

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького
Міністерство охорони здоров'я України
Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Ломіковська Марта Павлівна

УДК 616.72-002-021.5:616.98:(579.882+ 578.825.13)-036.11]-092.19-08

ДИСЕРТАЦІЯ

**«ІМУНОПАТОГЕНЕЗ ІНФЕКЦІЙНОГО РЕАКТИВНОГО АРТРИТУ
НА ТЛІ АКТИВОВАНИХ ОБЛІГАТНИХ ІНФЕКЦІЙ (CHLAMYDIA
TRACHOMATIS ТА ЕПШТЕЙНА-БАРР ВІРУС), ТАКТИКА ВЕДЕННЯ
ХВОРИХ»**

14.03.08— імунологія та алергологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ М. П. Ломіковська

Науковий керівник: Чопяк Валентина Володимирівна, доктор медичних наук,
професор

Харків – 2021

АНОТАЦІЯ

Ломіковська М. П. Імунопатогенез інфекційного реактивного артрити на тлі активованих облігатних інфекцій (*Chlamydia trachomatis* та Епштейна-Барр вірус), тактика ведення хворих.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.08— імунологія та алергологія. - Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Харків, 2021.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню впливу інфекційних облігатних інфекцій *Chlamydia trachomatis* та Епштейна-Барр вірусу на розвиток реактивного артрити та їх впливу на подальшу його трансформацію в ревматоїдний артрит і тактика лікування таких хворих.

Діагноз реактивного артрити та тлі *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) або поєднання з Епштейна-Барр вірусом (ВЕБ) верифіковано на основі клінічних, загальних лабораторних даних, молекулярно-генетичних досліджень щодо виявлення ДНК *C. trachomatis* (у сироватці крові та урогенітальному зішрябі) та Епштейна-Барр вірусу (у крові, слині, зішрябі слизової задньої стінки глотки) та специфічних молекул імуноглобуліну М та імуноглобуліну G (IgM, IgG) до причинних антигенів. Розширено знання щодо активності фагоцитарної системи нейтрофілів та моноцитів, особливостей популяційного та субпопуляційного складу лімфоцитів, їх активізаційних маркерів, синтезу цитокінів TNF- α , IL-17, IL-22, IL-23, IFN- γ та IL-10 у досліджуваних групах хворих. Вперше було досліджено експресію регуляторних молекул системи-мікрорибонуклеїнової кислоти (miR) - miR155 та miR146a та miR Епштейна-Барр вірусу BART-13, BART-15 у крові хворих на реактивний артрит. Вперше проведено порівняльне дослідження рівня експресії TLR9 на клітинах крові у хворих на реактивний та ревматоїдний артрит залежно від стадії реактивації ВЕБ. Вперше у хворих на РеА на тлі *C. trachomatis* та ВЕБ досліджено рівень продуктів глікації AGE в сироватці крові. Вперше на основі імунологічних та молекулярно-генетичних досліджень запропонована математична модель прогнозування

ризиків трансформації реактивного артрити тлі комбінованої інфекції (*S. trachomatis*+ВЕБ) в ревматоїдний артрит. Запропонована додаткова імуномодулююча терапія супроводу ліофілізованим діалізатом лейкоцитів "Імодин" хворим на реактивний артрит на тлі комбінованої інфекції (*S. trachomatis*+ВЕБ), проведена клінічна та імунологічна оцінка ефективності та безпеки вказаного препарату.

З використанням клінічних, загальних лабораторних, біохімічних, молекулярно-генетичних, імунологічних, інструментальних методів обстежено 88 пацієнтів з інфекційним реактивним артритом: 45 хворих з реактивним артритом спричиненим *S. trachomatis* (1-а група), 43 хворих з реактивним артритом на тлі комбінованої інфекції *S. trachomatis* та ВЕБ (2-а група), 31 хворий на ревматоїдний артрит (3-група) та 25 здорових осіб. Обстеження хворих на РА проводилось з метою побудови математичної моделі прогнозування ризику трансформації РеА в РА за допомогою методу логістичної регресії. З метою оцінки ефективності та безпеки препарату Імодин хворих 2-ї групи на РеА з комбінованим інфікуванням (*S. trachomatis*+ВЕБ) поділено випадковим способом на 2 підгрупи: 2А підгрупа (23 хворих), яким була призначена лише етіотропна та протизапальна терапія; 2В підгрупа (20 хворих), яким був призначений ліофілізований діалізат лейкоцитів "Імодин" як терапія супроводу на тлі етіотропного та протизапального лікування. Схема лікування Імодином передбачала застосування 5-ти доз: чотири основні дози (одна доза один раз на тиждень), п'ята доза вводилася через один місяць. Обстеження пацієнтів 2-ї групи проводились перед лікування та через 90 днів.

