УДК 616.72-036.11/.12-092.4/.9-092:612.127.2/.4

# АКТИВНІ ФОРМИ ОКСИГЕНУ ТА НІТРОГЕНУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ГОСТРОГО І ХРОНІЧНОГО ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АРТРИТУ

***І. Й. Кріль***[1]***, А. М. Гаврилюк***[1]***, А. В. Коцюруба***[2]***,***
***Ю. Я. Кіт***[3]***, В. В. Чоп'як***[1]***, Р. С. Стойка***[3]

[1]*Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького*
*вул. Пекарська, 69, Львів 79010, Україна*
*e-mail: kril.iryna@ukr.net*

[2]*Інститут фізіології імені О. О. Богомольця НАН України*
*вул. Богомольця, 4, Київ 01024, Україна*

[3]*Інститут біології клітини НАН України, вул. Драгоманова, 14/16, Львів 79005, Україна*

Процеси вільнорадикального окислення є важливою ланкою патогенезу ревматоїдного артриту. Активні форми оксигену та нітрогену за нормальних фізіологічних умов постійно утворюються в клітинах у невеликих кількостях під час окисного фосфорилювання. Вони виконують функції передачі клітинних сигналів, знищення патологічних чинників, регуляції апоптозу, проліферації та багатьох інших функцій клітин. Надмірна продукція активних форм оксигену за патологічних чи стресових умов призводить до пошкодження білків, ліпідів, нуклеїнових кислот і матричних компонентів клітини, зокрема, синовіальної мембрани і позасуглобових тканин. Мета роботи – визначити зміни пулів активних форм оксигену та нітрогену в сироватці крові щурів за експериментального карагенін- і колаген-індукованого запального артриту. Метод дослідження активних форм оксигену та нітрогену – спектрофотометричний. Результати досліджень: швидкість генерації активних форм оксигену ($O_2^{\bullet-}$, •OH) і стаціонарні пули $H_2O_2$ в циркуляції у групі експериментальних тварин з колагеновим артритом була вищою, ніж у групі тварин з карагеніновим запальним процесом. У цій же групі швидкість генерації активних форм нітрогену *de novo,* зокрема активність cNOS та, особливо, iNOS, як і стаціонарні пули активних форм нітрогену ($NO_2^-$, $NO_3^-$) також є вищими. Висновок: у групі тварин із колагеновим артритом, який є аналогом ревматоїдного артриту у людини, продукти оксидативного та нітрозативного стресів активніше сприяють формуванню патологічних змін у тканинах, порівняно з карагеніновою моделлю імунозапального процесу.

***Ключові слова***: ревматоїдний артрит, колагеновий артрит, карагеніновий артрит, активні форми оксигену, активні форми нітрогену.

## ВСТУП

Ревматоїдний артрит (РА) – це системне захворювання сполучної тканини із переважним ураженням дрібних суглобів за типом ерозивно-деструктивного поліартриту неясної етіології зі складним автоімунним патогенезом. Характерною ознакою РА є запальні процеси у суглобах і супутніх тканинах, що визначає важкість перебігу цього захворювання [17]. Відомо, що у розвиток запалення залучені оксидативні процеси за участю активних форм оксигену (АФО) й активних форм нітрогену (АФН) [10, 18]. Для вивчення механізмів розвитку ревматоїдного артриту широко використовують експериментальні моделі у щурів [8, 13]. Метою нашої роботи було дослідити вміст АФО і АФН у сироватці крові щурів за умов карагенінового (гострого) та колагенового (хронічного) запального артриту.

