

УДК 616.72-002-07:616.155.34-07]-092.9

ЗМІНИ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ НЕЙТРОФІЛІВ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КОЛАГЕНОВОГО АРТРИТУ

І. Й. Криль¹, А. М. Гаврилюк¹, В. В. Чоп'як¹, Ю. Я. Кит², А. В. Коцюруба³, Р. С. Стойка²

¹Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, вул. Пекарська, 69 б, 79010, Львів, Україна, zimenkovsky@meduniv.lviv.ua

²Інститут біології клітини НАН України, вул. Драгоманова, 14/16, Львів, 79005, Україна, institut@cellbiol.lviv.ua

³Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, вул. Богомольця, 4, 01024, Київ, Україна, pkostyuk@biph.kiev.ua

*Досліджували функціональні зміни у нейтрофілах щурів за умов експериментального колагенового артриту, який є моделлю ревматоїдного артриту (РА) у людей. Визначали поглинальну здатність нейтрофілів в експериментальних тварин у тестах спонтанного та стимульованого фагоцитозу, активність оксидативного вибуху (спонтанного та стимульованого) методом проточної цитометрії та концентрацію ряду вільних кисневих радикалів у сироватці крові цих тварин. Нативну кров експериментальних тварин інкубували з FITC-міченими бактеріями *E. coli* в присутності різних стимулів або без них та реєстрували відносну кількість клітин, які поглинули бактерії. Встановлено, що при спонтанному фагоцитозі поглинальна здатність нейтрофілів була підвищеною, що говорить про виражену активацію цих клітин, а після стимуляції *E. coli* — зниженою порівняно з контрольною групою тварин, що може свідчити про низьку резервну здатність нейтрофілів. При дослідженні спонтанної та стимульованої активності оксидативного вибуху у нейтрофілах спостерігалось підвищення показників при слабкій фізіологічній стимуляції та без неї, а стимуляція *E. coli* і сильний стимул РМА призводили до їх зниження. Ослаблення процесів перетравлення у нейтрофілах свідчить про підвищений ризик розвитку бактерійних інфекцій, а це в подальшому може призвести до аутоімунізації. Під час оксидативного вибуху утворюються вільні кисневі радикали, які токсично впливають на мембрани клітин. В експериментальній групі тварин виявлено підвищену концентрацію вільних кисневих радикалів порівняно з інтактною групою тварин. Ці дані підтверджують високу ймовірність формування патологічних змін на експериментальній моделі РА.*

Ключові слова: КОЛАГЕНОВИЙ АРТРИТ, БІЛІ ЛАБОРАТОРНІ ЩУРИ, НЕЙТРОФІЛИ, ФАГОЦИТАРНА АКТИВНІСТЬ, ОКСИДАТИВНИЙ ВИБУХ, ВІЛЬНІ КИСНЕВІ РАДИКАЛИ

THE FUNCTIONAL ACTIVITY CHANGES IN RAT'S NEUTROPHILS IN EXPERIMENTAL COLLAGEN ARTHRITIS

І. У. Криль¹, А. М. Гаврилюк¹, В. В. Чоп'як¹, Ю. Я. Кит², А. В. Котсиурба³, Р. С. Стойка²

¹Danylo Halysky Lviv National Medical University, Pekarska St., 69 b, Lviv, 79010, Ukraine, zimenkovsky@meduniv.lviv.ua

²Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, Drahomanov St., 14/16, Lviv, 79005, Ukraine, institut@cellbiol.lviv.ua

³Bogomoletz Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Bogomoletz St., 4, 01024, Kiev, Ukraine, pkostyuk@biph.kiev.ua

