов и способствует продукции противовоспалительных Т-регуляторных клеток на мышинных моделях аутоиммунных заболеваний [316]. Помимо этого, известно, что потребление с пищей низкомолекулярных антиоксидантов обратно пропорционально риску развития РА [151,402], а низкий их уровень в периферической крови предвещает возникновение данного заболевания [333].

В ряде работ было показано, что к рисковым факторам развития РА могут относиться пониженные концентрации витаминов А и Е, β-каротина, глутатиона, и низкая активность антиоксидантных ферментов в крови пациентов [85,86,298]. В свою очередь, развитие данного состояния может привести к серьезным метаболическим дисфункциям и разрушению биологических молекул [333].

Важную роль в развитии системного и местного (синовиального) окислительного стресса у больных с РА играют нейтрофилы [217,224]. Их оксидативный статус обычно коррелирует с активностью заболевания, уровнем маркеров окислительного стресса и повреждением тканей у пациентов [288,321]. Отложение иммунных комплексов (ИК) и белков системы комплемента на поверхности сустава ухудшает полное смыкание фагосом, что приводит к нарушению фагоцитоза. Затем нейтрофилы высвобождают большое количество окисляющих молекул и цитотоксических агентов в микросреду полузакрытой фагосомы, то есть на суставную поверхность и в синовиальную жидкость. Массивная инфильтрация нейтрофилами и их активация может подавить местные защитные антиоксидантные и антипротеазные механизмы и привести к серьезному повреждению окружающих тканей у пациентов с РА [217,224,278].

Активация нейтрофилов запускает окислительный взрыв, посредством которого с помощью НАДФН-оксидазы генерируются  $O_2^{\cdot -}$  и другие АФК

( $\text{HO}^\bullet$ ,  $^1\text{O}_2$ , и  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) в последующих реакциях, а также хлорноватистая кислота ( $\text{HOCl}$ ) посредством действия миелопероксидазы. НАДФН-оксидаза представляет собой многокомпонентный фермент, который локализован на плазматической мембране клеток [323]. Многочисленные исследования показали, что АФК, генерируемые НАДФН-оксидазой, могут оказывать патогенное воздействие при РА, и у больных с таким заболеванием повышена активность данного фермента в циркулирующих нейтрофилах и моноцитах [114,115].

У пациентов с РА циркулирующие нейтрофилы, поступившие к воспаленной синовиальной оболочке, оперативно реагируют на стимуляцию растворимыми и нерастворимыми ИК [175]. Базальные уровни АФК в целом,  $\text{HO}^\bullet$ , а также поколения ИК-стимулированных радикалов значительно повышены в нейтрофилах периферической крови и синовиальной жидкости у больных РА, по сравнению с нейтрофилами здоровых людей [288]. Показано, что уровень генерации АФК положительно коррелирует с активностью заболевания и содержанием С-реактивного белка и АЦЦП антител [278,288]. Вместе с тем, нейтрофилы синовиальной жидкости имеют тенденцию производить больше  $\text{O}_2^{\bullet-}$  и  $\text{HO}^\bullet$  и обладают более высокой активностью НАДФН-оксидазы, чем нейтрофилы периферической крови того же человека [288]. Таким образом, оценка содержания поколений АФК у нейтрофилов периферической крови и синовиальной жидкости может быть косвенным показателем воспаления и активности заболевания у пациентов с РА.

Воздействие на хрящ  $\text{HOCl}$  или  $\text{H}_2\text{O}_2$  ингибирует синтез протеогликанов,  $\text{HOCl}$  обладает также способностью к их разрушению [294]. Смягчают патогенное воздействие  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{HOCl}$  на хрящ каталаза и метионин соответственно [239]. Помимо этого, АФК, по-видимому, могут модулировать высвобождение эластазы и/или активность нейтрофильно-индуцированной деградации хряща [229].  $\text{HOCl}$  также опосредует активацию коллагеназы и желатиназы из гранул нейтрофилов и выработку хлоргидринов холестерина, что способствует повреждению тканей [294].

Вопреки традиционному мнению, согласно которому высокий уровень АФК опосредует воспаление, некоторые исследователи утверждают, что сокращение производства АФК вследствие полиморфизма в компонентах гена респираторного взрыва – цитозольного фактора нейтрофилов 1 (Ncf1 или p47phox), способствует активации артритогенных Т-клеток и приводит к тяжелому артриту у грызунов [312,385]. Физиологический же уровень свободных радикалов индуцирует апоптоз у аутореактивных артритогенных Т-клеток и предотвращает аутоиммунные реакции [205]. Животные, имеющие варианты Ncf1, связанные с низкой мощностью респираторного взрыва, проявляли повышенную восприимчивость к артриту, и патология протекала у них по более тяжелому варианту [205]. Высокий уровень АФК и окислительного стресса в суставах может влиять на Т-клеточную реактивность с помощью различных механизмов, где вступающие в реакцию свободные радикалы изменяют структуру мембран и внутриклеточных белков, участвующих в передаче сигналов Т-клеток. АФК функционируют также как внутриклеточные молекулы сигнализации, влияют на последующую модификацию антигена и его взаимодействие с Т-лимфоцитами, изменяют общее окислительно-восстановительное состояние внеклеточной среды [385]. Т-клетки синовиальной жидкости также имеют более высокий клеточный уровень АФК, чем Т-клетки периферической крови того же пациента [139].

Ряд активных форм азота, таких как NO и ONOO<sup>-</sup>, также участвуют в повреждении ткани в патогенезе РА. Данные частицы окисляют биомолекулы, изменяют окислительно-восстановительный баланс глутатиона, увеличивают активацию протеолитических систем, способствуют транслокации в ядро транскрипционного фактора NF-κB, который, в свою очередь, активирует транскрипцию медиаторов воспаления – ФНО-α, ИЛ-1, ИЛ-6, и др. Среди них ФНО-α играет центральную роль в устойчивом воспалении синовиальной оболочки посредством способности к стимуляции окислительного стресса [205]. ФНО-α продуцируется в



метаболическом каскаде, индуцируемом транскрипционным комплексом NF- $\kappa$ B, и повторно активирует данный фактор путем высвобождения его из комплекса с I- $\kappa$ B, который в стационарном состоянии фосфорилирует и инактивирует NF- $\kappa$ B [215]. Высокие уровни провоспалительных цитокинов в синовиальной ткани способствуют активации и рекрутированию нейтрофилов, синовиальных фибробластов и макрофагов, которые способствуют дальнейшему перепроизводству АФК. Данные радикалы повторно активируют сигнальный путь с участием фактора NF- $\kappa$ B по принципу положительной обратной связи, усиливая воспаление в синовии. Помимо окислительного стресса, NF- $\kappa$ B также стимулирует протеолитическую активность. Протеолитические ферменты играют центральную роль в разрушении хряща и кости в патогенезе РА. Цитокины, включая ФНО- $\alpha$  или ИЛ-1, активируют синовиальные фибробласты и макрофаги, которые продуцируют разрушающие хрящ ферменты, такие как ММР-1 и ММР-3. Полагают, что они секретируются синовиальными фибробластами и макрофагами в паннус пораженных суставов и могут разрушать ГК, протеогликан и коллаген, которые входят в состав хряща [237]. Кроме того, хондроциты, стимулированные ИЛ-1, секретируют ММР-3 и способствуют деструкции субхондральной кости [327]. Данный фермент рассматривается в качестве важного компонента разрушения суставов при РА, поскольку его концентрация в сыворотке пациентов коррелирует с активностью заболевания [389]. Кроме того, активация ФНО- $\alpha$  приводит к усилению экспрессии таких молекул, как лиганд рецептора-активатора NF- $\kappa$ B, что сопряжено с костной деструкцией [286]. Экспрессия данного лиганда в синовиальных фибробластах приводит к дифференциации клеток-предшественников остеокластов, экспрессирующих рецептор-активатор NF- $\kappa$ B на их поверхности. Клетки-предшественники, включая моноциты, мигрирующие в синовиальную ткань, созревают в остеокласты – первичные клетки, ответственные за деструкцию костной ткани, приводящей к эрозии, характерной для РА [206].

Таким образом, АФК как непосредственно, так и косвенно способствуют патогенезу и прогрессированию РА, вызывая окислительное повреждение, изменяя внутри- и внеклеточный окислительно-восстановительный гомеостаз, и модулируя активность протеолитических ферментов и иммунных клеток в условиях воспаления [313].

АФК оказывают также и прямое воздействие путем окисления основных компоненты хряща и кости, в том числе коллагена и ГК [197]. Так, для синовиальной жидкости при РА характерно пониженное содержание ГК и высокая инфильтрация лейкоцитами. Деградация ГК является, в том числе, результатом её фрагментации под действием  $\text{OH}^\bullet$  и результируется пониженной вязкостью синовиальной жидкости у пациентов с РА [197,287].  $\text{OH}^\bullet$  также модифицирует коллаген, что приводит к образованию поперечных связей или фрагментации белка [143]. Такой коллаген становится более восприимчивым к последующему расщеплению протеиназой в синовиальной жидкости.

Однако результаты, касающиеся исследований активности антиоксидантной системы организма при развитии РА, весьма противоречивы. Так, в некоторых работах было показано увеличение, а в других – уменьшение активности ряда антиоксидантных ферментов, таких как СОД, GPX, каталаза, в крови больных, страдающих данным заболеванием. Кроме того, в некоторых исследованиях было показано разнонаправленное изменение активности СОД и каталазы у пациентов [349,362,401]. Практически отсутствуют также сведения о возможностях регуляции свободнорадикального гомеостаза при РА. Это определяет актуальность исследований, посвященных данной проблеме.

### 1.3. Антиоксидантная система организма

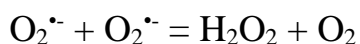
Деструктивному эффекту свободных радикалов противостоит АОС, ключевым звеном которой являются антиоксиданты — вещества, способные

понижать активность СО и обезвреживать АФК. Образующиеся при этом радикалы антиоксидантов имеют низкую токсичность и выводятся из организма в форме различных молекулярных соединений. В целом АОС организма можно подразделить на 2 звена: ферментативное и неферментативное.

### 1.3.1. Ферментативное звено антиоксидантной системы

Среди агентов первой линии защиты от действия АФК можно выделить такие ферменты, как СОД, каталаза, пероксидазы.

СОД представляет собой один из ключевых внутриклеточных ферментов АОС. В данную группу входят металлоферменты, катализирующие реакцию дисмутации  $O_2^{\cdot-}$ , благодаря чему концентрация данного радикала поддерживается в клетке на стационарном уровне:



Функционирование СОД обусловлено последовательными процессами восстановления и окисления ионов металла переменной валентности в активном центре фермента. Известно несколько изоферментов СОД, которые отличаются структурой активного центра: Cu-, Zn-, Mn- и Fe-СОД. Ионы меди необходимы для каталитической активности фермента [417], в то время как ионы цинка обеспечивают правильную конформацию белка, необходимую для функционирования активного центра [173]. Mn-СОД локализована в митохондриях гепатоцитов и миокардиоцитов эукариот, вблизи анионных каналов, Fe-СОД была выявлена только у прокариот.

Cu-, Zn-СОД имеет молекулярную массу около 33200 Да, представляет собой гомодимер, молекулярный вес субъединиц которого составляет 16300 Да [200]. В каждой субъединице фермента имеется по одному иону меди и цинка, внутри полипептидной цепи присутствует дисульфидный мостик, одна SH-группа и ацетилированная концевая аминогруппа [410]. При этом ионы Cu и Zn в активном центре молекулы фермента при взаимодействии

между собой находятся на таком близком расстоянии, что происходящие изменения в микроокружении одного иона влияют на микроокружение другого.

Конкурентными ингибиторами СОД могут выступать одновалентные анионы хлора и гидроксила благодаря их способности связывать ионы  $\text{Cu}$  из активного центра [322]. Помимо этого, фермент ингибируется цианидом [326], а его инактивация  $\text{H}_2\text{O}_2$  сопровождается восстановлением цитохрома  $c$  и люминесценцией. Однако, в невысоких концентрациях  $\text{H}_2\text{O}_2$  действует как восстановитель СОД, которая в восстановленной форме достаточно устойчива к кислороду [61].

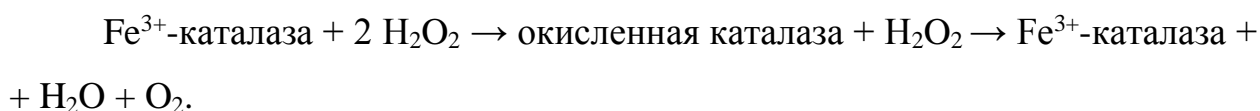
Молекулярная масса  $\text{Mn}$ -СОД и  $\text{Fe}$ -СОД составляет 39500 Да и 38700 Да соответственно, оба данных фермента являются димерами и имеют схожий аминокислотный состав [419].

У прокариот  $\text{Mn}$ -СОД и  $\text{Fe}$ -СОД не подвергаются ингибированию цианидом [191], помимо этого, активность второго фермента не зависит от наличия кислорода и чувствительна к концентрации ионов железа в среде [60]. Различная локализация  $\text{Mn}$ -СОД и  $\text{Fe}$ -СОД в *E. coli*, по-видимому, обусловлена неодинаковой их ролью в защите от  $\text{O}_2^{\cdot-}$ :  $\text{Mn}$ -СОД обезвреживает эндогенные АФК в матриксе прокариот, а  $\text{Fe}$ -СОД функционирует как «ловушка периплазматического пространства» экзогенных  $\text{O}_2^{\cdot-}$ .

Позднее была найдена экстрацеллюлярная форма СОД, представляющая собой гликопротеид, состоящий из двух соединенных дисульфидным мостиком димеров [310]. Каждая из 4-х субъединиц этого фермента имеет молекулярную массу около 30 кДа [268], содержит в активном центре ионы  $\text{Cu}$  и  $\text{Zn}$  [420]. Все субъединицы экстрацеллюлярной СОД имеют одинаковую первичную структуру [371], которая, однако, отличается от аминокислотного состава и антигенных свойств субъединиц цитоплазматической  $\text{Cu}$ -,  $\text{Zn}$ -СОД [268]. Эти ферменты имеют также разные генные локусы, кодирующие пептидную цепь апофермента, и различную

каталитическую активность [25]. Помимо этого, в отличие от Cu-, Zn-СОД – гомодимера с четырьмя остатками цистеина в каждой субъединице, экстрацеллюлярная СОД представляет собой тетрамер с шестью остатками цистеина в субъединицах [219,371]. Экстрацеллюлярная СОД локализована, главным образом, во внеклеточных пространствах [219], найдена в фибробластах и глиальных клетках [254] и является главным изоферментом плазмы крови, лимфы, синовиальной жидкости [342]. Высокий уровень экстрацеллюлярной СОД, помимо этого, обнаружен в легких, сердце [146], почках, плаценте [280]. Данный фермент подвергается ингибированию цианидом и инактивации  $H_2O_2$  [255], его секрецию способны блокировать ионы железа [353]. Экстрацеллюлярная СОД характеризуется высокой аффинностью к ряду гликозаминогликанов, таких как гепарин и сульфат гепарина [168]. По степени сродства к гепарину выделяют три формы экстрацеллюлярной СОД – не имеющую сродства и обладающие низкой и высокой аффинностью, соответственно: форма А, В и С [203]. Формы А и В локализуются преимущественно в плазме крови, а форма С связана с гликокаликсом эндотелиоцитов стенки сосудов, причем ее активность в несколько раз превышает активность внутриклеточной СОД [234].

Каталаза представляет собой гемопропротеин, способный разрушать  $H_2O_2$  в отсутствие акцепторов кислорода, при этом в роли донора электронов выступает сам  $H_2O_2$ . Молекула фермента состоит из 4 идентичных субъединиц, формирующих тетраэдр, и включает в себя четыре гемовых группы. Локализуется каталаза главным образом в пероксисомах, в меньшей степени – в микросомах и цитозоле. Данный фермент имеет невысокое сродство к  $H_2O_2$  и не способен эффективно обезвреживать данное соединение в низких концентрациях, характерных для цитоплазмы. В пероксисомах содержание  $H_2O_2$  существенно выше, и каталаза активно разрушает эти молекулы [39]. Содержится фермент во всех органах и тканях организма, но наибольшая его активность характерна для печени. Процесс разложения  $H_2O_2$  каталазой происходит в две стадии:



Каталаза в окисленной форме при этом работает подобно пероксидазе, субстратами для данной реакции могут быть метанол, этанол, формальдегид, формиат, и другие доноры водорода.

Необходимо отметить, что активности каталазы и СОД между собой взаимосвязаны, что может быть следствием их сопряженного функционирования в процессе элиминации  $\text{O}_2^{\cdot-}$  с образованием промежуточного продукта –  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Таким образом, два этих фермента работают как звенья одного пути метаболизма кислорода, локализованные в разных областях клетки.

GPX – фермент антиоксидантной защиты, представленный в 8 формах. GPX1 (сGPX) представляет собой цитозольный фермент, обнаруживающийся во всех тканях, включая клетки крови, и вступающий в реакцию с токсичными пероксидами, такими как  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Для GPX2 (GSHPX-GI) и GPX3 (pGPX) субстратами также выступают пероксиды, но GPX2 экспрессируется главным образом в клетках желудочно-кишечного тракта, тогда как GPX3 является секретлируемым ферментом и обнаруживается в плазме крови и молоке [166,314]. GPX4 (PHGPX) отличается тем, что катализирует фосфолипидные гидропероксиды, обнаруживается как в митохондриях, так и цитозоле, и экспрессируется в большинстве тканей, с наибольшей активностью в семенниках. Помимо этого, предполагают участие GPX4 в процессе апоптоза, защите митохондрий от повреждения АФК [183], синтезе семенной жидкости [166] и эмбриональном развитии [4, 392]. Ферменты GPX1-4 включают в свой состав селеноцистеин [109]. Форма GPX5 (eGPX) локализуется в придатках семенников и играет важную роль в фертильности [109]. GPX6, также известный как белок метаболизма обоняния, классифицируется как селенопротеин людей, но не грызунов [109], и участвует в процессе обоняния в обонятельном эпителии [166]. Относительно недавно была описана форма GPX7 (NPGPX). Как и GPX5, это

цистеин-содержащая изоформа, предположительно способная предотвращать развитие окислительного стресса в раковых клеточных линиях молочной железы [166] и участвующая в фолдинге белка в эндоплазматическом ретикулуме [109]. Форма GPX8, обнаруженная с помощью филогенетического анализа [166], также, как полагают, играют определенную роль в фолдинге белка [109]. GPX5-8 являются цистеин-содержащими изоформами фермента [109]. Включение Se в состав селенопротеинов (в том числе в виде селеноцистеина) происходит в процессе их синтеза с помощью механизма, включающего 3'-нетранслируемую область мРНК и транс-активирующие белки [204].

Молекулярная масса GPX-1 млекопитающих составляет от 83 до 95 кДа, фермент представляет собой гомотетрамер с массой субъединиц 22-23 кДа, включающих в себя 202-204 аминокислотных остатка [282,310,370]. Детоксикация пероксидов GPX-1 осуществляется посредством бисубстратного механизма типа «пинг-понг», в котором кинетика насыщения не наблюдается. Ферментативное восстановление пероксидов происходит с образованием промежуточных стабильных модификаций с селеноцистеином в активном сайте [69,154,171], после прохождения реакции на селеноле активного центра формируется селеновая кислота. Далее, одна молекула GSH восстанавливает селеновую кислоту, что приводит к образованию глутатионилированного селенола – промежуточного соединения [240]. Вторая молекула GSH восстанавливает связь глутатионилированного селенола, что приводит к восстановлению активного центра фермента с образованием окисленного глутатиона (GSSG). Последующее ревосстановление GSSG происходит под действием НАДФН-зависимой GSR. Таким образом, путем ферментативного обезвреживания пероксидов GPX1 регулирует состояние клеточного окислительного гомеостаза посредством окисления GSH – основного низкомолекулярного тиола в клетках. Помимо этого, GPX1 косвенно связана также с соотношением НАДФ<sup>+</sup>/НАДФН, восстановленная форма которого участвует в поддержании нормального

содержания GSH. Окисление GSH в реакции GPX1 может также влиять на активность пентозофосфатного пути, регулируемого соотношением НАДФ<sup>+</sup>/НАДФН [382]. Как показали некоторые исследования, достаточная концентрация GSH в клетке обычно защищает GPX1 от окислительной инактивации, что иллюстрирует важность общего клеточного окислительно-восстановительного гомеостаза в функционировании данного фермента [184,292].

GSR представляет собой гомодимерный флавопротеид, содержащий 450 аминокислотных остатков [189] и 1 молекулу ФАД на каждой субъединице, катализирует восстановление GSSG в соответствии с уравнением:



GSR играет важную роль в поддержании окислительно-восстановительного баланса внутри клетки [79] и концентрации GSH, участвующего в различных важных клеточных процессах [259]. Данный фермент является типичным белком семейства флавопротеиновых дисульфидных оксидоредуктаз, поскольку каждая его субъединица содержит четыре хорошо выделяемые области: ФАД-связывающий домен, НАДФ-связывающий домен, центральный домен и интерфейс домен. Два активных сайта находятся на границе двух субъединиц, где субстрат GSH связывается с остатками обеих глобул. Таким образом, только димерная форма фермента может быть каталитически активной. Связь между субъединицами димера включает в себя две области. Верхний участок в значительной мере способствует связыванию доменов и обеспечивает большую область контакта между субъединицами, тогда как меньший нижний участок формируется посредством контакта между двумя  $\alpha$ -спиральными частями цепи, выступающими из ФАД-связывающего домена. Верхняя область связывания формирует одну из самых жестких частей белка и содержит около 75% межсубъединичных водородных связей. Важность верхнего участка связывания в сборке димера подтверждается высокой степенью



консервативности данной последовательности у GSR из различных видов, в то время как нижняя область относительно слабо консервативна. Кроме этого, важную роль в структуре связи между димерами играет вода: ею заполнена полость между верхней и нижней областью связывания [262].

Механизм катализа GSR включает восстановление флавиновой молекулы с помощью НАДФН с последующим окислением флавина редокс-активным остатком цистина и образованием тиолята аниона и цистеина. GSSG после этого может быть восстановлен с помощью обратимых реакций обмена тиол-дисульфид [185].

GSH ( $\gamma$ -глутамил-цистеинил-глицин) – одно из основных внутриклеточных низкомолекулярных тиолсодержащих соединений, синтезирующихся почти во всех эукариотических клетках (рис. 2).

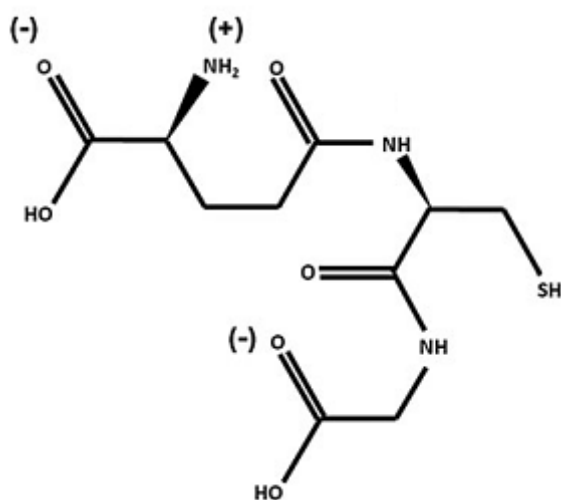


Рис. 2. Восстановленный глутатион.

Благодаря своему строению и высокой внутриклеточной концентрации (1–10 мМ, 10 мМ для клеток печени и различных типов злокачественных клеток) GSH выполняет антиоксидантные функции, участвует в поддержании клеточного редокс-статуса, работе системы детоксикации, синтезе эйкозаноидов, регуляции многих механизмов клеточной сигнализации, в частности при регуляции клеточного цикла, экспрессии генов, апоптоза [375]. GSH присутствует в клетке в основном в восстановленной форме, тогда как количество GSSG не превышает 1% от его общего

внутриклеточного содержания. Примерно 85–90% GSH находится в цитозоле, но некоторая его часть после синтеза в цитоплазме оказывается в митохондриях, ядре, пероксисомах, эндоплазматическом ретикулуме [358]. Поддержание оптимального соотношения GSH/GSSG в клетке является существенным для нормального ее функционирования и выживания. Недостаток GSH подвергает клетку риску окислительного повреждения. Установлено, что дисбаланс в регуляции GSH наблюдается при широком ряде патологий, таких как рак, нейродегенеративные заболевания, муковисцидоз, ВИЧ [375].

Синтез GSH *de novo* проходит в два АТФ-зависимых этапа, составляющих  $\gamma$ -глутамильный цикл из шести ферментативных реакций. На первом этапе происходит образование между глутаминовой кислотой и цистеином пептидной связи, которое катализируется  $\gamma$ -глутамилцистеинлигазой и является лимитирующей стадией в синтезе GSH. Второй этап – реакция, катализируемая глутатионсинтетазой, приводящая к образованию GSH в результате связывания глицина с  $\gamma$ -глутамилцистеином [250]. Фермент, способный гидролизовать специфическую связь в молекуле GSH между остатками глутаминовой кислоты и цистеина, –  $\gamma$ -глутамилтрансфераза, локализован на внешней стороне цитоплазматической мембраны определенных типов клеток и обеспечивает перенос  $\gamma$ -глутамильного остатка на аминокислоту, делая возможным ее транспорт в клетку [250]. Дипептид цистеинилглицин, образующийся в результате функционирования  $\gamma$ -глутамилтрансферазы, расщепляется дипептидазой до цистеина и глицина, которые представляют собой субстраты для  $\gamma$ -глутамилцистеинлигазы и глутатионсинтетазы соответственно. Разрыв связи между  $\gamma$ -глутамильным остатком и свободной аминокислотой обеспечивает  $\gamma$ -глутамилциклотрансфераза, в результате чего образуется свободная аминокислота и 5-оксупролин, превращающийся под действием оксупролиназы в глутаминовую кислоту – субстрат для  $\gamma$ -глутамилцистеинлигазы. Таким образом, внеклеточный GSH может быть

разрушен, входящие в его состав аминокислоты способны попасть внутрь клетки вновь, где опять возможно их включение в состав молекулы GSH. Большая часть содержания этого трипептида плазмы крови обеспечивается его синтезом в печени, поэтому сбой этого процесса в данном органе ведут к системным межорганным нарушениям гомеостаза GSH [283].

Восполнение содержания GSH осуществляется не только за счет синтеза *de novo*, но и активности GSR, которая восстанавливает GSSG в присутствии НАДФН до GSH [250].

Ключевым функциональным элементом в молекуле GSH является остаток цистеина, обеспечивающий наличие реакционноспособной тиольной группы. Важнейшая функция, которую выполняет GSH в клетке – участие в защите клеток от продуктов окислительного стресса. Так,  $H_2O_2$  восстанавливается до  $H_2O$  ферментом GPX с использованием GSH в качестве косубстрата. Восстановление органических гидроперекисей до соответствующих спиртов может осуществляться не только благодаря каталитической активности GPX, но и пероксидазной активности S-независимой GST, также использующей GSH в качестве косубстрата. Кроме этого, GSH служит для восстановления окисленной формы глутаредоксина, образующейся в результате восстановления дисульфидов [147]. Данный трипептид является низкомолекулярным антиоксидантом и может участвовать в неферментативной антиоксидантной защите, выступая эффективным скэвенджером свободных радикалов [178].

Многие белки имеют в своем составе функционально значимые остатки цистеина, которые могут подвергаться посттрансляционной модификации, в том числе и окислению. При физиологических условиях свободная аминокислота цистеин имеет значение рК 8,5, при котором невозможны окислительные модификации. Находясь в составе белков, цистеин может быть активирован, т.е. переходить в состояние тиолат-аниона. Этому способствует множество факторов, в том числе водородные связи, действие соседних основных аминокислотных остатков, микроокружение

цистеиновых остатков, связывание с субстратом [111]. Между остатками цистеина белка и молекулы GSH может образоваться дисульфидная связь (белок-SSG). Такой процесс, получивший название S-глутатионилирования, позволяет защищать белки от окислительного стресса и вносит существенный вклад в осуществление редокс-сигналинга и регуляцию активности белков [135]. В результате реакции S-глутатионилирования может меняться способность белка формировать дисульфидные связи и корректировать фолдинг, что оказывает влияние на функциональное состояние молекулы. Кроме того, S-глутатионилирование выступает как протекторный механизм от дальнейшего окисления сульфеновой кислоты (Cys-SOH), образовавшейся в результате окисления остатков цистеина, в сульфиновую (Cys-SO<sub>2</sub>H) и далее в сульфоновую (Cys-SO<sub>3</sub>H), восстановление которой в физиологических условиях невозможно [360].

Значительная роль в клеточных редокс-зависимых процессах принадлежит GST (КФ 2.5.1.18), образующей суперсемейство изоформ, катализирующих конъюгацию GSH с широким рядом неполярных соединений эндогенного и экзогенного происхождения, содержащих электрофильные атомы углерода, серы, азота и фосфора, что вносит важный вклад в защиту клетки от возможного токсического действия этих соединений [368,414]. К настоящему моменту изоферменты GST обнаружены в большинстве живых организмов, включая аэробные бактерии, дрожжи, растения, насекомых и позвоночных. В суперсемействе GST выделяют три субсемейства изоформ: цитозольные, митохондриальные и микросомальные.

У млекопитающих GST присутствует практически во всех органах и тканях, при этом содержание фермента в печени наибольшее. На долю цитозольных изоформ приходится примерно 90% активности GST в клетке. На основании сходства аминокислотной последовательности цитозольные изоформы GST у млекопитающих группируются в семь классов ( $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\pi$ ,  $\theta$ ,  $\zeta$ ,  $\omega$ ,  $\sigma$ ), которые объединяют 17 изоформ [414].

Микросомальные изоформы GST – это интегральные мембранные белки, которые в настоящее время получили название «мембрансвязанных белков метаболизма эйкозаноидов и глутатиона» [128]. Изоформы микросомального субсемейства разделяются на 4 субгруппы (I–IV), у представителей которых сходство аминокислотных последовательностей составляет менее 20%. У человека обнаружены 6 изоферментов, принадлежащих к I, II и IV субгруппам [128]. Как и представители цитозольных изоформ GST, микросомальные изоформы катализируют конъюгацию GSH с электрофильными соединениями, но, кроме того, принимают участие в процессах изомеризации ненасыщенных соединений и биосинтезе лейкотриенов и простагландинов [202].

Митохондриальной изоформой GST человека является изоформа GSTK1-1, принадлежащая к-классу [297]. Эта изоформа обнаружена и в пероксисомах человека [283]. GSTK1-1 грызунов и человека проявляет активность в отношении целого ряда традиционных для GST субстратов, в частности к 1-хлор-2,4-динитробензолу, а у *Caenorhabditis elegans* она участвует в энергетическом обмене и метаболизме липидов [267].

Цитозольные и митохондриальная изоформы GST являются гомо- или гетеродимерами, при этом субъединицы в составе гетеродимеров принадлежат одному и тому же классу. Если цитозольные изоформы GST являются димерами, то представители микросомального субсемейства могут быть моно-, ди- и тримерами, а также наблюдаются мультимерные комплексы [202,380]. Каждая субъединица состоит из двух доменов, соединенных небольшим неупорядоченным участком. N-концевой домен (G-сайт) – место связывания GSH – обладает топологией, подобной тиоредоксину, и состоит из четырех  $\beta$ -складчатых слоев ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3 и  $\beta$ 4), три из которых расположены антипараллельно, и трех  $\alpha$ -спиралей. Эти элементы вторичной структуры скомбинированы в последовательности  $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ . C-концевой домен (H-сайт) – место связывания косубстрата – это полностью  $\alpha$ -спиральный участок, состоящий либо из 5, либо из 6  $\alpha$ -спиралей ( $\alpha$ 4–8 или

$\alpha 4-9$ ). Дополнительной  $\alpha 9$ -спиралью обладают изоферменты  $\alpha$ ,  $\theta$  и  $\omega$  классов в отличие от изоферментов других классов. У изоформ  $\mu$ -класса есть уникальная  $\mu$ -петля на С-конце. У изоферментов  $\omega$ -класса на N-конце обнаружена дополнительная последовательность из 19 аминокислот, а у изоформ GST  $\theta$ -класса между  $\alpha 4$ - и  $\alpha 5$ -спиралями находится большая петля [281,414]. Различия в структурах представителей разных классов изоформ GST обеспечивает их широкую субстратную специфичность и разнообразие функций.

Всесторонний сравнительный анализ аминокислотной последовательности и структуры цитозольных изоформ GST, в особенности наличие определенных аминокислотных остатков в активном центре, позволил разделить их на две субгруппы: Y-GST – изоформы, у которых для активации GSH используется тирозин ( $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\pi$  и  $\sigma$  классы), и S/C-GST – изоформы, у которых взаимодействие с GSH осуществляется через остаток серина ( $\phi$ ,  $\tau$ ,  $\theta$  и  $\zeta$  классы) или цистеина ( $\beta$  и  $\omega$  классы) [281]. У представителей обеих субгрупп, а также у митохондриальных изоформ GST эти важные для активации GSH аминокислотные остатки располагаются в так называемой «каталитической петле», находящейся после первого  $\beta$ -складчатого слоя в тиоредоксин-подобном домене. Как уже отмечалось выше, структура H-сайта обладает значительной вариабельностью при сравнении структуры представителей различных классов.

При формировании димеров осуществляется взаимодействие между доменом I одной субъединицы и доменом II соседней по принципу «мяч-впадина» или «ключ-замок». В качестве «ключа» выступают определенные ароматические остатки из петли между  $\alpha 3$ -спиралью и  $\beta 2$ -слоем первого мономера и располагаются в гидрофобном «замке», образуемом впадиной между  $\alpha 4$ - и  $\alpha 5$ -спиралями второго мономера.

К основным функциям GST наряду с важной ролью в системе детоксикации относится участие в работе антиоксидантной системы

благодаря способности восстанавливать органические гидроперекиси до спиртов, используя GSH в качестве косубстрата [202].

GSH, окисляющийся до GSSG, может вновь перейти в восстановленную форму под действием GSR – фермента, для функционирования которого необходим НАДФН. Данное соединение, таким образом, является необходимым для рециркуляции GSH [309]. НАДФН вырабатывается в высоко консервативном цитозольном пентозофосфатном пути. Этот путь, как было показано, чрезвычайно важен для поддержания нормального метаболизма в условиях окислительного стресса во многих организмах. Данный процесс является также весомым фактором в поддержании физиологического состояния эритроцитов – клеток, имеющих значительный риск окислительного повреждения. Люди, дефицитные по ферментам пентозофосфатного пути, подвержены развитию гемолитической анемии, поскольку их эритроциты не в состоянии поддерживать достаточное содержание GSH [132]. Кроме того, воздействие окислительного стресса может стимулировать активность пентозофосфатного пути, что было показано на лимфоцитах человека [352]; надпочечниках, печени и поджелудочной железе крыс [276], клетках бактерий [263].

Г6ФДГ является лимитирующим ферментом пентозофосфатного пути [238]. Основными продуктами данного метаболического пути являются рибозо-5-фосфат, необходимый для биосинтеза нуклеиновых кислот, и НАДФН, вырабатываемый Г6ФДГ и 6-фосфоглюконатдегидрогеназой. Известно, что активность Г6ФДГ регулируется отношением НАДФН/НАДФ и повышается при уменьшении данного соотношения, что обеспечивает поддержание пула НАДФН. Помимо этого, было показано, что Г6ФДГ активируется после воздействия на клетки различных внеклеточных окислителей [238], которые приводят к снижению уровня НАДФ(Н).

Данный фермент представляет собой гомодимер с молекулярной массой 104-110кДа. Функциональным центром, влияющим на каталитическую активность Г6ФДГ, является остаток лизина в положении

169. Известно, что НАДФ, являющийся субстратом данного фермента, участвует также в стабилизации Г6ФДГ и поддержании её активного состояния, а продукт реакции, НАДФН – сильный ингибитор фермента, вызывающий диссоциацию молекулы. Помимо НАДФН, ингибиторами Г6ФДГ могут выступать такие соединения, как АТФ и 2,3-дифосфоглицерат [53].

Другим источником НАДФН является НАДФ-ИДГ [181] – распространенный фермент, обнаруженный у широкого ряда организмов: от человека до дрожжей, а также у растений, в цитозоле, пероксисомах или митохондриях [248,301]. Несмотря на то, что этот фермент может быть локализован в митохондриях, он отличается от НАД-ИДГ, которая функционирует в митохондриях как часть цикла Кребса. Тем не менее, подобно НАД-ИДГ, НАДФ-ИДГ катализирует декарбоксилирование изоцитрата до 2-оксоглутарата [201], что может осуществляться в митохондриях, цитозоле или пероксисомах с использованием изоцитрата, экспортированного через митохондриальную мембрану. Данный процесс позволяет производить НАДФН в клеточных компартментах без участия активного транспорта этой молекулы через мембрану [133].

Показано, что наличие мутаций гена ИДГ у людей было связано с такими заболеваниями, как [264] глиобластома. По типу используемого кофактора они могут быть либо НАД-зависимыми, либо НАДФ-зависимыми. Функционально ИДГ представляют собой мономеры или димеры, при этом активный центр мономерного типа фермента полностью сосредоточен на одной белковой цепи, в то время как у димерного типа ИДГ остатки цепей обеих субъединиц формируют активный сайт.

По результатам ряда исследований димерные НАДФ-ИДГ [130] были классифицированы на две группы: подсемейство I (S1-ИДГ) и подсемейство II (S2-ИДГ), в то время как НАД-ИДГ были классифицированы как подсемейство III (S3-ИДГ). Однако, наличие определенного кофактора не является для данного фермента монофилетическим свойством, т.е. НАД-ИДГ



может быть выявлена во всех подсемействах и является предком всех димерных ИДГ. Кроме того, НАДФ-ИДГ не найдена в подсемействе III, в то время как все мономерные формы фермента являются НАДФ зависимыми [233,359]. S1-ИДГ – гомодимеры с двумя активными центрами, активные в растворимой димерной форме, найденные у прокариот. Большинство ферментов данного подсемейства являются НАДФ-зависимыми, [138], но встречаются и НАД-зависимые [356]. ИДГ подсемейства II являются гомодимерами, похожими по структуре и функциям на S1-ИДГ, отличающимися своей первичной последовательностью. Данное подсемейство включает в себя преимущественно эукариотические ИДГ, в том числе человеческую цитозольную ИДГ [357]. Ферменты ряда бактерий также принадлежат к подсемейству II [354].

Эукариотические НАДФ-ИДГ включены в пути, связанные с синтезом липидов [141], защитой от окислительного стресса [325]. Клетки эукариот содержат, по меньшей мере, два вида изоферментов НАДФ-ИДГ: цитозольные и митохондриальные.

### 1.3.2. Неферментативное звено антиоксидантной системы

#### 1.3.2.1. Жирорастворимые антиоксиданты

Среди токоферолов наибольшей биологической активностью обладает  $\alpha$ -токоферол, выступающий в роли донора ионов водорода и [198] ограничивающий интенсивность протекания свободнорадикальных реакций. Данное соединение способно превращается в радикал, реагирующий с другим пероксидным радикалом с образованием безвредного соединения.  $\alpha$ -Токоферол поддерживает стабильность биологических мембран, предохраняя их компоненты от повреждения АФК, тормозит генерацию липопероксидов, обрывает цепь СО путем обезвреживания свободных радикалов в момент их генерации. Локализуются молекулы витамина Е во внутренних мембранах митохондрий, защищая данные структуры и лизосомы от разрушающего

воздействия пероксидов, а также являются ключевым фактором резистентности эритроцитов к действию гемолитических ядов [178,198]. Помимо этого,  $\alpha$ -токоферол играет важную роль в метаболизме селена — необходимого компонента функционирования глутатионпероксидазы. Окисленную форму витамина Е восстанавливает аскорбиновая кислота [106].

Витамин А — биологически активное соединение, участвующее в процессах синтеза серосодержащих биомолекул, связывания и обезвреживания ксенобиотиков и эндогенных соединений. Антиоксидантная активность данного витамина проявляется в его способности тормозить окисление сульфгидрильных групп до дисульфидных, принимать участие в окислительно-восстановительных процессах, восстанавливать функционально-структурные свойства мембран. Витамин А ингибирует канцерогенную активность бензпирена и ряда других соединений благодаря способности тормозить их микросомальное окисление.

$\beta$ -каротин [110], проявляющий наибольшую антиоксидантную активность при низком парциальном давлении кислорода в крови, осуществляет обезвреживание окисленных липопротеидов низкой плотности [174] и синглетного кислорода [110].  $\beta$ -Каротин, как и другие каротиноиды, действует в качестве антиоксиданта совместно с витаминами Е и С, составляя витаминную антиоксидантную группу. Показано, что поступление данных соединений в организм способствует снижению риска развития рака, катаракты, сердечно-сосудистых заболеваний.

Убихинон (коэнзим Q), необходимый для протекания процессов окисления в клетках и локализованный преимущественно в митохондриальных мембранах, выступает в роли ингибитора радикалов фенольного типа и пероксидных радикалов.

Стероидные гормоны благодаря своей липофильности обладают мембранотропными свойствами. Антиоксидантными эффектами из данного класса соединений обладают эстрогены, участвующие также в регуляции микросомального окисления, поддерживая активность монооксигеназной

системы. При возникновении патологических состояний, сопряженных с чрезмерной активацией СО, эстрогены предупреждают нарушения микросомального окисления и предохраняют биологические мембраны от повреждения.

### 1.3.2.2. Водорастворимые антиоксиданты

Аскорбиновая кислота – соединение, поступающее в организм человека с пищевыми продуктами, в т.ч. в окисленной форме — дегидроаскорбата. Витамин С, способный окисляться до дегидроаскорбиновой кислоты, представляет собой окислительно-восстановительную систему, отдающую и присоединяющую электроны и протоны. Данное соединение принимает активное участие в микросомальном окислении ксенобиотиков и эндогенных веществ, является кофактором для ряда монооксигеназ, участвует в гидроксилировании пролина и катаболизме тирозина. Кроме того, аскорбиновая кислота необходима для функционирования цитохрома Р-450, фагоцитарной и антимикробной активности нейтрофилов и макрофагов. Антиоксидантную роль витамин С проявляет при токсическом воздействии ряда соединений, выступает в качестве синергиста  $\beta$ -каротина и  $\alpha$ -токоферола. Помимо снижения антиоксидантного потенциала, дефицит аскорбиновой кислоты сопровождается нарушением биосинтеза коллагена. Витамин С участвует также в энергообеспечении синтеза интерферона и ряда других цитокинов, усиливает способность лейкоцитов к хемотаксису [94,104]. Аскорбиновая кислота наряду с  $\alpha$ -токоферолом ингибирует также ПОЛ, нейтрализует поступающие с загрязненным воздухом окислители, восстанавливает канцерогенные нитроамины. Помимо этого, витамин С блокирует пероксидацию холестерина липопротеидов низкой плотности [317], препятствуя тем самым развитию атеросклероза.

Фенольные соединения (полифенолы, флавоноиды) по своей структуре представляют собой вещества с углеродным скелетом, имеющим метильные, гидроксильные, ацетильные, метоксильные, и другие группы. Благодаря своему строению, такие соединения обладают способностью к ступенчатой отдаче электронов и проявляют антиоксидантную активность посредством двух механизмов: инактивация АФК и хелатирование ионов металлов переменной валентности [4]. При этом, в результате нейтрализации реактивных частиц, молекулы фенольных соединений сами превращаются в малоактивные радикалы. Антиоксидантными свойствами обладают только восстановленные формы веществ данного класса, в то время как хинонные, или окисленные формы являются слабыми антиоксидантами. Способностью к восстановлению хинонных форм обладает аскорбиновая кислота, возвращая им тем самым антиокислительные свойства. Ряд фенольных соединений - медиаторов, таких как адреналин, норадреналин, дофамин, синтезируется в организме человека. Помимо этого, к фенольным молекулам относятся также триптофан, фенилаланин, тиреоидные и стероидные гормоны, витамины Е и К, убихинон. [198].

К внеклеточным антиоксидантным соединениям можно также отнести [198] трансферрин, лактоферрин, ферритин. Железо, находясь в комплексе с этими белками, не вступает в реакции, сопровождающиеся генерацией АФК. Свободный гем, имеющий небольшую способность инициировать свободнорадикальное повреждение, связывается с гемопексином и гаптоглобином. Помимо этого, хелатировать ионы меди может альбумин, что возможно благодаря наличию в структуре его молекулы сульфгидрильной группы. В качестве гидрофильного антиоксиданта рассматривается также мочевины [241] и мочевины, присутствующая во внутренних средах организма.

$\alpha$ -липоевая кислота, или ТК – биологически активное вещество, участвующее в регуляции обмена липидов, углеводов, холестерина, а также выступающее в роли кофактора при окислительном декарбоксилировании

пирувата и 2-оксоглутарата. Данное соединение может быть представлено в 2 энантиомерных формах: R и S, кофактором для пируватдегидрогеназы и 2-оксоглутаратдегидрогеназы является R-форма (рис. 2).

В большинстве тканей ТК с помощью НАДН или НАДФН быстро превращается в восстановленную форму – ДГЛК, которая выполняет множество биологических функций, являясь мощным антиоксидантом, хелатором ионов металлов переменной валентности, восстанавливая окисленные формы других антиоксидантов, таких как витамин С, Е, глутатион, тиоредоксин, убихинон. Помимо этого, ТК способна выступать в роли скавенджера АФК благодаря напряженной конформации 5-членного кольца с внутримолекулярной дисульфидной связью, причем свою антиоксидантную активность данное вещество способно проявлять как в липидной, так и водной фазе (рис. 3, 4) [172,187,244,361].

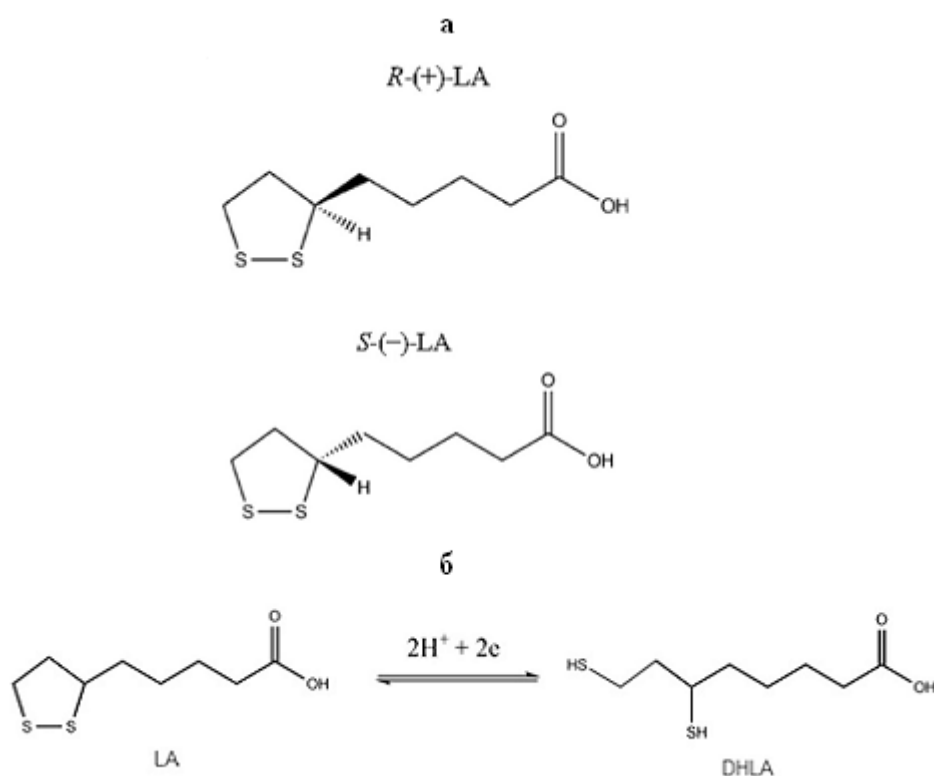


Рис. 3. R- и S-форма тиоктовой кислоты (а), окисленная и восстановленная форма тиоктовой кислоты (б).

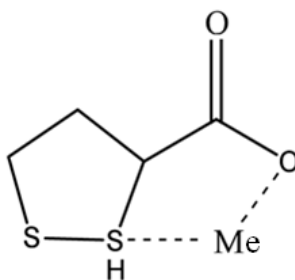


Рис. 4. Хелатирование ионов металлов переменной валентности молекулой тиоктовой кислоты.

Помимо этого, ТК и ДГЛК обладают способностью восстанавливать окисленный альбумин, поддерживая окислительный статус плазмы крови на необходимом уровне [290]. Также было показано, что ТК благоприятно воздействует на липидный профиль крови посредством снижения интенсивности ПОЛ и нормализуя соотношение атерогенных и антиатерогенных липопротеидов при атеросклерозе [157]. При ишемии/реперфузии головного мозга ТК проявляет антирадикальные свойства, оптимизирует основные метаболические процессы, в том числе пути энергообразования [55].  $\alpha$ -липоевая кислота, благодаря наличию в её структуре двух тиоловых групп, может применяться в качестве антидота при отравлениях многими тяжелыми металлами рядом ядовитых веществ. Данное соединение способно нивелировать развитие токсических эффектов, вызванных попаданием в организм мышьяка, ртути, цианистого калия [2].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### ГЛАВА 2 ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 2.1. Объект исследования

В качестве объекта исследования были выбраны самцы белых лабораторных крыс (*Rattus norvegicus*) массой 200-250 г.

Все манипуляции, проводимые во время эксперимента, соответствовали требованиям международных правил гуманного отношения к животным, отраженных в санитарных правилах по отбору и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) (УК РФ ст. 245).