**Практичне значення роботи.** Спрогнозувати динаміку розвитку запального процесу за умов індукції в експериментальних тварин аналога ревматоїдного артриту у людини.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проводили на 30 білих нелінійних щурах-самцях масою 160–220 г, яких утримували у звичайних умовах віварію. Усі експерименти виконано із дотриманням норм і принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986), Директиви Ради Європи 86/609/EEC (1986), Закону України № 3447-IV "Про захист тварин від жорстокого поводження", загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (2001). Стан запальних процесів оцінювали за гострого (карагеніновий набряк, група 1, n = 10) і хронічного (колагеновий артрит, група 2, n = 10) запалення кінцівок. Контрольною групою слугували інтактні щурі (n = 10). Карагеніновий набряк викликали одноразовим субплантарним введенням 1 мг (0,1 мл 1% розчину) карагеніну (Інтер Синтез, Китай) у задню лапу щурів [8]. Колагеновий артрит викликали одноразовим підшкірним введенням 400 мкг бичачого колагену II типу (Sigma-Aldrich, США), розчиненого в 15 мМ оцтовій кислоті із повним ад'ювантом Фрейнда (Calbiochem-Boehring Corp., США), у подушечку правої задньої лапи [13]. Після виникнення гострого (карагеніновий набряк) чи хронічного (колагеновий артрит) запалення кінцівок на 6 і 36 добу, відповідно, тварин декапітували під анестезією. Для дослідження використовували сироватку крові.

Швидкість генерації $O_2^{-\cdot}$ визначали за окисненням цитохрому *c* (Sigma-Aldrich), оцінюючи зміну оптичного поглинання за 550 нм [1]. Швидкість генерації $^{\cdot}OH$-радикалу визначали в інкубаційній суміші з 2-дезокси-D-рибозою (Sigma-Aldrich), як приріст концентрації малонового діальдегіду (МДА) за оптичним поглинанням при 532 нм [11]. Обидва показники виражали в умовних одиницях зміни величини екстинкції за 1 хв у розрахунку на 1 мл сироватки крові. Вміст $H_2O_2$ визначали, як описано в [7]. Для вимірювання активності $Ca^{2+}$-залежної конститутивної (cNOS) і $Ca^{2+}$-незалежної індуцибельної (iNOS) синтаз оксиду азоту використовували поєднання класичного методу [15] і його модифікації [6], пристосованої до спектрофотометричного вимірювання одного з продуктів реакції –

L-цитруліну. Активність сумарної NO-синтази (cNOS+iNOS) визначали в аліквотах зразків, які містили 500–1000 мкг білка, інкубуючи зразки у загальному об'ємі 1 мл суміші такого складу (мкмоль/мл): $KH_2PO_4$ (ч.д.а.) – 50; $MgCl_2$ (ч.д.а.) – 1; $CaCl_2$ (ч.д.а.) – 2; НАДФН (Sigma-Aldrich) – 1; L-аргінін (ч.д.а.) – 2; pH 7,0, протягом 60 хв при 37 °C. Для визначення активності $Ca^{2+}$-незалежної iNOS в інкубаційну суміш замість $CaCl_2$ додавали 2 мкмоль ЕДТА.

Сумарну активність $Ca^{2+}$-залежних ендотеліальної та нейрональної конститутивних ізоформ (cNOS = eNOS+nNOS) вираховували, віднімаючи від значення сумарної активності NOS значення активності iNOS. Активність ензимів виражали у пікомолях новоутвореного L-цитруліну за 1 хв з розрахунку на 1 мг загального білка у зразку. Вміст цитруліну визначали специфічним спектрофотометричним методом за кольоровою реакцією з антипірином (Sigma-Aldrich) [5]. Кількість нітрит-аніона ($NO_2^-$) та нітрат-аніона ($NO_3^-$) визначали у безбілкових аліквотах плазми крові в колориметричних реакціях, відповідно, за допомогою реактиву Гріса [9] і бруцину [12].

Базальну аргіназну активність визначали за утворенням сечовини в інкубаційній суміші [16]. Вміст сечовини оцінювали за допомогою добірки реактивів фірми "Філісіт-Діагностика", Дніпропетровськ, Україна).