There were investigated the functional changes in rat neutrophils in experimental collagen arthritis, which is a model of rheumatoid arthritis (RA) in humans. There were examined the absorption capacity of neutrophils in experimental animals in tests of spontaneous and stimulated phagocytosis, oxidative activity explosion (spontaneous and stimulated) by flow cytometry and concentration of free oxygen radicals in the

blood serum of these animals. Native blood of experimental animals were incubated with FITC-labeled E.coli bacteria in the presence of various stimuli or not, and the relative number of cells that have absorbed the bacteria. It was found that the increased spontaneous phagocytosis absorptivity of neutrophils, indicating a pronounced activation of these cells and its reduction after stimulation with E. coli compared to the animals control group that may be indicative of neutrophils's low back ability. During the study of spontaneous and stimulated activity of oxidative explosion in neutrophils it was observed the increase of the parameters in the cases of low physiological stimulation and without it. In the same time it was observed some stimulation of E.coli and strong PMA stimulation that led to their decrease. The neutrophils digestion process weakening indicated an increased the bacterial infections risk, which subsequently may lead to autoimmunization. Free oxygen radicals were formed during oxidative explosion that were toxic on the cell membrane. The experimental group of animals showed a high concentration of free oxygen radicals compared with intact animals group. These data confirm the high pathologic changes likelihood in the experimental model of RA.

Keywords: COLLAGEN ARTHRITIS, WHITE LABORATORY RATS, NEUTROPHILS, PHAGOCYTTIC ACTIVITY, OXIDATIVE EXPLOSION, FREE OXYGEN RADICALS

ИЗМЕНЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КОЛЛАГЕНОВОГО АРТРИТА

И. И. Криль¹, А. М. Гаврилюк¹, В. В. Чомяк¹, Ю. Я. Кит², А. В. Коцюруба³, Р. С. Стойка²

¹ Львовский национальный медицинский университет имени Даниила Галицкого, ул. Пекарская, 69 б, Львов, 79010, Украина, zimenkovsky@meduniv.lviv.ua

² Институт биологии клетки НАН Украины, ул. Драгоманова, 14/16, Львов, 79005, Украина, institut@cellbiol.lviv.ua

³ Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, ул. Богомольца, 4, Киев, 01024, Украина, rkostyuk@biph.kiev.ua

Исследовали функциональные изменения в нейтрофилах крыс в условиях экспериментального коллагенового артрита, который является моделью ревматоидного артрита (РА) у людей. Определяли поглотительную способность нейтрофилов у экспериментальных животных в тестах спонтанного и стимулированного фагоцитоза, активность окислительного взрыва (спонтанного и стимулированного) методом проточной цитометрии и концентрацию ряда свободных кислородных радикалов в сыворотке крови этих животных. Нативную кровь экспериментальных животных инкубировали с FITC-мечеными бактериями E.coli в присутствии различных стимулов или без них и регистрировали относительное количество клеток, которые поглотили бактерии. Установлено, что при спонтанном фагоцитозе поглощающая способность нейтрофилов была повышенной, что говорит о выраженной активации этих клеток, а после стимуляции E. coli — пониженной по сравнению с контрольной группой животных, что может свидетельствовать о низкой резервной способностью нейтрофилов. При исследовании спонтанной и стимулированной активности окислительного взрыва в нейтрофилах наблюдалось повышение показателей при слабой физиологической стимуляции и без нее, а стимуляция E.coli и сильный стимул PMA приводили к снижению. Ослабление процессов переваривания в нейтрофилах свидетельствует о повышенном риске развития бактериальных инфекций, а это в дальнейшем может привести к аутоиммунизации. При окислительном взрыве образуются свободные кислородные радикалы, которые оказывают токсическое влияние на мембраны клеток. В экспериментальной группе животных выявлено повышенную концентрацию свободных кислородных радикалов по сравнению с интактной группой животных. Эти данные подтверждают высокую вероятность формирования патологических изменений на экспериментальной модели РА.

Ключевые слова: КОЛЛАГЕНОВЫЙ АРТРИТ, БЕЛЫЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ КРЫСЫ, НЕЙТРОФИЛЫ, ФАГОЦИТАРНАЯ АКТИВНОСТЬ, ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ ВЗРЫВ, СВОБОДНЫЕ КИСЛОРОДНЫЕ РАДИКАЛЫ

Центральною проблемою сучасної ревматології є зростання захворюваності на ревматоїдний артрит (РА). Етіологія РА є багатофакторною (Brooks, 2006); хвороба може виникнути в результаті складних взаємодій між генетичними, гормональними, імунологічними, інфекційними, екологічними і фізіологічними факторами (MSR 2010) [1, 2].