#### 2.2. Методы исследования

##### 2.2.1. Создание модели ревматоидного артрита у крыс

РА вызывали путём подкожного введения в подушечку лапки полного адьюванта Фрейнда – комплекса соединений, вызывающего развитие данной патологии, в объёме 100 мкл [164].

В ходе работы было создано пять экспериментальных групп животных: крысы 1-ой группы (n=24) содержались на стандартном режиме вивария; животным 2-ой группы (n=32) индуцировали РА введением полного адьюванта Фрейнда; 3-я группа (n=8) – животные, которым с 7 дня развития РА внутрибрюшинно вводили ТК (Sigma-Aldrich, США) в 0,9% хлориде натрия, в дозе 16 мг/кг каждые 24 часа в течение последующих 8 дней; в 4-й (n=12) и 5-й (n=10) группах крысам после индуцирования РА вводили внутрибрюшинно ТК в дозе 35 и 70 мг/кг веса животного по вышеуказанной схеме. Дозы и схема введения тестируемого соединения были выбраны на основе проводимых ранее исследований [62]. На 15 день после начала эксперимента наркотизированных животных вскрывали и забирали материал для проведения эксперимента.

### 2.2.2. Подготовка материала для исследования

Для извлечения печени после вскрытия брюшной полости её промывали через портальную вену ледяным изотоническим раствором. После этого органы забирали и гомогенизировали с помощью гомогенизатора Daihan HG-15A в 4х-кратном объеме охлажденной среды выделения следующего состава: 50 ммоль/л трис-HCl-буфер, pH 7.6, 10 ммоль/л ЭДТА, 0.5 ммоль/л  $\beta$ -меркаптоэтанол.

Сердце извлекали у животных после многократного промывания ледяным физиологическим раствором, после чего осушали фильтровальной бумагой, взвешивали и гомогенизировали в 3х-кратном объеме охлажденной среды выделения.

Участок икроножной мышцы извлекали у животных и помещали в ледяной физиологический раствор. После этого ткань осушали фильтрованной бумагой, взвешивали и гомогенизировали в 5-кратном объеме охлажденной среды выделения.

Полученную вытяжку после гомогенизации тканей фильтровали через слой капрона с квадратными ячейками (0,1 мм) и центрифугировали при 5000 g в течение 10 мин с целью осаждения неразрушенных тканевых элементов. Супернатант использовали в дальнейших исследованиях.

Венозную кровь набирали из сердца животных в чистую стеклянную пробирку без антикоагулянта и помещали на 0,5 часа в термостат при температуре 37 °C, после расслаивания фаз собирали супернатант и центрифугировали его при 4000g в течение 10 мин. Полученную сыворотку использовали для дальнейшего исследования.

### 2.2.3. Определение содержания ревматоидного фактора

Содержание РФ определяли в сыворотке крови крыс турбидиметрическим методом с помощью приборов Cobas 6000 ("F.



Hoffmann-LaRocheLtd", Швейцария) и CobasIntegra 400 ("F. Hoffmann-LaRocheLtd", Швейцария) [7].

#### 2.2.4. Определение скорости оседания эритроцитов

СОЭ крови крыс определяли по методу Панченкова [30]. В капилляр Панченкова, калиброванный на 100 делений, набирали 5%-ный раствор цитрата натрия до метки «Р» и вносили его на часовое стекло. После этого в капилляр дважды набирали кровь до метки «К» и выдували ее на часовое стекло. Тщательно перемешивали кровь с цитратом натрия, набирали смесь в капилляр до метки «К» и оставляли его в штативе в вертикальном положении. Через 1 час определяли СОЭ и выражали данный показатель в миллиметрах.

#### 2.2.5. Определение содержания циркулирующих иммунных комплексов

В основе метода лежит процесс селективной преципитации комплексов антиген-антитело в 3,75% полиэтиленгликоле молекулярной массы 6000 (фирма «Serva», Германия) с последующим изменением оптической плотности образца [11].

Реактивы для проведения анализа:

1. Боратный буфер (3,410 г борной кислоты и 4,275 г буры растворяют в дистиллированной воде до объема 1 л).

2. Раствор полиэтиленгликоля (10 г полиэтиленгликоля растворить в боратном буфере до объема 240 мл).

Ход проведения анализа:

К 0,3 мл сыворотки крови добавляют 0,6 мл боратного буфера, перемешивают, переносят по 0,3 мл смеси в 2 пробирки. В опытную пробу добавляют 2,7 мл раствора полиэтиленгликоля, в контрольную – 2,7 мл

боратного буфера. Перемешивают, инкубируют 60 мин. и спектрофотометрируют при 450 нм.

Расчет производят по формуле:

$$\text{ИК} = (D_o - D_k) * 1000, \text{ у.е.} \quad (1)$$

где ИК – содержание иммунных комплексов в у.е.;  $D_o$  – оптическая плотность опытной пробы;  $D_k$  – оптическая плотность контрольной пробы.

### 2.2.6. Определение содержания иммуноглобулинов

Содержание IgA, IgM и IgG определяли иммуноферментным методом с использованием медицинского анализатора «Униплан» и диагностических наборов Cusabio® ELISA kits («Cusabio», Китай) в соответствии с прилагаемыми протоколами. Анализ основан на конкурентном ингибировании ферментативной активности. К стенкам лунок планшетов из данных наборов предварительно прикреплены соответствующие крысиные иммуноглобулины. В ходе анализа в лунки вносятся стандартные и опытные образцы, а также антитела к иммуноглобулину, конъюгированные с пероксидазой хрена. После удаления несвязанных реагентов и внесения субстрата для фермента в пробах появляется окраска, интенсивность которой обратно пропорциональна содержанию иммуноглобулина.

### 2.2.7. Измерение активности ферментов

Активность ферментов в тканях крыс выражали в Е на грамм сырой массы, Е на мл сыворотки и в виде удельной активности. За единицу ферментативной активности (Е) принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкМ продукта реакции за 1 мин при температуре 25°C. Активность ферментов исследовали на спектрофотометре Hitachi U-1900 с программным обеспечением.

### 2.2.7.1. Определение активности ферментов, сопряженных с окислительно-восстановительными превращениями НАД и НАДФ.

О скорости ферментативных реакций, сопряженных с окислительно-восстановительными превращениями НАД или НАДФ, судили по изменению оптической плотности при 340 нм [64]. Расчет активностей GPX, GSR, Г6ФДГ и НАДФ-ИДГ производили по следующей формуле:

$$E = \frac{D \times 1,0 \times V}{\Delta V \times t \times 6,22}, E \quad (2)$$

где  $D$  – прирост оптической плотности при 340 нм за определенное время;  $1,0$  – объем раствора в кювете, мл;  $V$  – общий объем ферментного раствора, мл;  $\Delta V$  – объем внесенной для измерения пробы, мл;  $t$  – время измерения, мин;  $6,22$  – коэффициент экстинкции для дегидрогеназ, соответствующий величине поглощения, которую дает 1 мкмоль кофермента, находящийся в 1 мл исследуемой смеси при измерении на спектрофотометре, когда толщина слоя измеряемого раствора составляет 1 см.

#### 2.2.7.1.1. Определение активности глутатионпероксидазы

Скорость GPX-реакции оценивали исходя из уменьшения оптической плотности опытных образцов при 340 нм, происходящего в результате окисления НАДФН за счет протекания сопряженных ферментативных реакций: образования GSSG под действием GPX и его последующего восстановления, взаимосвязанного с окислением НАДФН в GSR-реакции. Исследование активности GPX осуществляли в среде спектрофотометрирования следующего состава: 50 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7,4) содержащий 1 мМ ЭДТА, 0,12 мМ НАДФН, 0,85 мМ GSH, 0,37 мМ  $H_2O_2$ , 1 ед/мл GSR. Контрольная проба не содержала GSH [64].

#### 2.2.7.1.2. Определение активности глутатионредуктазы

Скорость GSR-реакции оценивали по снижению оптической плотности опытных образцов при 340 нм вследствие окисления НАДФН, происходящего за счет протекания реакции восстановления GSSG под действием GSR. Исследование активности GSR осуществляли в 50 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 1мМ ЭДТА, 0,16 мМ НАДФ(Н) и 0,8 мМ GSH [23].

#### 2.2.7.1.3. Определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы

Скорость Г6ФДГ-реакции оценивали по увеличению оптической плотности опытных образцов при 340 нм, обусловленному восстановлением НАДФ в ходе протекания реакции превращения глюкозо-6-фосфата в 6-фосфоглюконолактон. Среда спектрофотометрирования включала в себя 50мМ трис – HCl – буфер (рН 7,8), содержащий 3,2 мМ глюкозо-6-фосфат, 0,25 мМ НАДФ, 1,0 мМ  $MnCl_2$ . Реакцию запускали добавлением опытного образца в кювету [27].

#### 2.2.7.1.4. Определение активности НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы

Скорость окислительного декарбоксилирования изоцитрата анализировали по увеличению оптической плотности вследствие восстановления НАДФ. Активность НАДФ-ИДГ измеряли в среде спектрофотометрирования, включающей: 50 мМ трис-HCl буфера (рН 7,8), содержащий 1,5 мМ изоцитрата, 2 мМ  $MnCl_2$ , 0,4 мМ НАДФ [17].

### 2.2.7.2. Определение активности глутатионтрансферазы

Скорость GST-реакции оценивали по увеличению при 340 нм оптической плотности опытных образцов. Анализ активности фермента осуществляли с помощью субстрата – 1-хлор, 2,4-динитробензола.

Среда для измерения активности GST представляла собой: 0,1 М калий-фосфатный-буфер (рН 7,4), содержащий 1 мМ ЭДТА, 1мМ 1-Cl-2,4-динитробензол, 5 мМ GSH [185].

Расчет активности фермента производили по формуле:

$$E = \frac{D \times 1,0 \times V}{\Delta V \times t \times 9,6}, E \quad (3)$$

где D – прирост оптической плотности при 340 нм за определенное время; 1,0 – объем раствора в кювете, мл; V – общий объем ферментного раствора, мл;  $\Delta V$  – объем внесенной для измерения пробы, мл; t – время измерения, мин; 9,6– коэффициент экстинкции для глутатион-1хлор-2,4-динитробензол, соответствующий величине поглощения, которую дает 1 мкмоль кофермента, находящийся в 1 мл исследуемой смеси при измерении на спектрофотометре, когда толщина слоя измеряемого раствора составляет 1 см.

### 2.2.7.3. Определение активности аконитатгидратазы

Активность АГ определяли спектрофотометрически при 233 нм. Скорость превращения цитрата в ходе реакции оценивали по увеличению оптической плотности, сопряженному с образованием двойной связи в молекуле цис-аконитата. Среда для анализа активности АГ включала в себя: 50 мМ трис-HCl-буфер, рН 7,8, содержащий 0,15 мМ цитрат. Реакцию инициировали внесением исследуемого образца в спектрофотометрическую среду [9]. Активность рассчитывали по формуле:

$$E = \frac{\Delta D \times V \times V1}{\epsilon \times t \times V2}, E \quad (4)$$

где  $\Delta D$  – изменение оптической плотности пробы в единицу времени измерения  $t$ ;  $V$  - общий объём ферментного раствора, мл;  $V_1$  - объём реакционной среды, используемой для измерения активности фермента, мл;  $V_2$  - объём ферментного раствора, внесённый для измерения, мл;  $\varepsilon$  - коэффициент молярной экстинкции для хромофорной группы субстрата, отражающий изменение оптической плотности при окислении или восстановлении  $1 \mu\text{M}$  субстрата в  $1 \text{ мл}$  среды (для цис-аконитата –  $3,08$ );  $t$  - время измерения активности фермента, мин.

#### 2.2.7.4. Определение активности супероксиддисмутазы

Анализ активности СОД осуществляли спектрофотометрически при длине волны  $540 \text{ нм}$ . Активность фермента оценивали по ингибированию скорости восстановления тетразолия нитросинего в неэнзимотической системе феназинметасульфата и НАДН [36].

Исследование активности СОД производили в среде следующего состава:  $0,1 \text{ M}$  калий-фосфатный-буфер ( $\text{pH } 7,8$ ); содержащий  $0,33 \text{ mM}$  ЭДТА;  $0,41 \text{ mM}$  нитросинего тетразолия;  $0,01 \text{ mM}$  ФМС;  $0,8 \text{ mM}$  НАДН. Субстрат вносили из расчёта  $0,03 \text{ мл}$  на  $1 \text{ мл}$  среды инкубации. Реакцию инициировали добавлением НАДН, детектировали прирост оптической плотности в течение  $5 \text{ минут}$ .

За единицу активности СОД принимали количество фермента, необходимого для  $50\%$  ингибирования восстановления нитросинего тетразолия. Расчёт осуществляли по формуле:

$$\frac{100 - \frac{E_0 \times 100}{E_k}}{50 \times [\text{мг белка}]}, E \quad (5)$$

где  $E_0$  и  $E_k$  - среднее значение прироста экстинкции за  $5 \text{ минут}$  в опытной и контрольной пробах соответственно.

### 2.2.7.5. Определение активности каталазы

Активность каталазы определяли спектрофотометрически при длине волны 410 нм. В основе данного метода лежит способность  $\text{H}_2\text{O}_2$  и молибдата аммония образовывать стойкий окрашенный комплекс, имеющий максимум поглощения при 410 нм [14].

Реактивы для проведения анализа: 0,08% раствор  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 4,5% раствор аммония молибденовокислого; 0,1 М трис-НСl-буфер, рН 7,4; буферно-субстратная смесь (10 мл трис-НСl-буфера рН 7,4+30 мл 0,08%  $\text{H}_2\text{O}_2$ )

Таблица 1

Ход определения активности каталазы

	Контроль	Опыт	Примечание
Буферно-субстратная смесь	2 мл	2 мл	10 минут при 37 <sup>0</sup> С
Гомогенат	–	0,1 мл	3 минуты при 37 <sup>0</sup> С
Молибдат аммония	2 мл	2 мл	–
Гомогенат	0,1 мл	–	–

Расчет результата

$$A = \frac{(E_k - E_0) \times 1,0 \times 10^4 \times 4,1 \times 10^6}{22,2 \times 10^6 \times 3}, E \quad (6)$$

4,1 – конечный объем пробы;

$1,0 \times 10^4$  фактор разведения;

$10^6$  – коэффициент пересчета на мкм;

$22,2 \times 10^6$  – коэффициент молярной экстинции  $\text{H}_2\text{O}_2$ ;

3 минуты – время инкубации.

## 2.2.8. Определение содержания компонентов неферментативной антиоксидантной системы.

### 2.2.8.1. Определение концентрации восстановленного глутатиона

Принцип метода основан на способности сульфгидрильной группы GSH вступать в реакцию с 5,5- дитио-бис-(2-нитробензойной) кислотой (реактив Элмана), при этом в эквимольных количествах образуется тионитрофенильный анион, имеющий желтую окраску и максимум поглощения при 412 нм [6].

Ход определения:

1. В химическую пробирку наливали 0,5 мл пробы, 3,5 мл 0,1 М фосфатного буфера рН 7,4 и хорошо перемешивали;
2. 2,0 мл разведенной в 8 раз пробы переносили в центрифужную пробирку и добавляли к ней 1,0 мл 20% трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Тщательно перемешивали и оставляли в холодильнике на 15 – 20 минут.
3. Смесь вынимали из холодильника и центрифугировали 15 минут при 3000 об/мин при 0 ...+4 °С;
4. В химические пробирки наливали по 0,5 мл фосфатного буфера и в каждую вносили по 1,0 мл супернатанта;
5. В опытную пробирку №1 приливали 0,05 мл реактива Элмана, а в контрольную пробирку №2 – 0,05 мл метанола. Содержимое пробирок хорошо перемешивали;
6. Анализировали оптическую плотность опытной и контрольной проб против фосфатного буфера при  $\lambda$  412 нм в 10 мм-вой кювете.

Концентрация GSH рассчитывается по формуле:

$$C = \frac{E_{оп} - E_{к}}{13,1 \times 10^3} \times 72,6 \times 10^3, \text{ ммоль/л} \quad (7)$$

где С – содержание GSH, ммоль/л;  $E_{оп}$  – оптическая плотность опытной пробы;  $E_{к}$  – оптическая плотность контрольной пробы;  $13,1 \times 10^3$  –



коэффициент молярной экстинкции реактива Эллмана при 412 нм; 72,6 – фактор разведения.

#### 2.2.8.2. Определение содержания цитрата

Концентрацию цитрата оценивали по методу Нательсона. В основе метода лежит образование пентабромацетона из цитрата с участием бромного реактива и перманганата калия, его последующая экстракция петролейным эфиром и анализ поглощения окрашенного комплекса с тиомочевинной при длине волны 430 нм [3]. Расчёт осуществляли с помощью калибровочной кривой.

К 0,5 мл исследуемой жидкости добавляли 0,5 мл 17%-ного раствора ТХУ. Центрифугировали 10 минут при 4000g. В пробирку с притёртой пробкой к 0,5 мл супернатанта приливали 0,25 мл 50%-ного раствора  $H_2SO_4$ , 0,1 мл 1М бромистого калия и 0,05 мл насыщенного раствора перманганата калия. Встряхивали и охлаждали в холодильнике в течение 20 минут. Избыток перманганата калия устраняли внесением по каплям 3%-ного раствора  $H_2O_2$ . Для экстракции образовавшегося пентабромацетата приливали петролейный эфир в несколько стадий: сначала 0,5 мл, затем ещё 0,5 мл и в конце 0,3 мл. После внесения каждой порции петролейного эфира пробирку встряхивали на шейкере в течение 5 минут. Для проведения цветной реакции 1 мл эфирного экстракта переносили в пробирку с притёртой пробкой, куда предварительно было добавлено 2,5 мл 2%-ного раствора тиомочевины в боратном буфере. Пробирку встряхивали в течение 5 минут, после расслоения фаз нижний слой, окрашенный в светло-жёлтый цвет, осторожно отсасывали с помощью пипетки Пастера с оттянутым концом. Интенсивность окраски анализировали на спектрофотометре Hitachi U-1900 при 430 нм. Фотометрирование проводили против контроля, представляющего собой 0,5 мл 10%-ного раствора ТХУ, обработанного тем же способом.

## 2.2.9. Оценка оксидативного статуса

### 2.2.9.1 Определение интенсивности биохемилюминесценции

Интенсивность процессов СО оценивали с помощью метода железоиндуцированной хемилюминесценции пероксидом водорода, в основе которого лежит каталитическое разложение  $H_2O_2$  ионами металла с переходной валентностью –  $Fe^{2+}$ , по реакции Фентона:  $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^- + OH^\bullet + Fe^{3+}$ . Образующиеся при этом АФК ( $R^\bullet$ ,  $OH^\bullet$ ,  $RO^\bullet$ ,  $RO_2^\bullet$ ,  $O_2^{\bullet-}$ ) инициируют СО в исследуемом биологическом образце. Рекомбинация образовавшихся радикалов  $RO_2^\bullet$  приводит к генерации неустойчивого тетроксидов, разложение которого происходит с выделением кванта света. Интенсивность свободнорадикальных процессов анализировали при помощи биохемилюминометра БХЛ-07М с программным обеспечением. Кинетическую кривую биохемилюминесценции регистрировали на протяжении 30 секунд (периода наибольшей информации об его динамике) и оценивали следующие параметры: светосумму хемилюминесценции (S), интенсивность вспышки ( $I_{max}$ ), отражающие интенсивность свободнорадикальных процессов и величину тангенса угла наклона кривой ( $tg\alpha_2$ ), характеризующую общую антиоксидантную активность [15]. Активность исследуемого процесса зависит от воздействия полного комплекса соединений, обладающих как прооксидантным, так и антиоксидантным эффектом, что дает возможность оценить уровень компенсаторных механизмов свободнорадикального окисления в тканях. Помимо этого, данный метод является высокочувствительным по отношению к патологическим процессам в организме.

Для определения интенсивности биохемилюминесценции использовали среду следующего состава: 0,4 мл 0,1М калий-фосфатного буфера (рН 7,5), 0,4 мл 0,01мМ  $FeSO_4$ , 0,2 мл 2%-ного раствора  $H_2O_2$  (вносимого непосредственно перед измерением). Исследуемый образец вносили в количестве 0,1 мл перед добавлением 2%-ного раствора  $H_2O_2$ .

### 2.2.9.2 Определение содержания диеновых конъюгатов

Концентрацию диеновых конъюгатов (ДК) определяли спектрофотометрическим методом. Принцип данного метода состоит в том, что в процессе ПОЛ на стадии образования свободных радикалов в молекулах полиненасыщенных жирных кислот образуется система сопряженных двойных связей, ассоциированная с появлением максимума в спектре поглощения при 233 нм [59].

К 0,125 мл исследуемого образца приливали 0,125 мл физиологического раствора, затем гептан с изопропиловым спиртом по 1,5 мл. Полученную суспензию помещали в пробирки с плотно закрывающимися пробками и центрифугировали при 3000g в течение 10 мин. Супернатант переносили в градуированные пробирки и приливали 1/10 объема дистиллированной воды. После встряхивания и расслаивания фаз отбирали в новую пробирку гептановую фазу, к которой приливали по 0,5 мл этиловый спирт в объемном отношении 1:5 – 1:10. В качестве контроля использовали 96% этанол.

Содержание ДК в гомогенатах тканей рассчитывали по формуле:

$$[\text{ДК}] = \frac{V_{\text{общ}} \times D \times 10^6}{L \times E \times m \times V_{\text{внес}}}, \text{ мкмоль/г} \quad (8)$$

где [ДК] – концентрация диеновых конъюгатов;  $V_{\text{общ}}$  – объём полученного образца, мл;  $D$  – величина оптической плотности, ед.;  $L$  – длина оптического пути, см;  $E$  – коэффициент молярной экстинкции, равный  $2,2 \cdot 10^5 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ;  $V_{\text{внес}}$  – объём вносимой пробы, мл.

В сыворотке содержание ДК определяли по формуле:

$$C = \frac{D \times 10^6}{L \times V_{\text{внес}} \times 2,2 \times 10^5}, \text{ мкмоль/мл} \quad (9)$$

где  $C$  – концентрация ДК, мкмоль/мл;  $D$  – величина оптической плотности, ед.;  $L$  – длина оптического пути, см;  $2,2 \cdot 10^5$  – коэффициент молярной экстинкции,  $\text{М}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ;  $V_{\text{внес}}$  – объём вносимой пробы, мл.

### 2.2.9.3. Определение степени фрагментации ДНК

#### 2.2.9.3.1. Выделение тотальной ДНК

Выделение ДНК проводили с использованием набора реагентов «К-Сорб» (Синтол, Россия).

Для экстракции ДНК в 1,5 мл пробирки типа Eppendorf вносили 200 мкл исследуемого материала, 10 мкл протеиназы К и 200 мкл лизирующего раствора. Перемешивали содержимое на вортексе и инкубировали при температуре 65°C в течение 15 минут, периодически перемешивая содержимое пробирок. Краткосрочно центрифугировали для осаждения капель смеси с крышки и стенок пробирки.

Затем добавляли 200 мкл осаждающего раствора и перемешивали. Капли с крышек сбрасывали краткосрочным центрифугированием. Весь объем смеси переносили на колонку и центрифугировали 1 мин при 8 тыс. об/мин.

Промывали колонку последовательно добавляя 400 мкл промывочного раствора 1, 400 и 200 мкл промывочного раствора 2. После нанесения каждого раствора смесь центрифугировали как описано выше.

Очищенный препарат ДНК получали путем нанесения на колонку элюирующего раствора, прогретого до 70°C, и центрифугирования в течение 1 мин при 8 тыс. об/мин.

#### 2.2.9.3.2. Электрофорез ДНК

Фрагментацию ДНК детектировали с помощью проведения электрофореза образца ДНК в агарозном геле с использованием трис-ацетат-ЭДТА буфера (ТАЕ) [21]. 50-кратный ТАЕ буфер готовили следующим способом: для приготовления 100 мл раствора смешивали 24,22 г трис, 1,862 г ЭДТА, 73 мл стерильной дистиллированной воды. После этого pH раствора доводили до 7,6 уксусной кислотой (~8,96 мл или 9,4 г). В состав буфера для

нанесения входила 40% сахара в 1-кратном TAE буфере, содержащем 0,25% бромфенолового синего. В качестве маркеров молекулярной массы использовали набор «MassRuler» производства «Fermentas», включающий маркеры от 1500 до 10000 нуклеотидных пар.

Электрофорез проводили следующим образом. Вносили 450 мг агарозы в 30 мл однократного TAE буфера для приготовления 1,5%-ный раствора, нагревали до полного расплавления агарозы. Затем раствор охлаждали примерно до 60°C, вносили 1,5 мкл 2% раствора бромистого этидия и осторожно перемешивали, не допуская появления в геле пузырьков воздуха. Теплую агарозу выливали в кювету для геля, вертикально вставляли гребенки так, чтобы зубцы не доставали до дна примерно 1,5 мм. Оставляли раствор на 30 мин., затем осторожно удаляли гребенки. Заполняли камеру для электрофореза однократным TAE, помещали в нее кювету с гелем.

Подготавливали образцы исследуемой и маркерной ДНК путем их смешивания с буфером для нанесения. Осторожно вносили в лунки исследуемую и маркерную ДНК в объеме 8-10 мкл. Электрофорез проводили при 86 В в течение 1-2 часов. Просматривали гель в УФ-свете на трансиллюминаторе и фотографировали.

#### 2.2.9.4. Определение активности каспаз

Определение активности каспаз-3 и -8 проводили с помощью набора реактивов Caspase 3 Assay Kit, Colorimetric и Caspase 8 Assay Kit, Colorimetric («BioVision», США) в соответствии с прилагаемыми протоколами. Колориметрический анализ активности каспаз основан на гидролизе пептидного субстрата ацетил-Asp-Glu-Val-Asp-п-нитроанилида (в случае каспазы 3) и ацетил-Ile-Glu-Thr-Asp-п-нитроанилида (в случае каспазы 8) с образованием п-нитроанилина, имеющего максимум поглощения при 405 нм (молярный коэффициент поглощения = 10.5). Активность каспаз выражали в пикомолях продукта, образующегося в 1 мин, в расчете на 1 мг белка.

### 2.2.10. Унифицированный метод определения содержания общего белка по биуретовой реакции

Данный метод основан на способности белков вступать в реакцию в щелочной среде с  $\text{CuSO}_4$  с образованием окрашенного в фиолетовый цвет соединения.

Используемые реактивы:

1. 154 мМ хлорид натрия (изотонический раствор). Приготовление: 9,317 г  $\text{NaCl}$  доводится до 1 л дистиллированной водой.

2. Биуретовый реактив. Приготовление: в мерную колбу на 1 л наливается 100-150 мл дистиллированной воды, добавляется 8 г  $\text{NaOH}$ , 45 г сегнетовой соли (калий-натрий виннокислый четырёхводный), 15 г сульфата меди ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) и 5 г йодида калия ( $\text{KI}$ ). Каждый компонент смеси добавляется после полного растворения предыдущего строго в указанной последовательности. Оставляется стоять на ночь, затем доводится водой до метки и профильтровывается. Хранится в тёмной посуде в холодильнике.

3. 0,2 М раствор гидроксида натрия: 8 г  $\text{NaOH}$  доводят водой до 1 л.

4. 30 мМ раствор йодида калия: 0,5 г  $\text{KI}$  довести 0,2 моль/л  $\text{NaOH}$  до 100 мл.

5. Рабочий раствор биуретового реактива: к 20 мл биуретового реактива добавляют 80 мл 30 мМ раствора  $\text{KI}$ .

6. Основной калибровочный раствор альбумина из человеческой сыворотки, 100 г/л: 1 г альбумина растворяют в 10 мл изотонического раствора хлорида натрия.

Ход определения. В пробирку вносили 5 мл биуретового реактива, добавляли 0,1 мл исследуемого образца, перемешивали. Через 30 мин измеряли оптическую плотность против контроля при длине волны 540-560 нм (зелёный светофильтр). В качестве контроля использовали пробу, которая вместо исследуемого образца содержала физиологический раствор.

Расчёт концентрации белка осуществляли по калибровочному графику, для построения которого из калибровочного раствора альбумина готовили рабочие растворы с различной концентрацией белка (табл. 2). Из каждого разведения раствора альбумина отбирали по 0,1 мл и добавляли в пробирки с биуретовым реактивом. Через 30 мин все пробы фотометрировали против контроля при 540-560 нм. По полученным данным строили график зависимости оптической плотности образца от концентрации белка. Калибровочный график линеен до величины экстинкции 0,5. При более высокой величине экстинкции сыворотку разводят изотоническим раствором NaCl в соотношении 1:1 [37].

Таблица 2

## Приготовление рабочих калибровочных растворов белка

№ раствора	Основной калибровочный раствор альбумина, мл	Изотонический раствор NaCl, мл	Концентрация белка, г/л
1	0,4	0,6	40
2	0,6	0,4	60
3	0,8	0,2	80
4	1,0	-	100

## 2.2.11. Определение уровня транскриптов генов антиоксидантных ферментов

## 2.2.11.1. Выделение тотальной РНК

Выделение суммарной клеточной РНК производили с использованием набора «РНК-Экстран» (Синтол, Россия) согласно рекомендациям фирмы-производителя. Качество выделенной РНК оценивали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле, содержащем бромистый этидий в концентрации 0,5 мкг/мл, и последующей визуализации на трансиллюминаторе при длине волны 365 нм. Оценку содержания РНК

осуществляли на спектрофотометре Hitachi – U1900 при длине волны 260 нм.

#### 2.2.11.2. Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция

Для синтеза первой цепи комплементарной ДНК использовали рекомбинантную обратную транскриптазу вируса мышинного лейкоза Молони – M-MuLV. В качестве затравочного праймера использовали олиго-(dT)<sub>15</sub> праймер, что позволяет избирательно перевести в форму ДНК только молекулы информационной РНК, представляющих собой транскрипты работающих генов. С целью предотвращения деградации молекул РНК в реакционную смесь вносили ингибиторы РНКаз. Синтез кДНК проводили при температуре 42°C в течение 40 минут. Инактивацию M-MuLV ревертазы осуществляли путем прогревания пробирок при 92°C в течении 5 минут. Полученные в ходе обратной транскрипции продукты использовали для проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ).

Для амплификации определенных участков генов был разработан комплект генспецифических праймеров, с использованием программного обеспечения «Genamics Expression». Специфичность отжига праймеров анализировали с применением программы «Blast» ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/)). Праймеры по предоставленным последовательностям были синтезированы фирмой ЗАО «Синтол» (Россия).



Таблица 3.

Праймеры генов, использованных для проведения ПЦР

Обозначение транскрипта	Прямой праймер	Обратный праймер
SOD1	GGTCCAGCGGATGAA GAG	GGACACATTGGCCAC ACC
CAT	GCTAATGAAGACAAC GTCACCTCA	TGTTCTCACACAGGC GTTTC
GPX1	CGACATCGAACCCGA TATAGA	ATGCCTTAGGGGTTG CTAGG
GSR	TTCCTCATGAGAACCA GATCC	TGAAAGAACCCATC ACTGGTTA
GAPDH	CCCTCAAGATTGTCAG CAATG	AGTTGTCATGGATGA CCTTGG

Для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR GreenI использовали набор реактивов фирмы «Синтол» (Россия). В качестве матрицы использовали кДНК, полученную на предыдущем этапе. Исследование проводили на приборе АНК – 32. Схема проведения анализа была следующая: первоначальный прогрев смеси в течении 3 минут при 95°C, затем 40 циклов, состоящих из этапов денатурации (95°C – 15 секунд), отжига праймеров (60°C – 15 секунд) и элонгации (72°C – 30 секунд). После окончания ПЦР-РВ анализировали значения пороговых циклов. Для исключения ложноположительных результатов одновременно с исследуемыми образцами проводили амплификацию отрицательно-контрольных образцов: а) на контаминацию компонентов наборов посторонней ДНК; б) на соблюдение условий чистоты при подготовке образцов для амплификации. Реакционная смесь отрицательного контроля имела тот же состав, что и опытные образцы, только вместо исследуемого образца ДНК вносили соответствующий объем воды. Определение относительного уровня экспрессии исследуемых генов осуществляли с применением  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  метода [247].

### 2.3. Статистическая обработка экспериментальных данных

Опыты проводили в 8-32-кратных биологических повторностях. Аналитические повторы были проведены дважды для каждой пробы. Для проверки гипотезы о соответствии распределения полученных вариантов нормальному распределению использовали критерий Колмогорова - Смирнова в модификации Лиллиефорса. Результаты исследования обрабатывали с использованием показателей описательной статистики: выборочного среднего ( $\bar{X}$ ), выборочного стандартного отклонения ( $s$ ), стандартной ошибки среднего ( $s_{\bar{X}}$ ) по следующим формулам:

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{n}; s = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n-1}}; s_{\bar{X}} = \frac{s}{\sqrt{n}}, \quad (10)$$

где  $X$  – значение параметра,

$n$  – объем выборки,

$s$  – выборочное стандартное отклонение.

Полученные результаты опытных образцов сравнивали с контролем. В таблицах и на рисунках представлены данные как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Результаты эксперимента анализировали с использованием t-критерия Стьюдента с расчетом среднего значения, стандартного отклонения. Достоверно различающимися считали значения, для которых  $p \leq 0,5$  [20,29].

### ГЛАВА 3. ДИНАМИКА РАЗВИТИЯ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА И ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА ПРИ ИНДУКЦИИ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА

#### 3.1. Исследование динамики изменения маркерных показателей развития ревматоидного артрита

Задачей первой стадии исследования являлся подбор длительности эксперимента, обеспечивающей наиболее активное протекание патологического процесса на момент извлечения материала у лабораторных животных для проведения исследований. Исходя из данных, представленных в литературе, при создании модели адьювантного артрита патологический процесс достигает пика своего развития ориентировочно на 15-17 сутки после введения полного адьюванта Фрейнда в подушечку лапки крыс. Таким образом, животные выводились из эксперимента на 13, 15 и 17 день после индукции РА [163], а также на 6 день, соответствующий развитию максимальной припухлости конечности животного.

Исходя из полученных в ходе работы данных, содержание РФ в сыворотке крови крыс на 6, 13, 15 и 17 день эксперимента возрастало соответственно на 18, 46, 48 и 15 % (рис. 5). СОЭ животных в указанные сроки проведения эксперимента увеличивалась в 1,7, 1,8, 3,0 и 1,6 раза (рис. 6). Вместе с тем, разница между толщиной нормальной и опухшей лапок крыс на 6 день исследования составила  $1,4 \pm 0,1$  мм, в то время как на 13, 15 и 17 дни данный показатель снижался до  $0,7 \pm 0,1$  мм, что может быть связано с активацией компенсаторных механизмов в ответ на развитие патологии. Таким образом, динамика изменений лабораторных показателей развития РА свидетельствует о том, что наибольшая интенсивность протекания патологического процесса достигается на 15 день после инъекции полного адьюванта Фрейнда, что согласуется с имеющимися литературными данными.

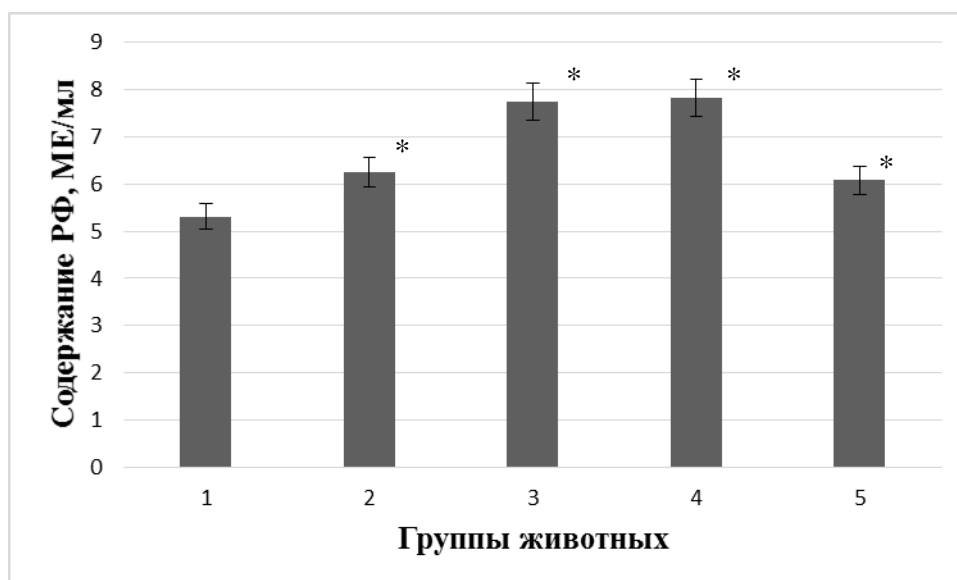


Рис. 5. Содержание ревматоидного фактора в сыворотке крови крыс в норме (1) и при развитии ревматоидного артрита на 6 (2), 13 (3), 15 (4) и 17 (5) день эксперимента

Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ ).

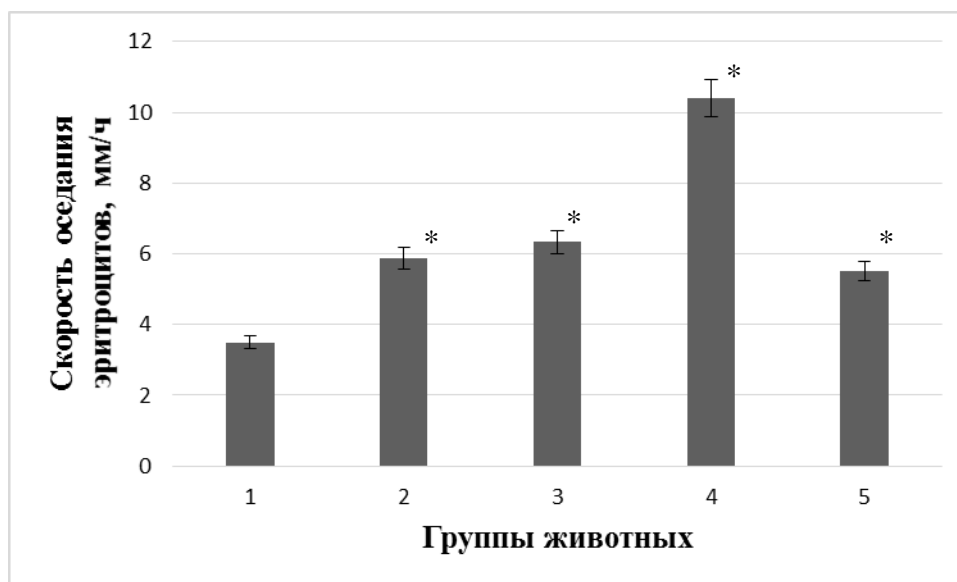


Рис. 6. Скорость оседания эритроцитов в крови крыс в норме (1) и при развитии ревматоидного артрита на 6 (2), 13 (3), 15 (4) и 17 (5) день эксперимента

Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ ).

### 3.2. Динамика изменения интенсивности свободнорадикального окисления биосубстратов в тканях крыс при развитии ревматоидного артрита

Интенсивность СО в тканях крыс исследовали на основании параметров биохемилюминесценции, содержания ДК – первичных продуктов ПОЛ, и активности АГ – фермента, представляющего собой критическую мишень действия АФК благодаря наличию в структуре чувствительного железо-серного кластера.

Исходя из полученных данных, показатели биохемилюминесценции у лабораторных животных наиболее явно возрастали на 15 день эксперимента. Так, значения  $I_{\max}$ , S и  $\text{tg}\alpha_2$  увеличивались в сыворотке крови крыс в 1,5, 1,3 и 1,7 раза; в сердце животных – в 1,3, 1,5 и 1,2 раза относительно контрольной группы. В печени крыс показатели  $I_{\max}$  и S возрастали в 1,2 раза, а  $\text{tg}\alpha_2$  – в 1,3 раза; в мышцах крыс в 1,4 раза увеличивались значения  $I_{\max}$  и  $\text{tg}\alpha_2$ , в то время как S возрастала в 1,3 раза (табл. 4, 5, 6).

Таблица 4

Интенсивность максимальной вспышки биохемилюминесценции, мВ, в тканях крыс в норме и при развитии ревматоидного артрита на 6, 13, 15 и 17 день эксперимента

Исследуемая ткань	Контрольная группа	6 день	13 день	15 день	17 день
Сыворотка крови	68,5±2,4	86,8±3,6*	89,0±3,1*	102,5±3,8*	80,9±3,4*
Сердце	51,5±1,9	57,5±1,7*	60,8±2,1*	65,4±1,5*	59,3±2,2*
Печень	42,0±1,4	47,4±1,6*	48,5±1,2*	52,1±1,3*	47,1±1,2*
Мышцы	91,4±3,4	108,3±3,6*	122,9±3,5*	131,1±4,3*	108,2±3,5*

Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ ).

Таблица 5

Светосумма биохемилюминесценции, мВ\*с, в тканях крыс в норме и при развитии ревматоидного артрита на 6, 13, 15 и 17 день эксперимента

Исследуемая ткань	Контрольная группа	6 день	13 день	15 день	17 день
Сыворотка крови	903±22,7	973,2±31,8*	1134,2±41,9 *	1197,0±23,6 *	1005,1±34,8 *
Сердце	485±14,6	626,2±16,4*	684,1±17,2*	715,0±13,2*	673,8±15,2*
Печень	92,3±2,0	105,3±2,5*	107,1±3,8*	109,3±2,5*	104,7±7,4*
Мышцы	528,1±23,4	616,4±16,5*	660,5±18,8*	675,2±25,9*	592,2±13,7*

Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ ).

Таблица 6

Тангенс угла наклона кинетической кривой биохемилюминесценции в тканях крыс в норме и при развитии ревматоидного артрита на 6, 13, 15 и 17 день эксперимента

Исследуемая ткань	Контрольная группа	6 день	13 день	15 день	17 день
Сыворотка крови	14,0±0,4	16,6±0,4*	19,2±0,5*	24,1±0,8*	18,0±0,4*
Сердце	7,1±0,1	7,8±0,2*	8,0±0,3*	8,5±0,1*	8,2±0,2*
Печень	8,1±0,1	9,0±0,3*	9,5±0,3*	10,1±0,2*	9,4±0,3*
Мышцы	34,5±0,4	37,7±1,2*	38,7±1,3*	48,8±1,5*	39,2±1,3*

Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ ).

Помимо этого, развитие РА у крыс сопровождалось накоплением в тканях ДК. Так, содержание данных продуктов возрастало на 6, 13, 15 и 17 день эксперимента в сыворотке крови крыс в 1,3, 2,1, 2,4 и 2,2 раза; в печени животных концентрация ДК увеличивалась в 2,6, 3,0, 3,2 и 2,9 раза; в мышцах крыс возрастание первичных продуктов ПОЛ происходило на 19, 25, 30 и 23 % соответственно. На 15 сутки исследования содержание ДК в сердце животных было выше контрольных значений в 1,8 раза, на 13 и 17 сутки – в 1,6 раза, а на 6 день эксперимента – в 1,4 раза (рис. 7).

У животных с индуцированным РА наблюдалось угнетение активности АГ, проявляемое наиболее интенсивно на 15 день после введения полного адьюванта Фрейнда. Так, активность фермента, выраженная в Е/мл сыворотки крови, снижалась в 1,5 раза, а активность АГ, представленная в виде Е/г сырой массы, уменьшалась в сердце, печени и мышцах крыс

соответственно в 1,8, 1,4 и 1,2 раза (рис. 8). Изменения удельной активности фермента носили схожий характер, данный показатель понижался в сыворотке крови и сердце крыс в 1,4 и 1,6 раза, в печени и мышцах животных – в 1,2 раза (рис. 1 приложения).

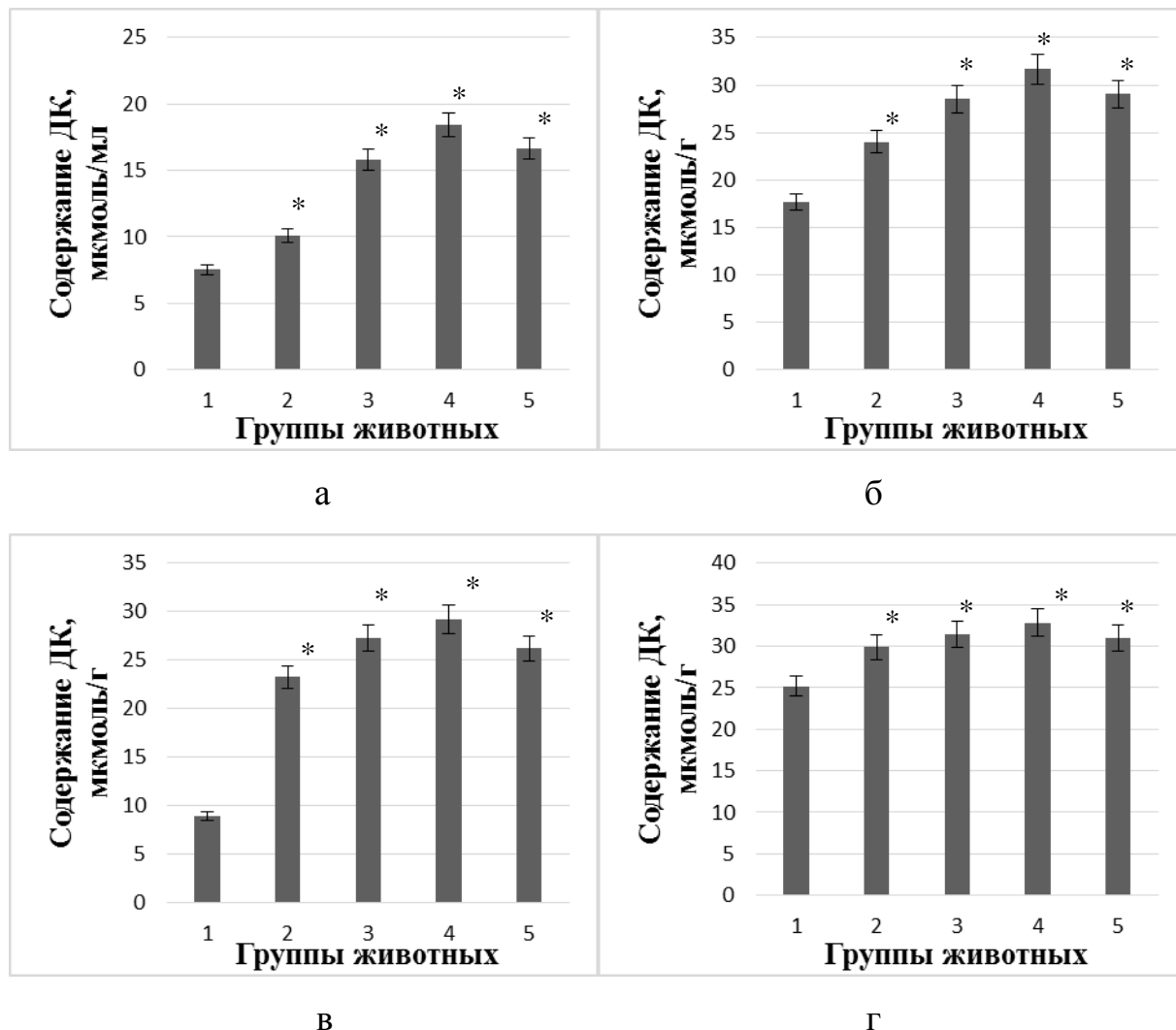


Рис. 7. Содержание диеновых конъюгатов в сыворотке крови (а), сердце (б), печени (в) и мышцах животных (г) в норме (1), и при развитии ревматоидного артрита на 6 (2), 13 (3), 15 (4) и 17 (5) день эксперимента  
Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ )



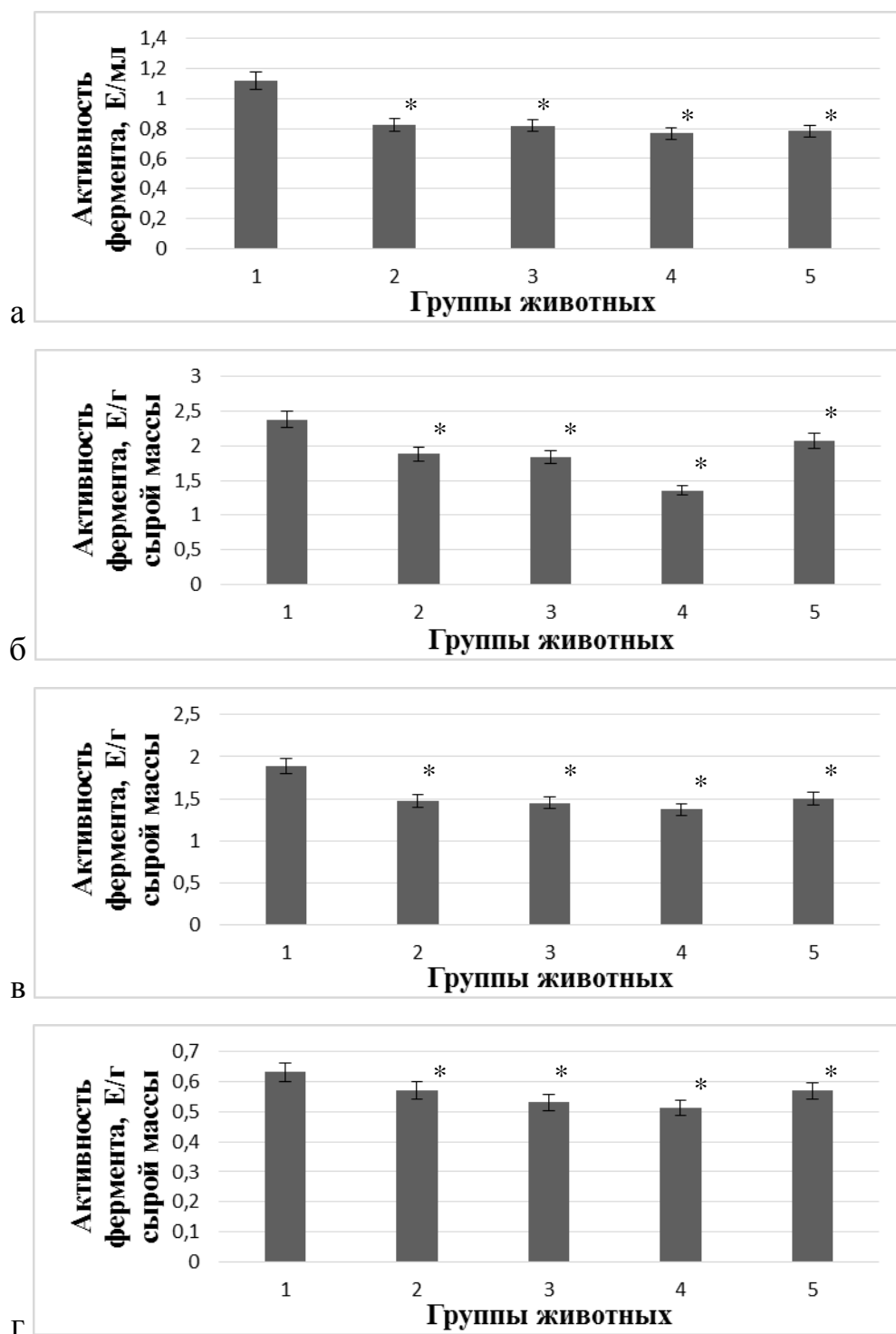


Рис. 8. Активность аконитатгидратазы, выраженная в Е/мл сыворотки крови (а), и представленная в виде Е/г сырой массы в сердце (б), печени (в) и мышцах животных (г) в норме (1), и при развитии ревматоидного артрита на 6 (2), 13 (3), 15 (4) и 17 (5) день эксперимента

Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ )

Таким образом, параметры, характеризующие интенсивность СО, возрастали в тканях лабораторных животных при развитии РА и достигали максимума на 15 день эксперимента, что соответствовало периоду развития наибольшей активности патологического процесса.