Для визначення вмісту малонового діальдегіду (МДА) до аліквот зразків додавали 0,5 мл 1% розчину тіобарбітурової кислоти в 50 мМ NaOH і 0,5 мл 2,8% розчину трихлороцтової кислоти. Суміш витримували 20 хв на киплячій водяній бані, охолоджували та визначали оптичне поглинання за 532 нм [2].

Достовірність порівнюваних показників оцінювали за критерієм «t» Стьюдента. Значення $P<0,05$ вважали статистично достовірними.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

За експериментального гострого (карагенінового) та хронічного (колагенового) запалення у сироватці крові піддослідних тварин можна виявити як оксидативний (генерування АФО), так і нітрозативний (утворення АФН) стрес. У табл. 1 представлені біохімічні показники, які характеризують оксидативний стрес у щурів за умов експериментальних запальних процесів, індукованих карагеніном чи колагеном.

Встановлено, що за умов як гострого (карагеніновий артрит), так і хронічного (колагеновий артрит) запалення виникає сильний оксидативний стрес, зокрема, у сироватці крові обох цих груп тварин достовірно зростає швидкість генерації гідроксильного та супероксидного радикалів, порівняно з контрольною групою тварин. У разі карагінінового артриту швидкість генерації •OH, який може утворюватись як унаслідок вільнорадикального розпаду пероксинітриту на •OH і $•NO_2$ (новий механізм утворення), так і у вільнорадикальних реакціях Фентона чи Хабер-Вальса перетворення $H_2O_2$ лише в •OH за наявності вільного заліза (класичний механізм) зростає у 3,8 разу (370,33±154,46 у.о), порівняно з групою контрольних тварин (98,6±17,73 у.о.). Генерація $O_2^{\cdot}$ утворюється за участю багатьох оксидаз, у т.ч. нуклеотидних (ксантин- і НАДФН-оксидази) і ліпідних (циклооксигеназа, ліпоксигеназа). З'ясовано, що за карагенінового артриту оксидази є основними генераторами супероксиду, що достовірно зростав на 235 %, тоді як вміст $H_2O_2$ зростав на 183 %. Що стосується хронічного запального процесу, то за умов

колагенової моделі експериментального артриту спостерігали ще більш виражене зростання швидкостей генерації •OH (у 4,5 разу) і $O_2^{\bullet-}$ (у 9 разів), порівняно з контролем. У разі колагенового артриту вміст $H_2O_2$ також зростав у 8 разів, порівняно з його вмістом у контрольній групі тварин. З літератури відомо, що за цих умов у активованих нейтрофілах до 90 % кисню відновлюється до $O_2^{\bullet-}$, що свідчить про оксидативний вибух. Із усіх активних форм оксигену стабільний $H_2O_2$ є найбільш асоційованим із фіброзом тканин. Отже, в обох експериментальних групах тварин встановлено статистично достовірне підвищення показників оксидативного стресу, порівняно з контрольною групою, причому в групі тварин із експериментальним колагеновим артритом (хронічний запальний процес) ці показники достовірно вищі, ніж у групі тварин із карагеніновим артритом (за гострого запального процесу). Це вказує на можливість більш значного ослаблення систем антиоксидативного захисту, як активності ферментів супероксиддисмутази, каталази, глютатіонпероксидази та ін., так і пулів низькомолекулярних антиоксидантів, у т.ч. глютатіону. Отже, отримані нами результати підтверджують високу готовність до формування фіброзних змін, а отже, і втрати функції суглоба у тварин із експериментальним колагеновим артритом.