РА є хронічною запальною хворобою, яка характеризується неконтрольованою проліферацією синовіоцитів, інфільтрацією надлишку запальних клітин і прогресуючими ерозіями суглоба, що веде до деструкції хряща та кістки. Стан хронічного запалення при РА є системним, але насамперед локалізованим у синовіумі. Його інфільтрують нейтрофіли, макрофаги, Т- і В-лімфоцити, які вивільнюють різноманітні прозапальні медіатори. Деструкція кістки та хряща відбувається за кількома імунопатологічними реакціями, що призводить до оксидативного та протеолітичного руйнування колагену та протеогліканів [3].

Основна причина патологічних змін при РА повністю не визначена. Виявлено, що фібробластоподібні синовіоцити здійснюють ключову роль у поширенні запалення та пошкодженні хряща, проліферуючи та продукуючи різні запальні медіатори, такі як простагландин E₂, інтерлейкін-1 (IL-1), фактор некрозу пухлини- α (TNF- α) [4]. Нейтрофіли є найважливішими клітинами, які присутні у суглобах пацієнтів із РА, і мають найбільшу, з усіх імунокомпетентних клітин, здатність вивільнювати прозапальні чинники, які залучені у пошкодження тканин кістки та хряща. Вони секретують велику кількість цитокінів і хемокінів, які впливають на розвиток хвороби та зміни всередині хворого суглоба [5]. Нейтрофіли, мігруючи у синовіальну рідину, фагоцитують імунні комплекси та виділяють реакційно активні форми кисню, індукуючи респіраторний вибух. Активні форми кисню, які вивільняються нейтрофілами пацієнтів із РА у синовіальну

рідину та тканини, спричинюють оксидативні пошкодження гіалуронової кислоти та ліпопротеїдів низької щільності, що в результаті пошкоджує хрящ, екстрацелюлярний колаген та ДНК [6].

Відомо, що в активованому стані нейтрофіли можуть виконувати функції макрофагів — тобто вони здатні синтезувати прозапальні цитокіни та експресувати антигени головного комплексу гістосумісності (МНС) II класу у такий спосіб, що будуть презентувати антигени та активувати Т-лімфоцити. Таким чином, вони стають складовими елементами патогенезу аутоімунних хвороб, у тому числі запальних артритів [7].

РА характеризується хронічним запаленням, яке ініціюється аутоімунними реакціями, коли організм починає утворювати антитіла проти антигенів власних клітин [1]. Пошкоджуються сполучнотканинні елементи — хрящі, судини, строма внутрішніх органів і т. д. Одним із найбільш можливих порушень функціонування імунної системи при РА є послаблення супресивних механізмів і, як наслідок, розвивається гіперактивація В-лімфоцитів і продукція аутоантитіл. Вважається, що оксидативний стрес у щурів із індукованим РА тісно пов'язаний із аутоімунними процесами. Для цієї патології годиться таке визначення як системний оксидативний стрес [8].

За імунокомплексно-опосередкованого артриту у мишей встановлено, що інфільтрація суглобу нейтрофілами безпосередньо впливає на руйнування хряща [7]. Дані, отримані на тваринних моделях, вказують на те, що нейтрофіли відіграють важливу роль в ініціації та розвитку експериментального артриту [5].

Метою роботи було: вивчити фагоцитарну активність нейтрофілів щурів за умов експериментального колагенового артриту; дослідити активність оксидативного вибуху (спонтанного та стимульованого) на експериментальній моделі хронічного запалення.

Методи і матеріали

Дослідження проводилися на 20 білих нелінійних щурах-самцях масою 160–220 г, які утримувалися в звичайних умовах віварію з вільним доступом до води і їжі. Усі експерименти виконано з дотриманням норм і принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин. Дослідження проводилося у двох групах тварин: перша група — щури з колагеновим артритом (n=11) та контрольна група — інтактні щури (n=9). Колагеновий артрит викликали однократним підшкірним введенням у подушечку правої задньої ноги 400 мкг колагену бика II типу в 15 mM оцтової кислоти з неповним ад'ювантом Фрейнда (Calbiochem-behring) у кількості 0,1 мл [10]. Після розвитку хронічного (колагеновий артрит) запального процесу на 36 день тварин декапітували під анестезією. Для досліджень використовували сироватку та цільну кров піддослідних тварин.