На 15 сутки после индукции РА происходило максимальное увеличение содержания цитрата на фоне снижения активности АГ у крыс. Так, содержание данного метаболита возрастало в сыворотке крови, сердце, печени и мышцах животных соответственно на 38, 156, 18 и 42 % (рис. 9).

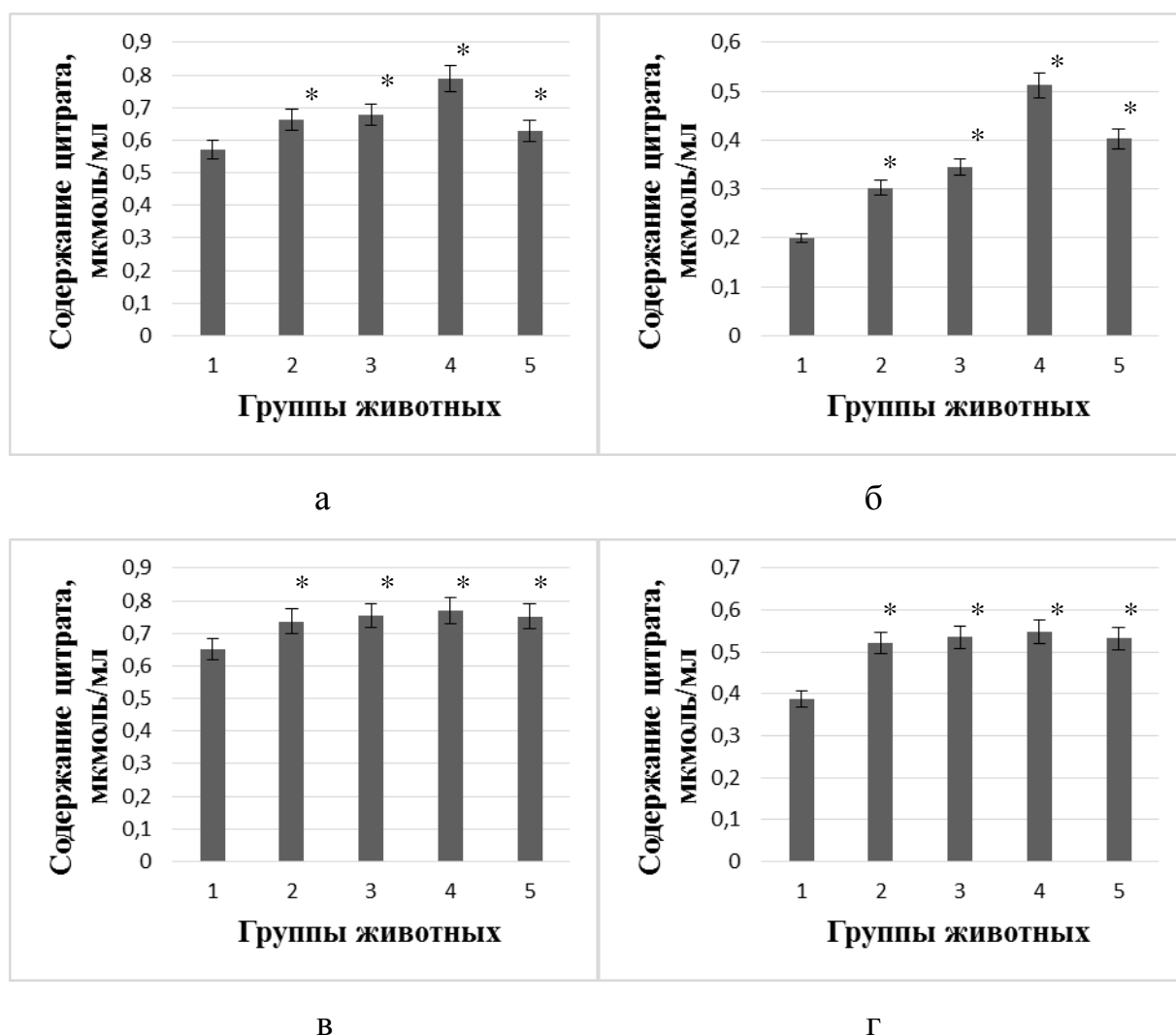


Рис. 9. Содержание цитрата в сыворотке крови (а), сердце (б), печени (в) и мышцах животных (г) в норме (1), и при развитии ревматоидного артрита на 6 (2), 13 (3), 15 (4) и 17 (5) день эксперимента

Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ )

### 3.3. Изменение активности каталазы в тканях крыс в динамике развития ревматоидного артрита

В ходе работы было проведено исследование динамики изменения активности каталазы – одного из ключевых антиоксидантных ферментов, участвующих вместе с СОД в элиминации первичных АФК. Исходя из полученных данных, активность каталазы, выраженная в Е/мл и Е/г сырой массы, наиболее интенсивно увеличивалась на 15 день эксперимента в сыворотке крови, сердце, печени и мышцах крыс – в 1,7, 1,4, 1,2 и 1,3 раза соответственно (рис. 10). Подобная тенденция наблюдалась также и для удельной активности фермента, возраставшей в указанных тканях в 2,6, 1,7, 1,6 и 1,5 раза (рис. 2 приложения).

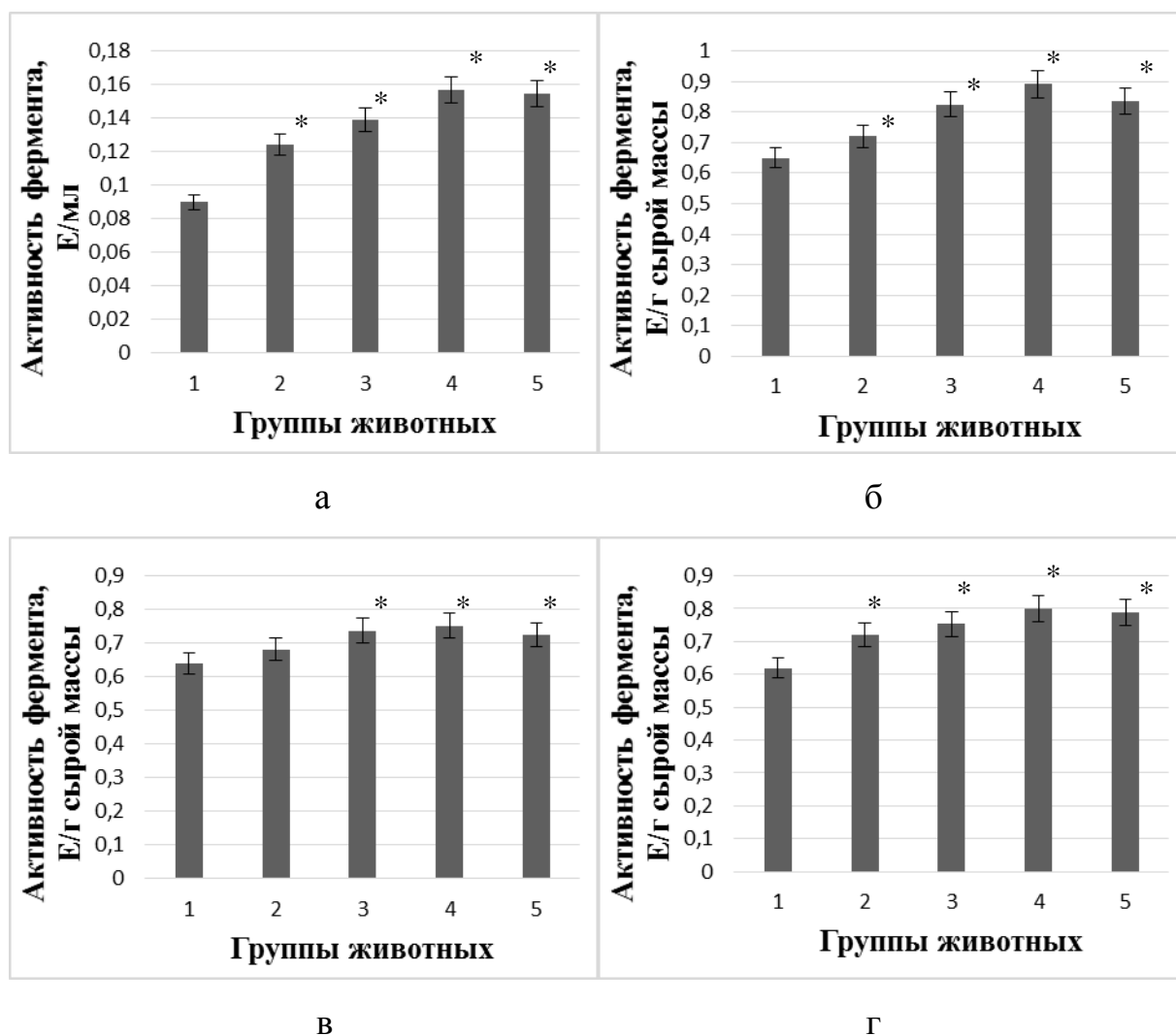


Рис. 10. Активность каталазы, выраженная в Е/мл сыворотки крови (а), и представленная в виде Е/г сырой массы в сердце (б), печени (в) и мышцах животных (г) в норме (1), и при развитии ревматоидного артрита на 6 (2), 13 (3), 15 (4) и 17 (5) день эксперимента

Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ )

### 3.4. Изменение концентрации восстановленного глутатиона в тканях крыс в динамике развития ревматоидного артрита

В ходе исследования был проведен анализ динамики изменения концентрации в тканях животных GSH – одного из важнейших соединений, относящегося к неферментативному звену АОС и участвующего в работе

глутатионовой системы. Было показано, что у животных с РА наблюдалось снижение содержания данного тиола во всех исследуемых тканях, связанное, по-видимому, с его расходом в процессе детоксикации АФК. Так, концентрация GSH уменьшалась на 6, 13, 15 и 17 день эксперимента в сыворотке крови крыс на 10, 11, 19 и 12 %; в сердце крыс снижение происходило в 1,6, 1,9, 2,2 и 2,0 раза; в печени животных – на 13, 14, 21 и 14 %. В мышцах крыс содержание исследуемого соединения на 6 и 13 сутки падало на 22 %, а на 15 и 17 сутки – на 24 и 23 % соответственно (рис. 11).

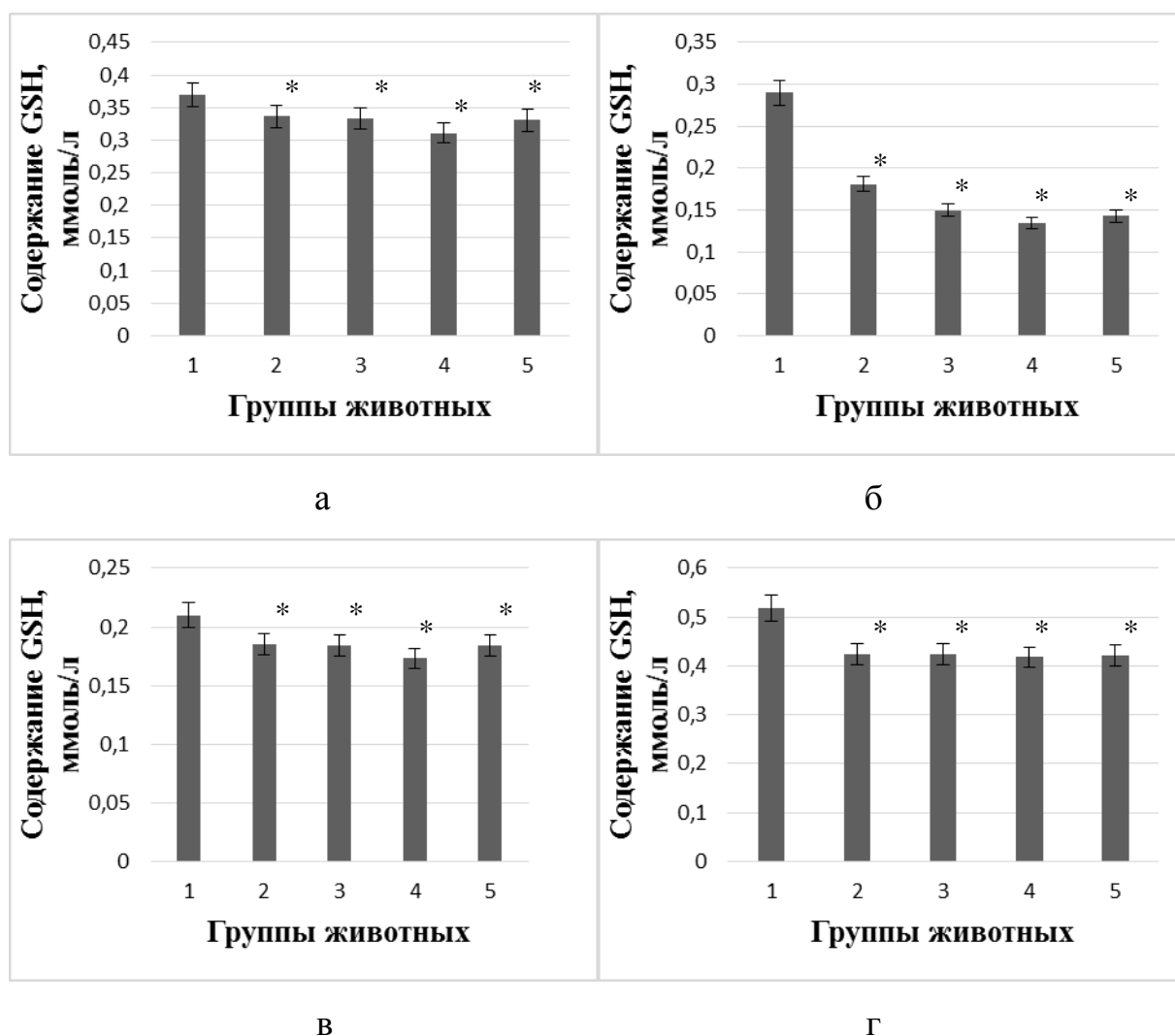


Рис. 11. Содержание восстановленного глутатиона в сыворотке крови (а), сердце (б), печени (в) и мышцах животных (г) в норме (1), и при развитии ревматоидного артрита на 6 (2), 13 (3), 15 (4) и 17 (5) день эксперимента

Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ )

Таким образом, наиболее явные изменения активности каталазы и содержания GSH происходили на 15 день после индукции РА, что соответствовало максимальной интенсивности протекания СО. Исходя из полученных результатов, оценка свободнорадикального гомеостаза при развитии РА и воздействии ТК в тканях крыс проводилась на 15 день после индукции патологии.

## ГЛАВА 4. ВОЗДЕЙСТВИЕ ТИКТОВОЙ КИСЛОТЫ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ И АПОПТОТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ РАЗВИТИИ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА

### 4.1. Воздействие тиктовой кислоты на маркерные показатели развития ревматоидного артрита.

Результаты исследования показали, что развитие РА у крыс помимо увеличения показателей РФ и СОЭ (см. рис. 5 и рис. 6) сопровождалось возрастанием содержания в сыворотке крови ЦИК, IgG, IgM и IgA в 1,2, 1,5, 1,7 и 1,4 раза соответственно (рис. 12, 13). Известно, что аутоантитела изотипов IgG, IgM и IgA, к которым относятся в том числе РФ и АЦЦП, являются иммунологическими факторами, играющими одну из ключевых ролей в развитии РА. Значительный вклад в патогенез заболевания вносят иммунные комплексы благодаря их способности активировать систему комплемента и стимулировать фагоциты, что приводит к выработке цитокинов, металлопротеиназ и АФК [208].

Введение ТК крысам с РА сопровождалось изменением маркерных показателей развития патологического процесса в сторону контрольных значений. Так, при использовании протектора в дозах 16, 35 и 70 мг/кг веса животного происходило снижение содержания РФ в сыворотке крови крыс на 27, 34 и 42 % соответственно (рис. 14). В то же время, СОЭ уменьшалась в 2,7 раза при введении ТК в дозе 16 и 35 мг/кг, и в 3,3 раза при использовании максимальной дозировки протектора (рис. 15). Концентрация ЦИК в сыворотке крови животных снижалась при введении тестируемого соединения в дозах 35 и 70 мг/кг на 25 %, а применение минимальной дозировки сопровождалось уменьшением данного показателя на 20 % (см. рис. 12). Введение ТК приводило также к снижению содержания иммуноглобулинов в сыворотке крови животных. Так, введение протектора в дозах 35 и 70 мг/кг сопровождалось понижением содержания IgG в 1,2 и 1,3

раза, IgM – в 1,3 и 1,4 раза, IgA – в 1,2 и 1,3 раза соответственно (см. рис. 13). Помимо этого, под воздействием исследуемого соединения происходило уменьшение толщины воспаленной лапки у крыс с РА, однако данные изменения были незначительны.

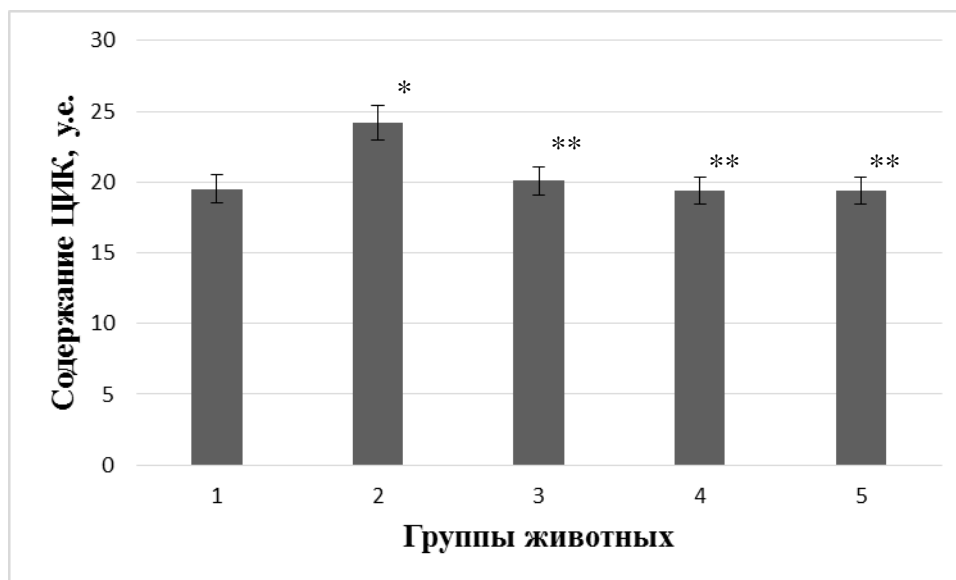


Рис. 12. Содержание циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови крыс в норме (1), при развитии ревматоидного артрита (2) и введении тиоктовой кислоты на фоне патологии в дозе 16 (3), 35 (4) и 70 (5) мг/кг веса животного

Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны, \*\* - отличия от значений второй группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ )



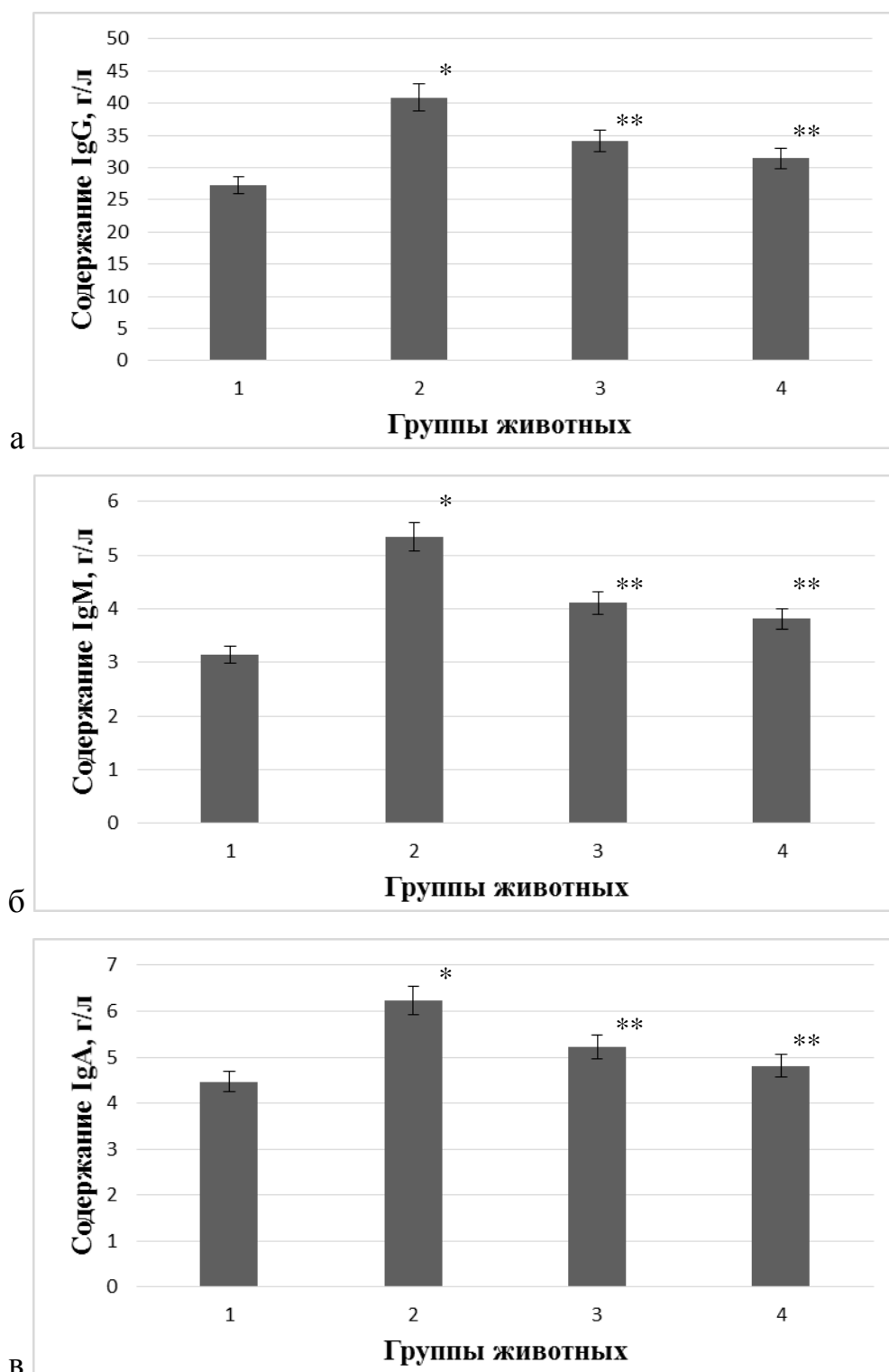


Рис. 13. Содержание в сыворотке крови крыс иммуноглобулинов класса G (а), М (б) и А (в) в норме (1), при развитии ревматоидного артрита (2) и введении тиоктовой кислоты на фоне патологии в дозе 35 (3) и 70 (4) мг/кг веса животного

Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны, \*\* - отличия от значений второй группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ )

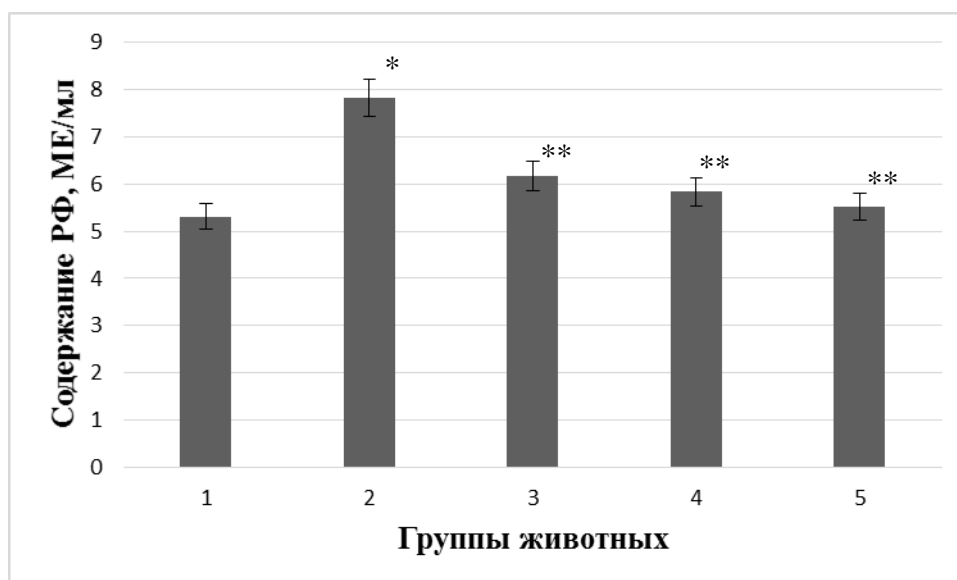


Рис. 14. Содержание ревматоидного фактора в сыворотке крови крыс в норме (1), при развитии ревматоидного артрита (2) и введении тиоктовой кислоты на фоне патологии в дозе 16 (3), 35 (4) и 70 (5) мг/кг веса животного  
Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны, \*\* - отличия от значений второй группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ )

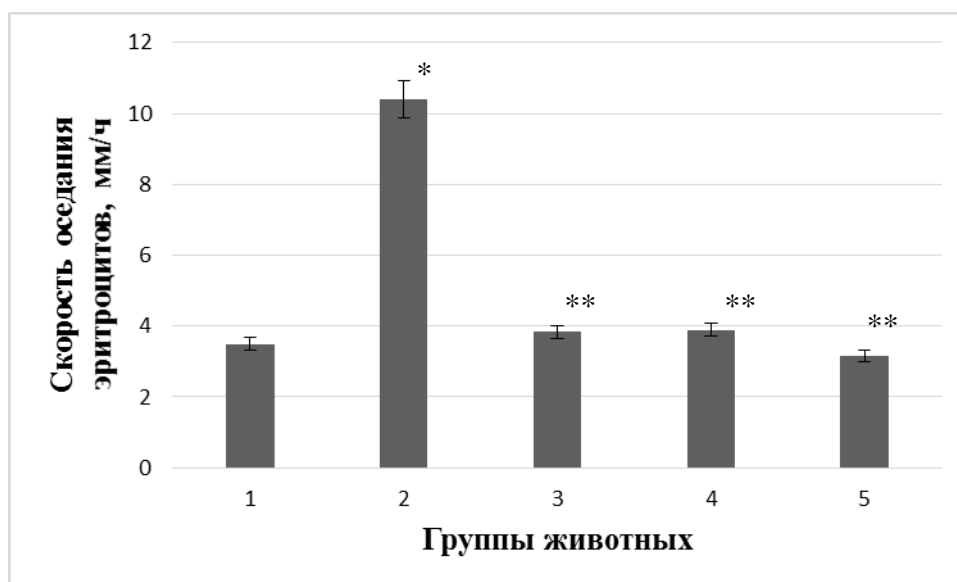


Рис. 15. Скорость оседания эритроцитов крови крыс в норме (1), при развитии ревматоидного артрита (2) и введении тиоктовой кислоты на фоне патологии в дозе 16 (3), 35 (4) и 70 (5) мг/кг веса животного  
Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны, \*\* - отличия от значений второй группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ )

По-видимому, данные изменения происходили благодаря наличию у молекулы ТК способности обезвреживать свободные радикалы. Известно, что ряд АФК, в том числе  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^{\cdot}$ , вовлечены в развитие острого и хронического воспаления, являющегося одним из ключевых факторов прогрессирования РА [180]. Кроме того, изменения маркерных параметров и показателей иммунного статуса в сторону контрольных значений можно объяснить наличием у ТК способности понижать тяжесть аутоиммунных заболеваний. Было показано, что применение ТК при аутоиммунном энцефаломиелите приводило к снижению инфильтрации центральной нервной системы и спинного мозга Т-клетками и макрофагами, демиелинизации и повреждения аксонов, содержания цитокинов, и ингибированию протеолитической активности матричных металлопротеиназ [246,402]. Существует также предположение о способности ТК уменьшать интенсивность воспаления на уровне транскрипции, основанное на молекулярных механизмах, обеспечивающих взаимосвязь ОС и воспаления. Так, известно, что ОС ассоциирован с активацией транскрипционного фактора  $Nf-kB$ , который транслоцируется в ядро и индуцирует экспрессию ряда белков, связанных с воспалением, васкулярной адгезией и миграцией моноцитов.  $Nf-kB$  находится в цитоплазме в неактивном состоянии, благодаря способности связываться с ингибитором своей активности – белком  $IkB$ . ТК ингибирует  $Nf-kB$ , по-видимому, благодаря своей способности тормозить деградацию  $IkB$  через модуляцию митоген-активируемой протеинкиназы, либо регенерируя витамин E, вследствие чего ингибируется протеинкиназа C, способная к фосфорилированию  $IkB$ , приводящего к его деградации [187].

#### 4.2. Влияние тиоктовой кислоты на интенсивность свободнорадикальных процессов в тканях крыс при ревматоидном артрите

К настоящему времени проведен ряд научных исследований, свидетельствующих об интенсификации генерации АФК в процессе патогенеза РА. Показано участие процессов СО в развитии данного заболевания. [74,119,213,226]. Известно, что АФК способны непосредственно оказывать деструктивное действие на биологические молекулы, а также выступать в роли триггера аутоимунной реакции. Помимо этого, показана обратная взаимосвязь между потреблением антиоксидантов с пищей и заболеваемостью РА [96,305], а также состоянием компонентов антиоксидантной системы и интенсивностью воспаления [223].

Оценку интенсивности СО в тканях крыс осуществляли на основе параметров биохемилюминесценции, содержания ДК и активности АГ.

Согласно полученным данным, показатели биохемилюминесценции, возраставшие при развитии РА (см. табл. 4, 5, 6), наиболее выражено изменялись в сторону контроля при введении ТК в дозе 70 мг/кг веса животного. Так, в сыворотке крови, сердце и мышцах крыс значения  $I_{\max}$ , снижались в 1,3 раза, в печени – в 1,2 раза относительно животных второй группы (табл. 7). Показатель  $S$  при этом уменьшался в сыворотке крови и сердце крыс в 1,3 и 1,5 раза, в печени и мышцах – в 1,2 раза (табл. 8). Снижение показателей биохемилюминесценции свидетельствует о способности ТК воздействовать на интенсивность процессов СО. В условиях воздействия ТК на фоне РА было также выявлено снижение общей антиоксидантной активности в тканях животных. Так, показатель  $tg\alpha_2$  при введении протектора в дозе 70 мг/кг уменьшался в сыворотке крови и сердце крыс в 1,5 и 1,2 раза, в то время как в печени и мышцах животных снижение данного параметра происходило в 1,3 раза (табл. 9). К такому изменению степени мобилизации антиоксидантных систем в организме может приводить

торможение реакций с участием АФК под действием тестируемого соединения.

Таблица 7

Интенсивность максимальной вспышки биохемилюминесценции, мВ, в тканях крыс в норме, при развитии ревматоидного артрита и воздействии тиоктовой кислоты на фоне патологии в дозе 16, 35 и 70 мг/кг веса животного

Группы животных	1	2	3	4	5
Сыворотка крови	68,5±2,4	102,5±3,8*	97,7±2,3**	86,9±2,1**	78,5±2,1**
Сердце	51,5±1,9	65,4±1,5*	65,1±1,8**	54,3±1,7**	51,1±1,8**
Печень	42,0±1,4	52,1±1,3*	51,7±1,4**	45,9±1,5**	44,1±1,7**
Мышцы	91,4±3,4	131,1±4,3*	111,8±2,2**	100,5±2,8**	99,2±3,0**

Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ );

\*\* - отличия от значений второй группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ ).

Таблица 8

Светосумма биохемилюминесценции, мВ\*с, в тканях крыс в норме, при развитии ревматоидного артрита и воздействии тиоктовой кислоты на фоне патологии в дозе 16, 35 и 70 мг/кг веса животного

Группы животных	1	2	3	4	5
Сыворотка крови	903±22,7	1197,0±23,6*	1119,0±25,3**	997,5±24,0*	923,8±21,6*
Сердце	485±14,6	715,0±13,2*	613,7±14,9*	495,5±13,4*	484,0±13,2*
Печень	92,3±2,0	109,3±2,5*	102,7±3,8**	95,5±3,3**	88,2±2,9**
Мышцы	528,1±23,4	675,2±25,9*	672,3±25,0*	607,9±24,8*	582,6±23,9*

Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ );

\*\* - отличия от значений второй группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ ).

Таблица 9

Тангенс угла наклона кинетической кривой биохемилюминесценции в тканях крыс в норме, при развитии ревматоидного артрита и воздействии тиоктовой кислоты на фоне патологии в дозе 16, 35 и 70 мг/кг веса животного

Группы животных	1	2	3	4	5
Сыворотка крови	14,0±0,4	24,1±0,8*	22,4±0,7**	17,5±0,4**	16,5±0,4**
Сердце	7,1±0,1	8,5±0,1*	8,4±0,2**	7,1±0,2**	7,1±0,1**
Печень	8,1±0,1	10,1±0,2*	9,7±0,3**	8,5±0,3**	8,0±0,2**
Мышцы	34,5±0,4	48,8±1,5*	41,0±1,6**	37,0±0,9**	37,6±1,3**

Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ );

\*\* - отличия от значений второй группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ ).

Помимо показателей биохемилюминесценции, при развитии РА происходило возрастание содержания ДК в тканях животных второй экспериментальной группы (см. рис. 7). Данные соединения, представляющие собой первичные продукты ПОЛ, являются токсическими метаболитами, оказывающими негативное действие на биологические структуры. Накопление таких соединений в условиях РА осуществляется, вероятно, под действием АФК, генерируемых в процессе развития патологии [335]. При этом, введение ТК, помимо уменьшения параметров биохемилюминесценции, способствовало снижению концентрации первичных продуктов ПОЛ у лабораторных животных. Так, использование

протектора в дозах 16, 35 и 70 мг/кг веса животного приводило к падению содержания ДК в сыворотке крови крыс в 1,5, 1,7 и 2,2 раза; в сердце животных – в 1,2, 1,4 и 1,5 раза; в печени крыс данный показатель снижался в 1,4, 1,6 и 2,1 раза. В мышцах экспериментальных животных введение ТК в дозах 35 и 70 мг/кг приводило к уменьшению концентрации ДК в 1,2 и 1,3 раза, в то время как использование дозы 16 мг/кг не привело к значимым изменениям (рис. 16). Наблюдаемое снижение содержания ДК в тканях крыс под воздействием протектора по сравнению с животными второй экспериментальной группы может свидетельствовать о реализации защитных и антиоксидантных свойств данного соединения в условиях развития РА.

Таким образом, полученные данные позволяют говорить о проявлении ТК антиоксидантных свойств в условиях развития РА. Известно, что в большинстве тканей данное соединение с помощью НАДН или НАДФН быстро превращается в восстановленную форму –ДГЛК, которая выполняет множество биологических функций, являясь мощным антиоксидантом, хелатором ионов металлов переменной валентности, восстанавливая окисленные формы других антиоксидантов, таких как витамин С, Е, глутатион, тиоредоксин, убихинон. Помимо этого, ТК способна выступать в роли скавенджера АФК благодаря напряженной конформации 5-членного кольца с внутримолекулярной дисульфидной связью, причем свою антиоксидантную активность данное вещество способно проявлять как в липидной, так и водной фазе (см. рис. 3, 4) [172,187,244,361].



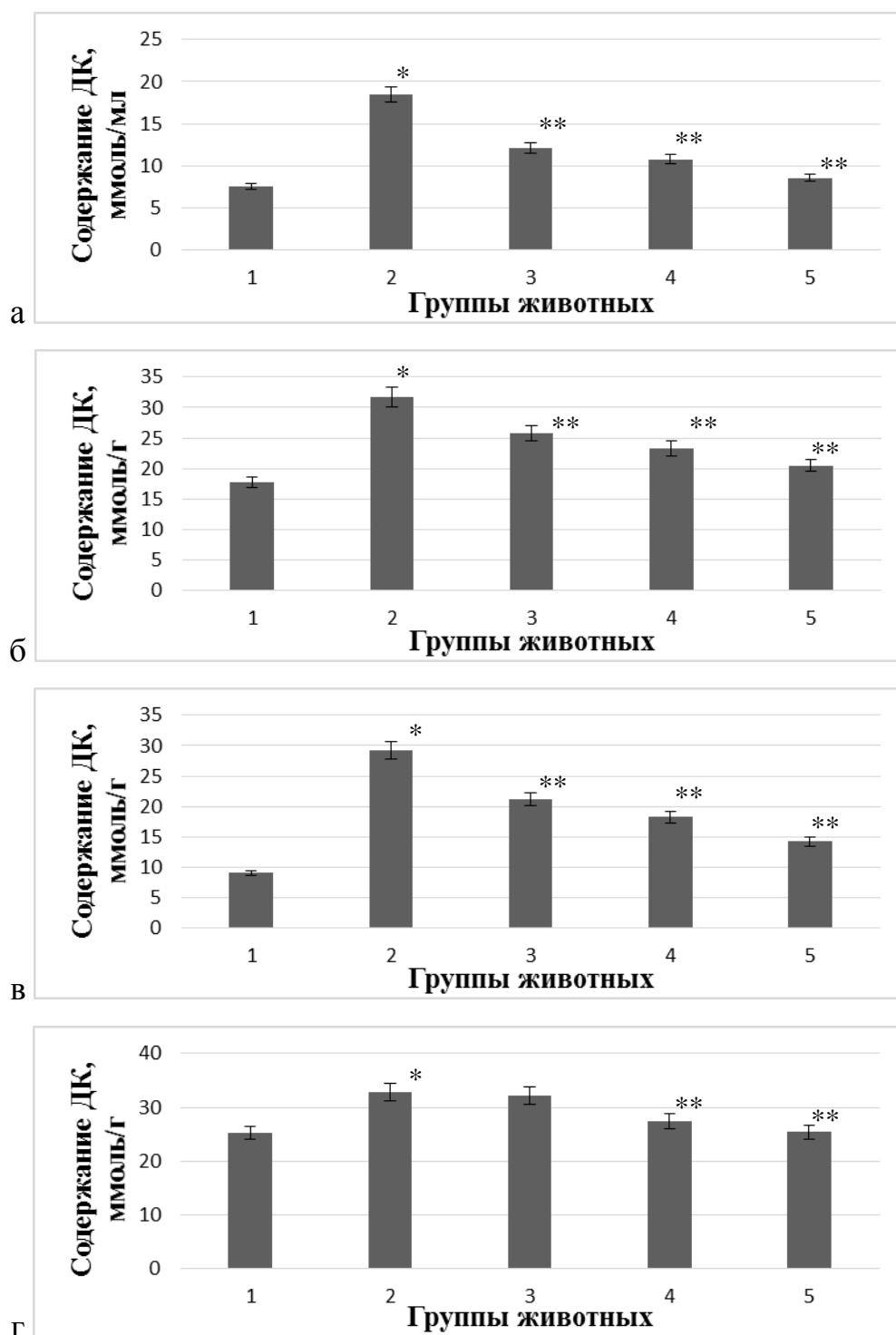


Рис. 16. Содержание диеновых конъюгатов в сыворотке крови (а), сердце (б), печени (в) и мышцах крыс (г) в норме (1), при развитии ревматоидного артрита (2) и введении тиоктовой кислоты на фоне патологии в дозе 16 (3), 35 (4) и 70 (5) мг/кг веса животного

Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны, \*\* - отличия от значений второй группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ )

Согласно современным представлениям, в качестве одной из критических мишеней действия АФК в условиях ОС рассматривается АГ. Как было показано, развитие РА сопровождалось снижением активности данного фермента и накоплением цитрата в тканях экспериментальных животных (см. рис. 8, 9). По-видимому, причиной подавления активности фермента являлось разрушающее влияние АФК на его активный центр, содержащий железо-серный кластер – чувствительную мишень действия свободных радикалов [179,272]. Увеличение содержания цитрата у животных с индуцированным РА происходило, вероятно, вследствие угнетения активности АГ, которая является основным ферментом, участвующим в метаболизме лимонной кислоты [179].

Введение ТК на фоне развития РА приводило к нормализации активности АГ. Так, применение данного протектора в дозах 16, 35 и 70 мг/кг веса тела животного сопровождалось повышением в сыворотке крови крыс активности фермента, выраженной в Е/мл, на 16, 19 и 38 % соответственно. Активность АГ, выраженная в Е/г сырой массы ткани, повышалась в этих условиях в сердце крыс на 14, 35 и 57 %; в мышцах – на 16, 18 и 23% соответственно. В печени животных введение ТК в дозе 35 и 70 мг/кг приводило к увеличению активности фермента на 27 и 44 %, в то время как доза протектора 16 мг/кг не оказала существенного эффекта (рис. 17). Изменения удельной активности АГ в условиях действия тестируемого соединения проявляли такую же тенденцию (рис. 3 приложения). Вместе с возрастанием активности АГ введение ТК приводило к уменьшению содержания цитрата в тканях лабораторных животных. Концентрация данного метаболита при использовании протектора в дозах 16, 35 и 70 мг/кг снижалась в сердце крыс в 1,9, 21, и 2,4 раза соответственно. При использовании ТК в дозе 35 и 70 мг/кг исследуемый показатель уменьшался в сыворотке крови в 1,3 и 1,4 раза, а в мышцах крыс – в 1,1 и 1,3 раза. В печени животных в обоих случаях падение концентрации происходило в 1,2 раза. В то же время, в сыворотке крови, печени и мышцах крыс

использование дозы протектора 16 мг/кг оказывало незначительный эффект на содержание цитрата (рис. 18). Изменение данных показателей в сторону нормы может быть связано с проявлением ТК антиоксидантных эффектов и её способностью снижать интенсивность СО, а также со снижением степени повреждения молекулы АГ свободными радикалами [244,361].

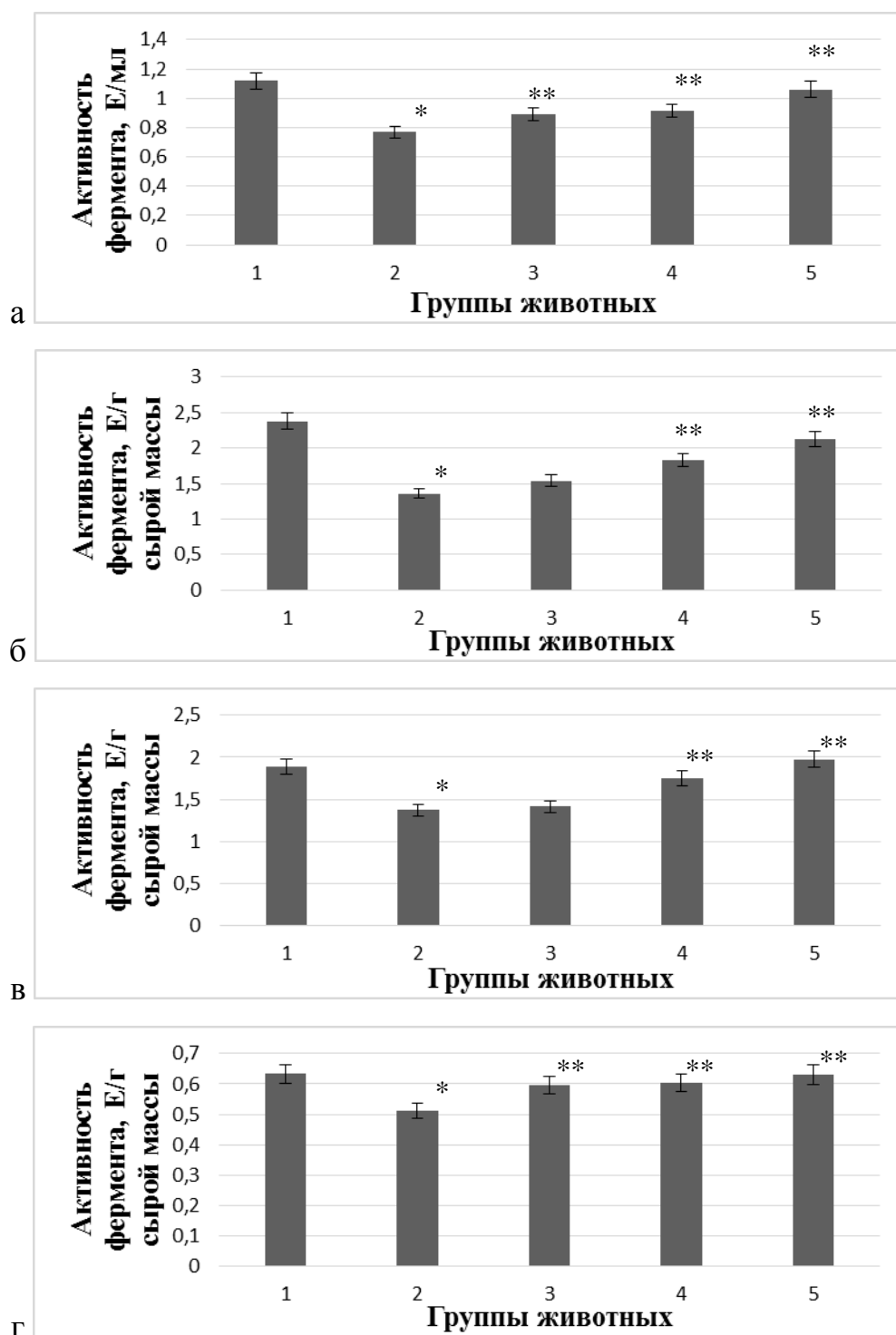


Рис. 17. Активность аконитатгидратазы, выраженная в Е/мл сыворотки крови (а), и представленная в виде Е/г сырой массы ткани сердца (б), печени (в) и мышц крыс (г) в норме (1), при развитии ревматоидного артрита (2) и введении тиоктовой кислоты на фоне патологии в дозе 16 (3), 35 (4) и 70 (5) мг/кг веса животного

Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны, \*\* - отличия от значений второй группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ )

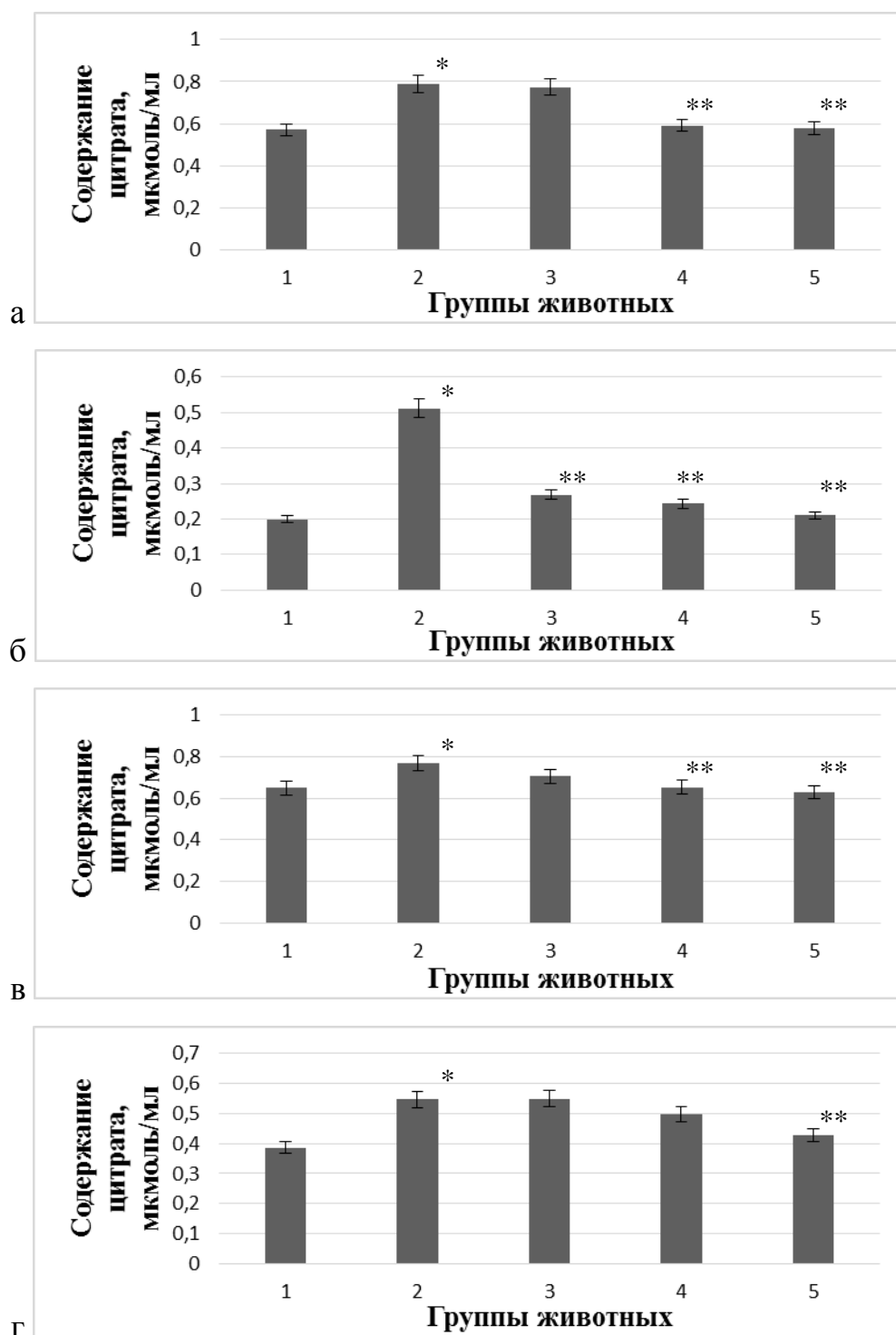


Рис. 18. Содержание цитрата в сыворотке крови (а), сердце (б), печени (в) и мышцах крыс (г) в норме (1), при развитии ревматоидного артрита (2) и введении тиоктовой кислоты на фоне патологии в дозе 16 (3), 35 (4) и 70 (5) мг/кг веса животного

Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны, \*\* - отличия от значений второй группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ )

#### 4.3. Активность апоптотических процессов в тканях крыс при ревматоидном артрите и воздействии тиоктовой кислоты

Нарушения свободнорадикального гомеостаза при РА могут выступать в качестве триггера процессов программированной клеточной гибели – апоптоза, происходящего с активацией каспаз – каскада внутриклеточных цистеиновых протеаз. Каспазы (1-14) представляют собой семейство эволюционно консервативных протеинов, обладающих специфической активностью к расщеплению белков после остатков аспартата [26]. В процессе апоптоза различные каспазы выполняют разные функции. В зависимости от того, на каком этапе данные белки вступают в каскад апоптоза, выделяют инициаторные и эффекторные каспазы. К инициаторным относят каспазы 2, 8, 9, 10, 12, к эффекторным — каспазы 3, 6, 7. В частности, к активации каспазы 8 приводит запуск сигнального пути апоптоза 1-го типа, классическими инициаторами которого, в свою очередь, выступают лиганд Fas-рецептора и ФНО- $\alpha$ . Далее каспаза 8 активирует эффекторные каспазы 3 и 7. После этого, происходит протеолиз с участием каспазы 3 ингибитора ДНКазы – фермента, ответственного за фрагментацию ДНК. Каспазы, помимо этого, гидролизуют белки ламины, армирующие ядерную мембрану, что приводит к конденсации хроматина. Также они принимают роль в деструкции протеинов, обеспечивающих поддержание структурно-функционального состояния цитоскелета, а также в инактивации и нарушении регуляции белков системы репарации ДНК, сплайсинга мРНК и репликации ДНК [34]. Ключевой при этом является каспаза 3. Поскольку данная каспаза по-видимому, усиливает сигналы инициации каспаз 8 и 9 для завершения процесса запрограммированной гибели клеток, оценка активности каспазы 3 и активирующей ее каспазы 8 может быть отнесена к основным методам определения уровня апоптоза в ткани. Терминальная фаза апоптоза проявляется деградацией клетки с расщеплением структурных белков, конденсацией хроматина и фрагментацией ДНК и является

необратимой [26,34]. Соответственно оценка степени фрагментации ДНК позволяет, в свою очередь, определить, были ли апоптотические сигналы трансдуцированы в ядро.