*Таблиця 1.* **Показники оксидативного стресу в сироватці крові щурів (M ± m, n = 10)**

*Table 1.* **The oxidative stress parameters in blood serum of rats (M ± m, n = 10)**

| Умови досліду | Швидкість генерації •OH-радикала, у.о. | Швидкість генерації $O_2^{\bullet-}$ радикала, у.о | Вміст $H_2O_2$, пмоль/мл |
|---|---|---|---|
| Гостре запалення (карагеніновий артрит) | 370,33±154,46* | 3,81±1,64* | 232,1±97,33* |
| Хронічне запалення (колагеновий артрит) | 450,14±79,59* | 14,93±2,52*/** | 1005,1±66,5*/** |
| Контроль | 98,6±17,73 | 1,62±0,46 | 127,4±11,91 |

**Примітки:** * – різниця достовірна (P < 0,05) порівняно з контролем; ** – різниця достовірна (P<0,05) між дослідними групами.

**Comments:** * – significant difference (P <0.05) compared with control;** – significant difference (P <0.05) between the experimental group.

Ми також визначали вміст продуктів нітрозативного стресу в тварин за експериментального карагенін- і колаген-індукованого артриту (табл. 2).

На моделі експериментального гострого запального процесу (карагеніновий артрит) у сироватці крові тварин не спостерігали достовірного зростання активності сумарної NOS (41,4±4,56 пмоль/хв/мл) і конститутивного кальцій-залежного (фізіологічного) синтезу *de novo* оксиду азоту за умов окиснення аргініну. В той же час активність патологічного індуцибельного синтезу *de novo* оксиду азоту достовірно зростає в 1,6 разу у тварин із гострим запальним артритом (28,4±1,05 пмоль/хв/мл), порівняно з активністю у контрольній групі тварин (17,07±1,49 пмоль/хв/мл).

На моделі хронічного запального процесу (колагеновий артрит) спостерігали такі зміни. Сумарна активність NOS (маркер окисного метаболізму L-аргініну)

у сироватці крові становила 58,87±14,18 пмоль/хв/мл, тобто достовірно зростала у 1,7 разу, порівняно з цією активністю у контрольній групі тварин (34,00±2,69 пмоль/хв/мл). У цьому разі активність iNOS становила 45,16±11,09 пмоль/хв/мл, що у 2,6 разу більше, порівняно з активністю iNOS у сироватці крові тварин контрольної групи (17,07±1,49 пмоль/хв/мл). Також спостерігали достовірну різницю активності iNOS у сироватці крові тварин різних дослідних груп – за моделі колагенового артриту рівень iNOS у сироватці був в 1,6 разу вищим, порівняно з його рівнем за експериментальної моделі карагенін-індукованого артриту.

*Таблиця 2.* **Показники нітрозативного стресу в сироватці крові щурів (M ± m, n = 10)**

*Table 2.* **The nitrosative stress parameters in blood serum of rats (M ± m, n = 10)**

| Умови досліду | Сумарна активність NOS, пмоль/хв/мл | Активність cNOS, пмоль/хв/мл | Активність iNOS, пмоль/хв/мл | Вміст $NO_2^-$ пмоль/мл | Вміст $NO_3^-$ нмоль/мл |
|---|---|---|---|---|---|
| Карагеніновий артрит | 41,48±4,56 | 13,08±3,51 | 28,4±1,05* | 49,43±3,52* | 706,18±50,39* |
| Колагеновий артрит | 58,87±14,18* | 13,71±3,09 | 45,16±11,09*/** | 134,04±72,61*/** | 2867,3±1185,1*/** |
| Контроль | 34,00±2,69 | 16,93±1,2 | 17,07±1,49 | 30,41±6,38 | 348,25±89,95 |

**Примітки:** * – різниця достовірна (P < 0,05) порівняно з контролем; ** – різниця достовірна (P<0,05) між дослідними групами.

**Comments:** * – significant difference (P <0.05) compared with control; ** – significant difference (P <0.05) between the experimental group.