Визначення фагоцитарної активності

Фагоцитарну активність нейтрофільних лейкоцитів визначали за допомогою набору реактивів Phagotest виробництва ORPEGEN Pharma (ФРН) згідно з інструкцією. Об'єктом фагоцитозу були опсонізовані бактерії (E.coli-FITC), мічені FITC-флюоресцеїном. Гепаринізовану цільну кров інкубували з FITC-міченими бактеріями E. coli при температурі 37 °C (позитивна проба) та температурі 4 °C (негативний контроль) протягом 10 хвилин. Фагоцитоз зупиняли поміщенням зразків на лід і додаванням розчину, який дозволяв відокремити мічені флюоресцеїном, поглинуті нейтрофілами часточки від приєднаних ззовні до клітинної мембрани. Після двох відмивань, додавався лізуючий розчин для видалення еритроцитів і розчин, який виключає агрегацію артефактів бактерій чи клітин. Аналіз проб виконувався на проточному цитофлюориметрі FACSCalibur (США) за допомогою програмного забезпечення CellQuestPro (Becton Dickinson). Популяцію нейтрофільних лейкоцитів визначали за допомогою гейтування за параметрами

прямого (FSC) та бокового (SSC) світлорозсіювання. Результати реєстрували на каналі флюоресценції FL1 — інтенсивність флюоресценції (відсоток клітин, які поглинули бактерії).

Визначення «оксидативного вибуху»

Для оцінки бактерицидного потенціалу нейтрофільних лейкоцитів і обумовленого цим ефективністю кілінгу фагоцитованих мікробних клітин використовували набір Phagoburst виробництва ORPEGEN Pharma (ФРН). Об'єктом фагоцитозу були FITC-мічені бактерії E. coli. Протеїнкіназу-3 ліганд форбол-12-міристан-13-ацетату (PMA) використовували в якості сильного стимулятора, а хемотаксичний пептид N-форміл-MetLeuPhe (fMLP) — в якості низького фізіологічного стимулу. Відсоток клітин, які продукують реактивні кисневі радикали, аналізували в якості середньої інтенсивності флюоресценції (ензиматичної активності). Аналіз проб виконувався на проточному цитофлюориметрі FACSCalibur (США) за допомогою програмного забезпечення CellQuestPro (Becton Dickinson).

Визначення швидкості генерації O_2^- та OH-радикалу

Швидкість генерації O_2^- визначали за окисненням цитохрому C, фіксуючи зміни екстинції реакційного середовища при 550 нм [11]. Визначення рівнів генерації OH-радикалу проводили в інкубаційній суміші по приросту MDA, фіксуючи показники екстинції при 532 нм [12].

Визначення вмісту H_2O_2

Безбілкові аліквоти плазми крові (100–250 мкг білка) додавали в кварцеву кювету (1 см), що містила 2 мл 0,1 M розчину KJ (ч. д. а.), надлишку лактопероксидази (50 нМ) («Sigma», США) в 0,05 M фосфатному буфері pH=7,33. Фіксували швидкі зміни екстинції проб при 353 нм. Кількість H_2O_2 виражали в пмоль на мг білка проби, використовуючи коефіцієнт молярної екстинції $\epsilon = 26000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [13].

Визначення вмісту малонового дигальдегіду (MDA)

До аліквот проб додавали 0,5 мл 1 % розчину тіобарбітурової кислоти в 50 мМ NaOH і 0,5 мл 2,8 % розчину трихлороцтової кислоти. Отриману суміш витримували 20 хв на киплячій водянній бані, охолоджували і визначали величину екстинції при 532 нм [13].