Согласно полученным результатам, в ДНК, выделенной из сердца, скелетных мышц и печени крыс с РА, визуализировалась фрагментация по сравнению с ДНК животных первой группы (рис. 19). Фрагменты ДНК из данных тканей при патологии образуют характерную «апоптозную лестницу». Фрагментирование при этом, исходя из литературных данных, возникает под воздействием апоптоз-специфических нуклеаз [270]. Выявляется также высокоподвижная полоса в области низких молекулярных масс, которая соответствует деградированной ДНК, наличие которой характерно для процесса некроза [66].

Результаты по оценке степени фрагментации ДНК из сердца, скелетных мышц и печени животных соотносятся с данными, полученными при измерении активности каспаз. Так, было показано увеличение активности каспазы 3 и 8 при развитии РА в сердце крыс в 3,2 и 1,8 раза, в печени – в 2,4 и 2,1 раза, в мышцах животных – в 3,1 и 2,6 раза относительно контрольной группы (рис. 20, 21). По-видимому, данные изменения связаны с активацией апоптотических процессов в клетках исследуемых тканей крыс, взаимосвязанной с чрезмерной генерацией АФК при патологии. Следует отметить, что возрастание активности каспаз было выявлено также и при других патологических состояниях, сопряженных с окислительным стрессом [244].

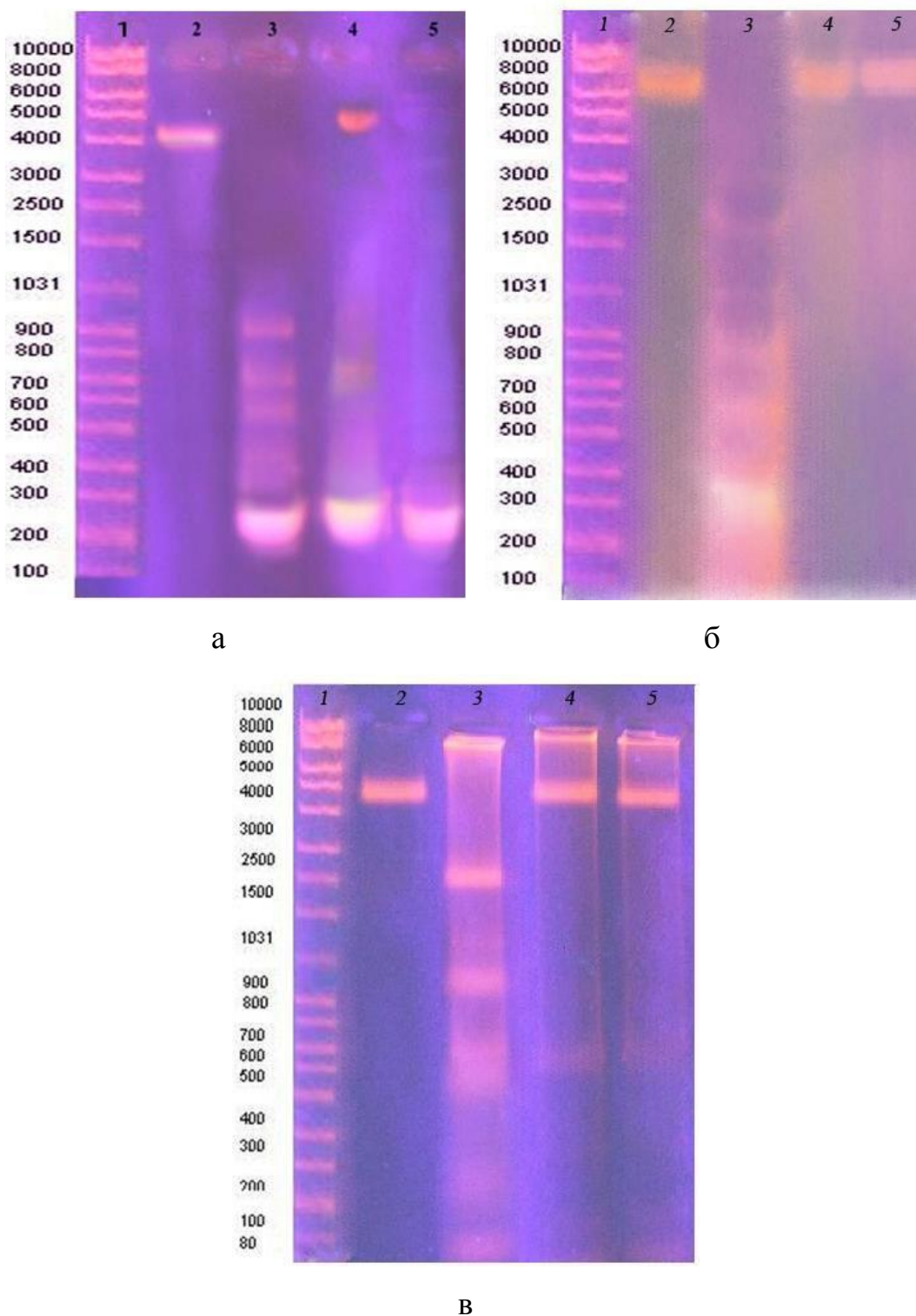


Рис. 19. Электрофореграмма препаратов ДНК из сердца (а), мышц (б) и печени крыс (в). 1 – маркеры молекулярной массы; группы животных: 2 – контроль, 3 – экспериментальный ревматоидный артрит; 4 – введение на фоне развития патологии тиоктовой кислоты в дозе 35 мг/кг, 5 – введение на фоне развития патологии тиоктовой кислоты в дозе 70 мг/кг



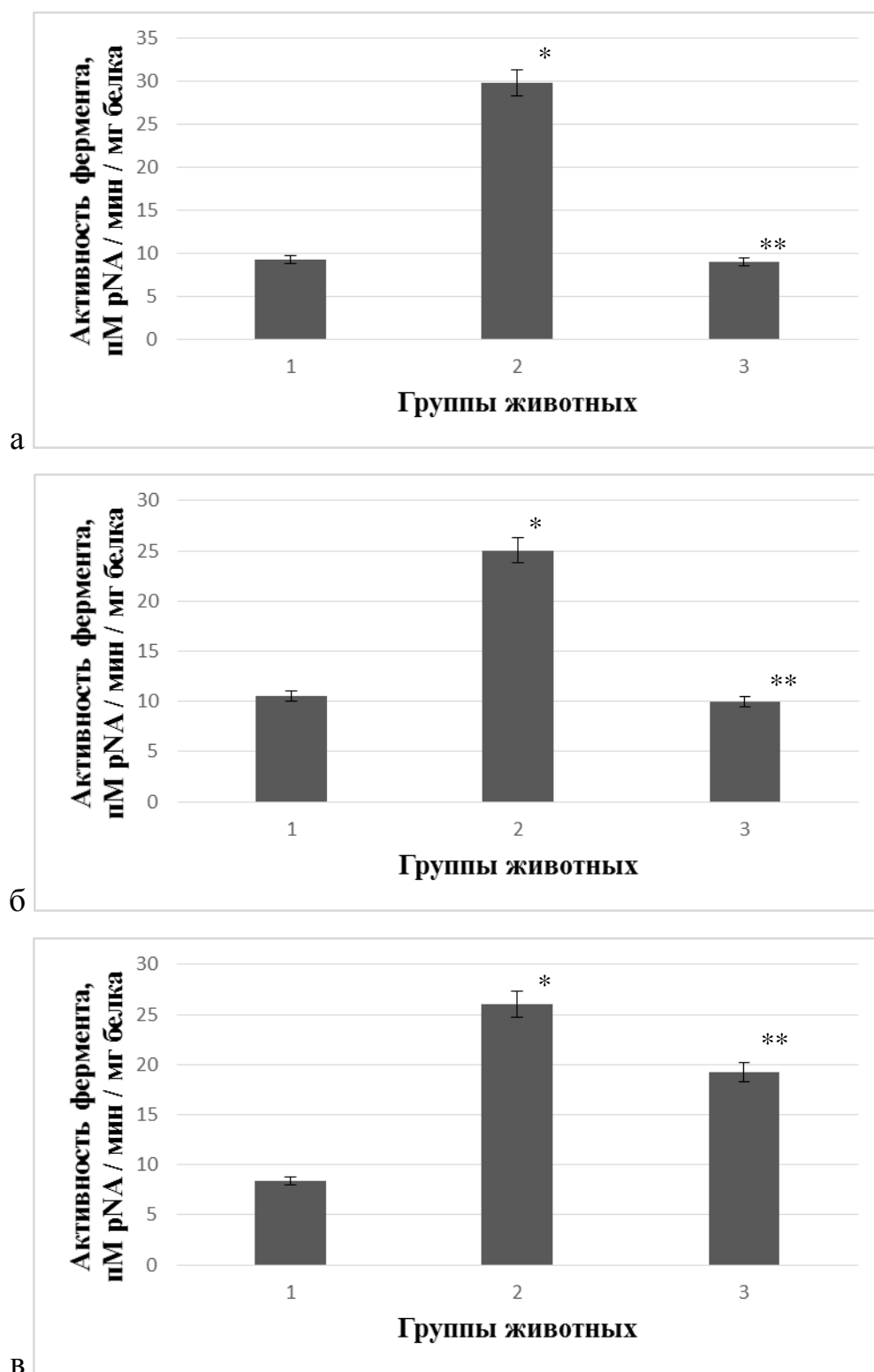


Рис. 20. Активность каспазы 3 в сердце (а), печени (б) и мышцах крыс (в) в норме (1), при развитии ревматоидного артрита (2) и введении тиоктовой кислоты на фоне патологии в дозе 70 мг/кг веса животного (3)

Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны, \*\* - отличия от значений второй группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ )

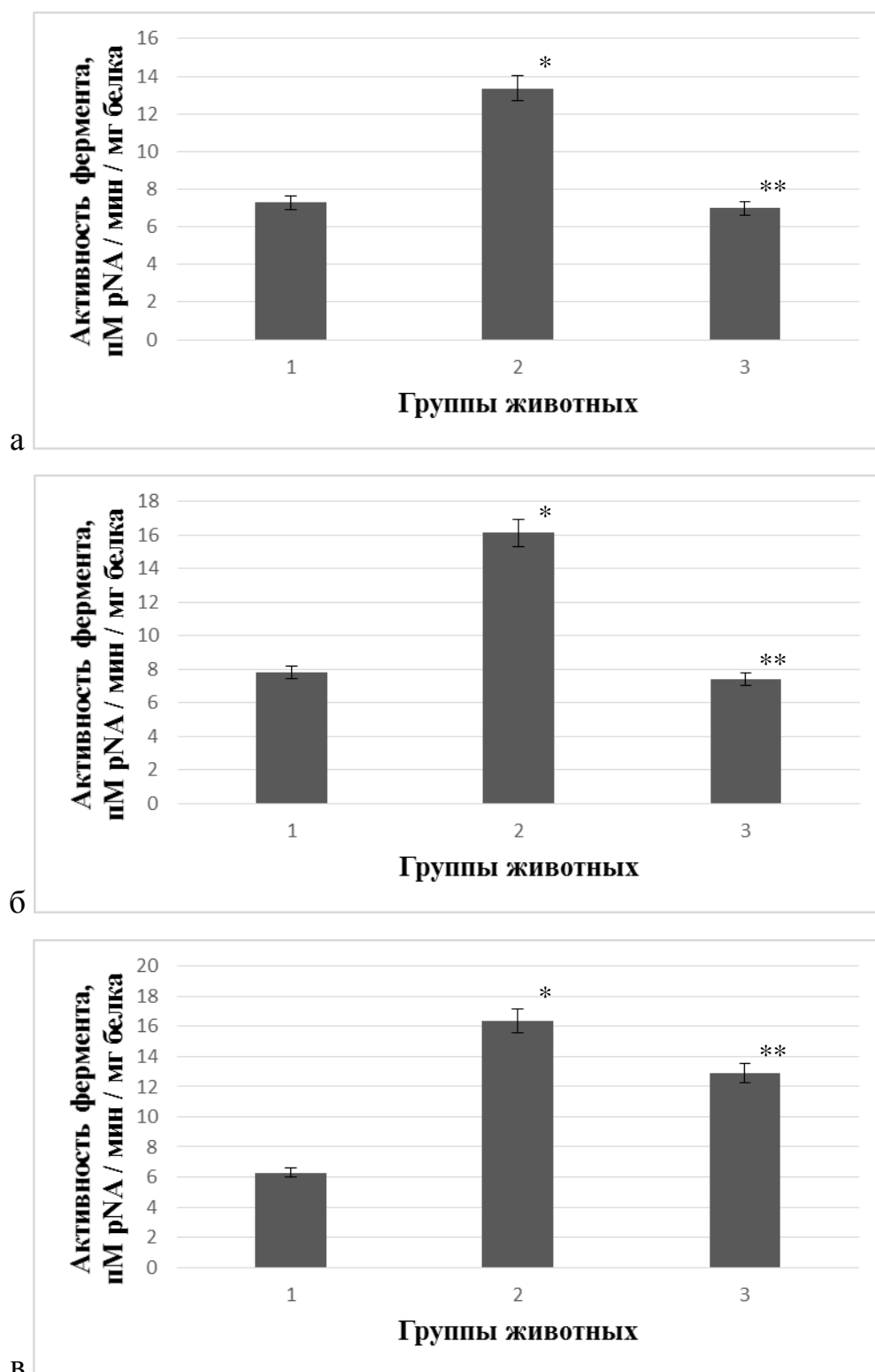


Рис. 21. Активность каспазы 8 в сердце (а), печени (б) и мышцах крыс (в) в норме (1), при развитии ревматоидного артрита (2) и введении тиоктовой кислоты на фоне патологии в дозе 70 мг/кг веса животного (3)

Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны, \*\* - отличия от значений второй группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ )

При оценке степени фрагментации ДНК в лейкоцитах периферической крови «апоптозная лестница» не визуализировалась. Полученные результаты могут быть объяснены с точки зрения наличия дефектов в протекании апоптоза, которые имеют важное значение в патогенезе РА. Так, в литературе имеются данные о гиперпролиферации и накоплении при данном заболевании фибробластоподобных синовиоцитов и аутореактивных лимфоцитов, потенциальной причиной которого называют незавершенность их апоптоза [19,52,91,159].

Показано, что введение ТК в дозах 35 и 70 мг/кг крысам с РА снижает степень фрагментации ДНК в сердце, скелетных мышцах и печени животных (см. рис. 19), что может быть свидетельством антиапоптотического действия исследуемого протектора. Эти результаты соотносятся с данными по снижению активности каспаз в условиях действия данного соединения на фоне развития патологии. Так, при введении ТК в дозе 70 мг/кг на фоне РА было показано снижение активности каспазы 3 и 8 в сердце крыс в 3,3 и 1,9 раза, в печени – в 2,5 и 2,2 раза, в мышцах – в 1,4 и 1,3 раза по сравнению с животными второй группы (см. рис. 20, 21). Снижение уровня апоптотических процессов в мышцах крыс может быть связано с уменьшением интенсивности СО под действием исследуемого соединения. Данный эффект может быть объяснен как самостоятельным антиоксидантным потенциалом ТК, обусловленного наличием двух тиоловых групп в молекуле, так и положительным воздействием на функционирование других антиоксидантных звеньев в организме. Так, известно, что протекторное действие исследуемого соединения связано с его участием в процессе регенерации окисленных форм глутатиона и убихинона [146,330]. Кроме того, было показано, что введение ТК в культуру клеток, подвергаемую воздействию ФНО- $\alpha$ , вызывающего программированную гибель гепатоцитов и клеток Купффера, предотвращает повреждение митохондрий, активацию сериновых протеаз, высвобождение цитохрома С и гибель клеток [152]. Также был выявлен позитивный эффект  $\alpha$ -липоевой

кислоты в клетках печени крыс при их повреждении, вызванном содержанием животных на диете, богатой омега-6 полиненасыщенными жирными кислотами [373].

## ГЛАВА 5. ВОЗДЕЙСТВИЕ ТИОКТОВОЙ КИСЛОТЫ НА АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ РАЗВИТИИ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА

### 5.1. Воздействие тиоктовой кислоты на активность супероксиддисмутазы и каталазы в тканях крыс при ревматоидном артрите

К антиоксидантным ферментам первой линии защиты относят СОД и каталазу. СОД катализирует превращение  $O_2^{\cdot-}$  с образованием  $H_2O_2$  и кислорода. Каталаза, в свою очередь, осуществляет разложение  $H_2O_2$  до воды, что препятствует образованию  $OH^{\cdot}$  в реакции Фентона. Таким образом, данные ферменты отвечают за эффективную элиминацию первичных АФК –  $O_2^{\cdot-}$  и  $H_2O_2$ , и играют важнейшую роль в клеточной защите от эндогенных радикалов, так как данные АФК возникают в первую очередь и способны давать начало более реакционноспособным формам [112]. Следует также отметить, что СОД и каталаза не используют кофакторы, что делает их функционирование не зависящим от активности других структур клетки [39,371].

Было показано, что развитие РА у крыс сопровождалось возрастанием активности СОД и каталазы в исследуемых тканях. Так, при индукции патологии активность СОД, выраженная в Е/мл сыворотки крови, увеличивалась в 1,7 раза, а активность фермента, представленная в виде Е/г сырой массы ткани, возрастала в печени животных в 2,8 раза, в сердце и мышцах крыс – в 1,4 раза относительно контроля (рис. 22). Аналогичный характер носили изменения удельной активности данного фермента, возраставшей в сыворотке крови, сердце, печени и мышцах крыс в 2,7, 1,7, 2,9 и 1,8 раза соответственно (рис. 4 приложения). Вместе с тем, развитие РА сопровождалось возрастанием активности каталазы в исследуемых тканях. Так, в сыворотке крови крыс активность данного фермента увеличивалась в 1,7 раза, а в сердце, печени и мышцах животных – в 1,4, 1,2, 1,3 раза относительно контрольной группы (рис. 23). Таким же образом изменялась и

удельная активность каталазы, возрастая в указанных тканях соответственно в 2,6, 1,7, 1,6 и 1,5 раза (рис. 5 приложения). Исходя из полученных результатов, можно предположить, что наблюдаемые изменения активности СОД и каталазы могут быть следствием активизации защитных функций организма адаптационного характера на чрезмерное образование АФК и интенсификацию окислительного стресса при развитии патологии [58]. Известно, что важнейшим фактором развития РА выступает процесс воспаления. Одним из первичных звеньев системы иммуногенеза, участвующих в развитии воспалительного процесса, являются гранулоцито-макрофагальные клетки, способные в ответ на внешний сигнал индуцировать генерацию АФК [313]. Данные соединения, образовавшиеся в процессе патогенеза, вызывают деструкцию биомолекул и инициируют ПОЛ, результатом чего являются морфо-функциональные нарушения клеточных структур, деградация коллагена, повреждение соединительной ткани. Кроме того, рост активности СОД и каталазы в сыворотке экспериментальных животных может быть результатом их выхода из клеток в кровь вследствие нарушения транспортных и барьерных свойств биомембран при интенсификации ПОЛ в условиях развития окислительного стресса [176].

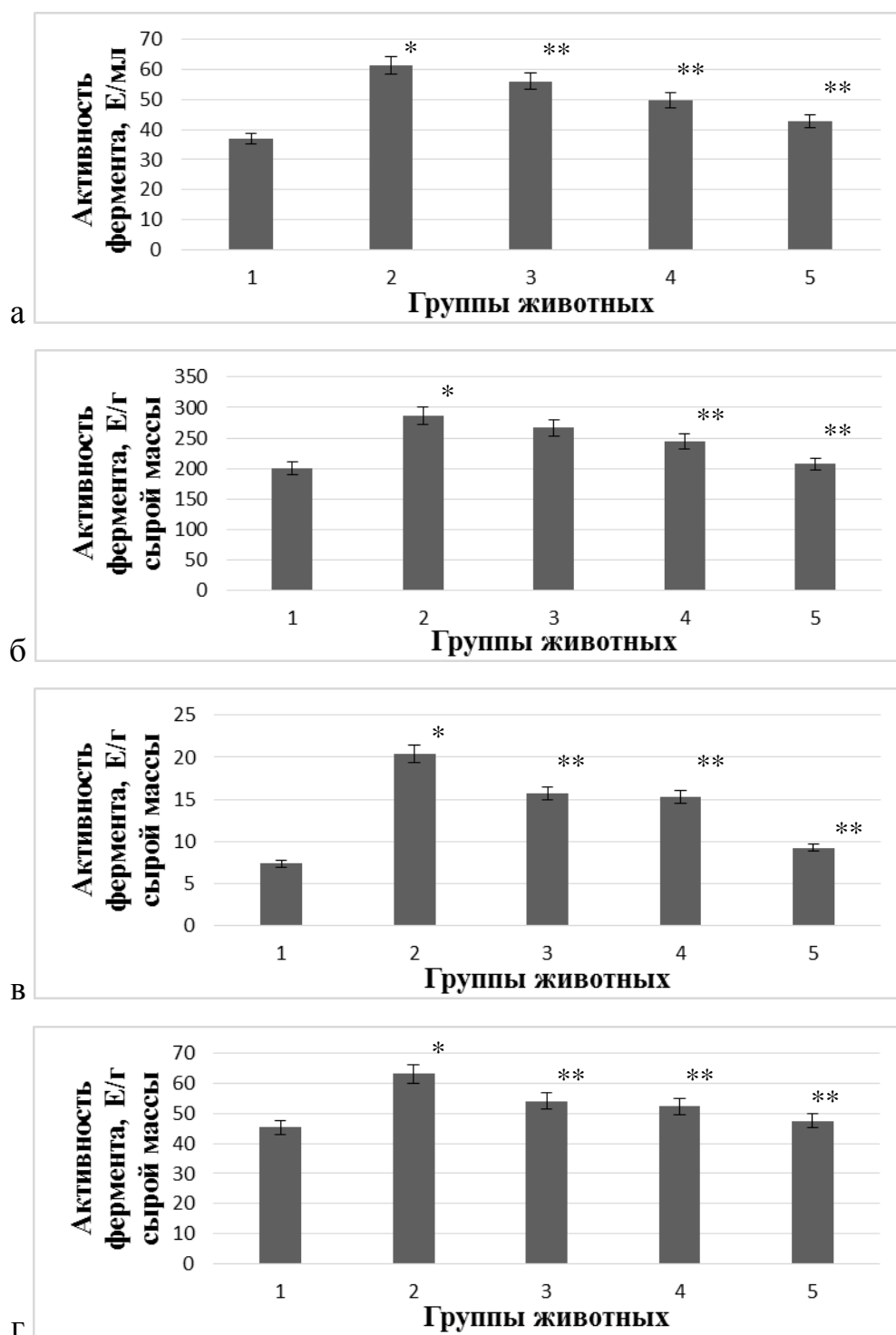


Рис. 22. Активность супероксиддисмутазы, выраженная в Е/мл сыворотки крови (а), и представленная в виде Е/г сырой массы ткани сердца (б), печени (в) и мышц крыс (г) в норме (1), при развитии ревматоидного артрита (2) и введении тиоктовой кислоты на фоне патологии в дозе 16 (3), 35 (4) и 70 (5) мг/кг веса животного

Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны, \*\* - отличия от значений второй группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ )

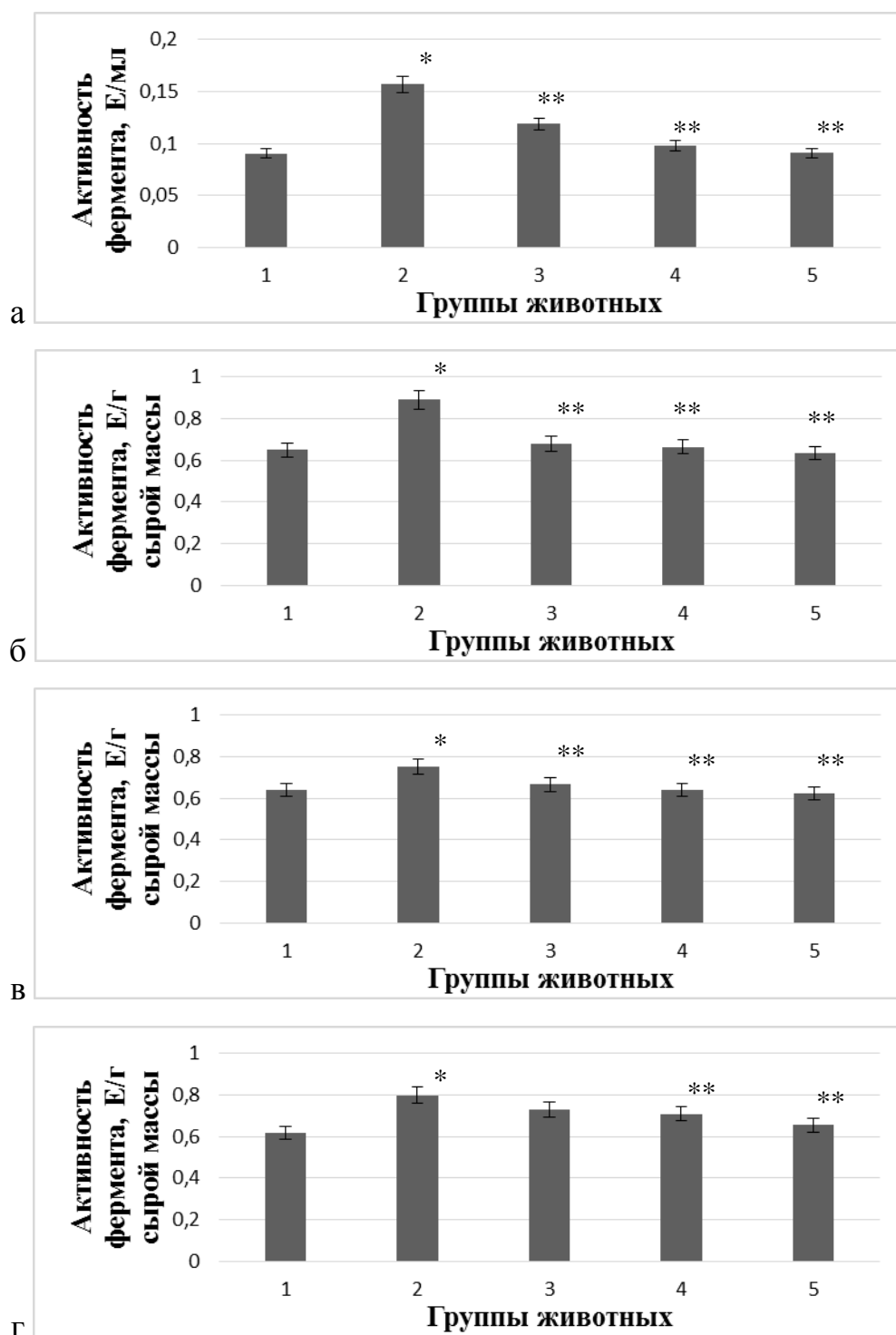


Рис. 23. Активность каталазы, выраженная в Е/мл сыворотки крови (а), и представленная в виде Е/г сырой массы ткани сердца (б), печени (в) и мышц крыс (г) в норме (1), при развитии ревматоидного артрита (2) и введении тиоктовой кислоты на фоне патологии в дозе 16 (3), 35 (4) и 70 (5) мг/кг веса животного

Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны, \*\* - отличия от значений второй группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ )



Введение ТК на фоне развития РА приводило к изменению активности СОД и каталазы в сторону контрольных значений, причем наибольший эффект протектора наблюдался при его использовании в дозе 70 мг/кг веса животного. Так, в данных условиях в 1,4 раза уменьшалась активность СОД, выраженная в Е/мл сыворотки крови животных, и представленная в виде Е/г сырой массы ткани сердца крыс. В печени и мышцах животных при этом снижение данного параметра происходило в 2,2 и 1,3 раза относительно второй экспериментальной группы (см. рис. 22). Удельная активность исследуемого фермента также проявляла тенденцию к понижению: данный показатель уменьшался в сердце и сыворотке крови крыс в 1,6 раза, а в печени и мышцах животных – в 2,7 и 1,8 раза (см. рис. 4 приложения). Как и в случае с СОД, введение ТК сопровождалось изменением активности каталазы в сторону контроля, наиболее эффективным при применении протектора в дозе 70 мг/кг. Так, активность фермента, выраженная в Е/мл сыворотки крови, уменьшалась в 1,7 раза. В тканях крыс активность каталазы, представленная в виде Е/г сырой массы, понижалась в сердце 1,4 раза, а в печени и мышцах – в 1,2 раза по сравнению со второй экспериментальной группой (см. рис. 23). Снижалась также и удельная активность каталазы: в сыворотке крови и мышцах – в 2,5 и 1,4 раза, а в сердце и печени крыс – в 1,6 раза (см. рис. 5 приложения). По-видимому, данные изменения были обусловлены снижением нагрузки на исследуемые защитные системы вследствие наличия у молекулы ТК антиоксидантных свойств, в том числе способности усиливать биосинтез GSH путем транслокации в ядро транскрипционного фактора Nrf-2 [172]. Кроме этого, имеются сведения о способности ТК снижать экспрессию белков p22phox и p47phox – субъединиц НАДФН-оксидазы, играющей важную роль в генерации АФК при иммунном ответе [384].

## 5.2. Активность глутатионового звена антиоксидантной системы в тканях крыс при ревматоидном артрите и воздействии тиоктовой кислоты

Как известно, РА относится к заболеваниям, патогенез которых тесно сопряжен с развитием ОС. Одним из главных звеньев защиты от негативного действия АФК является глутатионовая система, в состав которой входят ферменты GPX, GSR, GST и трипептид GSH, играющий роль восстановительного кофактора в GPX реакции, а также способный непосредственно взаимодействовать со свободными радикалами и гидропероксидами. GPX является ключевым ферментом, осуществляющим утилизацию АФК и продуктов ПОЛ. GSR, в свою очередь, с использованием НАДФН в качестве источника восстановительных эквивалентов обеспечивает восстановление GSSG, образованного в ходе GPX реакции, без усиления его синтеза *de novo* [395]. Таким образом, эти ферменты формируют единую систему, осуществляющую глутатионовый редокс-цикл. Важная роль принадлежит также и GST, осуществляющей главным образом детоксикацию продуктов ПОЛ, генерируемых при метаболизме ксенобиотиков в эндоплазматическом ретикулуме [196].

В ходе работы было показано, что развитие РА сопровождалось повышением активности GPX и GSR в исследуемых тканях лабораторных животных. Так, индукция патологии приводила к росту активности данных ферментов, выраженной в Е/мл сыворотки, на 16 и 24 % по сравнению с животными, содержащимися на стандартном режиме вивария. Активность GPX и GSR, представленная в виде Е/г сырой массы ткани, возрастала в сердце крыс на 50 и 17 %, в печени – на 26 и 22 %, в мышцах животных – на 13 и 37 % относительно контроля (рис. 24, 25). Подобная тенденция к увеличению оцениваемых показателей наблюдалась и для удельной активности этих ферментов при развитии патологии (рис. 6, 7 приложения). Вероятно, наблюдаемое изменение активности GPX являлось защитной реакцией организма в ответ на генерацию АФК при экспериментальном РА.

Возрастание активности GSR, катализирующей восстановление GSSG за счет использования НАДФН, также имеет важное адаптивное значение для формирования клеточного ответа на развитие ОС, поскольку в этих условиях возрастает активность GPX, непосредственно участвующей в обезвреживании метаболитов и продуктов реакций СО при участии GSH. Нельзя исключить, что определённый вклад в повышение активности исследуемых ферментов в сыворотке крови могло внести нарушение целостности цитоплазматических мембран клеток в условиях оксидативного стресса [182]. Однако, данные, полученные при исследовании тканей животных, позволяют говорить о том, что первостепенную роль в наблюдаемом изменении активности ферментов играет интенсификация СО при развитии патологии.

Данные, полученные при исследовании действия ТК показали, что введение протектора на фоне развития РА приводило к изменению активности GPX и GSR в сторону контрольных значений. При этом, наибольший эффект тестируемое соединение оказывало в дозе 70 мг/кг веса тела животного. Так, в этих условиях активность GPX и GSR, представленная в виде Е/мл сыворотки крови снижалась на 14 и 24%, а активность ферментов, выраженная в Е/г сырой массы, уменьшалась в сердце крыс на 37 и 20 %, в печени – на 27 и 24%, в мышцах животных – на 18 и 35 % относительно контроля (см. рис. 24, 25). Удельная активность GPX и GSR также наиболее эффективно снижалась после введения ТК в дозе 70 мг/кг (см. рис. 6, 7 приложения). Наблюдаемые изменения функционирования исследуемых ферментов согласуются с данными по интенсивности СО и содержания в тканях крыс первичных продуктов ПОЛ, что может быть объяснено наличием у тестируемого соединения антиоксидантных и протекторных свойств. Таким образом, ТК благодаря своему позитивному воздействию на свободнорадикальный гомеостаз в организме лабораторных животных, снижала, по-видимому, нагрузку на ферменты глутатионового редокс-цикла.

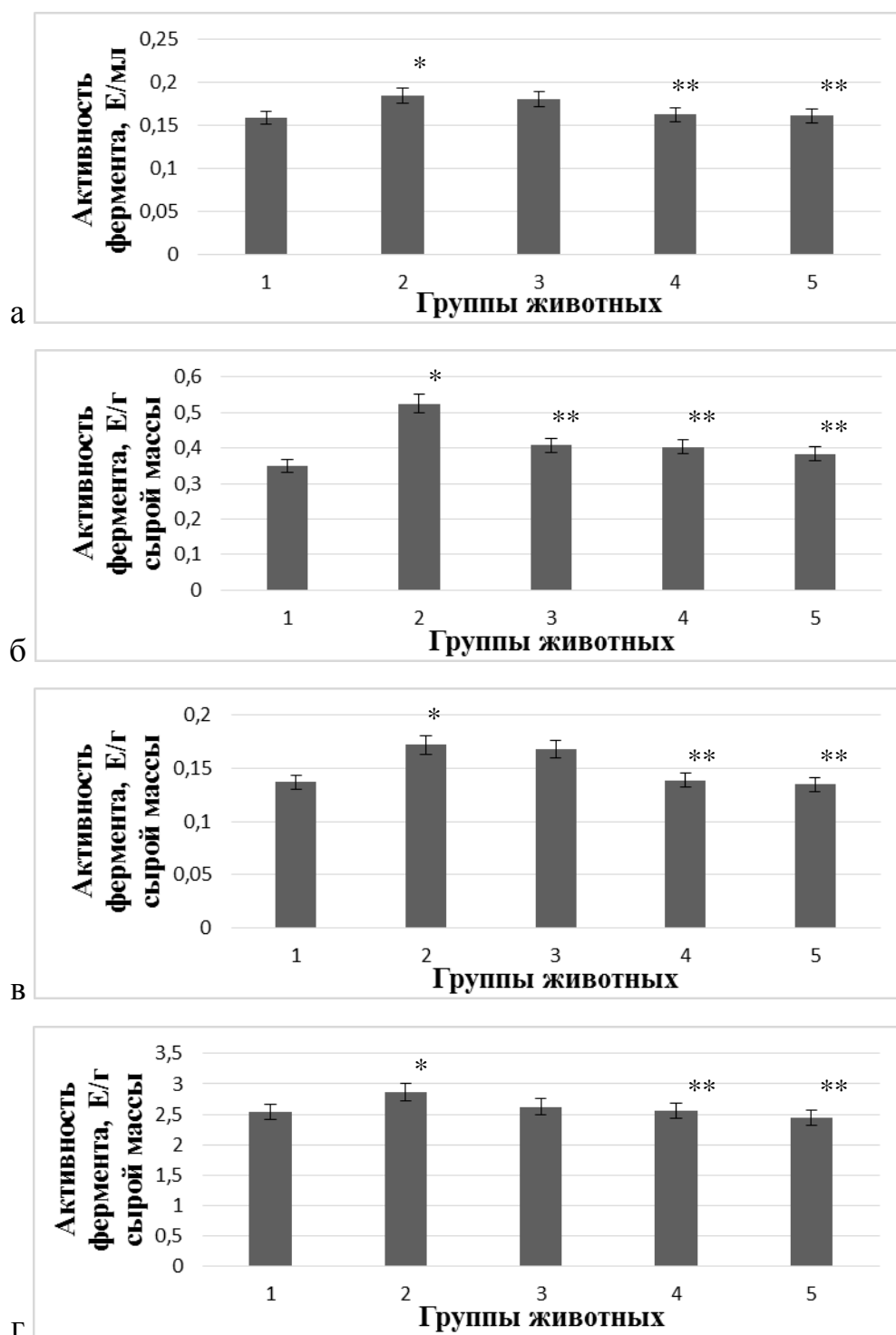


Рис. 24. Активность глутатионпероксидазы, выраженная в Е/мл сыворотки крови (а), и представленная в Е/г сырой массы ткани сердца (б), печени (в) и мышц крыс (г) в норме (1), при развитии ревматоидного артрита (2) и введении тиоктовой кислоты на фоне патологии в дозе 16 (3), 35 (4) и 70 (5) мг/кг веса животного

Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны, \*\* - отличия от значений второй группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ )

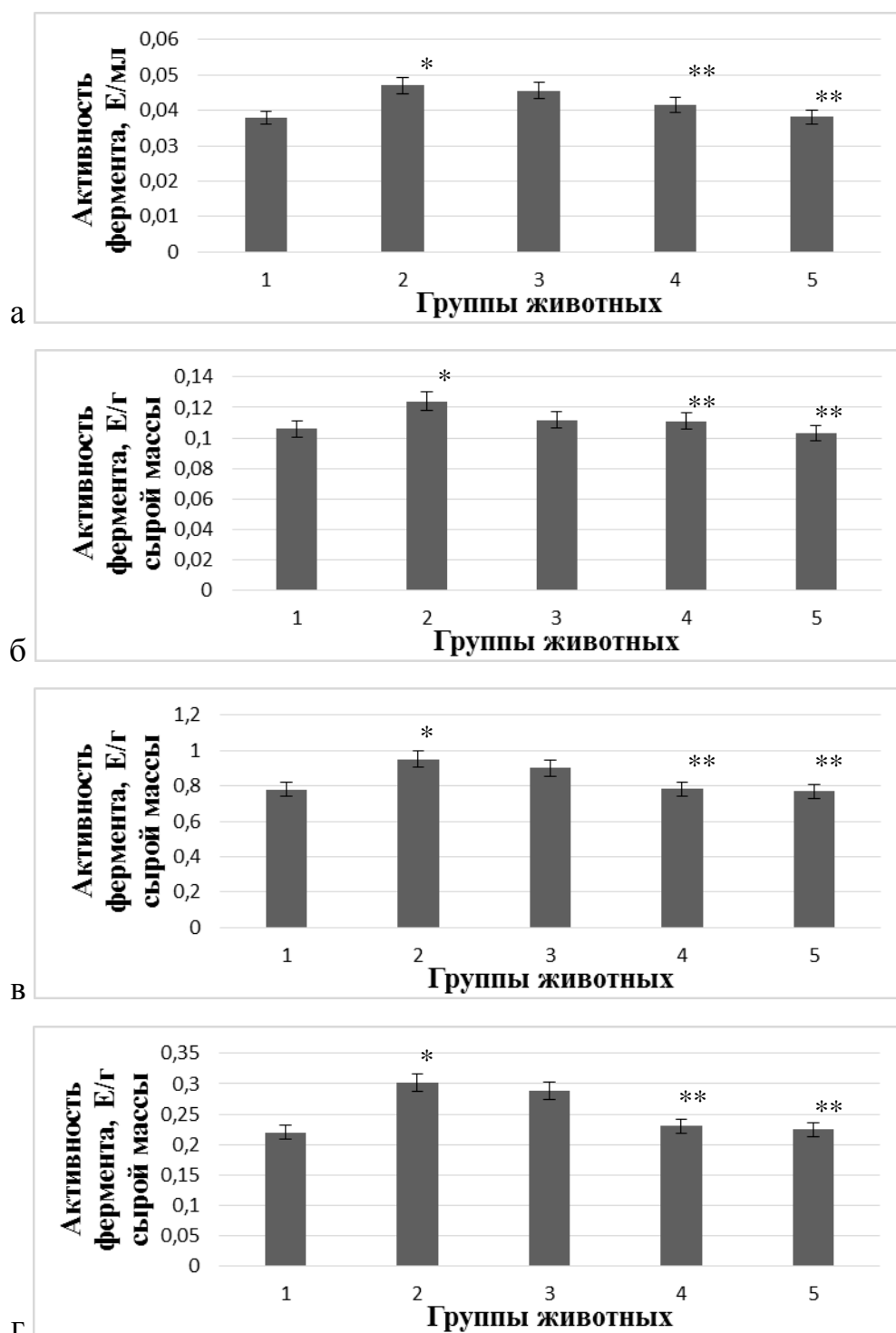


Рис. 25. Активность глутатионредуктазы, выраженная в Е/мл сыворотки крови (а), и представленная в Е/г сырой массы ткани сердца (б), печени (в) и мышц крыс (г) в норме (1), при развитии ревматоидного артрита (2) и введении тиоктовой кислоты на фоне патологии в дозе 16 (3), 35 (4) и 70 (5) мг/кг веса животного

Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны, \*\* - отличия от значений второй группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ )

В то же время, развитие РА сопровождалось уменьшением содержания GSH. Так, концентрация тиола снижалась в сыворотке крови, печени и мышцах крыс в 1,2, раза, а в сердце – в 2,2 раза относительно контроля (рис. 26). Наблюдаемые изменения могли быть связаны с расходом данного соединения для детоксикации продуктов СО, чрезмерная интенсификация которого происходила в условиях развития патологии [362]. Значительный вклад в изменение данного параметра мог быть внесен развитием дисбаланса между скоростью образования, восстановления GSSG и расходом GSH при усилении генерации АФК [13]. Судя по всему, на момент развития наибольшей интенсивности протекания РА, даже повышение активности GSR не способно было компенсировать потери GSH в тканях животных.

Введение ТК, при этом, способствовало изменению концентрации GSH в направлении контрольных значений во всех исследуемых тканях. Так, содержание данного тиола при использовании протектора в дозах 16, 35 и 70 мг/кг возрастало в сердце крыс в 2,0, 2,1 и 2,3 раза, а в сыворотке крови животных во всех трех случаях показатель увеличивался в 1,2 раза. Доза ТК 35 и 70 мг/кг способствовала росту содержания GSH в мышцах также в 1,2 раза, а в печени подобный прирост концентрации обеспечивало введение протектора в дозе 35 мг/кг. Использование минимальной дозировки тестируемого соединения при этом не приводило к существенным изменениям содержания GSH в печени и мышцах крыс, в то время как применение максимальной дозировки способствовало возрастанию данного параметра в 2,7 раза – выше контрольных значений. По-видимому, за счет реализации антиоксидантного действия исследуемого соединения происходило уменьшение степени развития ОС и, как следствие, снижение расходования GSH при РА. Увеличение концентрации GSH выше контрольных значений при введении ТК в дозе 70 мг/кг веса тела происходило, по-видимому, вследствие наличия у данного соединения способности воздействовать на биосинтез глутатиона, имеющий особенно большое значение в гепатоцитах [10]. Известно, что ДГЛК – восстановленная

форма ТК – участвует в превращении цистина в цистеин, являющийся лимитирующим субстратом для синтеза GSH. Кроме этого, ТК может увеличивать концентрацию цистеина в клетке путем усиления поступления цистина из плазмы и последующего его восстановления. Также, имеются данные, что ТК индуцирует синтез GSH de novo транскрипционно. Так, было показано, что с возрастом у крыс снижается уровень GSH в гепатоцитах вследствие падения активности  $\gamma$ -глутамилцистеинлигазы в условиях существенного уменьшения количества двух субъединиц этого фермента. Поскольку обе субъединицы  $\gamma$ -глутамилцистеинлигазы являются продуктами генов, представленных в составе антиоксидантного ответного элемента (АОЭ), было предположено, что снижение концентрации GSH с возрастом является следствием дефицита АОЭ-зависимой транскрипции генома. Действительно, как оказалось, уровень в ядре Nrf2 – важнейшего транскрипционного фактора АОЭ-зависимых генов, резко уменьшается с возрастом. Введение престарелым крысам ТК приводило к существенному увеличению активности  $\gamma$ -глутамилцистеинлигазы и концентрации GSH в печени. В данном случае исследуемый протектор действует, по-видимому, через регуляцию функциональной активности Nrf2. Так, ТК усиливает транскрипционную Nrf2-зависимую активность формирования липоилцистеинил дисульфидов на Keap1 белке, одной из функций которого является изоляция Nrf2 и шунтирование его к убиквитин лигазе. Таким образом, синтезированный Nrf2 не связывается с Keap1 и не подвергается деградации. Имеются также сведения, что при Fas-зависимом апоптозе администрирование ТК приводит к активации протеинкиназы-C, фосфорилирующей Nrf2 в районе Ser40, что способствует диссоциации данного транскрипционного фактора от Keap1, что также предотвращает деградацию Nrf2 [144].