Відомо, що активовані макрофаги та нейтрофіли продукують значну кількість NO, причому сама iNOS індукується в цих клітинах прозапальними цитокінами і цей процес значно підсилюється супероксидом. У цьому разі надлишковий оксид азоту, що продукується клітинами у ділянці запальних суглобів, активує процеси перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) [4], сприяючи втраті функції суглоба і кістки за РА. З'ясовано, що миші з дефіцитом iNOS нечутливі до IL-1-індукованої резорбції кістки, а анти-TNF-$\alpha$ терапія зменшує надпродукцію NO й індукцію iNOS у лімфоцитах периферичної крові пацієнтів із РА [14]. Отримані нами результати підтверджують цей механізм пошкодження суглобів у щурів із колагеновим артритом (CIA). Останній є добре вивченою експериментальною моделлю РА і використовується для дослідження патогенезу цього запального процесу [3]. Нами встановлено достовірне зростання в сироватці крові стабільних метаболітів NO, таких як $NO_2^-$ і $NO_3^-$, на моделі карагенінового і, особливо, колагенового артриту (табл. 2). Це може бути свідченням значно вищого рівня нітрозативного стресу за хронічної моделі, яке корелює з раніше показаними змінами активності iNOS. Наприклад, за колагенового артриту вміст циркулюючого в крові $NO_2^-$ достовірно зростав порівняно з таким вмістом у тварин контрольної групи у 4,5 разу (134,04±72,61 нмоль/мл,), а циркулюючий пул $NO_3^-$ зростав у 8,2 разу (2867,3±1185 нмоль/мл). Варто нагадати, що,

на відміну від нітрит-аніона, який утворюється за прямого окиснення NO в оксигенованих водних розчинах (таким чином, будучи своєрідним маркером оксигенації), нітрат-аніон утворюється, в основному, під час нерадикального розпаду пероксинітриту ($NO + {}^*O_2(-) \rightarrow ONOO(-) + H(+) \rightarrow ONOOH \rightarrow NO_3(-) + H(+)$). Отже, виявлене нами значне підвищення циркулюючих пулів нітрату в сироватці крові тварин із модельованим гострим і, особливо, хронічним експериментальним артритом незаперечно свідчить, з одного боку, про значне утворення та розпад токсичного пероксинітриту, з іншого – про індукцію як оксидативного, так і нітрозативного стресу за цих імунопатологій.

Відомо, що під час оксидативного стресу внаслідок інтенсифікації ПОЛ, у т.ч. поліненасичених жирних кислот, має місце значне пошкодження еластичності клітинних мембран. Ефективним маркером інтенсивності процесу ПОЛ у сироватці крові є концентрація малонового діальдегіду (МДА), зростання якого як за карагенінового, так і за колагенового артриту показано у табл. 3. На моделях гострого та хронічного запальних процесів концентрація МДА достовірно зростала удвічі до 2,31±0,81 мкмоль/мл і 2,77±0,16 мкмоль/мл відповідно, порівняно з його концентрацією у контрольної групи тварин (1,03±0,13 мкмоль/мл). Ми також спостерігали значне достовірне зростання аргіназної активності в сироватці крові як у карагеніновій (на 721 %), так і у колагеновій (на 842 %) моделях експериментального артриту, порівняно з такою активністю у контрольних тварин (табл. 3).

*Таблиця 3.* **Активність аргінази, вміст малонового діальдегіду і величини співвідношення неокисного та окисного (аргіназа/ NOS) метаболізму аргініну в сироватці крові щурів (M ± m, n = 10)**

*Table 3.* **Arginase activity, Malonedialdehyde content, nitrosative and oxidative ratio (arginase/NOS) of arginine metabolism in blood serum of rats (M ± m, n = 10)**

| Умови досліду | Активність аргінази, нмоль/хв/мл | Вміст МДА нмоль мг | Аргіназа/NOS, од |
|---|---|---|---|
| Карагеніновий артрит | 11,91±3,45* | 2,31±0,19* | 287,13±75,66* |
| Колагеновий артрит | 13,89±3,86* | 2,71±0,21* | 235,94±27,22* |
| Контроль | 1,65±0,63 | 1,03±0,11 | 48,53±7,34 |

**Примітки:** * – різниця достовірна (P < 0,05) порівняно з контролем; ** – різниця достовірна (P<0,05) між дослідними групами.