Отримані цифрові дані оброблялися статистично на персональному комп'ютері з використанням пакета прикладних програм. Достовірність розходження експериментальних і контрольних даних оцінювали з використанням критерію Стьюдента, достовірною вважали ймовірність помилки менше 5 % ($p < 0,05$).

Результати та обговорення

Отримані нами результати досліджень на моделі експериментального колагенового артриту у щурів свідчать про зміни функціональних характеристик нейтрофілів. Встановлено достовірне ($p < 0,05$) зростання спонтанної фагоцитарної активності нейтрофілів у щурів на моделі колагенового артриту (12,9%) порівняно з контрольними значеннями (9,2 %), яке відображено на рисунку 1.

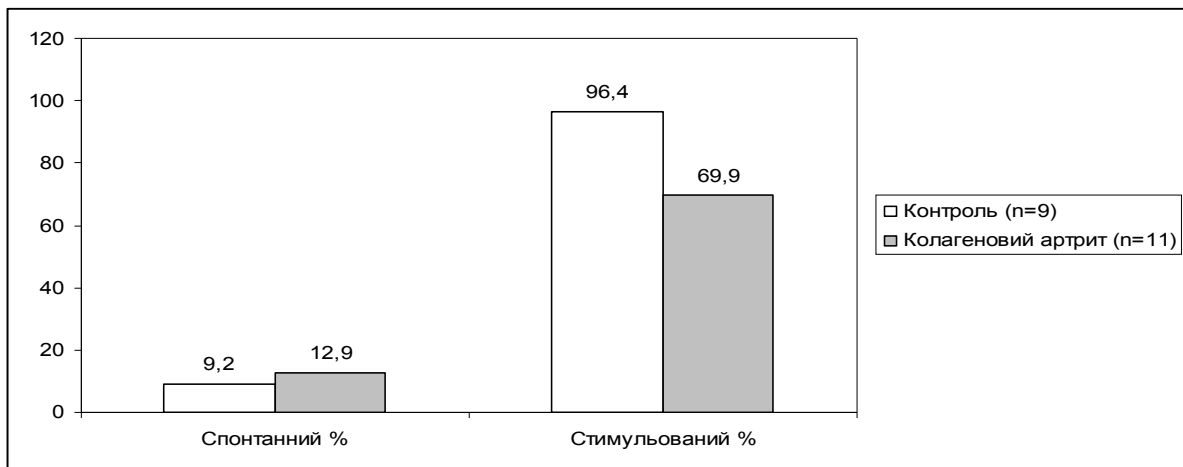


Рис. 1. Активність нейтрофілів крові щурів із колагеновим артритом

Що стосується показників стимульованого фагоцитозу, то спостерігалось достовірне ($p < 0,05$) зниження активності при колагеновому артриті (69,9 %), порівняно з інтактними щурами (96,4 %). Зміни фагоцитарної активності нейтрофілів можуть опосередковувати ослаблений кліренс імунних комплексів [14].

Також проведені дослідження активності «оксидативного вибуху» нейтрофілів крові щурів із колагеновим артритом як у нативній крові експериментальних тварин, так і після

стимуляції різними речовинами, що відображено на рисунку 2.

Як видно з отриманих даних (рис. 2), активність «оксидативного вибуху» без стимуляції (WS) нейтрофілів була достовірно ($p < 0,05$) вищою при колагеновому артриті у 2,75 рази порівняно з інтактними щурами.

Що стосується стимульованого *E. coli* «оксидативного вибуху», то не спостерігалось достовірної різниці відносних показників у дослідній групі порівняно з контрольною (70,4 %, $p > 0,05$).