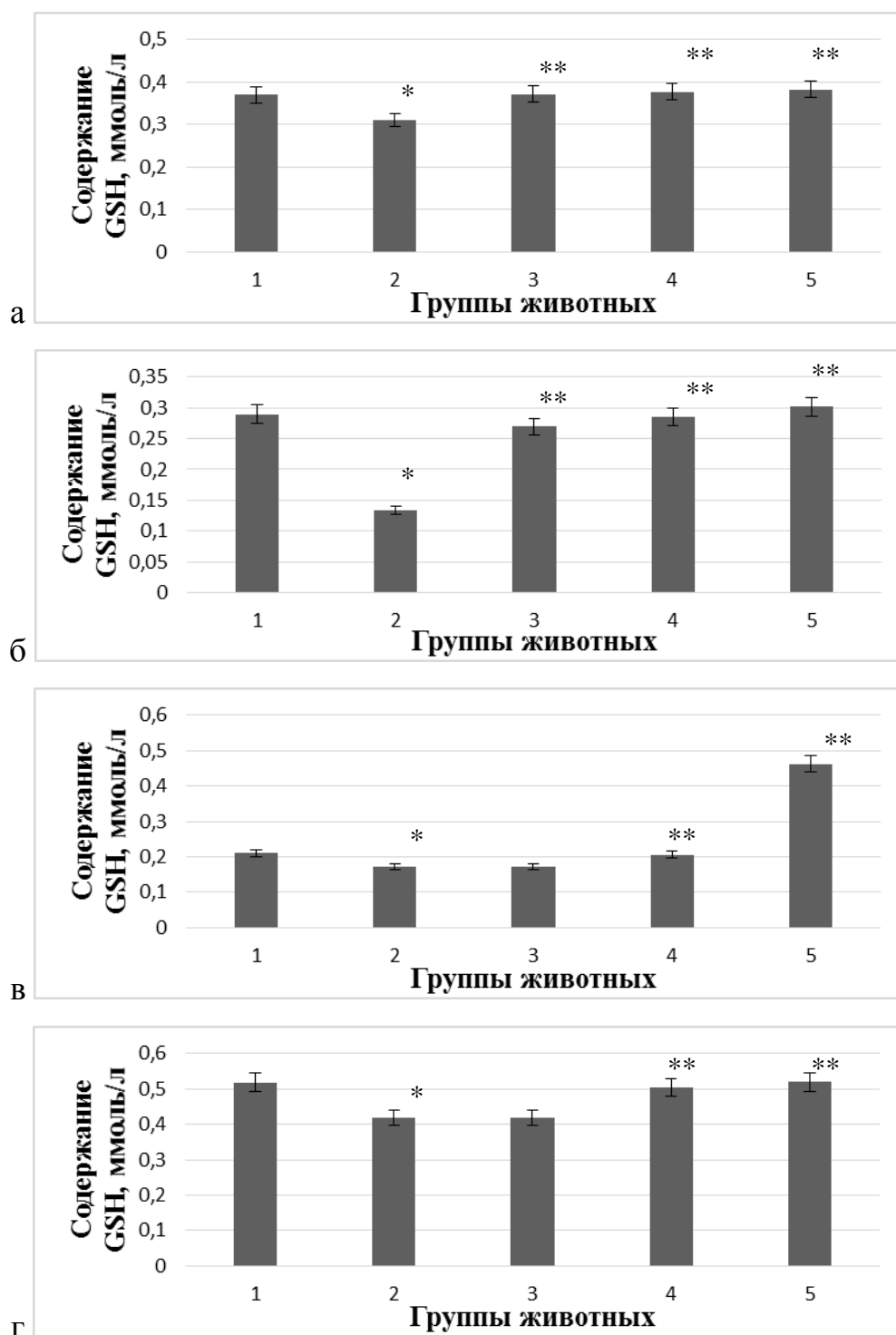


Рис. 26. Содержание восстановленного глутатиона в сыворотке крови (а), сердце (б), печени (в) и мышцах крыс (г) в норме (1), при развитии ревматоидного артрита (2) и введении тиоктовой кислоты на фоне патологии в дозе 16 (3), 35 (4) и 70 (5) мг/кг веса животного

Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны, \*\* - отличия от значений второй группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ )



Активность GST у крыс второй экспериментальной группы также уменьшалась по сравнению с контрольными животными. Так, в сыворотке крови крыс с РА активность данного фермента, выраженная в Е/мл снижалась в 2,1 раза, а активность GST, выраженная в Е/г массы ткани падала в сердце, печени и мышцах в 1,4 раза (рис. 27). Та же тенденция сохранялась и по отношению к удельной активности исследуемого фермента, снижавшейся в сыворотке крови и сердце в 1,8, 1,4 раза, а в печени и мышцах крыс – в 1,2 раза относительно контроля (рис. 8 приложения). Выявленные изменения активности GST могли быть связаны с дефицитом GSH – основного субстрата исследуемого фермента в условиях ОС, развивающегося при индукции РА [362]. Полученные данные соотносятся со снижением активности GST при развитии окислительного стресса у пациентов с остеоартритом коленного сустава [242].

К нормализации активности GST у крыс на фоне развития РА приводило введение исследуемого протектора. Так, использование ТК в дозе 16, 35 и 70 мг/кг способствовало возрастанию активности данного фермента, представленной в виде Е/мл сыворотки крови, в 1,8, 1,9 и 2,0 раза относительно контроля, а активность фермента, выраженная в Е/г сырой массы печени, увеличивалась при этом в 1,2, 1,3 и 1,4 раза. В мышцах крыс под воздействием протектора в дозе 16 мг/кг активность GST возрастала в 1,2 раза, в остальных случаях – в 1,3 раза. В сердце крыс все три дозы способствовали увеличению данного показателя в 1,4 раза (см. рис. 27). Удельная активность GST также возрастала под воздействием ТК, оказывающей наибольший эффект на данный параметр в дозе 70 мг/кг. В этом случае активность фермента увеличивалась в сыворотке крови, сердце, печени и мышцах крыс в 2,2, 1,4, 1,2 и 1,1 раза соответственно (см. рис. 8 приложения). Полученные данные согласуются с показателями содержания GSH – необходимого субстрата для функционирования GST, возраставшего под действием протектора на фоне патологии. Судя по всему, воздействие ТК на фоне РА обеспечивало ослабление нагрузки на GPX и GSR, и ослабление

расходования GSH для детоксикации АФК, благодаря проявлению антиоксидантных и протекторных свойств. Таким образом, уменьшение степени дисбаланса в глутатионовой АОС способствовало изменению анализируемых параметров в направлении контрольных значений.

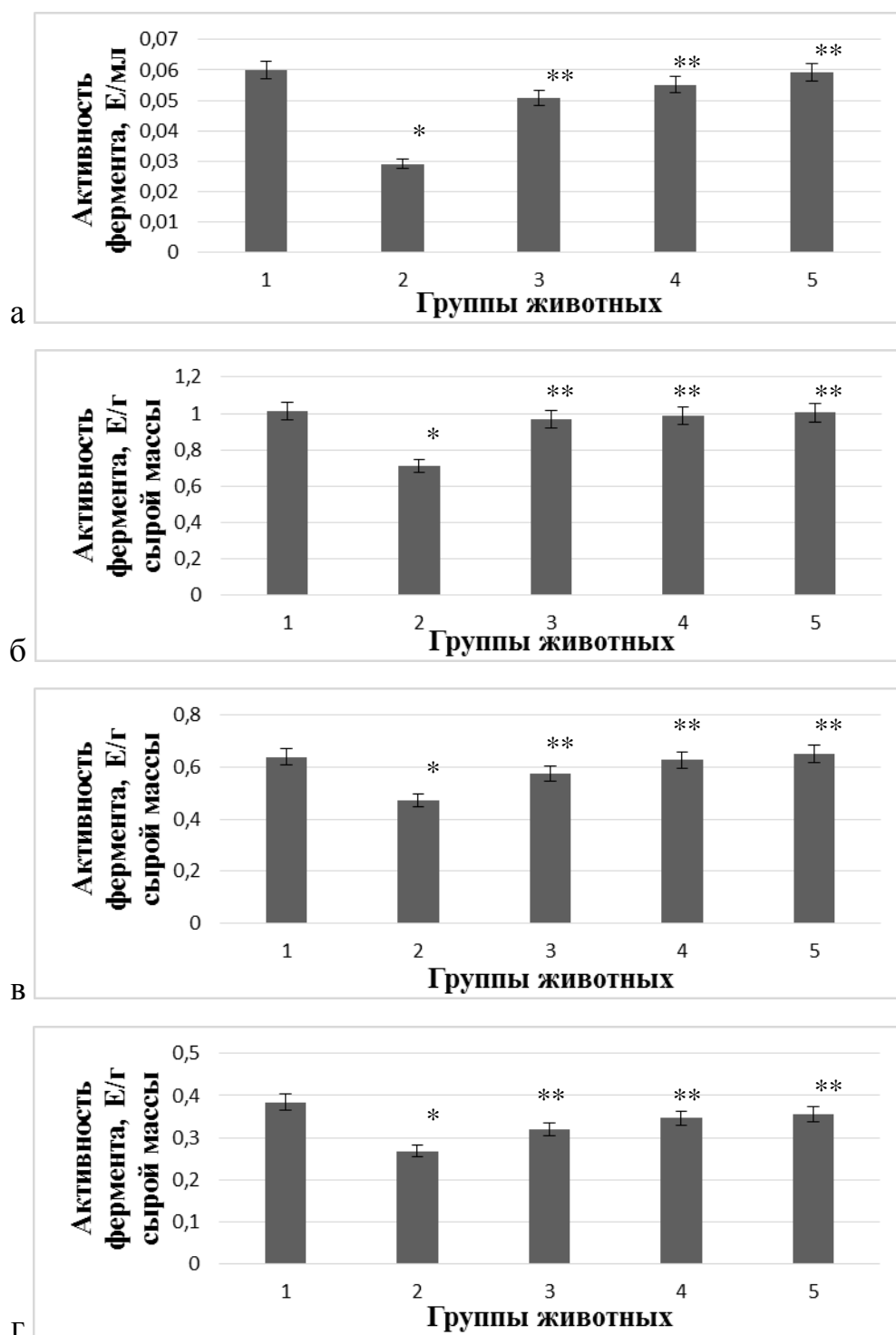


Рис. 27. Активность глутатионтрансферазы, выраженная в Е/мл сыворотки крови (а), и представленная в Е/г сырой массы ткани сердца (б), печени (в) и мышц крыс (г) в норме (1), при развитии ревматоидного артрита (2) и введении тиоктовой кислоты на фоне патологии в дозе 16 (3), 35 (4) и 70 (5) мг/кг веса животного

Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны, \*\* - отличия от значений второй группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ )

### 5.3. Уровень транскриптов генов супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в тканях крыс при ревматоидном артрите и воздействии тиоктовой кислоты

В ходе работы с помощью программы «qgene» осуществлялась оценка уровня транскриптов генов ряда антиоксидантных ферментов в исследуемых тканях лабораторных животных при РА и введении ТК на фоне развития патологии. В ходе данного анализа использовались следующие гены-мишени: Sod1, прямой праймер – GGTCCAGCGGATGAAGAG, обратный праймер – GGACACATTGGCCACACC; Cat, прямой праймер – GCTAATGAAGACAACGTCACCTCA, обратный праймер – TGTCTCACACAGGCGTTTC; Gpx1, прямой праймер – CGACATCGAACCCGATATAGA, обратный праймер – ATGCCTTAGGGGTTGCTAGG; Gsr, прямой праймер – TTCCTCATGAGAACCAGATCC, обратный праймер – TGAAAGAACCCATCACTGGTTA; референсный ген глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (ГАФДН), прямой праймер – CCCTCAAGATTGTCAGCAATG, обратный праймер – AGTTGTCATGGATGACCTTGG.

Тотальную РНК для исследований выделяли с помощью набора «РНК-Экстран» согласно протоколу производителя, с использованием ингибитора РНКаз, что позволило получить препараты, пригодные для дальнейших процедур (рис. 28).

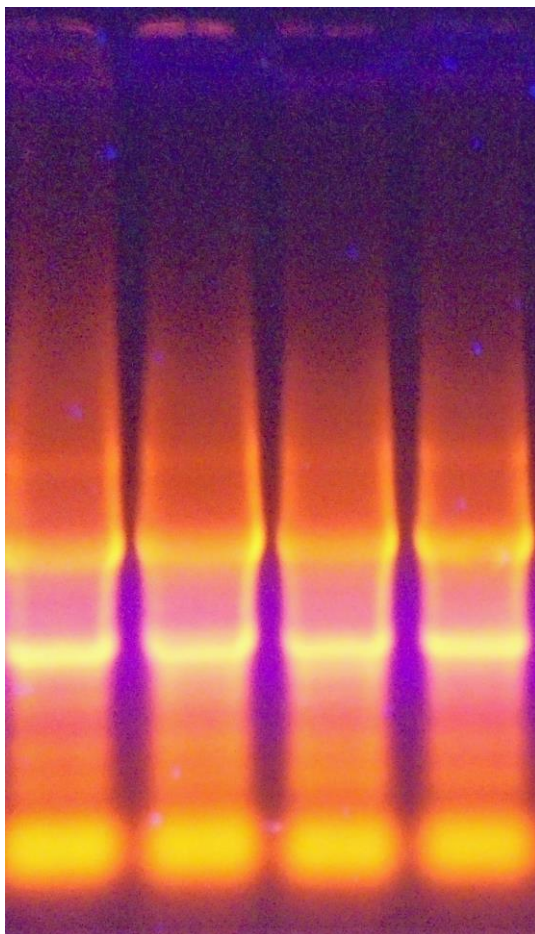


Рис. 28. Электрофореграмма тотальной РНК тканей крыс.

Суммарное содержание и чистоту препарата РНК оценивали спектрофотометрически. Образец РНК разбавляли бидистиллированной водой в 10 раз, измеряли оптическую плотность при 260 нм. Полученное значение поглощения образца умножали на молярный коэффициент экстинкции, составляющий 0,04, и получали концентрацию РНК в мкг/мл. Посредством определения соотношения поглощения при длинах волн 260, 280 и 230 нм, определяли чистоту препарата. Образец РНК считался чистым, если соотношение оптических плотностей при 260 и 280 нм составляло порядка 2,8, а соотношение поглощения при 260 и 230 нм находилось в интервале от 1,8 до 2,2. Для дальнейших исследований использовались только чистые образцы РНК.

Реакция обратной транскрипции проводилась с использованием рекомбинантной обратной транскриптазы вируса мышинового лейкоза Молони

– M-MuLV. В качестве затравочного праймера применялся олиго-(dT)<sub>15</sub> праймер, благодаря чему в форму ДНК избирательно переводились только молекулы матричной РНК, представляющие собой транскрипты работающих генов.

Все реакции амплификации подчинялись стандартной кинетике, при которой на кривой накопления ампликонов четко визуализируются три фазы: начальная, логарифмическая и фаза насыщения (рис. 29).

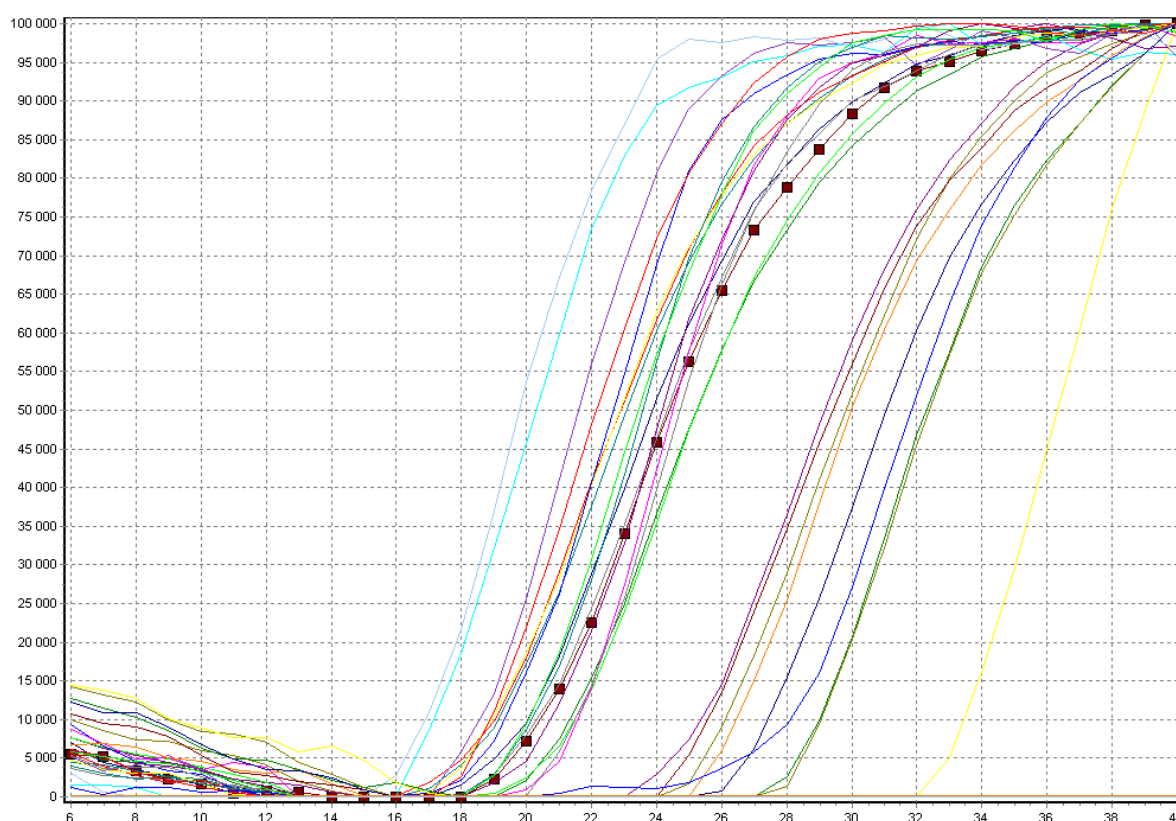


Рис. 29. Кинетика реакции накопления продуктов амплификации.

Расчет разницы экспрессии с учетом порогового цикла для ГАФДН и значений эффективности амплификации показал, что при РА происходит увеличение уровня транскриптов генов ферментов антиоксидантной защиты. Так, данный показатель для Sod1 увеличивался в крови, сердце, печени и мышцах крыс в 4,0, 3,1, 2,5 и 2,8 раза относительно животных контрольной группы (рис. 30). Уровень транскриптов Cat возрастал при этом в крови и сердце в 3,3, 3,1 раза, а в печени и мышцах крыс – в 2,6 раза (рис. 31). Для

Gpx1 прирост в крови и сердце животных составил 2,6 раза относительно контроля, в печени и мышцах – 2,4 и 2,8 раза (рис. 32). Gsr характеризовался увеличением уровня транскриптов в крови и сердце крыс в 3,0 раза, в печени и мышцах – в 2,5 и 3,3 раза относительно контроля (рис. 33). Полученные результаты соотносятся с данными по повышению активности исследуемых ферментов в тканях крыс при экспериментальном РА. По-видимому, усиление синтеза GPX, GSR, СОД и каталазы при РА может быть одним из важнейших механизмов, лежащих в основе возрастания активности исследуемых антиоксидантных ферментов в условиях патологии. Очевидно, возрастание уровня экспрессии исследованных ферментов может способствовать повышению устойчивости систем организма к окислительному стрессу. В то же время нельзя исключить возможности регуляции активности GPX, GSR, СОД и каталазы при патологии путем модификации свойств уже существующих молекул ферментов наряду с их синтезом *de novo* [269,362,401].

Полученные результаты согласуются с литературными данными, указывающими на возможность индукции антиоксидантных ферментов при ОС [220,266], и в частности, в условиях интенсификации процессов СО при РА [362]. Известно, что гены, кодирующие данные белки, имеют в области промотора сайт связывания для редокс-чувствительного транскрипционного ядерного фактора NF-κB [388], который контролирует экспрессию ряда генов, играющих важную роль в ответе на стресс. Можно предполагать, что при развитии патологического состояния интенсификация СО способствует индукции антиоксидантных ферментов путем активации NF-κB свободными радикалами, в том числе посредством инактивации фактора IκBa [277]. NF-κB также регулирует гены, продукты которых принимают участие в процессах воспаления, апоптоза, пролиферации и регенерации печени [415]. Кроме того, высокая концентрация антиоксидантных ферментов при РА может быть связана с активацией белка Nrf. Известно, что транскрипция антиоксидантных ферментов регулируется АОЭ. Nrf2 и Nrf1 являются

транскрипционными факторами, которые могут связываться с данными элементами и активировать гены антиоксидантных ферментов [149,209,279]. Имеются также некоторые данные, что транскрипция генов антиоксидантных ферментов находится в зависимости от степени восстановленности транскрипционных факторов SoxRS и OxyR [47].

Введение ТК на фоне РА сопровождалось снижением уровня транскриптов генов АОС крыс. Так, применение исследуемого протектора в дозе 70 мг/кг приводило к снижению данного параметра Sod1 в крови и сердце в 1,3 и 1,5 раза относительно второй экспериментальной группы. Уровень транскриптов Cat в этих условиях уменьшался в сердце и крови крыс в 1,4 и 1,3 раза. Данный показатель Gsr в крови и сердце животных понижался в 1,1 раза, как и уровень транскриптов Gpx1 в сердце крыс, тогда как в крови для этого гена наблюдалось уменьшение исследуемого параметра в 1,2 раза. В печени и мышцах животных уровень транскриптов всех исследуемых генов при введении ТК снижался в 1,2 раза относительно второй экспериментальной группы. Уменьшение активности и уровня экспрессии ферментов при введении ТК на фоне развития РА, вероятно, происходит благодаря реализации антиоксидантного действия данного соединения, снижающего степень мобилизации ферментов АОС. Таким образом, по-видимому, на уровень экспрессии генов GSR, GPX, СОД и каталазы в тканях животных влияет уровень процессов СО в организме при патологии и действии тиоктовой кислоты на фоне развития РА.



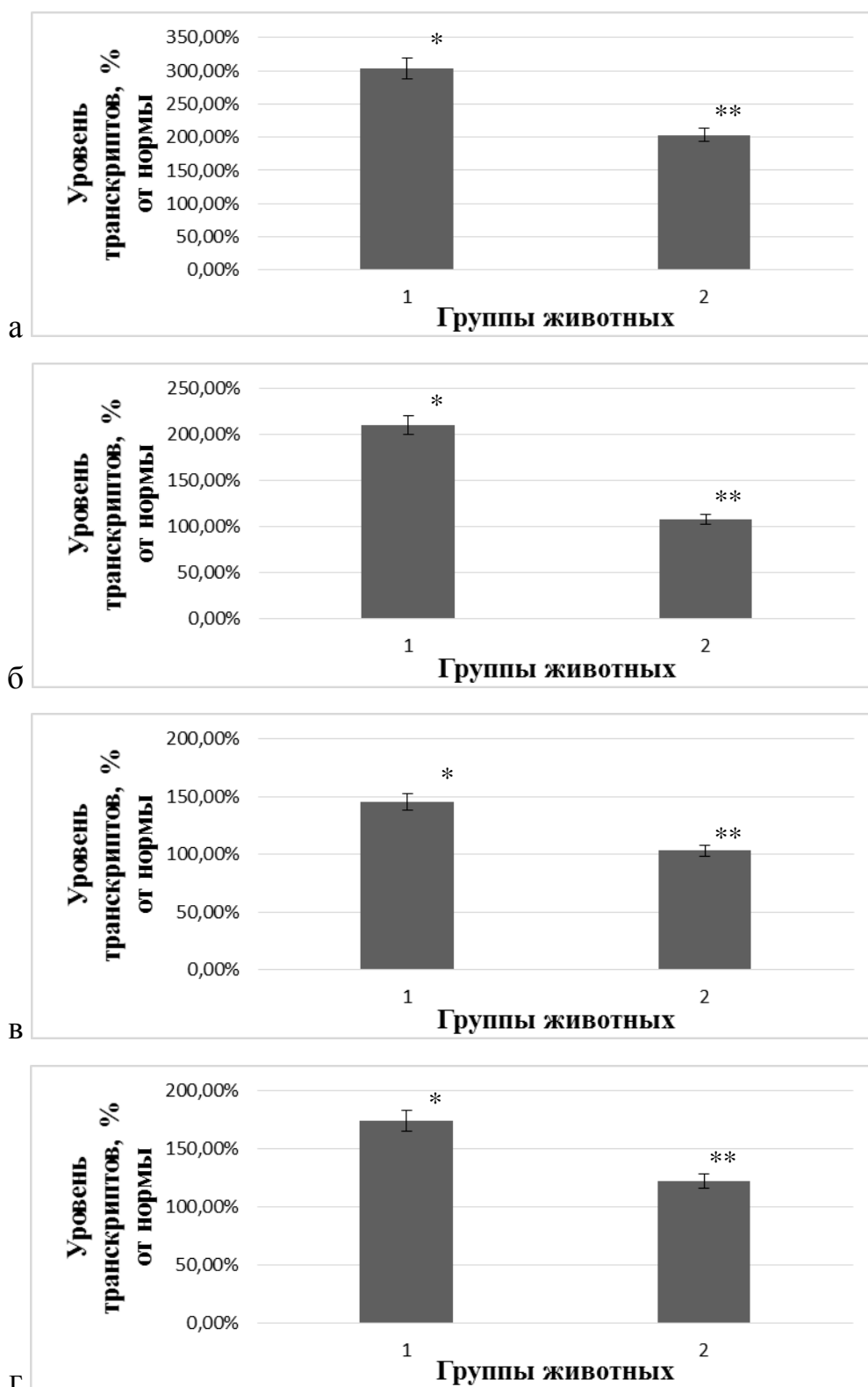


Рис. 30. Уровень транскриптов гена Sod1 в крови (а), сердце (б), печени (в) и мышцах крыс (г) при ревматоидном артрите (1) и введении тиоктовой кислоты на фоне патологии в дозе 70 мг/кг (2), % от нормы

Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны, \*\* - отличия от значений второй группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ )

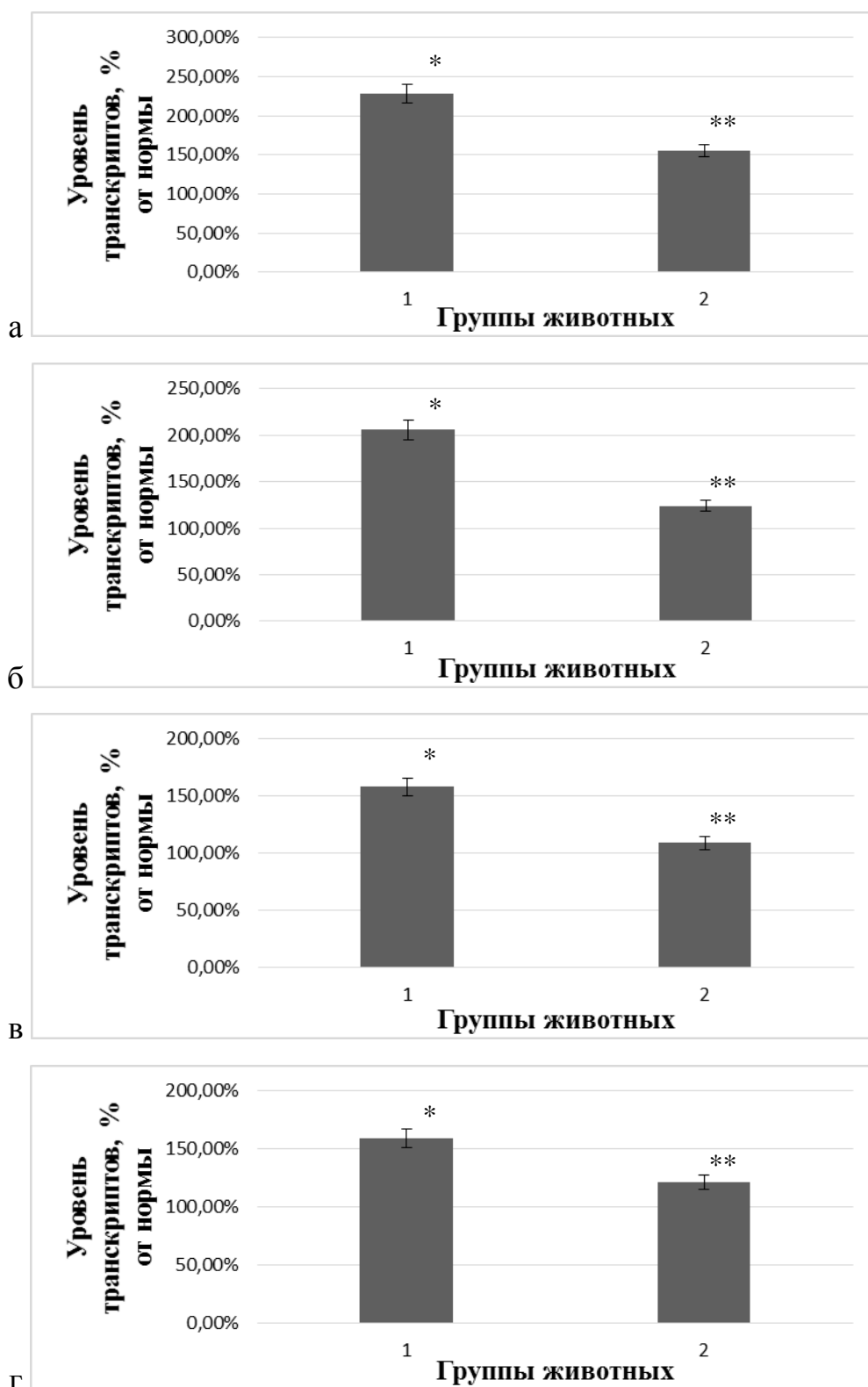


Рис. 31. Уровень транскриптов гена Cat в крови (а), сердце (б), печени (в) и мышцах крыс (г) при ревматоидном артрите (1) и введении тиоктовой кислоты на фоне патологии в дозе 70 мг/кг (2), % от нормы  
Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны, \*\* - отличия от значений второй группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ )

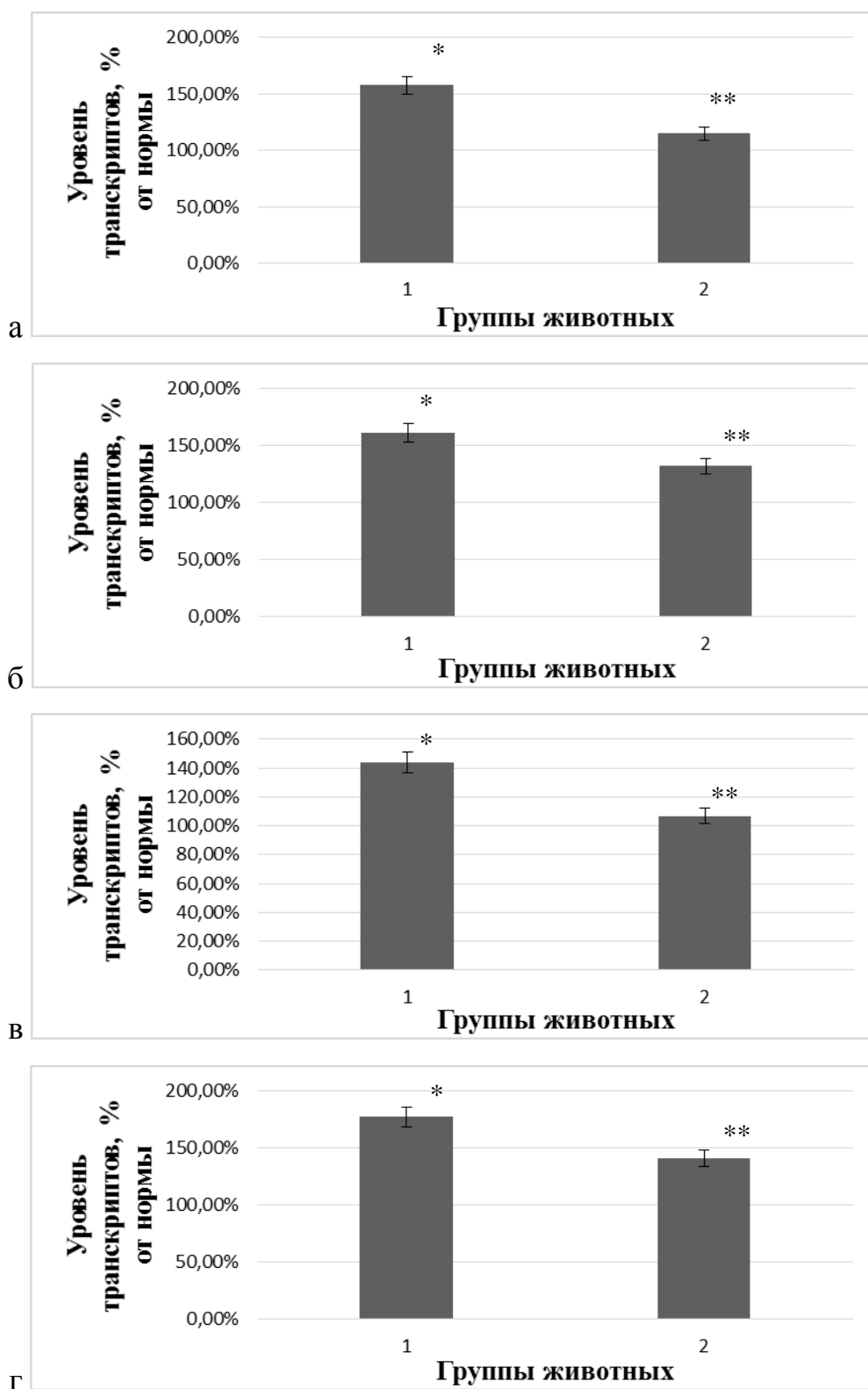


Рис. 32. Уровень транскриптов гена Grx1 в крови (а), сердце (б), печени (в) и мышцах крыс (г) при ревматоидном артрите (1) и введении тиоктовой кислоты на фоне патологии в дозе 70 мг/кг (2), % от нормы

Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны, \*\* - отличия от значений второй группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ )

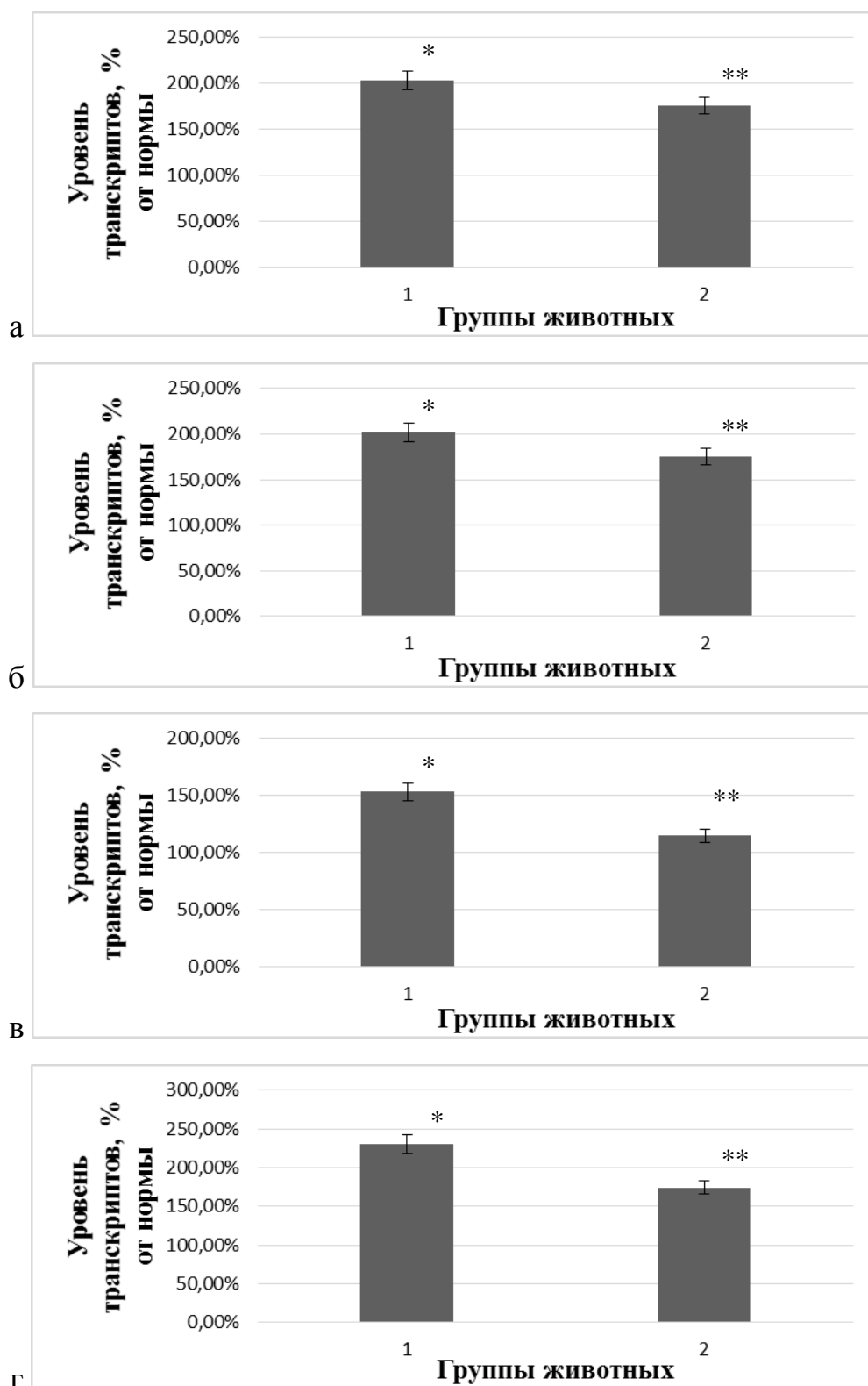


Рис. 33. Уровень транскриптов гена Gsr в крови (а), сердце (б), печени (в) и мышцах крыс (г) при ревматоидном артрите (1) и введении тиоктовой кислоты на фоне патологии в дозе 70 мг/кг (2), % от нормы  
Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны, \*\* - отличия от значений второй группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ )

Специфичность амплификации генов-мишеней при проведении ПЦР подтверждали плавлением продуктов реакции в диапазоне температур от 50 до 95° С после основных циклов. Кроме того, детекция продуктов амплификации осуществлялась методом электрофореза. Исходя из полученных данных, кривые плавления продуктов ПЦР соответствуют стандартному виду, при котором продукту амплификации каждой отдельной мишени соответствует ярко выраженный температурный пик (рис. 34). Электрофореграммы продуктов амплификации подтверждали результаты плавления и свидетельствовали о специфичности ПЦР (рис. 35).

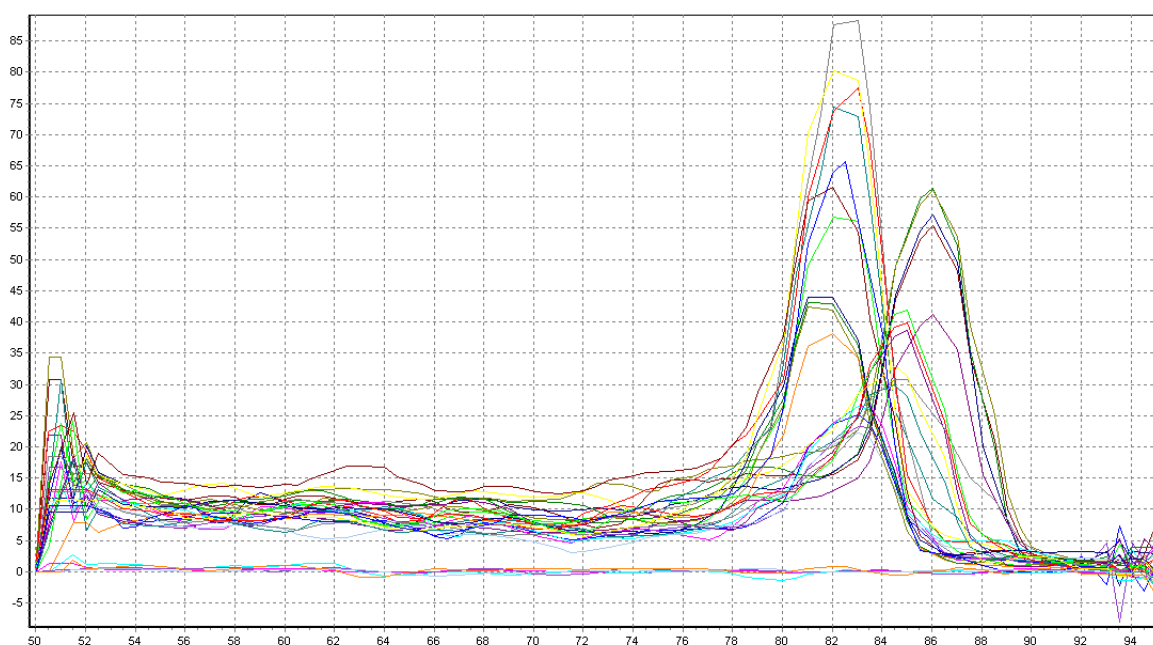


Рис. 34. Температурные кривые плавления продуктов амплификации при постановке ПЦР.

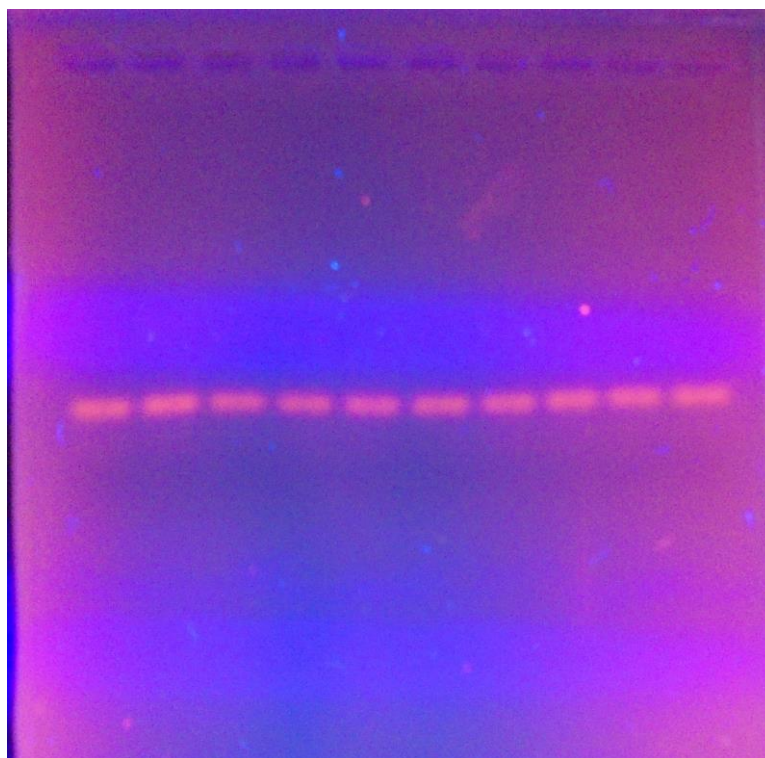


Рис. 35. Электрофореграмма продуктов амплификации ПЦР.

#### 5.4. Активность некоторых НАДФН-генерирующих ферментов в тканях крыс при ревматоидном артрите и воздействии тиоктовой кислоты

В процессе функционирования ферментов глутатионового редокс-цикла при детоксикации АФК происходит окисление GSH, который затем восстанавливается за счет НАДФН. Основными источниками данного соединения для глутатионовой АОС являются Г6ФДГ – один из ключевых ферментов пентозофосфатного пути, и НАДФ-ИДГ [54].

Результаты, полученные в ходе работы показали, что активность Г6ФДГ возрастала при развитии РА, что согласуется с данными по активности GSR при данной патологии. Так, активность Г6ФДГ, выраженная в Е/мл сыворотки, поднималась в 2,7 раза, а активность фермента, представленная в Е/г массы ткани, увеличивалась в сердце в 1,3 раза, в печени и мышцах крыс – в 1,2 раза относительно контроля (рис. 36). Возрастала при РА и удельная активность Г6ФДГ в сыворотке крови, сердце, печени и мышцах животных в 3,0, 1,5, 1,4 и 1,6 раза (рис. 9 приложения).

Помимо этого, развитие патологии сопровождалось ростом в сыворотке крови, печени и мышцах крыс активности НАДФ-ИДГ. Так, в сыворотке крови активность данного фермента, выраженная в Е/мл, увеличивалась в 1,9 раза, а активность НАДФ-ИДГ, представленная в виде Е/г сырой массы ткани мышц возрастала в 1,1 раза. При этом, изменения данного показателя в печени крыс при развитии РА не достоверно отличались от значений контрольной группы (рис. 37). Судя по всему, увеличение активности исследуемых ферментов могло иметь важное адаптивное значение в связи с возрастанием потребности в НАДФН глутатионовой АОС при интенсификации процессов СО на фоне РА. Однако, в сердце крыс при развитии патологии НАДФ-ИДГ проявляла тенденцию к уменьшению своей активности, представленной как в виде Е/г сырой массы ткани, так и в Е/мг белка. Данные показатели снижались у крыс второй экспериментальной группы относительно контроля в 1,7 и 1,5 раза соответственно (рис. 37, рис. 10 приложения). Как известно, способность миокарда к непрерывной работе в течение всей жизни организма обеспечивается наличием большого количества митохондрий по сравнению с другими органами и тканями (суммарный объем митохондрий по отношению к общему объему клетки превышает 30%). Так, в миокарде ресинтез АТФ должен происходить намного интенсивнее, чем в скелетной мускулатуре, поскольку содержание АТФ и креатинфосфата в сердечной мускулатуре ниже, чем в скелетной, а расход АТФ достаточно велик [5]. При этом, как известно, именно митохондрии являются главными источниками АФК в клетке, т.к. эти реактивные частицы могут быть образованы как побочные продукты при работе электротранспортной цепи митохондрий [38]. Кроме того, основным биоэнергетическим субстратом в сердце млекопитающих являются жирные кислоты, которые легко подвергаются окислению. Отмечается, что свободные жирные кислоты могут ингибировать окисление глюкозы в миокарде [348,398]. Нельзя исключить, что данная особенность метаболизма в сердечной мышце может являться дополнительным фактором,

способствующим высокой скорости протекания ПОЛ в миокарде. Снижение активности НАДФ-ИДГ в сердце животных могло быть связано с воздействием на данный фермент 4-гидроксиноненаль – конечного продукта пероксидного окисления омега-6 полиненасыщенных жирных кислот, образующегося при ряде патологий, сопряженных с ОС, в том числе при РА. В настоящее время имеются литературные данные, свидетельствующие о том, что 4-гидроксиноненаль способен накапливаться в сердечной ткани в условиях развития адьювант-индуцированного артрита и образовывать аддукт с НАДФ-ИДГ, инактивируя тем самым данный фермент [311].

Введение крысам с РА ТК способствовало нормализации параметров, характеризующих активность Г6ФДГ в исследуемых тканях. Так, наибольший эффект достигался при применении протектора в дозе 70 мг\кг: активность фермента, выраженная в Е/мл сыворотки крови, снижалась в 1,9 раза, а активность, представленная в виде Е/г сырой массы, в сердце уменьшалась в 1,3 раза, в печени и мышцах – в 1,2 раза (рис. 36). Удельная активность Г6ФДГ в данных условиях падала в сыворотке крови, сердце, печени и мышцах крыс в 2,2, 1,5, 1,3 и 1,1 раза соответственно относительно животных второй экспериментальной группы (рис. 9 приложения). Кроме этого, при введении ТК происходило снижение активности НАДФ-ИДГ в сыворотке крови крыс и повышение данного параметра в сердце животных, таким образом указанные показатели изменялись в сторону контрольных значений. Так, при использовании протектора в максимальной дозировке, активность фермента, выраженная в Е/мл сыворотки крови, падала в 1,6 раза, а удельная активность – в 1,8 раза. В то же время, в сердце животных активность НАДФ-ИДГ, как представленная в виде Е/г массы ткани, так и удельная, увеличивалась в 1,5 раза (рис. 37, рис. 10 приложения). По-видимому, уменьшение исследуемых параметров при введении ТК на фоне развития РА может быть следствием снижения потребности в поставке НАДФН для работы глутатионовой АОС. В сердце животных, судя по всему, под воздействием протектора происходило снижение интенсивности ПОЛ и



образования 4-гидроксиноненаля, что и приводило к нормализации активности НАДФ-ИДГ.

В печени и мышцах крыс с РА введение ТК в дозах 16 и 35 мг\кг веса тела не приводило к существенным изменениям активности НАДФ-ИДГ. При этом, использование максимальной дозы протектора способствовало росту в мышцах крыс активности фермента, выраженной в Е/г сырой массы в 1,6 раза, а удельной активности – в 1,5 раза относительно животных с РА. В печени крыс оба параметра увеличивались в 1,5 раза (рис. 37, рис. 10 приложения). Возрастание активности НАДФ-ИДГ в печени и мышцах крыс выше контрольных значений в условиях введения ТК в дозе 70 мг/кг могло быть обусловлено активирующим воздействием данного соединения на  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназу ( $\alpha$ -КГДГ). Данная система осуществляет образование сукцинил-СоА из 2-оксоглутарата, который поставляется реакцией, катализируемой ИДГ. Известно, что в условиях ОС  $\alpha$ -КГДГ способна обратимо инактивироваться путем глутатионилирования сульфгидрильных групп ТК – ковалентно связанного кофактора данного фермента. Реактивация  $\alpha$ -КГДГ после восстановления нормальных условий осуществляется глутаредоксином. По-видимому, введение ТК в дозе 70 мг/кг способствовало существенному снижению интенсивности СО, а также увеличению пула кофактора  $\alpha$ -КГДГ, что приводило к интенсификации превращения 2-оксоглутарата и, соответственно, изоцитрата. В мышцах более значимое увеличение активности НАДФ-ИДГ на фоне введения ТК происходило, по-видимому, вследствие отсутствия эффекта обратимого ингибирования посредством глутатионилирования  $\alpha$ -КГДГ-комплекса в скелетной мускулатуре [176,246]. Данный аспект можно объяснить тем, что гепатоциты, в отличие от миоцитов, являются главными поставщиками GSH, процесс синтеза этого тиола *de novo* в печени происходит наиболее активно, и по-видимому в данной ткани имеется достаточно резервов для осуществления процесса глутатионилирования.