**Comments:** * – significant difference (P <0.05) compared with control; ** – significant difference (P <0.05) between the experimental group.

Це свідчить про значну інтенсифікацію не лише окисного NO-синтазного, але й неокисного аргіназного шляхів метаболізму аргініну, який є спільним субстратом для обох шляхів. На це вказує також значення величин співвідношення активностей цих двох шляхів – аргіназа/NOS (табл. 3). Виявлено достовірне зростання величини співвідношення рівня неокисного та окисного метаболізму L-аргініну (Аргіназа/NOS) за умов колаген-індукованого артриту в 4,9 разу (235,94±27,22 у.о) і за

карагенінового набряку – в 5,9 разу (287,13±75,66 у.о.), порівняно з його величиною у контрольної групи тварин (48,53±7,34 у.о.). З цієї нагоди слід відзначити дві обставини. По-перше, з аргіназою за субстрат конкурує в основному cNOS, тоді як iNOS реутилізує L-аргінін із L-цитруліну (ко-продукт синтезу NO) у т.зв. цитруліновому циклі з використанням L-аспартату, як і за синтезу АМФ із ІМФ у синтезі *de novo* аденіннуклеотидів. По-друге, надзвичайно важливе значення має та обставина, що саме аргіназна реакція постачає попередники (L-пролін і L-оксипролін) для синтезу колагену (L-аргінін → L-орнітин → L-пролін → L-оксипролін → колаген). Отже, значне зростання аргіназної реакції за гострого та хронічного експериментальних артритів, як і за вірусної інфекції будь-якого генезу, може відігравати ключову роль у патогенезі цих імунопатологій.

## ВИСНОВКИ

1. Вміст активних форм оксигену ($O_2^{\bullet-}$, •OH, $H_2O_2$) і продуктів нітрозативного стресу (NOS (cNOS, iNOS), $NO_2$, $NO_3^-$, ARG) були вищими у сироватці крові щурів із колагеновим артритом, ніж у групі тварин із карагеніновим запальним процесом.
2. Одночасна індукція як оксидативного (генерація супероксиду), так і нітрозативного (генерація NO) стресу за обох досліджуваних форм РА має за наслідок значне утворення продукту взаємодії цих двох активних метаболітів оксигену і нітрогену – пероксинітриту, про що свідчать значні рівні нітрат-аніона – одного з продуктів його розпаду.
3. Як за гострої, так і за хронічної моделі РА має місце значна активація неокисного аргіназного шляху деградації аргініну в сироватці крові, за якого утворюються два попередники у біосинтезі колагену – пролін та оксипролін. Ступінь розвитку як оксидативного, так і нітрозативного стресу, а також активність аргінази, були вищими за хронічної (колагенової) експериментальної моделі РА.
4. Для прогнозування динаміки розвитку запального процесу за умов ревматоїдного артриту рекомендовано визначати співвідношення аргіназа/NOS, яке значно підвищується під час гострого процесу і прогресивно зростає під час його хронізації.

1. *Akopova O.V., Korkach Y.P., Kotsyuruba A.V.* et al. Reactive nitrogen and oxygen species mtabolism in rat heart mitochondria upon administration of NO donor *in vivo*. **Physiological Journal**, 2012; 2: 3–15. (in Ukrainian).
2. *Ayala A., Muñoz M., Argüelles S.* Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2014; 2: 1–31.
3. *Bendele A.M.* Animal models of rheumatoid arthritis. **J. Musculoskel Neuron Interact,** 2001; 1(4): 377–385.
4. *Bondar T.* L-arginin/nitric oxide system and immunity. **Experimental and Clinical Medicine**, 2009; 3: 4–8. (in Russian).
5. *Boyde T.R., Rahmatullah M.* Optimization of conditions for the colorimetric determination of citrulline, using diacetyl monoxime. **Anal. Biochem,** 1980; 107(2): 424–431.