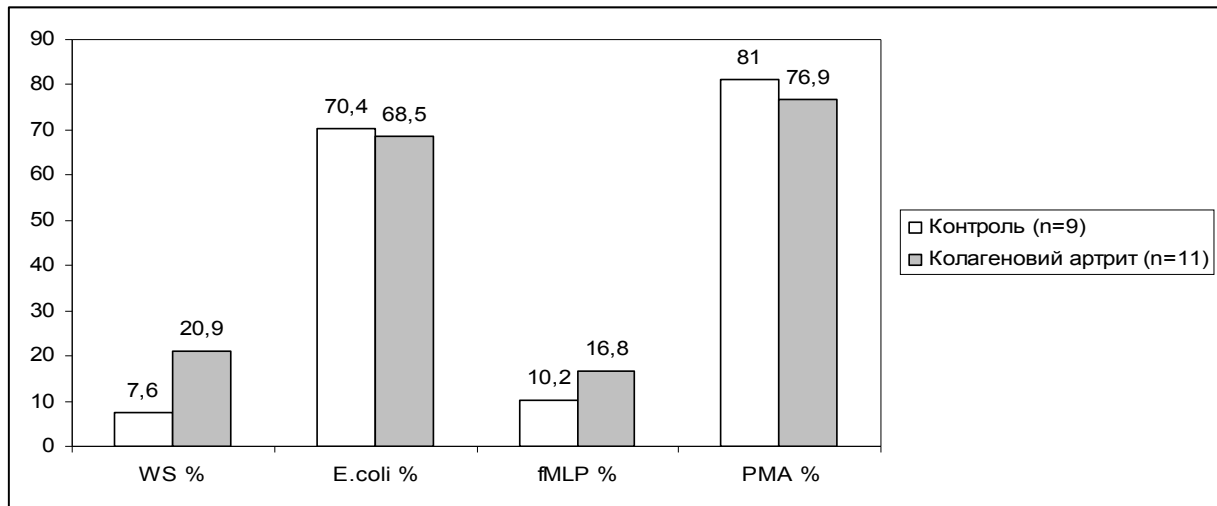


Рис. 2. Активність «оксидативного вибуху» нейтрофілів крові щурів із колагеновим артритом

При використанні слабого фізіологічного стимулятора fMLP спостерігалось достовірне ($p < 0,05$) зростання показників на моделі хронічного запального процесу. При використанні сильного стимулу PMA спостерігалось зниження показників без достовірної різниці порівняно з контрольною групою (81 %, $p > 0,05$).

Ряд авторів стверджує, що у пацієнтів з РА активованими є тільки нейтрофіли із синовіальної рідини. У крові пацієнтів з РА знайдено підвищену кількість нейтрофілів із низькою густиною, а їх ультраструктурне дослідження показало, що ці нейтрофіли є поляризованіші порівняно із нейтрофілами здорових добровольців. Ці зміни є подібними до тих, які зазнають нейтрофіли, активовані бактеріями, хемоатрактантами чи імунними комплексами [6]. Інші дослідники показали, що у пацієнтів РА були підвищені функції поліморфноядерних лейкоцитів (респіраторний вибух і хемотаксис) та посилена експресія мембранних рецепторів, що корелювало із ступенем активності хвороби. Нативна активність респіраторного вибуху у нейтрофілах хворих РА статистично достовірно не відрізнялася від контролю, однак респіраторний вибух у нейтрофілах, стимульованих IgG-IC (імунними

комплексами, опсонізованими імуноглобулінами) у хворих з активною стадією РА був вищим норми, а стимуляція нейтрофілів NHS-IC (імунними комплексами, опсонізованими пулом нормальних сироваток людини), суттєво підвищила продукцію вільних кисневих радикалів [6]. Отримані нами результати показують, що при колагеновому артриті (експериментальному аналогу РА) спонтанна активність оксидативного вибуху у нейтрофілах крові була вищою норми, а після стимуляції E. coli незначно знизилася відносно до норми. Це свідчить, що нейтрофіли тварин із колагеновим артритом мають нижчий поріг чутливості на інфекційні антигени, ніж нейтрофіли здорових. Зниження якості фагоцитозу у нейтрофілах веде за собою підвищення ризику розвитку бактерійних інфекцій — відомих тригерів аутоімунізації [14].