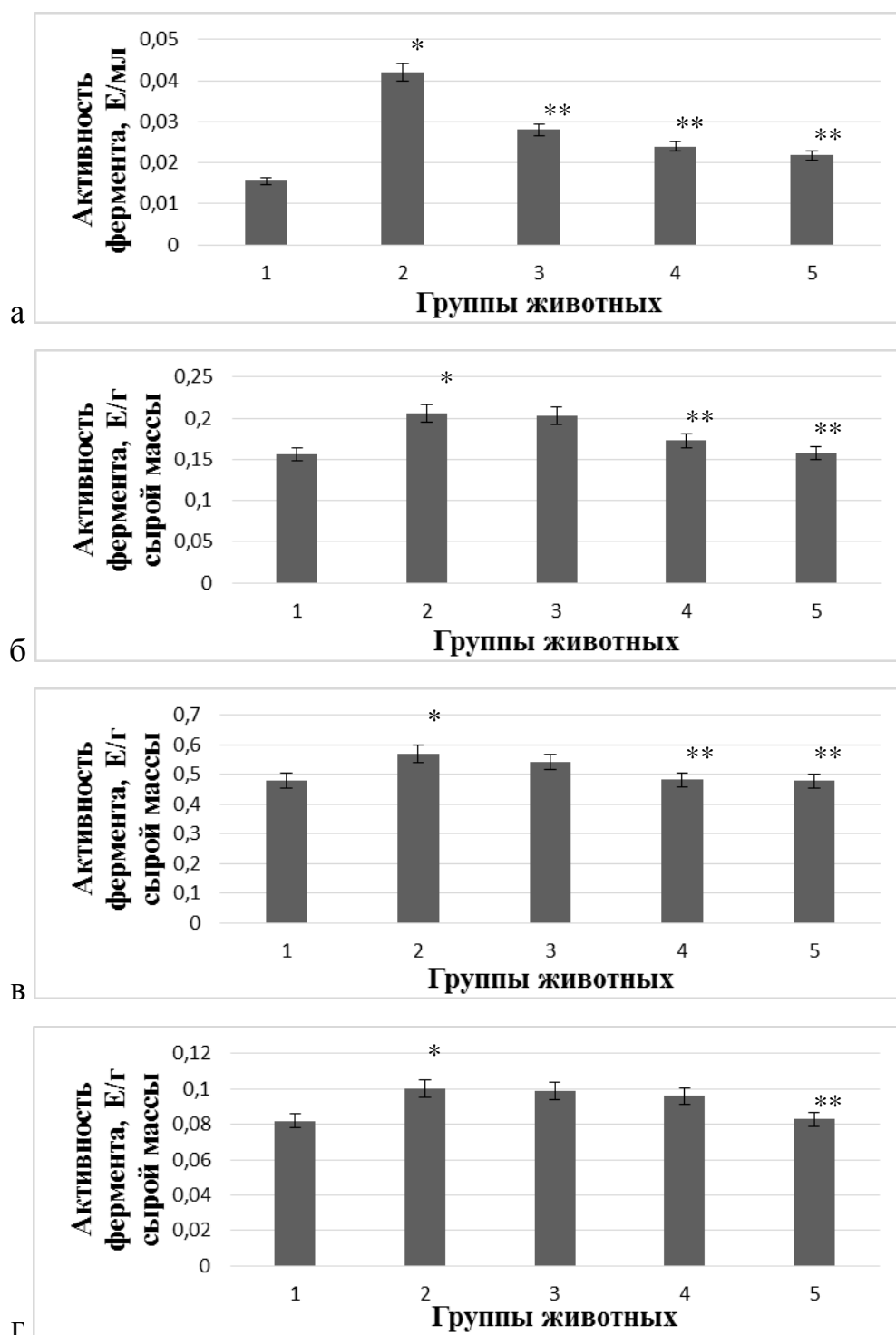


Рис. 36. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, выраженная в Е/мл сыворотки крови (а), и представленная в Е/г сырой массы ткани сердца (б), печени (в) и мышц крыс (г) в норме (1), при развитии ревматоидного артрита (2) и введении тиоктовой кислоты на фоне патологии в дозе 16 (3), 35 (4) и 70 (5) мг/кг веса животного

Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны, \*\* - отличия от значений второй группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ )

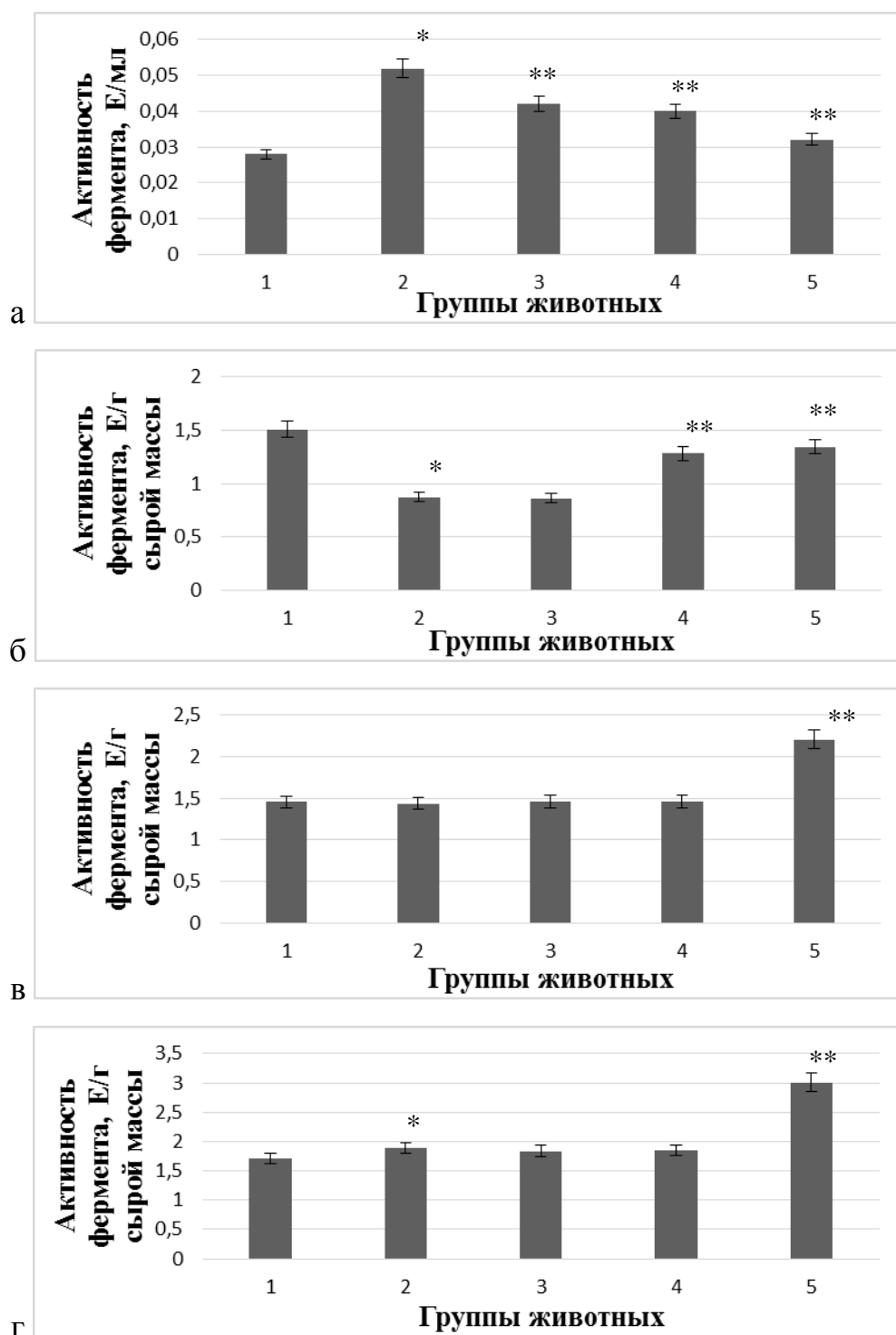


Рис. 37. Активность НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы, выраженная в Е/мл сыворотки крови (а), и представленная в Е/г сырой массы ткани сердца (б), печени (в) и мышц крыс (г) в норме (1), при развитии ревматоидного артрита (2) и введении тиоктовой кислоты на фоне патологии в дозе 16 (3), 35 (4) и 70 (5) мг/кг веса животного

Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны, \*\* - отличия от значений второй группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ )

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование динамики развития РА на основе маркерных показателей и ряда параметров свободнорадикального гомеостаза показало, что максимальная интенсивность патологического процесса приходится на 15 день после введения полного адьюванта Фрейнда, что согласуется с литературными данными [163]. Применение ТК на фоне патологии приводило к изменению маркерных показателей в сторону контрольных значений, что, по-видимому, обусловлено наличием у молекулы протектора антиоксидантных свойств, а также способности снижать тяжесть аутоиммунных заболеваний и интенсивности воспаления путем ингибирования транскрипционного фактора Nf-kB [187,246,402].

Развитие РА у лабораторных животных характеризовалось интенсификацией СО и мобилизацией АОС. Было показано, что при индукции данной патологии увеличивались значения показателей биохемилюминесценции и содержания ДК в тканях крыс. По-видимому, полученные данные свидетельствовали о чрезмерной генерации АФК, играющих важную роль в патогенезе РА и являющихся триггером аутоиммунной реакции [335]. Накопление первичных продуктов ПОЛ происходило при этом вследствие окисления биологических молекул образовавшимися свободными радикалами. Наблюдалось также угнетение активности АГ вследствие разрушения АФК железо-серного кластера активного центра, и накопление цитрата – основного субстрата данного фермента. Введение ТК на фоне патологии приводило к уменьшению параметров, характеризующих интенсивность СО, восстановлению активности АГ и снижению содержания цитрата. По-видимому, благоприятный эффект исследуемое соединение оказывало благодаря способности как непосредственно обезвреживать АФК и хелатировать ионы металлов переменной валентности, так и участвовать в регенерации других антиоксидантов и [172,187,244,361].

Кроме того, развитие патологии, сопровождалось активацией апоптотических процессов, что выражалось в соответствующих изменениях электрофореграмм ДНК и активности каспаз в тканях крыс РА. Усиление данного процесса происходило, по-видимому, под действием свободных радикалов, генерируемых в большом количестве в процессе патогенеза РА. Использование ТК в качестве протектора способствовало уменьшению интенсивности апоптотических процессов, что может быть связано как с антиоксидантной активностью данного соединения, так и с наличием у него антиапоптотических свойств [152,373].

Индукция РА приводила к росту активности СОД и каталазы в исследуемых тканях животных, что являлось защитной реакцией организма на чрезмерную генерацию АФК гранулоцито-макрофагальными клетками в процессе патогенеза данного заболевания. Для тканей крыс, которым вводили ТК в качестве протектора, была характерна более низкая активность анализируемых ферментов, по сравнению с животными с патологией, что могло являться следствием снижения нагрузки на данные защитные системы. Так, помимо непосредственного антиоксидантного эффекта исследуемое соединение может усиливать биосинтез GSH, а также снижать экспрессию субъединиц фермента НАДФН-оксидазы, играющей важную роль в генерации АФК при иммунном ответе [172,384].

При развитии РА происходило повышение активности GPX и GSR, что имело важное адаптивное значение для формирования клеточного ответа на развитие ОС. Концентрация GSH при этом снижалась в исследуемых тканях крыс вследствие его расходования для детоксикации АФК. Уменьшалась также и активность GST в условиях дефицита основного субстрата данного фермента – GSH. Введение ТК способствовало нормализации исследуемых параметров, что происходило, видимо, благодаря снижению нагрузки на ферменты глутатионового редокс-цикла и уменьшению степени дисбаланса глутатионовой АОС. Увеличение концентрации GSH выше контрольных значений в печени лабораторных животных, получавших максимальную дозу

протектора, по-видимому, было связано со способностью ТК активизировать биосинтез данного тиола, главным источником которого выступают гепатоциты.

Данные, полученные в ходе исследования показали, что развитие патологии сопровождалось увеличением уровня транскриптов генов ферментов СОД, каталазы, GPX и GSR, что могло выступать в качестве одного из механизмов возрастания их активности в условиях окислительного стресса. Введение ТК, проявляющей протекторные свойства в условиях интенсификации СО, сопровождалось уменьшением уровня транскриптов генов анализируемых ферментов, что согласуется с данными по изменению их активности.

Индукция РА приводила к увеличению активности НАДФ-ИДГ и Г6ФДГ в большинстве исследуемых тканей животных, что могло быть следствием возрастания потребности в НАДФН глутатионовой АОС. В сердце крыс уменьшение активности НАДФ-ИДГ происходило, по-видимому, вследствие образования неактивного аддукта между данным ферментом и 4-гидроксиноненалем – продуктом ПОЛ. Введение ТК способствовало нормализации активности исследуемых ферментов благодаря снижению потребности GSR в НАДФН, а также уменьшению интенсивности СО в тканях животных. Увеличение активности НАДФ-ИДГ в печени и мышцах крыс выше контрольных значений после введения протектора в максимальной дозе могло являться следствием активирующего воздействия ТК на  $\alpha$ -КГДГ-комплекс, сопряженного с усилением образования изоцитрата – субстрата ИДГ.

Воздействие исследуемого протектора на окислительно-восстановительный гомеостаз лабораторных животных носило дозозависимый характер, наибольший эффект ТК оказывала в дозировке 70 мг/кг.

На основании проведенного исследования была предложена гипотетическая схема, отражающая основные механизмы регуляции

свободнорадикального гомеостаза под воздействием ТК (схема 1). Так, тестируемое биологически активное соединение, являющееся кофактором для пируватдегидрогеназного и 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса (на схеме ПДГК и 2-ОГДГК соответственно), с помощью НАДН или НАДФН быстро превращается в восстановленную форму –ДГЛК, которая выполняет множество биологических функций. Данное соединение является мощным антиоксидантом, хелатором ионов металлов переменной валентности, способно восстанавливать окисленные формы других антиоксидантов, таких как витамин С, Е, глутатион, тиоредоксин, убихинон. ТК также выступает в роли скавенджера АФК благодаря напряженной конформации 5-членного кольца с внутримолекулярной дисульфидной связью, причем свою антиоксидантную активность данное вещество способно проявлять как в липидной, так и водной фазе [172,187,244,361]. Кроме того, исследуемое соединение способно снижать экспрессию НАДФН-оксидазы, играющей важнейшую роль в генерации АФК при РА, а также транскрипционно усиливать биосинтез GSH и уменьшать интенсивность воспалительного процесса [172,187,246,302,384]. Проявление ТК протекторных свойств при патологии способствовало снижению интенсивности ОС и апоптотических процессов, уменьшению нагрузки на АОС. Таким образом, показана возможность регуляции свободнорадикального гомеостаза в условиях развития РА при помощи ТК, что может представлять значительный интерес с точки зрения фармакологической коррекции метаболических нарушений при данном патологическом состоянии.

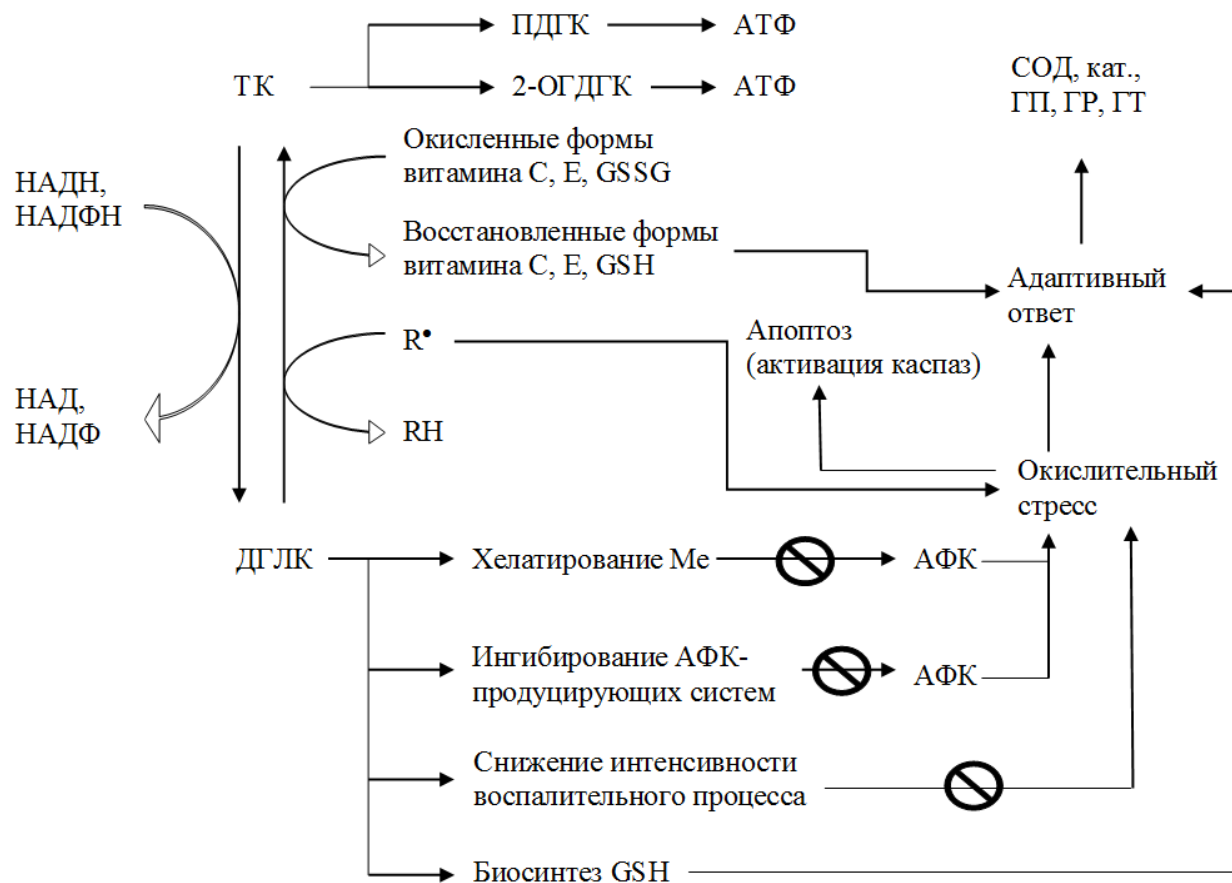


Схема 1. Регуляция свободнорадикального гомеостаза под воздействием тиоциановой кислоты в условиях развития ревматоидного артрита.



## ВЫВОДЫ

1. Наибольшая активность патологического процесса, а также максимальные значения показателей состояния окислительно-восстановительного гомеостаза: параметры биохемилюминесценции, содержание диеновых конъюгатов и восстановленного глутатиона, активность каталазы и аконитатгидратазы, достигаются на 15 день после индукции ревматоидного артрита, вызванной введением полного адьюванта Фрейнда экспериментальным животным.

2. Введение тиоктовой кислоты на фоне развития ревматоидного артрита приводило к снижению в крови экспериментальных животных скорости оседания эритроцитов, а также содержания ревматоидного фактора, циркулирующих иммунных комплексов, иммуноглобулинов класса А, М и G, возраставшего при индукции патологии. Наблюдаемые изменения маркерных показателей развития ревматоидного артрита свидетельствуют о наличии у исследуемого соединения протекторных и противовоспалительных свойств. Наибольший эффект в большинстве случаев оказывало введение тиоктовой кислоты в дозе 70 мг\кг веса тела животного.

3. Под воздействием тиоктовой кислоты снижалась интенсивность свободнорадикального окисления, о чем свидетельствовало уменьшение показателей биохемилюминесценции и содержания диеновых конъюгатов в тканях лабораторных животных, а также нормализация активности аконитатгидратазы – чувствительной мишени действия активных форм кислорода.

4. Использование тиоктовой кислоты в качестве протектора приводило к снижению степени фрагментации ДНК и активности каспаз в тканях животных экспериментальных групп, что может быть связано с наличием у данного соединения антиапоптотических свойств и способности тормозить процессы свободнорадикального окисления.

5. Показано, что введение тиоктовой кислоты приводило к уменьшению активности супероксиддисмутазы и каталазы в исследуемых тканях крыс, что могло свидетельствовать о снижении нагрузки на антиоксидантную систему под воздействием исследуемого протектора.

6. При введении тиоктовой кислоты происходило снижение активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы, а также возрастание активности глутатионтрансферазы и содержания восстановленного глутатиона. Таким образом, использование данного протектора способствовало изменению исследуемых параметров в направлении контрольных значений путем снижения мобилизации и степени дисбаланса глутатионовой антиоксидантной системы.

7. Под воздействием тиоктовой кислоты в тканях экспериментальных животных происходило уменьшение уровня транскриптов генов ферментов супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы, увеличение уровня которых при развитии ревматоидного артрита являлось, по-видимому, одним из механизмов повышения активности данных ферментов в ответ на интенсификацию свободнорадикального окисления.

8. Введение тиоктовой кислоты сопровождалось нормализацией активности НАДФ-изоцитратдегидрогеназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в тканях крыс вследствие снижения потребности поставки НАДФН для глутатионовой антиоксидантной системы, обезвреживающей активные формы кислорода. Возрастание активности НАДФ-изоцитратдегидрогеназы выше контрольных значений при применении протектора в максимальной дозе в печени и мышцах крыс могло быть следствием активирующего воздействия исследуемого протектора на  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназный комплекс.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Александрова Е.Н. Современные стандарты лабораторной диагностики ревматических заболеваний / Е.Н. Александрова, А.А. Новиков, Е.Л. Насонов // Научно-практическая ревматология. – 2013. – Т. 51, № 4. – С. 368-376.
2. Анисимов В.Е. Биохимия и клиническое применение липоевой кислоты (витамина N) / В.Е. Анисимов. – Казань: Изд. Казан. ун-та, 1969. – 115 с.
3. Афанасьев В.Г. К микрометоду определения лимонной кислоты в сыворотке крови с помощью фотоэлектроколориметра / В.Г. Афанасьев, В.С. Зайцев, Т.И. Вольфсон // Лаб. дело. – 1973. – № 4. – С. 115-116.
4. Барабой В.А. Растительные фенолы и здоровье человека / В.А. Барабой. — М.: Наука, 1984. – 160 с.
5. Березов Т.Т. Биологическая химия / Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. – М.: Медицина, 2008. – 704 с.
6. Брусков В.И. Образование активных форм кислорода под действием тепла при восстановлении растворённого кислорода воздуха / В.И. Брусков, Ж.К. Масолимов, А.В. Черников // Доклады Академии Наук. – 2001. – Т. 381, № 2. – С. 262 – 264.
7. Вершинин В.И. Аналитическая химия / В.И. Вершинин, И.В. Власова, И.А. Никифорова. – М.: Академия, 2011. – 444 с.
8. Визель А.О. Новый аспект фармакологического подхода к соединениям фосфора. Димефосфон / А.О. Визель, Р.С. Гараев., отв. ред. О.Г. Синяшин. – Казань: Печать-Сервис-XXI век, 2012. – 189 с.
9. Влияние мелатонина на оксидативный статус, содержание цитрата и активность аконитатгидратазы в печени крыс при токсическом гепатите/ А.Н. Пашков [и др.] // Проблемы эндокринологии. – 2005. – Т.51, №6. – С.41-43.
10. Волоскова А.В. Исследование влияния различных доз тиоктовой кислоты на активность глутатионовой системы в печени крыс в норме и

при экспериментальном токсическом гепатите / А.В. Волоскова, Т.Н. Попова, Л.В. Матасова // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация – 2005. – №1. – С. 87-90.

11. Гриневич Ю.А. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных / Ю.А. Гриневич, А.Н. Алферов // Лаб. дело. – 1981. – 8. – С.493.
12. Диагностическое значение антител к модифицированному циклическому виментину при раннем ревматоидном артрите / А.А. Новиков [и др.] // Клин. Лаб. Диагност. – 2008. – Т. 8. – С. 27—29.
13. Дмитриев В.А. Сравнительная характеристика фармакокинетики, клинической эффективности и безопасности генерических препаратов диклофенака и ибупрофена: автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. мед. Наук: 14.00.25 / Дмитриев Виктор Александрович; «Клин. фарм.» ГУ Науч. центр биомед. технол. РАМН. – Москва, 2008. – 21 с.
14. Дубинина Е.Е. Антиоксидантная система плазмы крови / Е.Е. Дубинина // Укр. Биохим. Журн. – 1992. – Т. 64, № 2. – С. 3 – 15.
15. Журавлев А.И. Биохемиллюминесценция / А.И. Журавлев. – М.: Наука, 1983. – 298 с; Хемилюминесцентные методы в оценке свободнорадикальных реакций / В.А. Косолапов, О.В. Островский, А.А. Спасов // Клиническая и лабораторная диагностика. – 1999. – Т. 9. – С. 41.
16. Зинчук И.Ю. Социальное бремя ревматоидного артрита / И.Ю. Зинчук, В.Н. Амирджанова // Научно-практическая ревматология. – 2014. – Т. 52, № 3. – С. 331-335.
17. Интенсивность свободнорадикального окисления и каталитические свойства NADP-изоцитратдегидрогеназы в печени крыс в норме и при токсическом гепатите / Е.М. Андреещева [и др.] // Биомедицинская химия. – 2006. – Т. 52, Вып. 2. – С.153-160.
18. Инфликсимаб в российской клинической практике/ Г.В. Лукина [и др.] // Современная ревматология. – 2012. – №3 – С. 37-43.

19. Кайдашев И.П. Роль апоптоза в развитии аутоиммунных заболеваний / И.П. Кайдашев // Клиническая иммунология. Аллергология. Инфектология. – 2008. – №6. – С. 38-46.
20. Калаева Е.А. Теоретические основы и практическое применение математической статистики в биологических исследованиях и образовании / Е.А. Калаева, В.Г. Артюхов, В.Н. Калаев. – Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2016. – 283 с.
21. Калинина Т.С. Уровень мРНК фермента апоптоза-каспазы-3 в стволе и коре головного мозга крыс в постнатальном онтогенезе / Т.С. Калинина, А.В. Баннова, Н.Н. Дыгало // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2002. – Т. 134, № 12. – С. 641–644.
22. Каратеев А.Е. Применение нестероидных противовоспалительных препаратов. Клинические рекомендации / А.Е. Каратеев, Е.Л. Насонов // РМЖ. – 2006. – Т. 14, № 25. – С. 1769-1778.
23. Кинетические свойства глутатионредуктазы из печени крыс в норме и при экспериментальном токсическом гепатите / А.А. Агарков [и др.] // Вестник ВГУ, серия: химия, биология, фармация. – 2007. – №2. – С. 59-63.
24. Кишкун А.А. Доказательная лабораторная медицина / А.А. Кишкун, С.Л. Арсенин, О.Л. Кольченко // Клин. Лаб. Диагност. – 2005. – Т. 5. – С. 24—32.
25. Костюк В.А. Биорадикалы и биоантиоксиданты / В.А. Костюк, А.И. Потапович. – Минск: БГУ, 2004. – 179 с.
26. Куцый М.П. Участие протеаз в апоптозе / М.П. Куцый, Е.А. Кузнецова, А.И. Газиев // Биохимия. – 1999. – Т. 64. – С. 149–163.
27. Левенкова М.В. Особенности регуляции активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы из печени крыс некоторыми углеводами и ди- и трикарбоновыми кислотами при токсическом гепатите / М.В. Левенкова, Т.Н. Попова, А.В. Семенихина // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2006. – №2. – С. 34-36.

28. Лечение ревматоидного артрита. Клинические рекомендации / ред. Е.Л. Насонова. – М.: Алмаз, 2006. – 118 с.
29. Ллойд Э. Справочник по прикладной статистике / Э. Ллойд, У. Ледерман. – М.: Финансы и статистика, 1990. – 525 с.
30. Луговская С.А. Лабораторная гематология / С.А. Луговская, В.В. Долгов. – Тверь: Триада, 2006. – 158 с.
31. Лучихина Е.Л. Актуальные вопросы применения ингибиторов фактора некроза опухоли при ревматоидном артрите/ Е.Л. Лучихина, Д.Е. Каратеев // Современная ревматология. – 2008. – №4 – С. 46-51.
32. Лучихина Е.Л. Прогнозирование и длительное поддержание низкой активности заболевания на фоне терапии генно-инженерными биологическими препаратами при ревматоидном артрите/ Е.Л. Лучихина // Современная ревматология. – 2014. – №2 – С. 55-59.
33. Мазуров В.И. Клиническая ревматология: Руководство для врачей / В.И. Мазуров. – СПб.: Фолиант, 2005. – 488 с.
34. Мартынова Е.А. Регуляция активности каспаз в апоптозе / Е.А. Мартынова // Биоорганическая химия. – 2003. – Т. 29, №5. – С. 518-543.
35. Марусенко И.М. Терапия ревматоидного артрита с применением генно-инженерных биологических препаратов в Республике Карелия / И.М. Марусенко // Современная ревматология. – 2013. – №4 – С. 97-100.
36. Матюшин Б.Н. Определение супероксиддисмутазной активности в материале пункционной биопсии печени при ее хроническом поражении / Б.Н. Матюшин, А.С.Логинов, В.Д. Ткачев // Лаб. дело. – 1991. – № 7. – С. 16-19.
37. Меншикова В.В. Справочник Лабораторные методы исследования в клинике / В.В. Меншикова. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.
38. Меншикова Е.Б. Окислительный стресс при воспалении / Е.Б. Меншикова, Н.К. Зенков // Успехи Современ. Биологии. – 1997. – Т. 117, № 2. – С. 155-157.

39. Мирошниченко О.С. Биогенез, физиологическая роль и свойства каталазы / О.С. Мирошниченко // Биополимеры и клетка. – 1992. – Т 8, № 6. – С. 3–9.
40. Мосесова Н.С. Экспериментальное исследование противовоспалительных свойств мексидола / Н.С. Мосесова, В.Л. Ковалева, Л.И. Ларенцова // Сборник трудов III Всероссийской научно-практической конференции «Образование, наука и практика в стоматологии». – Москва. – 2006. – С. 108-110.
41. Мошкин А.В. Обеспечение качества в клинической лабораторной диагностике / А.В. Мошкин, В.В. Долгов. – М.: Медиздат, 2004. – 216 с.
42. Назаренко Г.И. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований / Г.И. Назаренко, А.А. Кишкун. – М.: Медицина, 2000. – 261 с.
43. Насонов Е.Л. Васкулиты и васкулопатии / Е.Л. Насонов, А.А. Баранов, Н.П. Шилкина. – Ярославль: Верхне-Волжское, 1999. – 48 с.
44. Насонов Е.Л. Лечение ревматоидного артрита: современное состояние проблемы / Е.Л. Насонов // РМЖ. – 2006. – Т. 14, № 8. – С. 573.
45. Насонов Е.Л. Применение генно-инженерных биологических препаратов для лечения ревматоидного артрита: общая характеристика / Е.Л. Насонов, Д.Е. Каратеев // Научно-практическая ревматология. – 2013. – Т. 51, № 2. – С. 163-169.
46. Насонов Е.Л. Современные направления иммунологических исследований при хронических воспалительных и аутоиммунных заболеваниях человека / Е.Л. Насонов // Тер. Арх. – 2001. – Т. 8. – С. 43-46.
47. Николайчик Е.А. Регуляция метаболизма клетки / Е.А. Николайчик. – Минск: БГУ, 2007. – 165 с.
48. Опыт применения тоцилизумаба у больных ревматоидным артритом (по данным многоцентрового исследования ЛОРНЕТ / Е.Ю. Панасюк [и др.] // Научно-практическая ревматология. – 2013. – Т. 51, № 2. – С. 104-110.

49. Перекисное окисление липидов и а-токоферол у больных диффузным токсическим зобом / Р.С. Тишенина [и др.] // Проблемы эндокринологии. – 2000. – Т. 46, № 6. – С. 26 – 28.
50. Ревматология. Клинические рекомендации / ред. Е.Л. Насонова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. – 262 с.
51. Ревматология: национальное руководство / ред. Е.Л. Насонова, В.А. Насоновой. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 720 с.
52. Роль апоптоза в патогенезе ревматоидного артрита - сообщение 2 / А.Н. Богданов [и др.] // Научно-практическая ревматология. – 2006. – Вып. 1. – С. 40-48.
53. Роль свободнорадикальных и метаболических процессов в патогенезе сахарного диабета I типа: монография / А.А. Савченко, Н.М. Титова, Т.Н. Субботина [и др.]. – Красноярск: Сиб. Фед. Ун-т, 2012. – 269 с.
54. Свиридов М.М. Каталитические свойства 6-фосфоглюконатдегидрогеназы из печени крысы в норме и при токсическом гепатите / М.М. Свиридов, А.В. Семенихина, Т.Н. Попова // Биомед. Химия. – 2006. – Т. 52, № 5. – С. 479–488.
55. Свободнорадикальные процессы и антиоксидантная терапия при ишемии головного мозга / Э.Ю. Соловьева [и др.] // Журн. Неврол. Психиат. – 2008. – Т. 108, № 6. – С. 37-42.
56. Современные стандарты фармакотерапии ревматоидного артрита / Е.Л. Насонов [и др.] // Клин. Фарм. Терапия. – 2005. – №1. – С. 72-75.
57. Сочетанная пульс-терапия метотрексатом и дексаметазоном у больных ранним ревматоидным артритом с неблагоприятными прогностическими факторами: открытое рандомизированное исследование / А.Л. Маслянский [и др.] // Научно-практическая ревматология. – 2013. – Т. 51, № 2. – С. 125-131.
58. Специфичность систем антиоксидантной защиты органов и тканей — основа дифференцированной фармакотерапии антиоксидантами / В.Н.



- Бобырев [и др.] // Эксперим. и клин. Фармакология. – 1994. – Т. 57, № 1. – С. 47-54.
59. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот / И.Д. Стальная // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1972. – С. 63-64.
60. Турков М.И. Супероксиддисмутаза: свойства и функции / М.И. Турков // Успехи современной биологии. – 1976. – Т. 81. – Вып. 3. – С. 341-355.
61. Фридович И.В. Радикалы кислорода, пероксид водорода и токсичность кислорода / И.В. Фридович // Свободные радикалы в биологии / Под ред. У. Прайора. М.: Мир, 1979. – Т. 1. – С. 272-314.
62. Хафиз А. Регуляция свободнорадикального гомеостаза при хронической алкогольной интоксикации у крыс: автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. биол. Наук: 03.01.04 / Хафиз Аллекрад; ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет». – Воронеж, 2012. – 24 с.
63. Чичасова Н.В. Инфликсимаб (Ремикейд): возможности в лечении ревматоидного артрита / Н.В. Чичасова // Современная ревматология. – 2011. – №1 – С. 67-75.
64. Шульгин К.К. Получение и свойства глутатионпероксидазы / К.К. Шульгин, Т.Н. Попова, Т.И. Рахманова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2008. – Т.44, №3. – С. 276-280.
65. Эффективность лечения инфликсимабом резистентных форм ювенильного ревматоидного артрита / Е.И. Алексеева [и др.] // Вопросы современной педиатрии. – 2006 – Т. 5, № 2 – С.20-30.
66. Ярилин А.А. Апоптоз. Природа феномена и его роль в целостном организме / А.А. Ярилин // Патол. Физиол. Эксп. Терап. – 1998. – Т. 2. – С. 38-48.
67. 1-alpha,25-dihydroxyvitamin D3 (1,25(OH)(2)D(3)) hampers the maturation of fully active immature dendritic cells from monocytes / M.O. Canning [et al.] // Eur. J. Endocrinol. – 2001. – V. 145. – P. 351–357.

68. 4-Hydroxynonenal: A Membrane Lipid Oxidation Product of Medicinal Interest / G. Poli [et al.] // *Med. Res. Rev.* – 2008. – V. 28, № 4. – P. 569-631.
69. A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P / G. Takebe [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – P. 41254–41258.
70. A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis / L. Padyukov [et al.] // *Arthritis and rheumatism.* – 2004. – V. 50. – P. 3085–3092.
71. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: Smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination / L. Klareskog [et al.] // *Arthritis and rheumatism* – 2006. – V. 54. – P. 38–46.
72. A retrospective cohort study of cigarette smoking and risk of rheumatoid arthritis in female health professionals / E.W. Karlson [et al.] // *Arthritis and rheumatism.* – 1999. – V. 42. – P. 910–917.
73. Aaseth J. Rheumatoid arthritis and metal compounds – perspectives on the role of oxygen radical detoxification / J. Aaseth, M. Haugen, O. Forre // *Analyst.* – 1998. – №123. – P. 3-6.
74. Aberrant reactive oxygen and nitrogen species generation in rheumatoid arthritis (RA): causes and consequences for immune function, cell survival, and therapeutic intervention / D.C. Phillips [et al.] // *Antioxidants and Redox Signaling.* – 2010. – V. 12, № 6. – P. 743–785.
75. Activin A induces cell proliferation of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis / F. Ota [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2003. – V. 48. – P. 2442—2449.
76. Acute-phase serum amyloid A stimulation of angiogenesis, leukocyte recruitment, and matrix degradation in rheumatoid arthritis through an NFkappaB-dependent signal transduction pathway / R. Mullan [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2006. – V. 54. – P. 105—114.

77. Adjuvant treatment of recent onset rheumatoid arthritis by selenium supplementation: preliminary observations / A. Peretz [et al.] // *Br. J. Rheumatol.* – 1992. – V. 31, № 4. – P. 281–282.
78. Advanced glycation end-products: a review / R. Singh [et al.] // *Diabetologia.* – 2001. – V. 44, № 2. – P. 129–146.
79. Akerboom, T. P. M. The relationship of biliary glutathione disulfide efflux and intracellular glutathione disulfide content in perfused rat liver / T. P. M. Akerboom, M. Bilzer, H. Sies // *J. Biol. Chem.* – 1982. – V. 257. – P. 4248-4256.
80. An ACR20 response is not required for inhibition of structural damage progression by abatacept / H. Genant [et al.] // *Arthr. Rheum.* – 2005. – V. 52. – P. 738-739.
81. Antibodies of, IgG, IgA and IgM isotypes against cyclic citrullinated peptide precede the development of rheumatoid arthritis / H. Kokkonen [et al.] // *Arthritis research & therapy.* – 2010. – V. 13. – R13.
82. Antibody response to the human stress protein BiP in rheumatoid arthritis / M. Bodman-Smith [et al.] // *Rheumatology (Oxford)* – 2004. – V. 43. – P. 1283—1287.
83. Anti-Cyclic Citrullinated Peptide versus Anti-Sa Antibodies in Diagnosis of Rheumatoid Arthritis in an Outpatient Clinic for Connective Tissue Disease and Spondyloarthritis / F. Lopez-Longo [et al.] // *J. Rheumatol.* – 2006. – V. 33. – P. 1476—1481.
84. Anti-inflammatory effects of leflunomide on cultured synovial macrophages from patients with rheumatoid arthritis / M. Cutolo [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 2003. – V. 62, № 4. – P. 297–302.
85. Antioxidant enzymes; possible mechanism of gold compound treatment in rheumatoid arthritis / A.A. Kerimova [et al.] // *Pathophysiology.* – 2000. – V. 7, № 3. – P. 209–213.

86. Antioxidant micronutrients and risk of rheumatoid arthritis in a cohort of older women / J.R. Cerhan [et al.] // *Am. J. Epidemiol.* – 2003. – V. 157. – P. 345–354.
87. Antioxidants and antiinflammatory dietary supplements for osteoarthritis and rheumatoid arthritis / C.C. Rosenbaum [et al.] // *Altern. Ther. Health Med.* – 2010. – V. 16, № 2. – P. 32-40.
88. Antioxidants inhibit tumor necrosis factor-alpha mediated stimulation of interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1, and collagenase expression in cultured human synovial cells / M. Sato [et al.] // *J. Rheumatol.* – 1996. – V. 23, № 3. – P. 432–438.
89. Antioxidants suppress mortality in the female NZB x NZW F1 mouse model of systemic lupus erythematosus (SLE) / S. Suwannaroj [et al.] // *Lupus.* – 2001. – V. 10, № 4. – P. 258–265.
90. Anti-Sa sera from patients with rheumatoid arthritis contain at least 2 different subpopulations of anti-Sa antibodies / M. Escalona [et al.] // *J. Rheumatol.* – 2002. – V. 29. – P. 2053—2060.
91. Apoptosis in the rheumatoid arthritis synovial membrane: modulation by disease-modifying anti-rheumatic drug treatment / M.D. Smith [et al.] // *Rheumatology.* – 2010. – V. 49. – P. 862–875.
92. Arnson Y. Vitamin D and autoimmunity: new aetiological and therapeutic considerations / Y. Arnson, H. Amital, Y. Shoenfeld // *Ann. Rheum. Dis.* – 2007. – V. 66. – P. 1137–1142.
93. Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme / I. Matsumoto [et al.] // *Science.* – 1999. – V. 286. – P. 1732—1735.
94. Ascorbate and cysteine-mediated selective neutralisation of extracellular oxidants during N-formyl peptide activation of human phagocytes / R. Anderson [et al.] // *Agents and Actions.* — 1987. — V. 20 (1/2). — P. 77.
95. Association between occupational exposure to mineral oil and rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA case-control study / B. Sverdrup [et al.] // *Arthritis research & therapy.* – 2005. – V. 7. – P. R1296–R1303.

96. Aswad D.W. Isoaspartate in peptides and proteins: formation, significance, and analysis / D. W. Aswad, M. V. Paranandi, B. T. Schurter // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2000. – V. 21, № 6. – P. 1129–1136.
97. Autoantibodies can be prognostic markers of an erosive disease in early rheumatoid arthritis / J. Vencovsky [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 2003. – V. 62. – P. 427—430.
98. Autoantibodies to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis: clinical performance and biochemical aspects of an RA-specific marker / S Nijenhuis [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* – 2004. – V. 350. – P. 17—34.
99. Autoantibody profiling as early diagnostic and prognostic tool for rheumatoid arthritis / V.P. Nell [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 2005. – V. 64. – P. 1731—1736.
100. Autoantibody to the nuclear antigen RA33: a marker for early rheumatoid arthritis / W. Hassfeld [et al.] // *Br. J. Rheumatol.* – 1993. – V. 32. – P. 199—203.
101. Avouac J. Diagnostic and predictive value of anti-cyclic citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: a systematic literature review / J .Avouac, L. Gossec, M. Dougados // *Ann. Rheum. Dis.* – 2006. – V. 65. – P. 845—851.
102. Bach R. Fibrinolytic and fibrin stabilizing activity of synovial membranes / R. Bach, J. Gormsen // *Ann. Rheum. Dis.* – 1976. – V. 29. – P. 287—293.
103. Bauerova K. Role of reactive oxygen and nitrogen species in etiopathogenesis of rheumatoid arthritis / K. Bauerova, A. Bezek // *Gen. Physiol. Biophys.* – 1999. – V. 18. – P. 15–20.
104. Beisel W.R. Single nutrients and immunity / W.R. Beisel // *Amer. J. Clin. Nutr.* — 1982. — 35. — P.417-468.
105. Bermudez E.A. C-reactive protein, statins, and the primary prevention of atherosclerotic cardiovascular disease / E.A. Bermudez, P.M. Ridker // *Prev. Cardiol.* – 2002. – V. 5. – P. 42–46.

106. Biokinetics of dietary RRR- $\alpha$ -tocopherol in the male guinea pig at three dietary levels of vitamin C and two levels of vitamin E. Evidence that vitamin C does not «spare» vitamin E in vivo / G.W. Burton [et al.] // *Lipids*. — 1990. — V. 25. — P.199-210.
107. Blood transfusion, smoking, and obesity as risk factors for the development of rheumatoid arthritis: Results from a primary care-based incident case-control study in Norfolk, England / D.P. Symmons [et al.] // *Arthritis and rheumatism*. — 1997. — V. 40. — P. 1955–1961.
108. Brigden M. The erythrocyte sedimentation rate. Still a helpful test when used judiciously / M. Brigden // *Postgrad. Med.* — 1998. — V. 103. — P. 257—274.
109. Brigelius-Flohe R. Glutathione peroxidases / R. Brigelius-Flohe, M. Maiorino // *Biochim. Biophys. Acta* — 2013. — V. 1830. — P. 3289–3303.
110. Burton G.W. Beta-carotene: an unusual type of antioxidant/ G.W. Burton, K.U. Ingold // *Science* — 1984. — V. 224. — P. 569-573.
111. Cai Z. Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health / Z. Cai, L.J. Yan // *Journal of Biochemical and Pharmacological Research*. — 2013. — V. 1. — P. 15–26.
112. Caloric restriction or catalase inactivation extends yeast chronological lifespan by inducing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and superoxide dismutase activity / A. Mesquita [et al.] // *PNAS*. — 2010. — V. 107, № 34. — P. 15123-15128.
113. Cantorna M.T. 1,25-Dihydroxycholecalciferol inhibits the progression of arthritis in murine models of human arthritis / M.T. Cantorna, C.E. Hayes, H.F. DeLuca // *J. Nutr.* — 1998. — V. 128. — P. 68–72.
114. Cartilage degradation by stimulated human neutrophils: elastase is mainly responsible for cartilage damage / J. Hilbert [et al.] // *Bioorganic Chemistry*. — 2002. — V. 30, № 2. — P. 119–132.
115. Cartilage degradation by stimulated human neutrophils: reactive oxygen species decrease markedly the activity of proteolytic enzymes / J. Schiller [et al.] // *Chemistry and Biology*. — 2000. — V. 7, № 8. — P. 557–568.

116. Cecil R.L.F. Cecil Textbook of Medicine / R.L.F. Cecil, L. Goldman, D.A. Ausiello. – Philadelphia: W.B. Saunders, 2004. – 2506 p.
117. Central role of nitric oxide in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus / G. Nagy [et al.] // *Arthritis Research & Therapy*. – 2010. – V. 12, № 3. – P. 210, 6 pages.
118. Characterisation of fibroblast-like cells in pannus lesions of patients with rheumatoid arthritis sharing properties of fibroblasts and chondrocytes / C. Xue [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 1997. – V. 56. – P. 262—267.
119. Chiurciu V. Chronic inflammatory disorders and their redox control: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities / V. Chiurciu, M. Maccarrone // *Antioxidants and Redox Signaling*. – 2011. – V. 15, № 9. – P. 2605–2641.
120. Choy E.H. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis / E.H. Choy, G.S. Panayi // *N. Engl. J. Med.* – 2001. – V. 344, № 12. – P. 907–916.
121. Cigarette smoke decreases pulmonary dendritic cells and impacts antiviral immune responsiveness / C.S. Robbins [et al.] // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* – 2004. – V. 30. – P. 202–211.
122. Citrullinated vimentin as an important antigen in immune complexes from synovial fluid of rheumatoid arthritis patients with antibodies against citrullinated proteins / K. van Steendam [et al.] // *Arthritis Research & Therapy*. – 2010. – V. 12. № 4. – P. R132, 10 pages.
123. Citrullination is an inflammationdependent process / D. Makrygiannakis [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 2006. – V. 65. – P. 1219—1222.
124. Citrullination of fibronectin in rheumatoid arthritis synovial tissue / X. Chang [et al.] // *Rheumatology (Oxford)*. – 2005. – V. 44, № 11. – P. 1374-1382.
125. Citrullination of synovial proteins in murine models of rheumatoid arthritis / E.R. Vossenaar [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2003. – V. 48, № 9. – P. 2489—2500.