6. *Chin S.Y., Pandey K.N., Shi S.J*. et al. Increased activity and expression of $Ca^{2+}$-dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats. **Amer. J. Physiol,** 1999; 277(5): 797–804.
7. *Conte D., Narindrasorasa K. S., Sarkar B*. *In vivo* and *in vitro* iron replaced zinc finger generates free radicals and causes DNA damage. **Eur. J. Biochem,** 1996; 271(9): 5125–5130.
8. *Fehrenbacher J.C., Vasko M.R., Duarte D.B*. Models of inflammation: Carrageenan- or complete Freund's Adjuvant (CFA)-induced edema and hypersensitivity in the rat. **Curr. Protoc. Pharmacol,** 2012; 5 (5.4): doi: 10.1002/0471141755. ph 0504s56.
9. *Green L.L., Wagner D.A., Glogowski J.* et al. Analysis of nitrate, nitrite and [$^{+5}$N] nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem**, 1982; 126**(**1): 131–138.
10. *Hitchon C., El-Gabalawy H.* Oxydation in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res. The,** 2004; 6: 265–278.
11. *Humphries K.M., Yoo Y., Szweda L.I*. Inhibition of NADH-linked mitochondrial respiration by 4-hydroxy-2-nonenal. **Biochem**. **J**, 1998; 37(2): 552–557.
12. *Jsukahara H*. Effect of NOS inhibitions on bone metabolism in growing rats. **Amer. J. Physiol,** 1996; 270(5): 840–845.
13. *Leonaviciene L., Bradunaitt R., Vaitkiene D.* et al. Collagen-induced arthritis and pro-/antioxidant status in Wistar and Lewis rats. **Biologija**, 2008; 54(4): 290–300.
14. *Nagy G., Clark J, Buzas E.* et al. Nitric oxide, chronic inflammation and autoimmunity. **Immunol. Letters,** 2007; 111: 1–5.
15. *Salter M., Knowles R.G., Moncada S.* Widespread tissue distribution, species and changes in activity of $Ca^{2+}$-dependent and $Ca^{2+}$-independent nitric oxide syntases. **FEBS Lett**, 1991; 291(1): 145-149.
16. *Shugaley V.S., Kozina A.S.* Urea and arginase activity in rat's organs with cold acclimatization. **Fyzyol. Zh. USSR,** 1977; 8: 1199–1202. (in Russian).
17. *Stamp L.K., Khalilova I., Tarr J.M.* et al. Myeloperoxidase and oxidative stress in rheumatoid arthritis. **Rheumatology,** 2012; 19: 1–7.
18. *Winyard P., Ryan B., Eggleton P.* et al. Measurement and meaning of markers of reactive species of oxygen, nitrogen and sulfur in healthy human subjects and patients with inflammatory joint disease. **Biochem. Soc. Trans,** 2011; 39: 1226–1232.

## ROLE OF REACTIVE OXYGEN AND NITROGEN SPECIES IN FORMATION OF ACUTE AND CHRONIC EXPERIMENTAL ARTHRITIS

***I. I. Kril*[1], *A. M. Gavrylyuk*[1], *A. V. Kotsyuruba*[2], *Yu. Ya. Kit*[3], *V. V. Chopyak*[1], *R. S. Stoika*[3]**

[1]*Danylo Halytskyi Lviv National Medical University*
*69, Pekarska St., Lviv 79010, Ukraine*
*e-mail: kril.iryna@ukr.net*

[2]*Bohomolets Institute of Physiology, NAS of Ukraine*
*4, Bogomolets St., Kyiv 01024, Ukraine*

[3]*Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, 14/16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine*