Натомість додавання fMLP в якості низького фізіологічного стимулу до нейтрофілів тварин із колагеновим артритом дало підвищений результат, а форбол-12-міристат-13-ацетату (PMA) в якості сильного стимулятора — незначно знижений у порівнянні із показниками стимуляції нейтрофілів здорових тварин. Відомо, що міграція нейтрофілів у тканину, охоплену запальним процесом, відбувається завдяки хемотактичному інградієнту fMLP. Є дані, що експозиція

нейтрофілів до fMLR та компоненту комплементу C5a індукує клітинну поляризацію хеморецепторів і формування багатих на актин псевдоподій. Далі патоген фагоцитується і підлягає деструкції у внутрішньоклітинній фаголізосомі [7]. Отримані нами результати вказують на те, що при колагеновому артриті у щурів хемотактичний механізм є активованим. Це підтверджує думку вчених, що під час

хронічного запалення нейтрофіли здійснюють активацію продукції цитокінів та хемокінів своїми протеазами [7].

У результаті оксидативного вибуху утворюються вільні кисневі радикали, серед яких особливо токсичний вплив на мембрани клітин здійснюють малоновий діальдегід (MDA), гідроксильний радикал (*OH-), супероксидний радикал (*O₂⁻) та гідроген пероксид (H₂O₂) (табл.).

Таблиця

Активні форми кисню у сироватці експериментальних тварин із колагеновим артритом (M±m)

Група	MDA	*OH(-)	*O ₂ (-)	H ₂ O ₂
	Mkmol/ml	E/min/ml	E/min/ml	nmol/ml
Контроль (n=9)	1,03±0,13	98,6±17,73	1,62±0,46	106,09±28,56
Колагеновий артрит (n=11)	2,53±0,14*	412,91±78,51*	4,31±1,55*	279,73±49,41*

Примітка: * — p<0,05 порівняно з контролем

Отримані результати показали, що у щурів із експериментальним колагеновим артритом всі досліджувані показники є статистично достовірно (p<0,05) підвищеними у порівнянні з контрольною групою. Так, при колагеновому артриті MDA — маркер інтенсивності ланцюгової реакції пероксидного окиснення ліпідів — у 2,46 рази був більшим порівняно з контрольною групою тварин, швидкість генерації гідроксильного радикалу, який є маркером високомолекулярної антиоксидантної системи був більшим у 4,19 рази, швидкість генерації супероксидного радикалу, маркеру активності прооксидантних нуклеотидних ксантин- і НАДФН-оксидаз, ліпідних циклооксигеназ і ліпоксигеназ був більшим у 2,66 рази і концентрація гідроген пероксиду була у 2,64 рази більшою, ніж у інтактних тварин. Відомо, що далеко не всі реактивні форми кисню є високореактивними. Оксидативний стрес розвивається в результаті дисбалансу між продукцією молекул реактивних форм кисню із руйнівною здатністю, та їх знешкодженням за допомогою відповідної системи [15]. H₂O₂, подібно як *O₂(-) та *OH(-), є загальновідомою реактивною формою кисню, але має значно ширший і

триваліший «радіус дії» і може служити сигнальною молекулою як для передачі сигналу всередину клітини, так і при взаємодії клітина-клітина [5]. H₂O₂ задіяний у процесах гіпертрофії та апоптозу у суглобі. Показано, що H₂O₂ із усіх реактивних форм кисню є найбільш асоційованим із фіброзом тканин [4]. У зв'язку з цим, отримані результати вищевказаних реактивних форм кисню, підтверджують високу готовність до формування фіброзних змін (а, значить, і втрати функції суглоба) у експериментальних тварин при колагеновому артриті. Оксидативний стрес руйнує і поліненасичені жирні кислоти, що також пошкоджує еластичність клітинних мембран. Цей процес відображається у підвищенні концентрації малонового діальдегіду у біологічних рідинах [8]. Ми отримали аналогічні результати у досліджуваній групі експериментальних тварин.

Висновки

Вивчено функціональний стан нейтрофілів у щурів на експериментальній моделі колагенового артрититу: поглинальна здатність нейтрофілів без стимуляції є підвищеною, а після стимуляції E. coli —

зниженою порівняно з контрольною групою тварин.

Досліджено спонтанну та стимульовану активність оксидативного вибуху: слабка стимуляція викликала підвищення показників, а стимуляція E. coli та сильним стимулом РМА — їх зниження.