126. Clavel G. Recent data on the role for angiogenesis in rheumatoid arthritis / G. Clavel G., N. Bessis, M.C. Boissier // *Joint Bone Spine*. – 2003. – V. 70. – P. 321–326.
127. Clinical significance of IgA rheumatoid factor subclasses in rheumatoid arthritis / D. Houssien [et al.] // *J. Rheumatol.* – 1997. – V. 24. – P. 2119–2122.
128. Common structural features of MAPEG – a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism / P.J. Jakobsson [et al.] // *Protein Science*. – 1999. – V. 8. – P. 689–692.
129. Comparison of tocilizumab monotherapy versus methotrexate in patients with moderate to severe rheumatoid arthritis. The AMBITION study / G. Jones [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 2010. – V. 69. – P. 86–88.
130. Comparison of isocitrate dehydrogenase from three hyperthermophiles reveals differences in thermostability, cofactor specificity, oligomeric state, and phylogenetic affiliation / I.H. Steen [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – P. 43924–43931.
131. Comparison of threshold cutpoints and continuous measures of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in predicting future rheumatoid arthritis / L.B. Chibnik // *J. Rheumatol.* – 2009. – V. 36. – P. 706–711.
132. Congenital 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) deficiency associated with chronic hemolytic anemia in a Spanish family / J.L. Vives Corrons [et al.] // *Am. J. Hematol.* – 1996. – V. 53. – P. 221–227.
133. Contreras-Shannon V. Influence of compartmental localization on the function of yeast NADP-specific isocitrate dehydrogenase / V. Contreras-Shannon, L. McAlister-Henn // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2004. – V. 423. – P. 235–246.
134. Contribution of the advanced glycation end product pentosidine and of maturation of type I collagen to compressive biomechanical properties of



- human lumbar vertebrae / S. Viguet-Carrin [et al.] // *Bone*. – 2006. – V. 39, № 5. – P. 1073–1079.
135. Control of oxidative posttranslational cysteine modifications: from intricate chemistry to widespread biological and medical applications / C. Jacob [et al.] // *Chemical Research in Toxicology*. – 2012. – V. 25. – P. 588–604.
136. COOH-terminal heparinbinding fibronectin fragment induces nitric oxide production in rheumatoid cartilage through CD44 / T. Yasuda [et al.] // *Rheumatology*. – 2004. – V. 43. – P. 1116–1120.
137. Costenbader K.H. Antioxidant intake and risks of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in women / K.H. Costenbader, J.H. Kang, E.W. Karlson // *Am. J. Epidemiol.* – 2010. – V. 172. – P. 205–216.
138. Crystal structure of *Bacillus subtilis* isocitrate dehydrogenase at 1.55 Å. Insights into the nature of substrate specificity exhibited by *Escherichia coli* isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase / S.K. Singh [et al.] // *The Journal of biological chemistry*. – 2001. – V. 276. – P. 26154-26163.
139. CTLA-4Ig suppresses reactive oxygen species by preventing synovial adherent cell-induced inactivation of Rap1, a Ras family GTPase mediator of oxidative stress in rheumatoid arthritis T cells / P.H.J. Remans [et al.] // *Arthritis & Rheumatism*. – 2006. – V. 54, № 10. – P. 3135–3143.
140. Cuzzocrea S. Role of nitric oxide and reactive oxygen species in arthritis / S. Cuzzocrea // *Current Pharmaceutical Design*. – 2006. – V. 12, № 27. – P. 3551–3570.
141. Cytosolic NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase plays a key role in lipid metabolism / H.J. Koh [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – P. 39968-39974.
142. Dayer E. Primer: the practical use of biological markers of rheumatic and systemic inflammatory diseases / E. Dayer, J. Dayer, P. Roux-Lombard // *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* – 2007. – V. 3, № 9. – P. 512—520.
143. Deberg M. New serum biochemical markers (Coll 2-1 and Coll 2-1 NO2) for studying oxidative-related type II collagen network degradation in patients

- with osteoarthritis and rheumatoid arthritis / M. Deberg, A. Labasse, S. Christgau // *Osteoarthritis Cartilage*. – 2005. – V. 13. – P. 258–265.
144. Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid / J.H. Suh [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 2004. – V. 101, № 10. – P. 3381-3386.
145. Decreased pulmonary extracellular superoxide dismutase during systemic inflammation / J. Ueda [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2008. – Vol. 45, № 6. – P. 897-904.
146. Deneke S.M. Thiol-based antioxidants / S.M. Deneke // *Curr. Top. Cell Regul.* – 2000. – V. 36. – P. 151-180.
147. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes / M. Deponte // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2013. – V. 1830. – P. 3217–3266.
148. Detection and isolation of human serum autoantibodies that recognize oxidatively modified autoantigens / P. Eggleton [et al.] // *Free Radical Biology & Medicine*. – 2013. – V. 57. – P. 79–91.
149. Dhakshinamoorthy S. Small maf (MafG and MafK) proteins negatively regulate antioxidant response element-mediated expression and antioxidant induction of the NAD(P)H: Quinone oxidoreductase 1 gene / S. Dhakshinamoorthy, A. Jaiswal // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V.275, №51. – P. 40134-40141.
150. Diagnostic value of antibodies against a modified citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis / C. Dejaco [et al.] // *Arthritis Res. Ther.* – 2006. – V. 8, № 4. – P. 119—125.
151. Dietary beta-cryptoxanthin and inflammatory polyarthritis: results from a population-based prospective study / D.J. Pattison [et al] // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2005. – V. 82. – P. 451–455.
152. Disruption of Redox Homeostasis in Tumor Necrosis Factor-Induced Apoptosis in a Murine Hepatocyte Cell Line / R.H. Pierce [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2000. – V. 157, № 1. – P. 221-236.

153. Distribution of protein nitrotyrosine in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis / K. Sandhu [et al] // *The Journal of Rheumatology*. – 2003. – V. 30, № 6. – P. 1173–1181.
154. Diversity of glutathione peroxidases / F. Ursini [et al.] // *Methods Enzymol.* – 1995. – V. 252. – P. 38–53.
155. Do oral contraceptives reduce the incidence of rheumatoid arthritis? A pilot study using the Stockholm County medical information system / P. Allebeck [et al] // *Scandinavian journal of rheumatology*. – 1984. V 13. – P. 140–146.
156. Effect of interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis (OPTION study): a double-blind, placebo-controlled, randomized trial / J.S. Smolen [et al.] // *Lancet*. – 2008. – V. 371. – P. 987-997.
157. Effects of  $\alpha$ -lipoic acid and L-carnosine supplementation on antioxidant activities and lipid profiles in rats / M. Y. Kim [et al.] // *Nutr. Res. Pract.* – 2011 – V. 5, № 5. – P. 421–428.
158. Efficacy of anti-CD20 treatment in patients with rheumatoid arthritis ant to a combination of methotrexate/anti-TNF therapy / M. Bokareva [et al.] // *Scand. J. Immunol.* – 2007. – V. 66. – P. 467-483.
159. Eguchi R. Apoptosis in autoimmune diseases / R. Eguchi // *Intern. Med.* – 2001. – V. 40. – P. 275-284.
160. El-Gabalawy H.S. Anti-Sa antibodies: prognostic and pathogenetic significance to rheumatoid arthritis / H.S. El-Gabalawy, J.A. Wilkins // *Arthritis Res. Ther.* – 2004. – V. 6. – P. 86—89.
161. Emery P. Rheumatoid Arthritis / P. Emery, M. Suarez-Almazor // *Clin. Evid.* – 2003. – V. 10. – P. 1454–1476.
162. Evaluation of anti-citrullinated filaggrin antibodies as hallmarks for the diagnosis of rheumatic diseases / S. Dubucquoi // *Ann. Rheum. Dis.* – 2004. – V. 63. – P. 415—419.

163. Evaluation of the effect of methionine and glucosamine on adjuvant arthritis in rats / D. Wang [et al.] // *Clinical and Experimental Immunology*. – 2011. – V. 163. – P. 225-234.
164. Evaluation of the effect of methionine and glucosamine on adjuvant arthritis in rats / Y. Yamagishi [et al.] // *Experimental and Therapeutic Medicine*. – 2012. – V. 4. – P. 640-644.
165. Evidence for oxidised low density lipoprotein in synovial fluid from rheumatoid arthritis patients / L. Dai [et al.] // *Free Radical Research*. – 2000. – V. 32, № 6. – P. 479–486.
166. Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (GPx) superfamily / A. Toppo [et al.] // *Antioxid. Redox Signal*. – 2008. – V. 10. – P. 1501–1514.
167. Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages / E.R. Vossenaar [et al.] // *Ann. Rheum. Dis*. – 2004. – V. 63. – P. 373–381.
168. Extracellular superoxide dismutase (ecSOD) in vascular biology: an update on exogenous gene transfer and endogenous regulators of ecSOD / Z. Qin [et al.] // *Transl. Res*. – 2008. – Vol. 151, № 2. – P. 68-78.
169. Fibrin(ogen) exacerbates inflammatory joint disease through a mechanism linked to the integrin  $\alpha M\beta 2$  binding motif / M. Flick [et al.] // *J. Clin. Invest*. – 2007. – V. 117. – P. 3224—3235.
170. Fine specificity of the anti-citrullinated protein antibody response is influenced by the shared epitope alleles / K.N. Verpoort [et al.] // *Arthritis and rheumatism*. – 2007. – V. 56. – P. 3949–3952.
171. Flohe L. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme / L. Flohe, W.A. Gunzler, H.H. Schock // *FEBS Lett*. – 1973. – V. 32. – P. 132–134.
172. Flora S.J.S. Structural, Chemical and Biological Aspects of Antioxidants for Strategies Against Metal and Metalloid Exposure / S.J.S. Flora // *Oxid. Med. Cell. Longev*. – 2009. – V. 2, №4. – P. 191-206.

173. Forman H. J. On the stability to bovine superoxide dismutase / H. J. Forman, I. Fridovich // *The J. of Biol. Chem.* – 1973. – V. 248, № 8. – P. 2645–2649.
174. Formation of non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) in plasma and low density lipoprotein exposed to oxidative stress in vitro / S.M. Lynch [et al.] // *J. Clin. Invest.* — 1994. — V. 93. — P. 998-1004.
175. Fossati G. Insoluble and soluble immune complexes activate neutrophils by distinct activation mechanisms: changes in functional responses induced by priming with cytokines / G. Fossati, R.C. Bucknall, S.W. Edwards // *Ann. Rheum. Dis.* – 2002. – V. 61, № 1. – P. 13–19.
176. Frei B. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma / B. Frei, R. Stocker, B.N. Ames // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1988. – V. 85. – P. 9748-9752.
177. Frei B. Content of antioxidants, preformed lipid hydroperoxides and cholesterol as predictors of the susceptibility of human LDL to metal ion-dependent and independent oxidation / B. Frei, J.M. Gaziano // *J. Lipid Res.* — 1993. — V. 34. — P. 2135-2145.
178. Galano A. Glutathione: mechanism and kinetics of its non-enzymatic defense action against free radicals / A. Galano, J.R. Alvarez-Idaboy // *RSC Advances.* – 2011. – V. 1. – P. 1763–1771.
179. Gardner P.R. Aconitase is a sensitive and critical target of oxygen poisoning in cultured mammalian cells and in rat lungs / P.R. Gardner, D.M. Nguyen, C.W. White // *Proc. Nat. Acad. Sci.* – 1994. – V. 91, № 25. – P. 12248-12252.
180. Generation of neoantigenic epitopes after posttranslational modification of type II collagen by factors present within the inflamed joint / A. Nissim [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2005. – V. 52, № 12. – P. 3829-3838.
181. Genetic and biochemical interactions involving tricarboxylic acid cycle (TCA) function using a collection of mutants defective in all TCA cycle genes / B. Przybyla-Zawislak [et al.] // *Genetics* – 1999. – V. 152. – P. 153–166.

182. Glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient mice have increased renal oxidative stress and increased albuminuria / Y. Xu // *FASEB J.* – 2010. – V. 24, № 2. – P. 609–616.
183. Glutathione peroxidase 4 has a major role in protecting mitochondria from oxidative damage and maintaining oxidative phosphorylation complexes in gut epithelial cells / P. Cole-Ezea [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2012. – V. 53. – P. 488–497.
184. Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase / H. Sies [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272. – P. 27812–27817.
185. Glutathione transferase superfamily behaves like storage proteins for dinitrosyl-diglutathionyl-iron complex in heterogeneous systems / P. Turella [et al.] // *The journal of biological chemistry.* – 2003. – V. 278, № 43. – P. 42294–42299.
186. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants / G. Noctor [et al.] // *Journal of Experimental Botany.* – 1998. – V. 49, № 321. – P. 623–647.
187. Glutathionylation of  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase: The chemical nature and relative susceptibility of the cofactor lipoic acid to modification / A.L. McLain [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2013. № 8. – P. 161–169.
188. Gomes M.B. Alpha-lipoic acid as a pleiotropic compound with potential therapeutic use in diabetes and other chronic disease / M.B. Gomes, C.A. Negrato // *Diabetol. Metab. Syndr.* – 2014. – Vol. 6, № 1. – P. 80, 18 pages.
189. Gravallesse E.M. Cellular mechanisms and the role of cytokines in bone erosions in rheumatoid arthritis / E.M. Gravallesse, S.R. Goldring // *Arthritis Rheum.* – 2000. – V. 43. – P. 2143-2151.
190. Greer S. Glutathione reductase from *Escherichia coli*: cloning and sequence analysis of the gene and relationship to other flavoprotein disulfide oxidoreductases / S. Greer, R.N. Perham // *Biochemistry.* – 1986. – V. 25. – P. 2736-2742.

191. Gregersen P.K. Genetics of rheumatoid arthritis: confronting complexity / P.K. Gregersen // *Arthritis Res.* – 1999. – V. 1. – P. 37-44.
192. Gregogy, E. M. Superoxide dismutase and oxygen toxicity in a eukaryote / E. M. Gregogy, S. A. Goscin, I. Fridovich // *J. of Bacteriol.* – 1974. – V. 117, № 2. – P. 456-460.
193. Griffiths H.R. Is the generation of neo-antigenic determinants by free radicals central to the development of autoimmune rheumatoid disease / H. R. Griffiths // *Autoimmunity Reviews.* – 2008. – V. 7, № 7. – P. 544–549.
194. Grinnell S. Responses of lymphocytes of patients with rheumatoid arthritis to IgG modified by oxygen radicals or peroxynitrite / S. Grinnell, K. Yoshida, H.E. Jasin // *Arthritis & Rheumatism.* – 2005. – V. 52, № 1. – P. 80–83.
195. Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: an introduction / American college of rheumatology ad hoc committee on immunologic testing guidelines // *Arthritis Rheum.* – 2002. – V. 47. – P. 429–433.
196. Habig W.H. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation / W.H. Habig, M.J. Pabst, W.B. Jakoby // *J. Biol. Chem.* – 1974. – V. 22. – P. 7130–7139.
197. Hadjigogos K. The role of free radicals in the pathogenesis of rheumatoid arthritis / K. Hadjigogos // *Panminerva Med.* – 2003. – V. 45. – P. 7–13.
198. Halliwell B. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy / B. Halliwell, J. Gutteridge // *Lancet.* — 1984. — V. 1. – P.1396-1397.
199. Haque U.J. The role of biologicals in early rheumatoid arthritis / U.J. Haque, J.M. Bathon // *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* – 2005. – V. 19, № 1. – P. 179-189.
200. Hartz, J. W. Preparation and physicochemical properties of human erythrocyte cytochrome c / J. W. Hartz, H. F. Deutsch // *The J. of Biol.Chem.* – 1969. – V. 244, № 17. – P. 4565-4572.

201. Haselbeck, R.J. Function and expression of yeast mitochondrial NAD- and NADP-specific isocitrate dehydrogenases / R.J. Haselbeck, L. McAlister-Henn // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V. 268. – P. 12116–12122.
202. Hayes J.D. Glutathione transferases / J.D. Hayes, J.U. Flanagan, I.R. Jowsey // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* – 2005. – V. 45. – P. 51–88.
203. Heparin-affinity patterns and composition of extracellular superoxide dismutase in human plasma and tissues / J. Sandström [et al.] // *Biochem. J.* – 1993. – V. 294, № 3. – P. 853-857.
204. Hesketh J. Nutrigenomics and selenium: Gene expression patterns, physiological targets, and genetics / J. Hesketh // *Annu. Rev. Nutr.* – 2008. – V. 28. – P. 157–177.
205. Hitchon A. Oxidation in rheumatoid arthritis / A. Hitchon, H. S. El-Gabalawy // *Arthritis Research & Therapy.* – 2004. – V, 6, № 6. – P. 265–278.
206. Hitchon C.A. The synovium in rheumatoid arthritis / C.A. Hitchon, H.S. El-Gabalawy // *Open Rheumatol. J.* – 2011. – V. 5. – P. 107–114.
207. Hochdosiertes Vitamin E bei chronischer Polyarthritits / G. Kolarz [et al.] // *Aktuelle Rheumatologie.* – 1990. – V. 15. – P. 233–237.
208. Holers V.M. Autoimmunity to Citrullinated Proteins and the Initiation of Rheumatoid Arthritis / V.M. Holers // *Curr. Opin. Immunol.* – 2013. – V 25, № 6. – P. 728-735.
209. Huang H.C. Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2 / H.C. Huang, T. Nguyen, C.B. Pickett // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – V. 97, №23. – P.12475-13480.
210. Human extracellular superoxide dismutase is a tetramer composed of two disulphide-linked dimers: a simplified, high-yield purification of extracellular superoxide dismutase / T. D. Oury [et al.] // *Biochem. J.* – 1996. – V. 317, № 1. – P. 51-57.



211. Hydroxyl radical modification of Immunoglobulin G generated cross-reactive antibodies: its potential role in systemic lupus erythematosus / A. Al-Shobaili [et al.] // *Clinical Medicine Insights*. – 2011. – V. 4. – P. 11–19.
212. Identification of citrullinated vimentin peptides as T cell epitopes in HLA-DR4-positive patients with rheumatoid arthritis / A.L. Feitsma [et al.] // *Arthritis and rheumatism*. – 2010. – V. 62. – P. 117–125.
213. Identification of the advanced glycation end products N $\epsilon$ -carboxymethyllysine in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis / S Drinda [et al.] // *Annals of the Rheumatic Diseases*. – 2002. – V. 61, № 6. – P. 488–492.
214. Identification of the receptor for advanced glycation end products in synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis / S Drinda [et al.] // *Rheumatology International*. – 2005. – V. 25, № 6. – P. 411–413.
215. IKK alpha limits macrophage NF-kappaB activation and contributes to the resolution of inflammation / T. Lawrence [et al.] // *Nature*. – 2005. – V. 434. – P. 1138–1143.
216. Immunological findings in cigarette smokers / P. Moszczynski [et al.] // *Toxicol. Lett*. – 2001. – V. 118. – P. 121–127.
217. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis / M. Altindag [et al.] // *Clinical Biochemistry*. – 2007. – V. 40, № 3-4. – P. 167–171.
218. Increased methyl esterification of altered aspartyl residues erythrocyte membrane proteins in response to oxidative stress / S. Ingrosso // *European Journal of Biochemistry*. – 2000. – V. 267, № 14. – P. 4397–4405.
219. Increased yield of high-purity and active tetrameric recombinant human ECSOD by solid phase refolding / K. Ryu [et al.] // *Microbiol. Biotechnol*. – 2008. – V. 18, № 10. – P. 1648-1654.
220. Induction of antioxidant gene expression in a mouse model of ischemic cardiomyopathy is dependent on reactive oxygen species / S. Sharma [et al.] // *Free Radic. Biol. Med*. – 2006. – V. 40. – P. 2223-2231.

221. Inhibition of antigen-presenting cell function and stimulation of human peripheral blood mononuclear cells to express an anti-inflammatory cytokine profile by the stress protein BiP: relevance to the treatment of inflammatory arthritis / V. Corrigan [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – V. 50. – P. 1164–1171.
222. Insights into rheumatoid arthritis derived from the Sa immune system / H. Menard [et al.] // *Arthritis Res.* – 2000. – V. 2. – P. 429–432.
223. Intracellular protein modification associated with altered T cell functions in autoimmunity / M.L. Yang [et al.] // *The Journal of Immunology.* – 2006. – V. 177, № 7. – P. 4541–4549.
224. Investigation of protein oxidation and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis / H. Baskol [et al.] // *Cell Biochemistry and Function.* – 2006. – V. 24, № 4. – P. 307–311.
225. Involvement of CD44 in induction of matrix metalloproteinases by a COOH-terminal heparinbinding fragment of fibronectin in human articular cartilage in culture / T. Yasuda [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2003. – V. 48. – P. 1271–1280.
226. Ishibashi T. Consumption of water containing a high concentration of molecular hydrogen reduces oxidative stress and disease activity in patients with rheumatoid arthritis: an open-label pilot study / T. Ishibashi, B. Sato, M. Rikitake // *Med. Gas. Res.* – 2012. – V. 2. – P. 27–30.
227. Isoaspartyl post-translational modification triggers autoimmune responses to self-proteins / M.J. Mamula [et al.] // *Journal of Biological Chemistry.* – 1999. – V. 274, № 32. – P. 22321–22327.
228. IUIS/WHO/AF/CDC Committee for the Standardization of Autoantibodies in Rheumatic and Related Diseases. Cutting edge diagnostics in rheumatology: the role of patients, clinicians, and laboratory scientists in optimizing the use of autoimmune serology / A.S. Wilk [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – V. 51. – P. 291–298.

229. Iwamura H. Interaction between neutrophil-derived elastase and reactive oxygen species in cartilage degradation / H. Iwamura, A.R. Moore, D.A. Willoughby // *Biochimica et Biophysica Acta—General Subjects*. – 1993. – V.1156, № 3. – P. 295–301.
230. James M.J. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production / M.J. James, R.A. Gibson, L.G. Cleland // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2000. – V. 71. – P. 343S–348S.
231. Jawaheer D. Rheumatoid arthritis. The genetic components / D. Jawaheer, P.K. Gregersen // *Rheum. Dis. North. Clin. North. Am.* – 2002. – V. 28. – P. 1-15.
232. Joint erosion in RA: interaction between tumor necrosis factor alfa, interleukin 1 and receptor activator of nuclear factor kB ligand (RANKL) regulate osteoclasts/ D. O’Gradaigh [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 2004. – V. 63. – P. 354—359.
233. Kalinina O.V. Amino acid residues that determine functional specificity of NADP- and NAD-dependent isocitrate and isopropylmalate dehydrogenases / O.V. Kalinina, M.S. Gelfand // *Proteins*. – 2006. – V. 64. – P. 1001-1009.
234. Karlsson, K. Binding of human extracellular-superoxide dismutase C to cultured cell lines and to blood cells / K. Karlsson, S. L. Marklund // *Lab. Invest.* – 1989. – V. 60, № 5. – P. 659-666.
235. Khan F. Prevalence of anti-3-nitrotyrosine antibodies in the joint synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis and systemic lupus erythematosus / F. Khan, A.A. Siddiqui // *Clinica Chimica Acta*. – 2006. – V. 370, № 1-2. – P. 100–107.
236. Kitas G.D. Tackling ischaemic heart disease in rheumatoid arthritis / G. D. Kitas, N. Erb // *Rheumatology*. – 2003. – V. 42, № 5. – P. 607–613.
237. Klareskog L. Rheumatoid arthritis / L. Klareskog, A.I. Catrina, S. Paget // *Lancet*. – 2009. – V. 373. – P. 659–672.
238. Kletzien R.F. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a “housekeeping” enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress

- / R.F. Kletzien, P.K. Harris, L.A. Foellmi // *Faseb. J.* – 1994. – V. 8. – P. 174–181.
239. Kowanko C. Mechanisms of human neutrophil-mediated cartilage damage in vitro—the role of lysosomal enzymes, hydrogen peroxide and hypochlorous acid / C. Kowanko, E.J. Bates, A. Ferrante // *Immunology and Cell Biology.* – 1989. – V. 67, № 5. – P. 321–329.
240. Kraus R.J. Oxidized forms of ovine erythrocyte glutathione peroxidase. Cyanide inhibition of a 4-glutathione:4-selenoenzyme / R.J. Kraus, J.R. Prohaska, H.E. Ganther // *Biochim. Biophys. Acta* / - 1980. – V. 615. – P. 19–26.
241. Krinsky N.L. Membrane antioxidants / N.L. Krinsky // *Ann. NY. Acad. Sci.* — 1988. — V. 551. — P. 17-33.
242. Kulich W. Effect of the NSAID nimesulide on the radical scavenger glutathione S-transferase in patients with osteoarthritis of the knee / W. Kulich, N. Fagerer, H. Schwann // *Current Medical Research and Opinion.* – 2007. - V. 23, № 8. – P. 1981-1986.
243. Kushner I. The phenomenon of the acute phase response / I. Kushner // *Ann. NY Acad. Sci.* – 1982. – V. 389. – P. 39—48.
244. Liang J.F. Inhibition of nitric oxide synthesis in primary cultured mouse hepatocytes by alpha-lipoic acid / J.F. Liang, T. Akaike // *Chem. Biol. Interact.* – 2000. – V. 124, № 1. – P. 53-60.
245. Ligier S. A new antibody in rheumatoid arthritis targeting glycated IgG: IgM anti-IgG-AGE / S. Ligier, P. Fortin, M. Newkirk // *Rheumatology.* – 1998. – V. 37, № 12. – P. 1307–1314.
246. Lipoic Acid Attenuates Inflammation via cAMP and Protein Kinase A Signaling / S. Salintho [et al.] // *PLoS ONE.* – 2010. – V. 5, № 9. – P. e13058, 10 pages.
247. Livak K.J. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> Method / K.J. Livak, T.D. Schmittgen // *Methods.* – 2001. – V. 25, № 4. – P. 402-408.

248. Localization of cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase in the peroxisomes of rat liver cells: biochemical and immunocytochemical studies / T. Yoshihara [et al.] // *J. Histochem. Cytochem.* – 2001. – V. 49. – P. 1123–1131.
249. Localization of peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) and citrullinated protein in synovial tissue of rheumatoid arthritis / X. Chang [et al.] // *Rheumatology.* – 2005. – V. 44. – P. 40–50.
250. Lu S.C. Glutathione synthesis / S.C. Lu // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 2013. – V. 1830. – P. 3143–3153.
251. Lysine residues direct the chlorination of tyrosines in YXXK motifs of apolipoprotein A-I when hypochlorous acid oxidizes high density lipoprotein / C. Bergt [et al.] // *Journal of Biological Chemistry* – 2004. – V. 279, № 9. – P. 7856–7866.
252. Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis / J.H. Yen [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2001. – V. 193. – P. 1159-1167.
253. Malle E. Human serum amyloid A (SAA) protein: a prominent acute-phase reactant for clinical practice / E. Malle, F. De Beer // *Eur. J. Clin. Invest.* – 1996. – V. 26. – P. 427—435.
254. Marklund, S. L. Expression of extracellular superoxide dismutase by human cell lines / S. L. Marklund // *Biochem. J.* – 1990. – V. 266, № 1. – P. 213-219.
255. Marklund, S. L. Properties of extracellular superoxide dismutase from human lung / S.L. Marklund // *Biochem. J.* – 1984. – V. 220, № 1. – P. 269-272.
256. Matrix metalloproteinase production by COOH-terminal heparin-binding fibronectin fragment in rheumatoid synovial cells / T. Yasuda [et al.] // *Lab. Invest.* – 2003. – V. 83. – P. 153–162.
257. McLain A.L.  $\alpha$ -Ketoglutarate dehydrogenase: A mitochondrial redox sensor / A.L. McLain, P.A. Szweda, L.I. Szweda // *Free Radic. Res.* – 2011. – V. 45, № 1. – P. 29-36.

258. 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 [et al.] // *Biochem. Soc. Trans.* – 2011. – V. 39. – P. 1226–1232.
259. Meister A. *Coenzymes and Cofactors* / A. Meister // Wiley. – 1989. – V. 3A. – P. 1-48.
260. Meki A.-R.M.A. Effect of green tea extract and vitamin C on oxidant or antioxidant status of rheumatoid arthritis rat model / A.-R.M.A. Meki, E.A. Hamed, Kh.A. Ezam // *Indian Journal of Clinical Biochemistry.* – 2009. – V. 24, № 3. – P. 280-287.
261. Mesenchymal cells expressing bone morphogenetic protein receptors are present in the rheumatoid arthritis joint / L. Marinova-Mutafchieva [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2000. – V. 43. –P. 2046—2055.
262. Mittl P.R.E. Structure of glutathione reductase from *Escherichia coli* at 1.86 Å resolution: comparison with the enzyme from human erythrocytes and / P.R.E. Mittl, G.E. Schulz // *Protein Sci.* – 1994. – V. 3. – P. 799-809.
263. Modulation of talA gene in pentose phosphate pathway for overproduction of poly-beta-hydroxybutyrate in transformed *Escherichia coli* harboring phbCAB operon / B.C. Song [et al.] // *J. Biosci. Bioeng.* – 2006. –V. 102. – P. 237–240.
264. Molecular mechanisms of “off-on switch” of activities of human IDH1 by tumor-associated mutation R132H / B. Yang [et al.] // *Cell research.* – 2010. – V. 20. – P. 1188-1200.
265. Molendi-Coste O. Why and how meet n-3 PUFA dietary recommendations? / O. Molendi-Coste, V. Legry, I.A. Leclercq // *Gastroenterol Res. Pract.* – 2011. – V. 2011. – P. 364040, 11 pages.
266. Molis T.M. Modulation of estrogen receptor mRNA expression by melatonin in MCF-7 human breast cancer cells / T.M. Molis, L.L. Spriggs, S.M. Hill // *Mol. Endocrinol.* – 1994. – V. 8. – P. 1681–1690.

267. Morel F. The glutathione transferase kappa family / F. Morel, C. Aninat // *Drug Metabolism Reviews*. – 2011. – V. 43. – P. 281–291.
268. Mouse extracellular superoxide dismutase: primary structure, tissue-specific gene expression, chromosomal localization, and lung in situ hybridization / R. J. Folz [et al.] // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* – 1997. – V. 17, № 4. – P. 393-403.
269. Mulherin D.M. Glutathione reductase activity, riboflavin status, and disease activity in rheumatoid arthritis / D.M. Mulherin, D.I. Thurnham, R.D. Situnayake // *Ann. Rheum. Dis.* – 1996. – V. 55, № 11. – P. 837-840.
270. Muller K. Gp120 of HIV-1 induces apoptosis in rat cortical cell cultures: prevention by memantine / K. Muller // *Eur. J. Pharmacol.* – 1992. – V. 226, № 6. – P. 209-214.
271. Multiple antibody reactivities to citrullinated antigens in sera from patients with rheumatoid arthritis: association with HLA-DRB1 alleles / O. Snir [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 2009. – V. 68. – P. 736–743.
272. Murakami K. Inactivation of aconitase in yeast exposed to oxidative stress / K. Murakami, M. Yoshino // *Mol. Biol. Int.* – 1997. – V. 41, № 3. – P. 481-486.
273. Mutated citrullinated vimentin (MCV) as a candidate autoantigen for diagnosis and monitoring of disease activity in rheumatoid arthritis / H. Bang [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 2006. – V. 65, Suppl.II. – P. 144.
274. Myeloperoxidase and oxidative stress in rheumatoid arthritis / L.K. Stamp [et al.] // *Rheumatology*. – 2012. – V. 51, № 10. – P. 1796–1803.
275. Myklebust G. A prospective study of 287 patients with polymyalgia rheumatica and temporal arteritis: clinical and laboratory manifestations at onset of disease and at the time of diagnosis / G. Myklebust, J.T. Gran // *Br. J. Rheumatol.* – 1996. – V. 35. – P. 1161—1168.
276. NADPH production by the pentose phosphate pathway in the zona fasciculata of rat adrenal gland / W.M. Frederiks [et al.] // *J. Histochem. Cytochem.* – 2007. – V. 55. – P. 975–980.

277. Nam H. The role of nitric oxide in the particulate matter (PM<sub>2.5</sub>)-induced NF kappa B activation in lung epithelial cells / H. Nam, B. Choi, J. Lee // *Toxiol. Lett.* – 2004. – V.1, №2. – P.95-102.
278. Neutrophils in rheumatoid arthritis: more than simple final effectors / H.S. Cascão [et al.] // *Autoimmunity Reviews.* – 2010. – V. 9, № 8. – P. 531–535.
279. Nguen T. Transcriptional regulation of the antioxidant response element. Activation by Nrf2 and repressin by MafK / T. Nguen, H.Huang, B.Cecil // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275. – P. 15446-15473.
280. Nozik-Grayck, E. Extracellular superoxide dismutase / E. Nozik-Grayck, H. B. Suliman, C. A. Piantadosi // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2005. – V. 37, № 12. – P. 2466-2471.
281. Oakley A. Glutathione transferases: a structural perspective / A. Oakley // *Drug Metabolism Reviews.* – 2011. – V. 43. – P. 138–151.
282. Oh S.H. Selenium as a component of glutathione periodase isolated from ovine erythrocytes / S.H. Oh, H.E. Ganther, W.G. Hoekstra // *Biochemistry.* – 1974. – V. 13. – P. 1825–1829.
283. Ookhtens M. Role of the liver in interorgan homeostasis of glutathione and cyst(e)ine / M. Ookhtens, N. Kaplowitz // *Seminars in Liver Disease.* – 1998. – V. 18. – P. 313–329.
284. Oral contraception, parity, breast feeding, and severity of rheumatoid arthritis / C. Jorgensen [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 1996. – V. 55. – P. 94–98.
285. Oral contraceptives and rheumatoid arthritis: results from a primary care-based incident case-control study / P. Brennan [et al.] // *Semin. Arthritis Rheum.* – 1997. – V. 26. – P. 817–823.
286. Osteoimmunology: cytokines and the skeletal system / S.H. Lee [et al.] // *BMB Reports.* – 2008. – V. 41. – P. 495–510.
287. Oxidative damage to hyaluronate and glucose in synovial fluid during exercise of the inflamed rheumatoid joint. Detection of abnormal low-molecular-mass metabolites by proton-n.m.r. spectroscopy / M. Grootveld [et al.] // *Biochem. J.* – 1991. – V. 273. – P. 459–467.



288. Oxidative stress as a potential biomarker for determining disease activity in patients with rheumatoid arthritis / S. Kundu [et al.] // *Free Radical Research*. – 2012. – V. 46, № 12. – P. 1482–1489.
289. Oxidative stress-induced antibodies to carbonyl-modified protein correlate with severity of chronic obstructive pulmonary disease / A. Kirkham [et al.] // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2011. – V. 184, № 7. – P. 796–802.
290. Packer L. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant / L. Packer, E.H. Witt, H.J. Tritschler // *Free Radic. Biol. Med.* – 1995. – V. 19, № 2. - P. 227-250.
291. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease / E.R. Vossenaar [et al.] // *Bioessays*. – 2003. – V. 25. – P. 1106–1118.
292. Padmaja S. Inactivation of glutathione peroxidase by peroxynitrite / S. Padmaja, G.L. Squadrito, W.A. Pryor // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1998. – V. 349. – P. 1–6.
293. Palaniyappan A. Immunomodulatory effect of DL- $\alpha$ -lipoic acid in aged rats / A. Palaniyappan, R. Alphonse // *Exp. Gerontol.* – 2011. – V. 46, № 9. – P. 709-715.
294. Panasenکو O.M. Hypochlorous acid as a precursor of free radicals in living systems / O.M. Panasenکو, I.V. Gorudko, A.V. Sokolov // *Biochemistry*. – 2013. – V. 78, № 13. – P. 1466–1489.
295. Panayi G.S. Pathogenesis of rheumatoid arthritis – The role of T cells and other beasts / G.S. Panayi, V.M. Corrigan, C. Pitzalis // *Rheum. Dis. Clin. N. Am.* – 2001. – V. 27. – P. 317-334.
296. Pankov R. Fibronectin at a glance / R. Pankov, K.M. Yamada // *J. Cell. Sci.* – 2002. – V. 115. – P. 3861–3863.
297. Parallel evolutionary pathways for glutathione transferases: structure and mechanism of the mitochondrial class kappa enzyme rGSTK1-1 / J.E. Ladner [et al.] // *Biochemistry*. – 2004. – V. 43. – P. 352–361.

298. Paredes S. Antioxidant vitamins and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis: association with inflammatory markers / S. Paredes, J. Girona, E. Hurt-Camejo // *J. Rheumatol.* – 2002. – V. 29. – P. 2271–2277.
299. Pattison J. Dietary antioxidants in inflammatory arthritis: do they have any role in etiology or therapy? / J. Pattison, P. G. Winyard // *Nature Clinical Practice Rheumatology.* – 2008. – V. 4, № 11. – P. 590–596.
300. Pepys M.B. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein / M.B. Pepys, M.L. Baltz // *Adv. Immunol.* – 1983. – V. 34. – P. 141—212.
301. Peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase. Characterization and activity regulation during natural senescence / F.J. Corpas [et al.] // *Plant Physiol.* – 1999. – V. 121. – P. 921–928.
302. Pharma-cokinetic study of liponic acid in multiple sclerosis: Comparing mice human pharmacokinetic parameters / V. Yadav [et al.] // *Mult. Scler.* – 2010. – V. 16, № 4. – P. 387-397.
303. Polymyalgia rheumatic without significantly increased erythrocyte sedimentation rate. A more benign syndrome / M. Gonzalez-Gay [et al.] // *Arch. Intern. Med.* – 1997. V. 157. – P. 317—320.
304. Predictive value of antibodies to citrullinated peptides and rheumatoid factors in anti-TNF-alpha treated patients / F. Bobbio-Pallavicini [et al.] // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2007. – V. 1109. – P. 287—295.
305. Predictive value of antibodies to cyclic citrullinated peptide in patients with very early inflammatory arthritis / K. Raza [et al.] // *The Journal of Rheumatology.* – 2005. – V. 32, № 2. – P. 231–238.
306. Presence of autoantibodies to the glycolytic enzyme-enolase in sera from patients with early rheumatoid arthritis / V. Saulot [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2002. – V. 46, № 5. – P. 1196—1201.
307. Promoting export of macrophage cholesterol: the physiological role of a major acute phase protein, serum amyloid A / S. Tam [et al.] // *J. Lipid. Res.* – 2002. – V. 43. – P. 1410—1420.

308. Protein, iron, and meat consumption and risk for rheumatoid arthritis: a prospective cohort study / E. Benito-Garcia [et al.] // *Arthritis research & therapy*. – 2007. – V. 9, № 1. – R16.
309. Proteomic analysis of cellular response to oxidative stress / T. Rabilloud [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – P. 19396–19401.
310. Purification and properties of glutathione peroxidase from human liver / T. Miwa [et al.] // *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. – 1983. – V. 31. – P. 179–185.
311. Ramipril attenuates lipid peroxidation and cardiac fibrosis in an experimental model of rheumatoid arthritis / Q. Shi [et al.] // *Arthritis Res Ther.* – 2012. – V. 14, № 5. – P. R223, 14 pages.
312. Redox regulation of T-cell function: from molecular mechanisms to significance in human health and disease / P. Kesarwani [et al.] // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2013. – V. 18, № 12. – P. 1497–1534.
313. Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis / L.I. Filippin [et al.] // *Clin. Exp. Immunol.* – 2008. – V. 152, № 3. – P. 415–422.
314. Regulation and function of selenoproteins in human disease / F.P. Bellinger [et al.] // *Biochem. J.* – 2009. – V. 422. – P. 11–22.
315. Results of a two-year followup study of patients with rheumatoid arthritis who received a combination of abatacept and methotrexate / J.M. Kremer [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2008. – V. 58. – P. 953–963.
316. Retinoic acid inhibits Th17 polarization and enhances FoxP3 expression through a Stat-3/Stat-5 independent signaling pathway / K.M. Elias // *Blood* – 2008. – V. 111, № 3. – P. 1013–1020.
317. Retsky K.L. Ascorbic acid oxidation product(s) protect human low density lipoprotein against atherogenic modification / K.L. Retsky, M.W. Freeman, B. Frei // *J. Biol. Chem.* — 1993. — V. 268. — P. 1304–1309.
318. Rheumatoid arthritis associated autoantibodies in patients with synovitis of recent onset / R. Goldbach-Mansky [et al.] // *Arthritis Res.* – 2000. – V. 2. – P. 236—243.

319. Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative / D. Aletaha [et al.] // *Arthritis and rheumatism*. – 2010. V. 62. – P. 2569–2581.
320. Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin / E.R. Vossenaar [et al.] // *Arthritis Res. Ther.* – 2004. – V. 6. – P. 142—150.
321. Rheumatoid arthritis: the role of reactive oxygen species in disease development and therapeutic strategies / A. Gelderman [et al.] // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2007. – V. 9, № 10. – P. 1541–1567.
322. Rigo, A. Competitive inhibition of Cu, Zn-superoxide dismutase / A. Rigo, R. Stevanado, P. Viglino // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 1977. – V. 79, № 3. – P. 776-783.
323. Robinson J.M. Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes / J.M. Robinson // *Histochemistry and Cell Biology*. – 2008. – V. 130, № 2. – P. 281–297.
324. Rodríguez-García J. Increased concentrations of serum pentosidine in rheumatoid arthritis / J. Rodríguez-García, J.R. Requena, S. Rodríguez-Segade // *Clinical Chemistry*. – 1998. – V. 44, № 2. – P. 250–255.
325. Role of NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase (NADP<sup>+</sup>-ICDH) on cellular defence against oxidative injury by gamma-rays / S.H. Lee [et al.] // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2004. – V. 80. –P. 635-642.
326. Rotilio, G. A pulse radiolysis study of superoxide dismutase / G. Rotilio, R. C. Bray, E. M. Fielden // *Biochim. et Biophys. Acta*. – 1972. – V. 268, № 2. – P. 605-609.
327. Schett G. Immune cells and mediators of inflammatory arthritis / G. Schett // *Autoimmunity* – 2008. – V. 41. – P. 224–229.
328. Scott D.L. The distribution of fibronectin in the pannus in rheumatoid arthritis / D.L. Scott, J.P. Delamere, K.W. Walton // *Br. J. Exp. Pathol.* – 1981. – V. 62. – P. 362–368.

329. Selenium concentration in erythrocytes of patients with rheumatoid arthritis. Clinical and laboratory chemistry infection markers during administration of selenium / K. Heinle [et al.] // *Medizinische Klinik*. – 1997. – № 92 (Suppl 3). – P. 29–31.
330. Self W.T. Synthesis and characterization of selenotrisulfide-derivatives of lipoic acid and lipoamide / W.T. Self, L. Tsai, T.C. Stadtman // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2000. – V. 97. – P. 12481-12486.
331. Sensitivity and specificity of anti-Sa autoantibodies for rheumatoid arthritis / W. Hueber [et al.] // *Rheumatology* – 1999. – V. 38. – P. 155—159.
332. Serum amyloid A in the assessment of early inflammatory arthritis / G. Cunnane [et al.] // *J. Rheumatol.* – 2000. – V. 27. – P. 58—63.
333. Serum antioxidants and risk of rheumatoid arthritis / M. Heliövaara [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 1994. – V. 53. – P. 51–53.
334. Serum concentrations of alpha tocopherol, beta carotene, and retinol preceding the diagnosis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus / G.W. Comstock // *Ann. Rheum. Dis.* – 1997. – V. 56. – P. 323–325.
335. Serum level of oxidative stress marker is dramatically low in patients with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab / M. Hirao [et al.] // *Rheumatol. Int.* – 2012. – V. 32, № 12. – P. 4041–4045.
336. Serum matrix metalloproteinase 3 levels in comparison to C-reactive protein in periods with and without progression of radiological damage in patients with early rheumatoid arthritis / M. Posthumus [et al.] // *Clin. Exp. Rheum.* – 2003. – V. 21. – P. 465—472.
337. Serum selenium, serum alpha-tocopherol, and the risk of rheumatoid arthritis / P. Knekt [et al.] // *Epidemiology*. – 2000. – V. 11. – P. 402–405.
338. Shmerling R.H. The rheumatoid factor: an analysis of clinical utility / R.H. Shmerling, T.L. Delbanco // *Am. J. Med.* – 1991. – V. 91. – P. 528—534.

339. Sibia J. Safety of T-cell co-stimulation modulation with abatacept in patients with rheumatoid arthritis / J. Sibia, R. Westhovens // *Clin. Exp. Rheumatol.* – 2007. – V. 25 (Suppl 46). – P. 46-56.
340. Silman A. Timing of pregnancy in relation to the onset of rheumatoid arthritis / A. Silman, A. Kay, P. Brennan // *Arthritis Rheum.* – 1992. – V. 35. – P. 152–155.
341. Simopoulos A.P. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases / A.P. Simopoulos // *Journal of the American College of Nutrition.* – 2002. – V. 21. – P. 495–505.
342. Skrzycki, M. Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) – structure, properties and functions / M. Skrzycki, H. Cieczot // *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online).* – 2004. – V. 58. – P. 301-311.
343. Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells / D. Makrygiannakis [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 2008. – V. 67. – P. 1488–1492.
344. Smoking, obesity, alcohol consumption, and the risk of rheumatoid arthritis / L.F. Voigt [et al.] // *Epidemiology.* – 1994. – V. 5. – P. 525–532.
345. Sox H.C. The erythrocyte sedimentation rate. Guidelines for rational use / H.C. Sox, M.H. Liang // *Ann. Intern. Med.* – 1986. – V. 104. – P. 515–523.
346. Springer D. Rheumatoide Arthritis: Hochdosiertes Vitamin E zeigt analgetischen Effekt / D. Springer // *Natura Med.* – 1998. – V. 13. – P. 30–32.
347. Stamp LK. Diet and rheumatoid arthritis: a review of the literature / L.K. Stamp, M.J. James, L.G. Cleland // *Semin. Arthritis Rheum.* – 2005. – V. 35. – P. 77–94.
348. Stanley W.C. Metabolic link between ischemia and cardiac dysfunction / W.C. Stanley // *Heart Metab.* – 2005. – V. 27. – P. 30–33.
349. Staroń A. Oxidative stress in erythrocytes from patients with rheumatoid arthritis / A. Staroń, G. Małkosa, M. Koter-Michalak // *Rheumatol. Int.* – 2012. – V. 32, № 2. – P. 331-334.

350. Steenland K. Kidney disease and arthritis in a cohort study of workers exposed to silica / K. Steenland, W. Sanderson, G.M. Calvert // *Epidemiology*. – 2001. – V. 12. – P. 405–412.
351. Steiner G. Purification and partial sequencing of the nuclear autoantigen RA33 shows that it is indistinguishable from A2 protein of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex / G. Steiner, K. Hartmuth, K. Skriver // *J. Clin. Invest.* – 1992. – V. 90. – P. 1061—1066.
352. Stimulation of the pentose phosphate pathway and glutathione levels by dehydroascorbate, the oxidized form of vitamin C / F. Puskas [et al.] // *FASEB J.* – 2000. – V. 14. – P. 1352–1361.
353. Stralin, P. Oxidative stress, NO\* and smooth muscle cell extracellular superoxide dismutase expression / P. Stralin, H. Jacobsson, S. L. Marklund // *Biochim. Biophys Acta.* – 2003. – V. 1619, № 1. – P. 1-8.
354. Structural and Functional Properties of isocitrate dehydrogenase from the psychrophilic bacterium *Desulfotalea psychrophila* reveal a cold-active enzyme with an unusual high thermal stability / A.E. Fedoy [et al.] // *Journal of Molecular Biology* – 2007. – V. 372. – P. 130-149.
355. Structural integrity of histone H2B in vivo requires the activity of protein L-isoaspartate O-methyltransferase, a putative protein repair enzyme / A.L. Young [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2001. - V. 276, № 40 – P. 37161–37165.
356. Structure and quantum chemical analysis of NAD<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase: hydride transfer and co-factor specificity / K. Imada [et al.] // *Proteins*. – 2008. – V. 70. – P. 63-71.
357. Structures of human cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase reveal a novel self-regulatory mechanism of activity / X. Xu [et al.] // *The Journal of biological chemistry* – 2004. – V. 279. – P. 33946-33957.
358. Subcellular compartmentalization of glutathione: correlations with parameters of oxidative stress related to genotoxicity / R.M. Green [et al.] // *Mutagenesis*. – 2006. – V. 21. – P. 383–390.

359. Substrate-free structure of a monomeric NADP isocitrate dehydrogenase: an open conformation phylogenetic relationship of isocitrate dehydrogenase / F. Imabayashi // *Proteins*. – 2006. – V. 63. – P. 100-112.
360. Sulfiredoxin, the cysteine sulfinic acid reductase specific to 2-Cys peroxiredoxin: its discovery, mechanism of action, and biological significance / S.G. Rhee [et al.] // *Kidney International Supplement*. – 2007. – V. 72. – P. S3–S8.
361. Suntres Z.E. Prophylaxis against lipopolysaccharide-induced liver injuries by lipoic acid in rats / Z.E. Suntres // *Pharm. Res.* – 2003. – V. 48. – P. 585-591.
362. Surapneni K.M. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with rheumatoid arthritis / K.M. Surapneni, V.S. Chandrasada Gopan // *Indian J. Clin. Biochem.* – 2008. – V. 23, № 1. – P. 41-44.
363. Synovial fluid matrix metalloproteinase 3 levels are increased in inflammatory arthritis whether erosive or not / C. Ribbens [et al.] // *Rheumatology*. – 2000. – V. 39. – P. 1357—1365.
364. Szekanecz Z. Chemokines and angiogenesis / Z. Szekanecz, A.E. Koch // *Curr. Opin. Rheumatol.* – 2001. – V. 13. – P. 202-208.
365. Tak P.P. The pathogenesis and prevention of joint damage in rheumatoid arthritis – Advances from synovial biopsy and tissue analysis / P.P. Tak, B. Bresnihan // *Arthritis Rheum.* – 2000. – V. 43. – P. 2619-2633.
366. Taylor P.C. Anti-TNF biologic agents: still the therapy of choice for rheumatoid arthritis / P.C. Taylor, M. Feldman // *Nat. Rev. Rheumatol.* – 2009. – V. 5. – P. 578-582.
367. Technical and diagnostic performance of 6 assays for the measurement of citrullinated protein/peptide antibodies in the diagnosis of rheumatoid arthritis / D. Coenen [et al.] // *Clin. Chem.* – 2007. – V. 53, № 3. – P. 498—504.
368. Tew K.D. Glutathione-s-transferases as determinants of cell survival and death / K.D. Tew, D.M. Townsend // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2012. – V. 17. – P. 1728–1737.



369. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis / F.C. Arnett [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 1988. – V. 31. – P. 315–324.
370. The amino-acid sequence of bovine glutathione peroxidase / W.A. Gunzler [et al.] // *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.*. – 1984. – V. 365. – P. 195–212.
371. The dual nature of human extracellular superoxide dismutase: one sequence and two structures / S. V. Petersen [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2003. – V. 100, № 24. – P. 13875-13880.
372. The effect of oral contraceptives and estrogen replacement therapy on the risk of rheumatoid arthritis: a population based study / M.F. Doran [et al.] // *J. Rheumatol.* – 2004. – V. 31. – P. 207–213.
373. The Effects Of Alpha Lipoic Acid On Liver Cells Damages And Apoptosis Induced By Polyunsaturated Fatty Acids / F. Kaya-Dagistanli [et al.] // *Food and Chemical Toxicology.* – 2013. – V. 53. – P. 84-93.
374. The efficacy and safety of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate treatment / P. Emery [et al.] // *Arthr. Rheum.* – 2006. – V. 54. – P. 1390-1400.
375. The importance of glutathione in human disease / S. Toppo [et al.] // *Biomedicine & Pharmacotherapy.* – 2003. – V. 57. –P. 145–155.
376. The INOVA CCP3.1 IGA/IGG ELISA represents significant improvement in the laboratory diagnosis of rheumatoid arthritis / Z. Szekanecz [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 2008. – V. 67 (Suppl. II). – P. 568.
377. The links between joint damage and disability in rheumatoid arthritis / D.L. Scott [et al.] // *Rheumatology (Oxford).* – 2000. – V. **39**. – **P.** 122–132.
378. The localization of fibronectin in rheumatoid arthritis synovium by light and electron microscopic immunohistochemistry / T. Matsubara [et al.] // *Rheumatol. Int.* – 1983. – V. 3. – P. 153–159.
379. The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantobodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin / C. Masson-Bessiere [et al.] // *J. Immunol.* – 2001. – V. 166. – P. 4177—4184.