Free radical oxidation processes is an important link of rheumatoid arthritis pathogenesis. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species are formed during cellular oxidative phosphorylation. They perform an important role in the transmission of cellular signals, destroy of foreign agents, regulation of cell proliferation. The hyperproduction of the reactive oxygen species can lead to a damage of proteins, lipids,

nucleic acids and cell matrix components, including the synovial membrane and extra-articular tissues. **Objective**: to determine the reactive oxygen and nitrogen species roles in rats's blood serum at experimental carrageenan- and collagen-induced inflammatory arthritis. **Method**: spectrophotometry with using biochemical analysis. **Results**: Rate of the reactive oxygen species ($NO_2^-$, •OH, $H_2O_2$) generation in the group of animals with collagen arthritis was higher than in the group of animals with carrageenan inflammation. In the same experimental group the nitrosative stress products and activities (cNOS, iNOS, $NO_2^-$, $NO_3^-$, ARG) were higher too. **Conclusion**: Products of the oxidative and nitrosative stresses contribute actively to development of pathological changes in tissues of animals with collagen arthritis which is an analogue of rheumatoid arthritis in humans, compared to the carrageenan-induced model of the immunoinflammatory process.

***Keywords**:* rheumatoid arthritis, collagen arthritis, carrageenan arthritis, reactive oxygen species, reactive nitrogen species.

## РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ ОКСИГЕНА И НИТРОГЕНА В ФОРМИРОВАНИИ ОСТРОГО И ХРОНИЧЕСКОГО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АРТРИТА

***И. И. Криль*[1], *А. М. Гаврилюк*[1], *А. В. Коцюруба*[2], *Ю. Я. Кит*[3], *В. В. Чопяк*[1], *Р. С. Стойка*[3]**

[1]*Львовский национальный медицинский университет имени Даниила Галицкого*
*ул. Пекарская, 69, Львов 79010, Украина*
*e-mail: kril.iryna@ukr.net*

[2]*Институт физиологии имени А. А. Богомольца НАН Украины*
*ул. Богомольца, 4, Киев 01024, Украина*

[3]*Институт биологии клетки НАН Украины, ул. Драгоманова, 14/16, Львов 79005, Украина*

Процессы свободнорадикального окисления являются важным звеном патогенеза ревматоидного артрита. Активные формы оксигена и нитрогена в нормальных физиологических условиях постоянно образуются в клетках в небольших количествах во время окислительного фосфорилирования. Они выполняют функции передачи клеточных сигналов, уничтожения патологических факторов, регуляции апоптоза, пролиферации и многих других функций клеток. Чрезмерная продукция активных форм оксигена в патологических или стрессовых условиях приводит к повреждению белков, липидов, нуклеиновых кислот и матричных компонентов клетки, в частности синовиальной мембраны и мягких тканей. Цель работы – определить изменения пулов активных форм оксигена и нитрогена в сыворотке крови крыс в экспериментальном каррагинан- и коллаген-индуцированном воспалительном артрите. Метод исследования активных форм оксигена и нитрогена – спектрофотометрический. Результаты исследования активных форм оксигена и нитрогена: скорость генерации активных форм оксигена ($O_2^{\bullet-}$, •OH) и стационарные пулы $H_2O_2$ в циркуляции в группе экспериментальных животных с коллагеновым артритом была выше, чем в группе животных с каррагинановым воспалительным процессом. В этой же группе скорость генерации активных форм оксигена и нитрогена *de novo*, в частности активность cNOS и, особенно, iNOS, как и стационарные пулы активных форм

нитрогена ($NO_2^-$, $NO_3^-$) также выше. Вывод: в группе животных с коллагеновым артритом, который является аналогом ревматоидного артрита у человека, продукты оксидативного и нитрозативного стрессов активнее способствуют формированию патологических изменений в тканях, по сравнению с каррагинановой моделью аутоиммунного процесса.

***Ключевые слова:*** ревматоидный артрит, коллагеновый артрит, каррагинановый артрит, активные формы оксигена, активные формы нитрогена.

Одержано: 02.10.2014