В експериментальній групі тварин виявлено підвищену концентрацію вільних кисневих радикалів порівняно з контролем.

Перспективи подальших досліджень. Слід було б вивчити фагоцитарну активність моноцитів щурів за умов експериментального колагенового артрититу; дослідити активність оксидативного вибуху (спонтанного та стимульованого) на експериментальній моделі хронічного запалення.

1. Yu H., Lu Ch., Tan M. T., Moudgil K. D. Comparative antigen-induced gene expression profiles unveil novel aspects of susceptibility/resistance to adjuvant arthritis in rats. *Molecular Immunology*, 2013, № 56, p. 531–539.

2. Sakai Y., Aminaka M., Takata A. et al. Oxidative stress in mature rat testis and its developmental changes. *Development Growth and Differentiation*, 2010, № 52, p. 657–663.

3. Stamp L. K., Khalilova I., Tarr J. M. et al. Myeloperoxidase and oxidative stress in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 2012, № 19, p. 1–7.

4. Xiao-Yi J., Chang Y., Sun X.-J. et al. Total glucosides of paeony inhibit the proliferation of fibroblast-like synoviocytes through the regulation of G-proteins in rats with collagen-induced arthritis. *International Immunopharmacology*, 2014, № 18, p. 1–6.

5. Cross A., Barnes Th., Bucknall R. C. et al. Neutrophil apoptosis in rheumatoid arthritis is regulated by local oxygen tensions within joints. *Journal of Leukocyte Biology*, 2006, Vol. 80, p. 521–526.

6. Paoliello-Paschoalato A. B., Moreira M. R., Azzolini A.E.C.S. et al. Activation of Complement Alternative Pathway in Rheumatoid Arthritis:

Implications in Peripheral Neutrophils Functions. *The Open Autoimmunity Journal*, 2011, № 3, p. 1–9.

7. Wright H. L., Moots R. J., Bucknall R. C., Edwards S. W. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology*, 2010, № 49, p. 1618–1631.

8. Ponist S., Mihalova D., Jancinova V. et al. Reduction of oxidative stress in adjuvant arthritis. Comparison of efficacy of two pyridoindoles: stobadine dipalmitate and SMe1.2HCl. *Acta Biochimica Polonica*, 2010, Vol. 57, No. 2, p. 223–228.

9. Luo N., Li Sh., Yuan G. et al. Inhibitory action of different doses of tripterygium hypoglaucom hutch on expression of hypoxia inducible factor-1 α in collagen II-induced arthritis rat model. *Central European Journal of Immunology*, 2013, № 38 (1), p. 8–14.

10. Leonaviciene L., Bradunait R., Vaitkiene D. et al. Collagen-induced arthritis and pro-/antioxidant status in Wistar and Lewis rats. *Biologija*, 2008, Vol. 54, No. 4, p.290–300.

11. Kuthan H., Ullrich U., Estabrook R. W. A quantitative test for superoxide radicals produced in biological systems. *Biochem. J.*, 1982, Vol. 203, № 3, p. 551–558.

12. Humphries K M., Yoo Y., Szweda L I. Inhibition of NADH-linked mitochondrial respiration by 4-hydroxy-2-nonenal. *Bioch.*, 1998, Vol. 37, № 2, p. 552–557.

13. 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, № 9 (271), p. 5125–5130.

14. Golab J., Jakobisiak M., Lasek W., Stoklosa T. *Immunologia*. Warszawa, Wydawnictwo naukowe PWN, 2007. 511 s.

15. Kampfner C., Spillner S., Spillner K. et al. Evidence for an adaptation in ROS scavenging system in human testicular peritubular cells from infertility patients. *International Journal of Andrology*, 2012, № 35, p. 793–801.

16. Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol.*, 2011, № 194, p. 7–15.

17. Benedetti S., Tagliamonti M. Ch., Catalani S. et al. Differences in blood and semen oxidative status in fertile and infertile man, and their relationship with sperm quality. *Reproductive BioMedicine Online*, 2012, № 25, p. 300–306.