380. The membrane organization of leukotriene synthesis / A.K. Mandal [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2004. – V. 101. – P. 6587–6592.
381. The number of elevated cytokines and chemokines in preclinical seropositive rheumatoid arthritis predicts time to diagnosis in an age-dependent manner / K.D. Deane [et al.] // Arthritis and rheumatism. – 2010. – V. 62. – P. 3161–3172.
382. The pentose phosphate cycle is regulated by NADPH/NADP ratio in rat liver / I. Fabregat [et al.] // Arch. Biochem. Biophys. – 1985. – V. 236. – P. 110–118.
383. The presence of citrullinated proteins is not specific for rheumatoid synovial tissue / E.R. Vossenaar [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. – V. 50, № 11. – P. 3485—3494.
384. The protective effects of alpha-lipoic acid on kidneys in type 2 diabetic gotokakisaki rats via reducing oxidative stress / B. Feng [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2013. – V. 14, № 4. – P. 6746 – 6756.
385. The protective role of ROS in autoimmune disease / L.M. Hultqvist [et al.] // Trends in Immunology. – 2009. – V. 30, № 5. – P. 201–208.
386. The stress protein BiP is overexpressed and is a major B- and T-cell target in rheumatoid arthritis / S. Blaab [et al.] // Arthritis Rheum. – 2001. – V. 44. – P. 971—980.
387. Thorn C.F. Regulation of the human acute phase serum amyloid A genes by tumour necrosis factoralpha, interleukin-6 and glucocorticoids in hepatic and epithelial cell lines / C.F. Thorn, Z.Y. Lu, A.S. Witehead // Scand. J. Immunol. – 2004. – V. 59. – P. 152—158.
388. Tomas-Zapico C. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes / C. Tomas-Zapico, A. Coto-Montes // J. Pineal. Res. – 2005. – V. 39, № 2. – P. 99-104.
389. Treating to target matrix metalloproteinase 3 normalisation together with disease activity score below 2. yields better effects than each alone in

- rheumatoid arthritis patients: T-4 Study / Y. Urata [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 2012. – V. 71. – P. 534–540.
390. Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody / N. Nishimoto [et al.] // *Arthr. Rheum.* – 2004. – V. 50. – P. 1761-1769.
391. Turner S. Rheumatoid arthritis in workers exposed to silica in the pottery industry / S. Turner, N. Cherry. // *Occup. Environ. Med.* – 2000. – V. 57. – P. 443–447.
392. Ufer C. The roles of glutathione peroxidases during embryo development / C. Ufer, C.C. Wang // *Front. Mol. Neurosci.* – 2011. – V. 4. – P. 12.
393. Uhlig T. Current tobacco smoking, formal education, and the risk of rheumatoid arthritis / T. Uhlig, K.B. Hagen, T.K. Kvien // *J. Rheumatol.* – 1999. – V. 26. – P. 47–54.
394. Up-regulation of cytokines and chemokines predates the onset of rheumatoid arthritis / H. Kokkonen [et al.] // *Arthritis and rheumatism.* – 2010. – V. 62. – P. 383–391.
395. Upton J.R. The effects of dietary oxidized fat and selenium source on performance, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity in broiler chickens / J.R. Upton, F.W. Edens, P.R. Ferket // *J. Appl. Poult. Res.* – 2009. – V. 18, № 2. – P. 193-202.
396. Uric acid a better scavenger of free radicals than vitamin C in rheumatoid arthritis / M. Mahajan [et al.] // *Indian Journal of Clinical Biochemistry.* – 2009. – V. 24, № 2. – P. 205-207.
397. Ursum J. The value of antibodies to mutated citrullinated vimentin in early arthritis / J. Ursum, D. Schaardenburg, M. Nielen // *Ann. Rheum. Dis.* – 2007. – V. 66 (Suppl. II). – P. 339.
398. Ussher J.R. Clinical implications of energetic problems in cardiovascular disease / J.R. Ussher, G.D. Lopaschuk // *Heart Metab.* – 2006. – V. 32. – P. 9-17.

399. Utrecht Rheumatoid Arthritis Cohort Study Group. Overview of work disability in rheumatoid Arthritis patients as observed in cross-sectional and longitudinal surveys / S.M. Verstappen [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2004. – V. 51, № 3. – P. 488–497.
400. Vigushin D.M. Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in health and disease / D.M. Vigushin, M.B. Pepys, P.N. Hawkins // *J. Clin. Invest.* – 1993. – V. 91. – P. 1351—1357.
401. Vijayakumar D. Lipid peroxidation of antioxidant status in blood of rheumatoid arthritis patients / D. Vijayakumar, K. Suresh, S. Manoharan // *Indian J. Clin. Biochem.* – 2006. – V. 21, № 1. – P. 104-108.
402. Vitamin C and the risk of developing inflammatory polyarthritis: prospective nested case-control study / D.J. Pattison [et al] // *Ann. Rheum. Dis.* – 2004. – V. 63. – P. 843–847.
403. Vitamin D intake and risks of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in women / K.H. Costenbader [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 2008. – V. 67. – P. 530–535.
404. Vitamin D intake is inversely associated with rheumatoid arthritis: results from the Iowa Women's Health Study / L.A. Merlino [e al.] // *Arthritis and rheumatism.* – 2004. – V. 50. – P. 72–77.
405. Vitamin E in the primary prevention of rheumatoid arthritis: the Women's Health Study / E.W. Karlson [et al.] // *Arthritis and rheumatism.* – 2008. – V. 59. – P. 1589–1595.
406. Vossenaar E.R. Citrullination, a possible functional link between susceptibility genes and rheumatoid arthritis / E.R. Vossenaar, A.J. Zendman, W.J. van Venrooij // *Arthritis Res. Ther.* – 2004. – V. 6. – P. 1–5.
407. Waaler E. On the occurrence of factoring human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscle / E. Waaler // *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* – 1939. – V. 17. – P. 172—182.

408. Water-soluble fullerene (c60) inhibits the development of arthritis in the rat model of arthritis / K. Yudoh [et al.] // *Int. J. Nanomedicine*. – 2009. – V. 19, № 4. – P. 217-225.
409. Weimann B.J. Inhibition of autoimmune deterioration in MRL/lpr mice by vitamin E / B.J. Weimann, D. Hermann // *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* – 1999. – V. 69, № 4. – P. 255–261.
410. Weisiger R. A. Superoxide dismutase / R. A. Weisiger, I. Fridovich // *The J. Of Biol.Chem.* – 1973. – V. 248, № 10. – P. 3582-3592.
411. Wilder R.L. Adrenal and gonadal steroid hormone deficiency in the pathogenesis of rheumatoid arthritis / R.L. Wilder // *J. Rheumatol. Suppl.* – 1996. – V. 44. – P. 10–12.
412. Wilder R.L. Hormonal regulation of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-12 and interleukin-10 production by activated macrophages. A disease-modifying mechanism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus? / R.L. Wilder, I.J. Elenkov // *Annals of the New York Academy of Sciences* – 1999. – V. 876. – P. 14–31.
413. Winyard P.G. Oxidative activation of antioxidant defence / P.G. Winyard, C.J. Moody, C. Jacob // *Biochem. Sci.* – 2005. – V. 30, № 8. – P. 453-461.
414. Wu B. Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery / B. Wu, D. Dong // *Trends in Pharmacological Sciences*. – 2012. – V. 33. – P. 656–668.
415. Yamada Y. Deficient liver regeneration after carbon tetrachloride injury in mice lacking type1 but not type 2 tumor necrosis factor receptor / Y. Yamada, N. Fausto // *Am. J. Pathol.* – 1998. – V. 152, №6. – P. 1577-1589.
416. Yamanishi Y. Pathogenesis of rheumatoid arthritis: The role of synoviocytes / Y. Yamanishi, G.S. Firestein // *Rheum. Dis. Clin. N. Am.* – 2001. – V. 27. – P. 355-371.
417. Yamazaki Y. Metalation states versus enzyme activities of Cu, Zn-superoxidedismutase probed by electrospray ionization mass spectrometry /

- Y. Yamazaki, T. Takao // *Anal. Chem.* – 2008. – V. 80, № 21. – P. 8246–8252.
418. Yasuda T. A fibronectin fragment induces type II collagen degradation by collagenase through an interleukin-1-mediated pathway / T. Yasuda, A.R. Poole // *Arthritis Rheum.* – 2002. – V. 46. – P. 138–148.
419. Yost F.J. An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli* / F. J. Yost, I. Fridovich // *The J. of Biol. Chem.* – 1973. – V. 248, № 11. – P. 4905-4906.
420. Zelko I. N. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the Cu, Zn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression / I. N. Zelko, T. J. Mariani, R. J. Folz // *Free Radic. Biol. Med.* – 2002. – V. 33, № 3. – P. 337-349.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

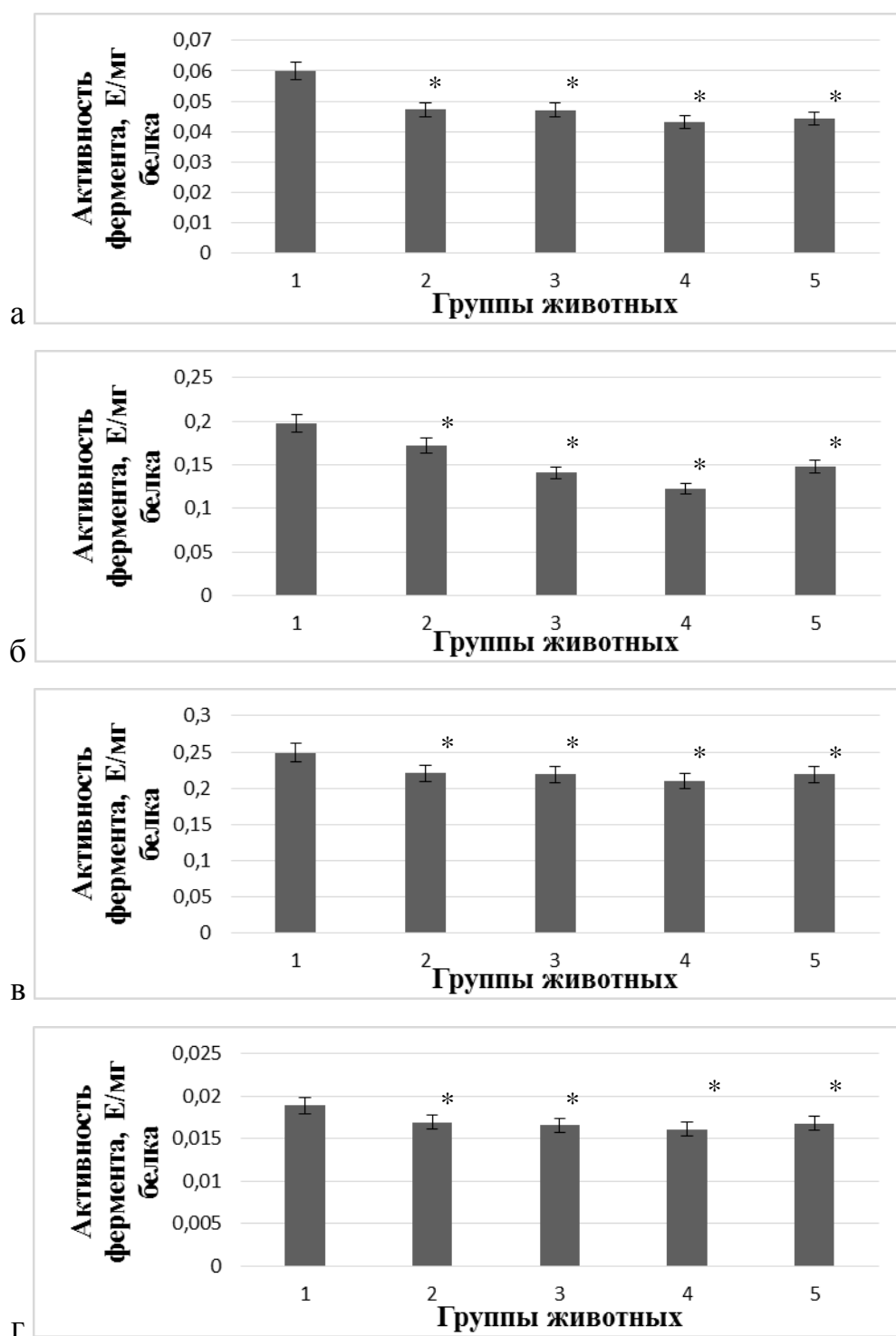


Рис. 1. Удельная активность аконитатгидратазы в сыворотке крови (а), сердце (б), печени (в) и мышцах животных (г) в норме (1), и при развитии ревматоидного артрита на 6 (2), 13 (3), 15 (4) и 17 (5) день эксперимента  
Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ )

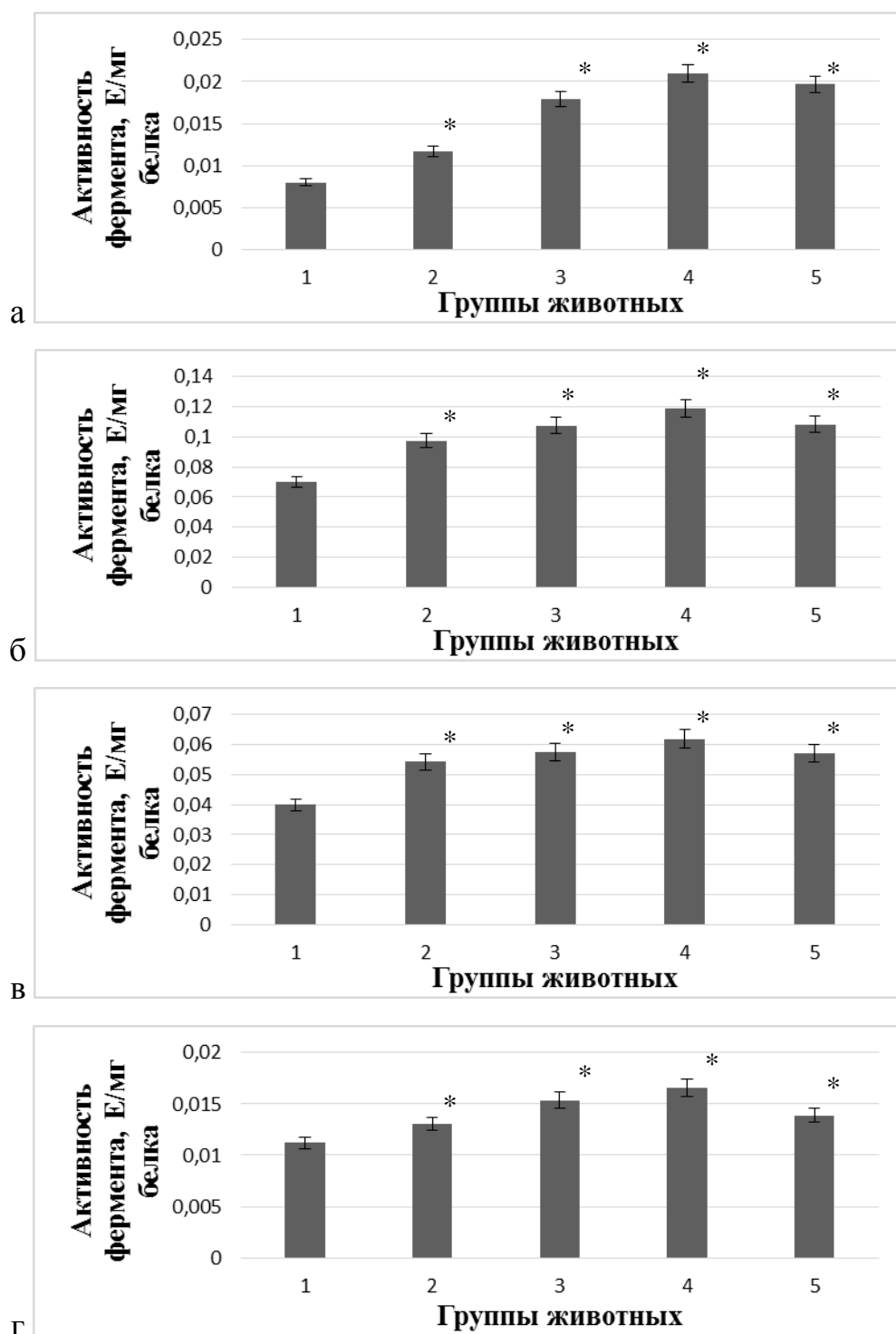


Рис. 2. Удельная активность каталазы в сыворотке крови (а), сердце (б), печени (в) и мышцах животных (г) в норме (1), и при развитии ревматоидного артрита на 6 (2), 13 (3), 15 (4) и 17 (5) день эксперимента  
Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ )



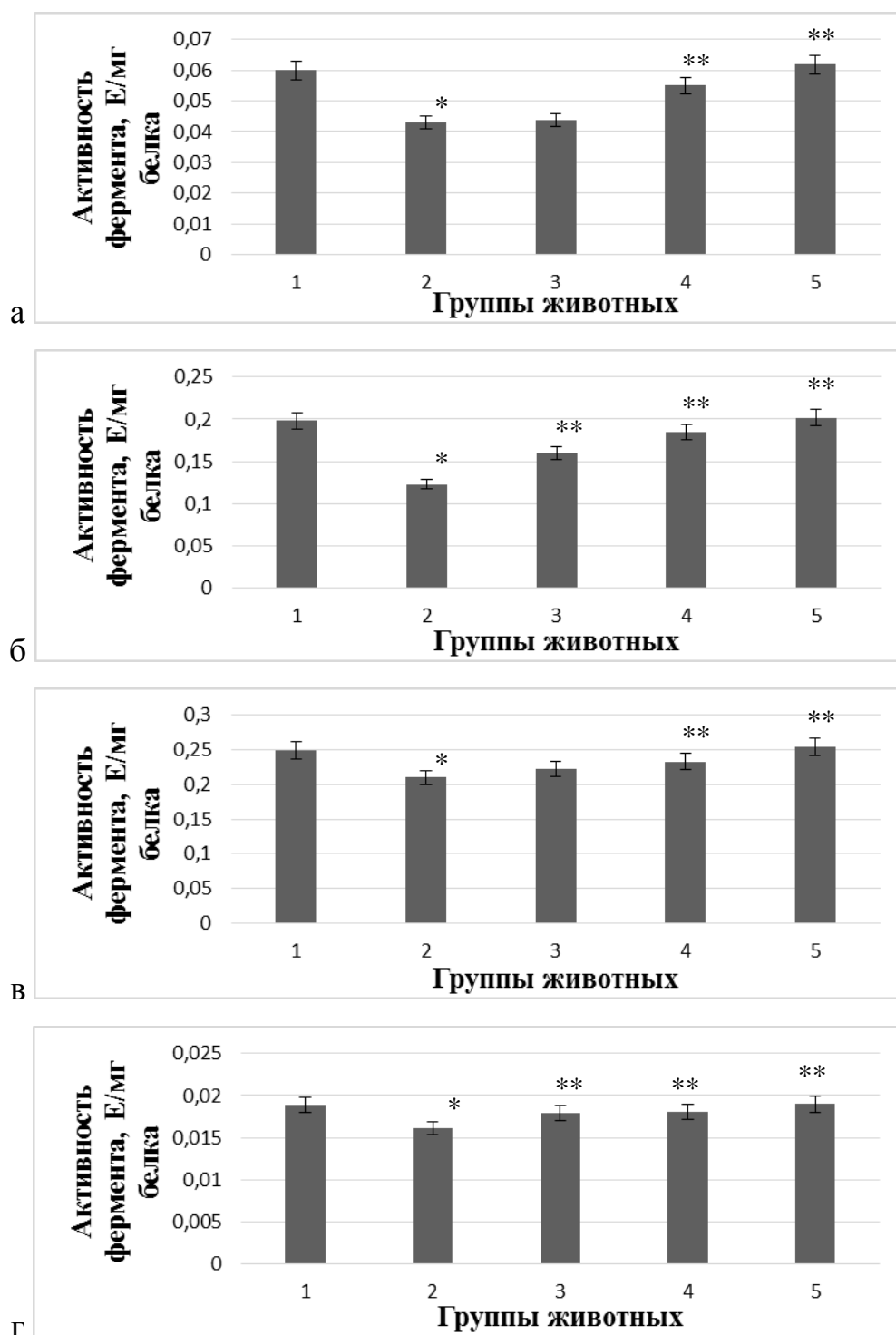


Рис. 3. Удельная активность аконитатгидратазы в сыворотке крови (а), сердце (б), печени (в) и мышцах крыс (г) в норме (1), при развитии ревматоидного артрита (2) и введении тиоктовой кислоты на фоне патологии в дозе 16 (3), 35 (4) и 70 (5) мг/кг веса животного

Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны, \*\* - отличия от значений второй группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ )

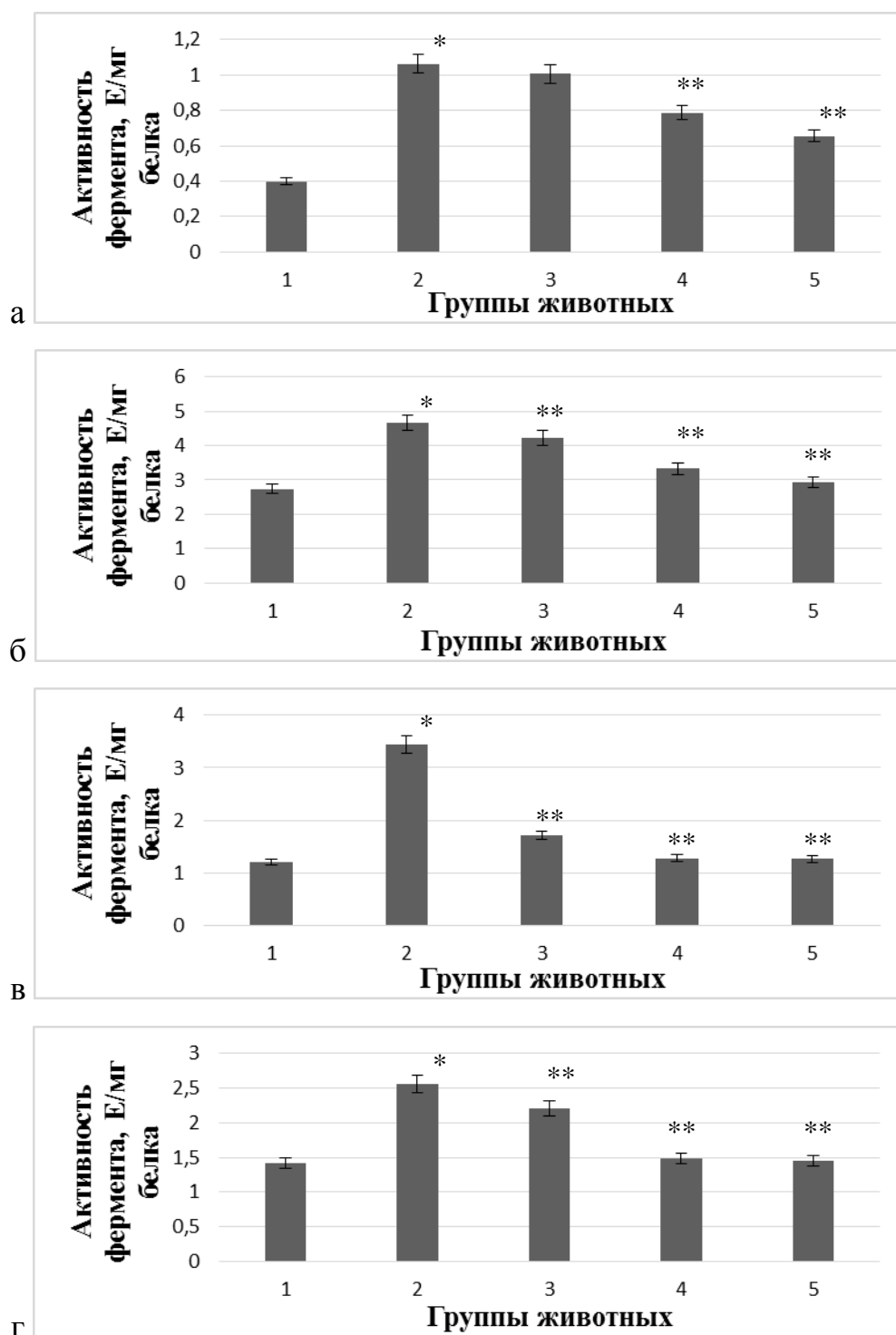


Рис. 4. Удельная активность супероксиддисмутазы в сыворотке крови (а), сердце (б), печени (в) и мышцах крыс (г) в норме (1), при развитии ревматоидного артрита (2) и введении тиоктовой кислоты на фоне патологии в дозе 16 (3), 35 (4) и 70 (5) мг/кг веса животного

Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны, \*\* - отличия от значений второй группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ )

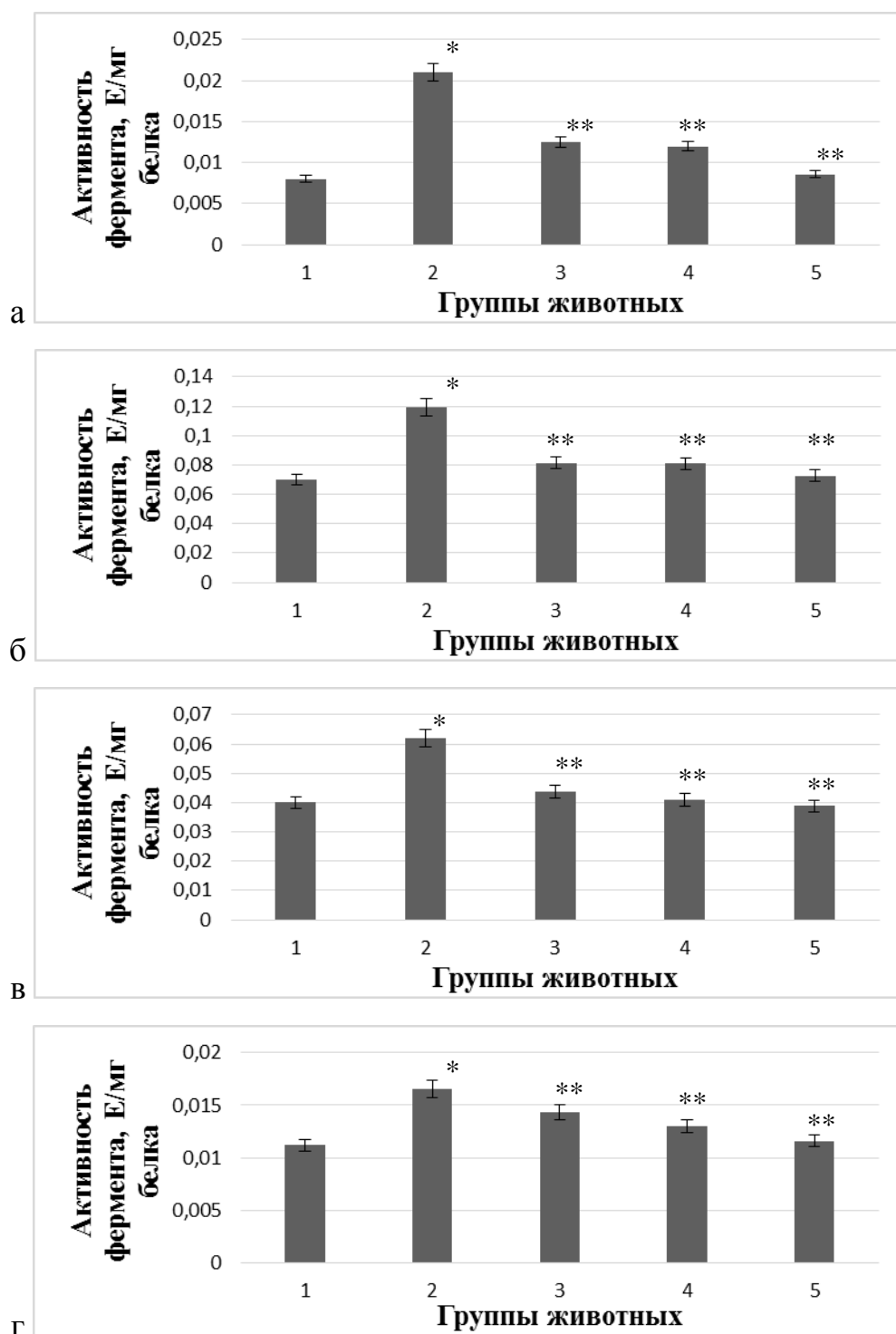


Рис. 5. Удельная активность каталазы в сыворотке крови (а), сердце (б), печени (в) и мышцах крыс (г) в норме (1), при развитии ревматоидного артрита (2) и введении тиоктовой кислоты на фоне патологии в дозе 16 (3), 35 (4) и 70 (5) мг/кг веса животного

Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны, \*\* - отличия от значений второй группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ )

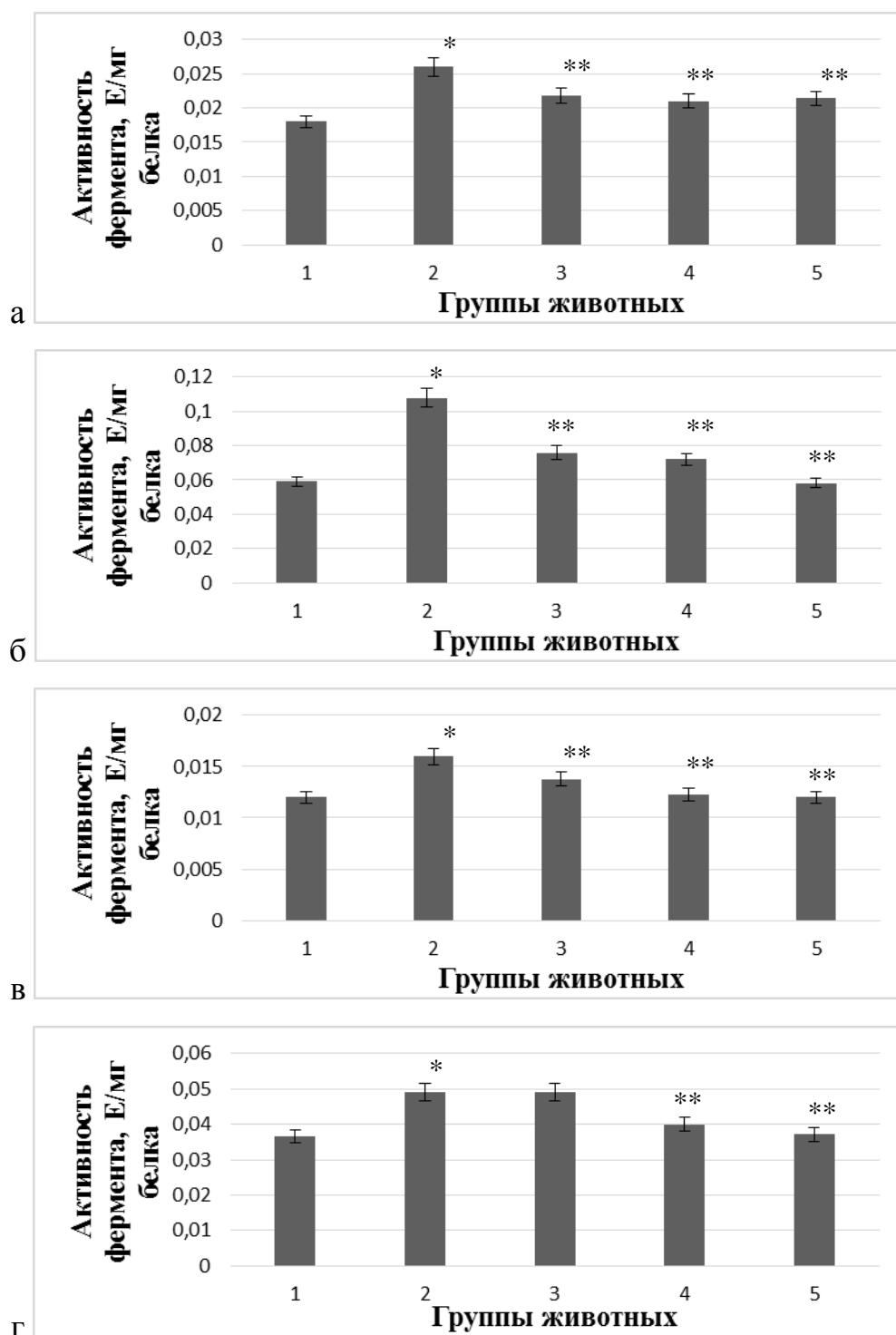


Рис. 6. Удельная активность глутатионпероксидазы в сыворотке крови (а), сердце (б), печени (в) и мышцах крыс (г) в норме (1), при развитии ревматоидного артрита (2) и введении тиоктовой кислоты на фоне патологии в дозе 16 (3), 35 (4) и 70 (5) мг/кг веса животного

Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны, \*\* - отличия от значений второй группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ )

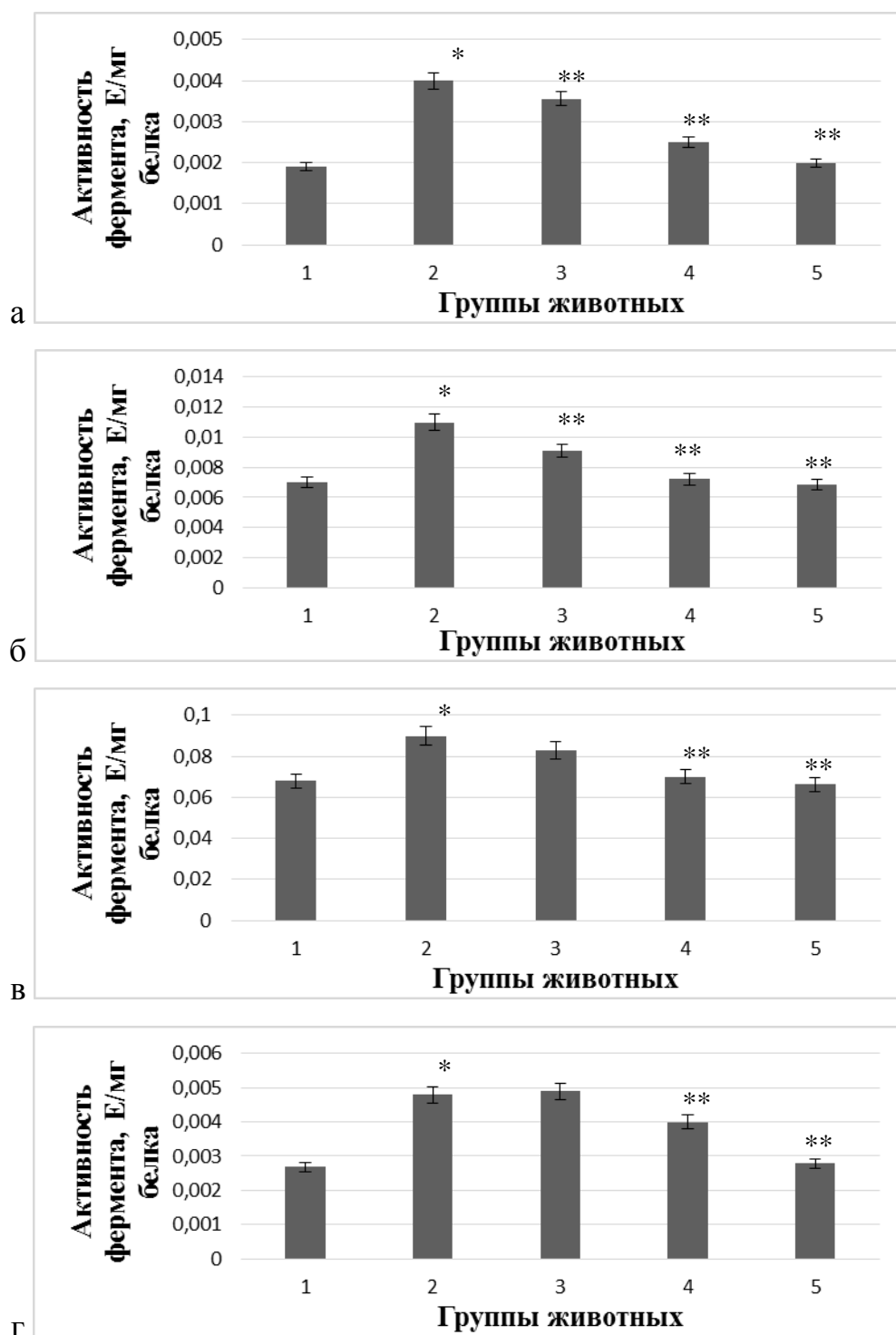


Рис. 7. Удельная активность глутатионредуктазы в сыворотке крови (а), сердце (б), печени (в) и мышцах крыс (г) в норме (1), при развитии ревматоидного артрита (2) и введении тиоктовой кислоты на фоне патологии в дозе 16 (3), 35 (4) и 70 (5) мг/кг веса животного

Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны, \*\* - отличия от значений второй группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ )

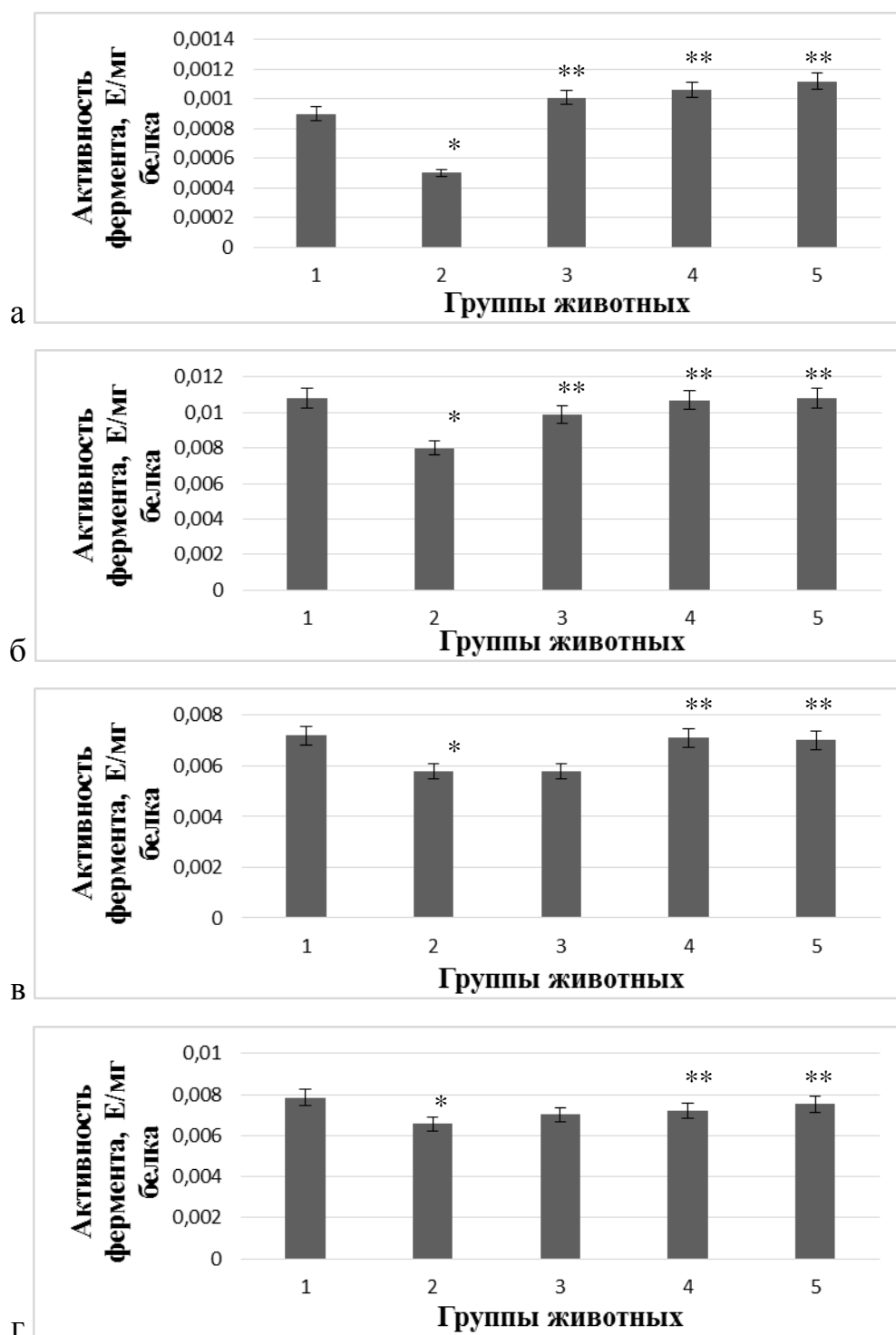


Рис. 8. Удельная активность глутатионтрансферазы в сыворотке крови (а), сердце (б), печени (в) и мышцах крыс (г) в норме (1), при развитии ревматоидного артрита (2) и введении тиоктовой кислоты на фоне патологии в дозе 16 (3), 35 (4) и 70 (5) мг/кг веса животного

Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны, \*\* - отличия от значений второй группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ )

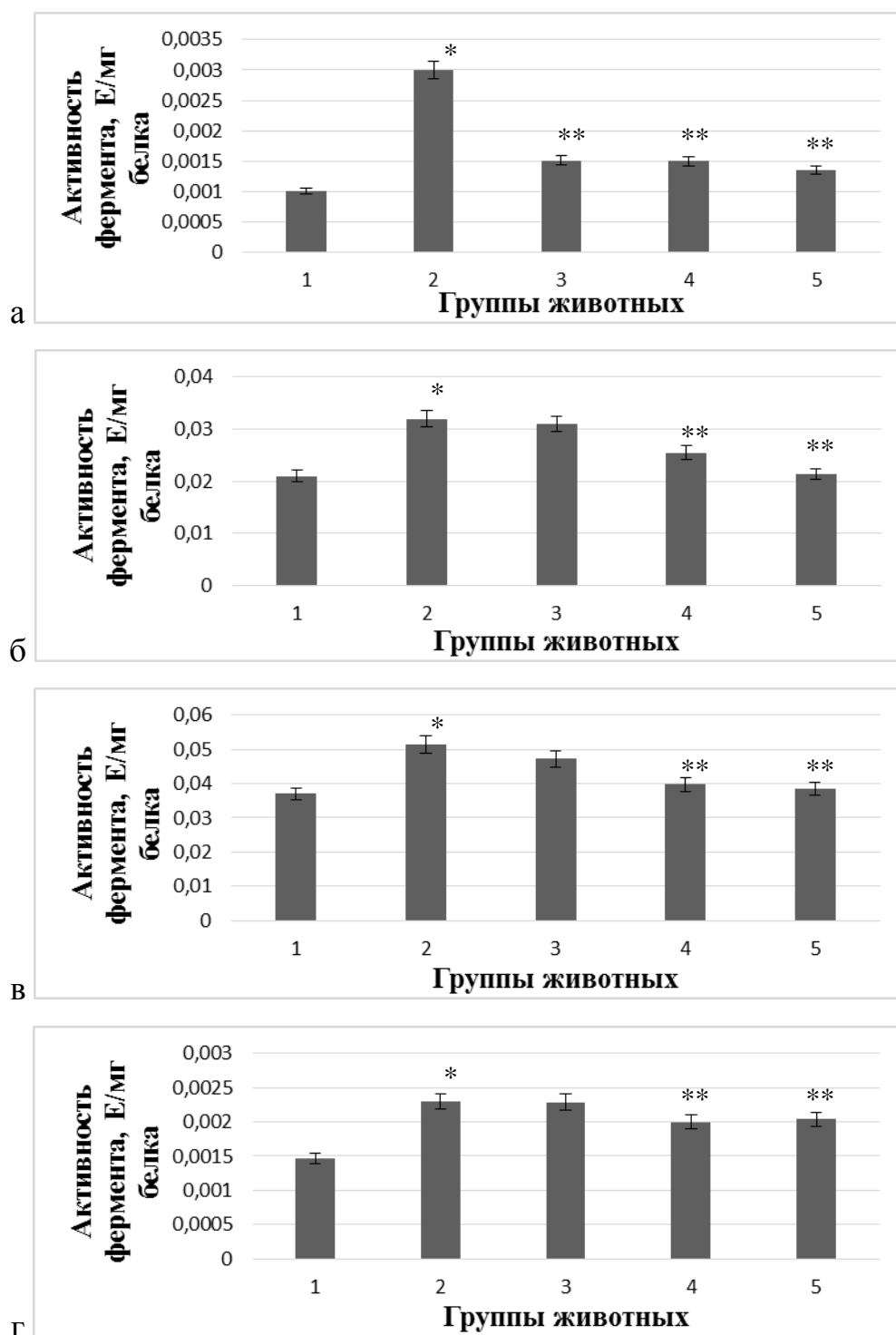


Рис. 9. Удельная активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в сыворотке крови (а), сердце (б), печени (в) и мышцах крыс (г) в норме (1), при развитии ревматоидного артрита (2) и введении тиоктовой кислоты на фоне патологии в дозе 16 (3), 35 (4) и 70 (5) мг/кг веса животного

Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны, \*\* - отличия от значений второй группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ )

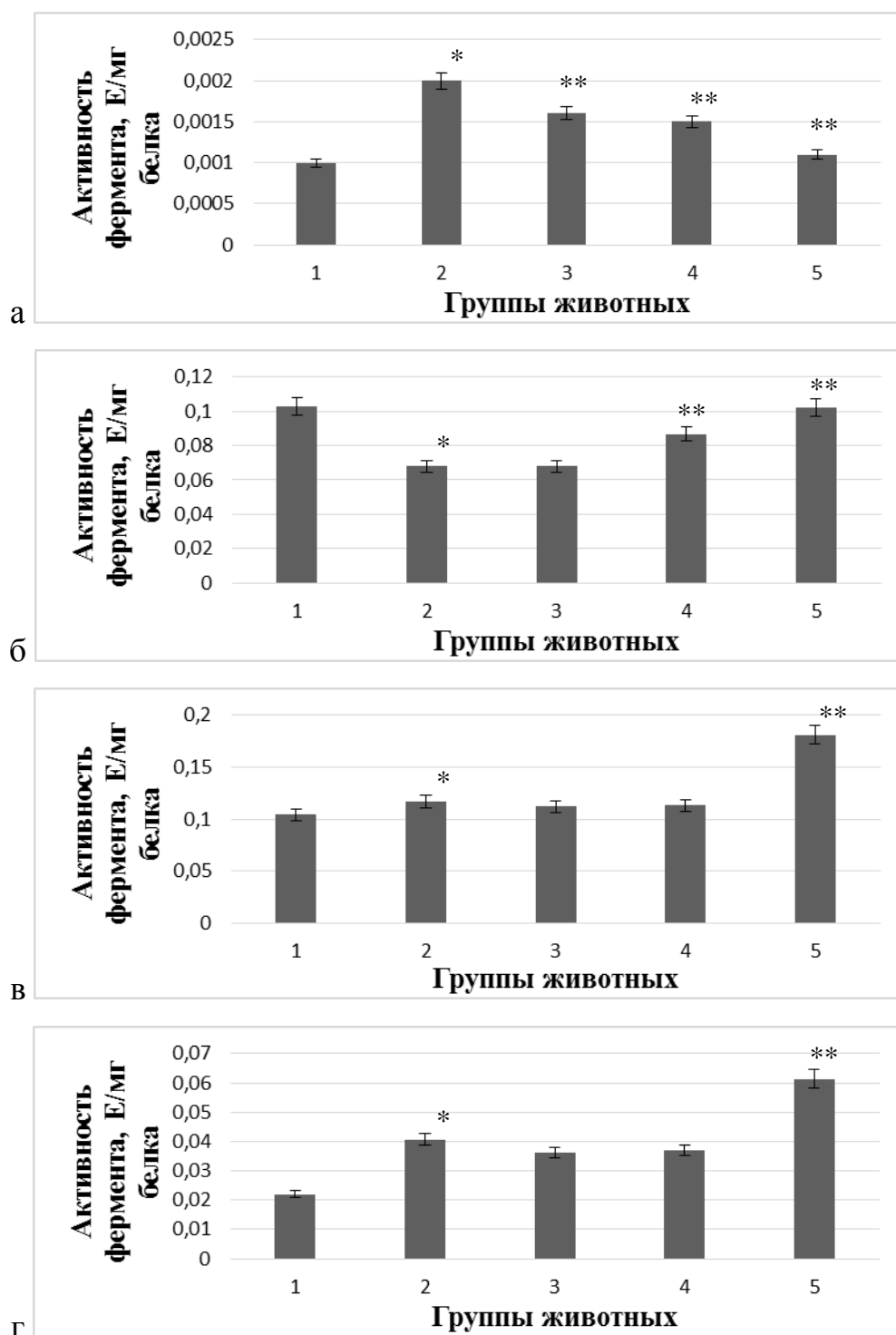


Рис. 10. Удельная активность НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы в сыворотке крови (а), сердце (б), печени (в) и мышцах крыс (г) в норме (1), при развитии ревматоидного артрита (2) и введении тиоктовой кислоты на фоне патологии в дозе 16 (3), 35 (4) и 70 (5) мг/кг веса животного

Примечание: \* - отличия от значений контрольной группы достоверны, \*\* - отличия от значений второй группы достоверны (уровень значимости  $p < 0,05$ )