Клінічну оцінку хворих на РеА проводили на основі скарг, загального огляду, визначення індексу активності DAREA (кількість болючих та набряклих суглобів, оцінка болю та загального стану пацієнта, рівень С-реактивного білка). Верифікацію Епштейна-Барр вірусу проводили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з набором реагентів «АмпліСенс» (Росія) для визначення ДНК ВЕБ одночасно в трьох біологічних середовищах (кров, слина, зішкряб задньої стінки глотки), за

рівнем продукції специфічних IgM та IgG до капсидного (VCA) та IgG до нуклеарного (EBNA) антигенів вірусу в сироватці крові. Ідентифікацію хламідійної інфекції проводили за допомогою ПЛР для визначення ДНК *S. trachomatis* в сироватці крові та урогенітальному зішкрябі та за рівнем синтезу специфічних класів імуноглобулінів IgM, IgG, IgA в сироватці крові. Визначення специфічних імуноглобулінів здійснювали імуноферментним методом за допомогою тест систем «Вектор-Бест» (Росія). Для визначення експресії miR146a, miR155, BART-13, BART-15 використовували метод ПЛР за методикою Tagman з використанням «Rotor Gene 6000» (Corbett Research, Австралія). Оцінку експресії TLR9 на клітинах крові оцінювали за допомогою методу проточної цитометрії з використанням відповідних моноклональних антитіл. Оцінка фагоцитарної та оксидативної активності, фенотипування лімфоцитів та їх активізаційних маркерів, проводились методом проточної цитофлюориметрії на цитометрі FACS Calibur «Becton Dickinson» (США) з використанням відповідних тест систем «Becton Dickinson». Рівень цитокінів у крові визначали за допомогою платформи BioPlex 200 з HRF (Bio-Rad, США), використовуючи технологію Luminex xMAP. Визначення кінцевих продуктів глікації (AGE) проводили методом ІФА, використовуючи Stat Fax 4300 ChroMate (США). Всі статистичні обрахунки проводилися із використанням програмного забезпечення RStudio v. 1.1.442 та R Commander v.2.4-4. Проводили визначення середніх значень та їх стандартних похибок, оцінку вірогідності різниці за допомогою методу Манна-Уїтні та критерію Стюдента, визначали коефіцієнти кореляції між показниками різних груп хворих.

У хворих на РеА всіх груп переважав молодий вік ($28,4 \pm 8,39$). Вікової достовірної різниці у досліджуваних групах не виявлено ($p > 0,05$). Щодо гендерного розподілу в усіх групах хворих на РеА переважали чоловіки. Активність запального процесу за індексом DAREA була в 1,40 рази вищою у хворих на РеА з комбінованою інфекцією ($13,6 \pm 1,45$, $p < 0,05$) порівняно з групою хворих на РеА з *S. trachomatis* ($9,71 \pm 1,23$). Окрім суглобового синдрому в хворих на РеА з комбінованою інфекцією

спостерігались субфебрилітет у 53,5% осіб, лімфаденопатія у 34,9% хворих, часто рецидивуючий тонзиліт у 32,6% осіб; у пацієнтів з РеА хламідійного та комбінованого генезу – увеїти, ураження нижніх відділів сечостатевої системи спостерігались відповідно у 62,2% та 55,9% хворих. ШОЕ та СРП були підвищеними в усіх досліджуваних групах пацієнтів з РеА порівняно зі здоровими ($p < 0,05$). Виявлено відносний лімфоцитоз та моноцитоз у хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis*+ВЕБ).

Частота виявлення ДНК в урогенітальному зішкрябі була більшою ніж у крові в 1,47 рази у хворих на РеА з ізольованою хламідійною інфекцією і в 1,67 рази – у хворих з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis*+ВЕБ). У групах хворих на РеА з хламідійною та комбінованою інфекціями підвищені рівні специфічних IgG до *C. trachomatis* були виявлені відповідно у 93,0% та 96,7% осіб, IgM – у 35,6% та 39,5% хворих, а IgA – у 84,5% та 79,0% пацієнтів. У хворих з РеА та комбінованою інфекцією (*C. trachomatis*+ВЕБ) ДНК ВЕБ виявлялась у 32,6% хворих в зішкрябах слизової задньої стінки глотки, у 4,65% – у слині, і у 62,8% пацієнтів одночасно у кількох біологічних середовищах в різних комбінаціях: слина + зішкряб слизової – у 55,8% кров, слина і зішкряб – у 6,98% хворих. Щодо серологічних досліджень ВЕБ-інфекції у хворих на РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis* + ВЕБ), то у всіх пацієнтів виявлено підвищення в 6 разів титру антитіл класу IgG до ядерного антигену ВЕБ (IgG EBNA) та до капсидного антигену (IgG VCA).

У групі хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) виявлено зміну рівня miR ВЕБ BART-13 та BART-15. У хворих інших груп наявність молекул BART-13 та BART-15 була відсутньою. Так, у пацієнтів з РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) був виявлений збільшений рівень молекул BART-13 – Me=7,01 у.о. (25%=0,05; 75%=53,5), ($p < 0,01$), а рівень BART-15 в цій же групі хворих становив – Me=0,56 у.о. (25%=0,01; 75%=6,33), ($p < 0,01$). Виявлено значні зміни експресії miR146a та miR155 у досліджуваних групах хворих. Рівень miR146a був найбільшим та підвищеним у пацієнтів з РеА з комбінованим

інфікуванням (*C. trachomatis* + ВЕБ) – $Me=66,8$ у.о. ($25\%=12,0$, $75\%=82,0$; $p<0,01$) та збільшеним у групі пацієнтів з РеА з хламідійною інфекцією $Me=8,67$ у.о. ($25\%=4,39$, $75\%=17,0$; $p<0,01$) порівняно зі здоровими $Me=0,18$ у.о. ($25\%=0,04$, $75\%=0,48$), при цьому рівень експресії *miR146a* був у 7,71 рази вищим у групі пацієнтів з РеА з комбінованою інфекцією порівняно з хворими на РеА лише з *C. trachomatis*, ($p<0,05$). Рівень *miR155* був найвищим та збільшеним у пацієнтів з РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis* + ВЕБ) – $Me=0,44$ у.о. ($25\%=0,04$, $75\%=0,66$; $p<0,01$) та збільшеним у групі пацієнтів з РеА з хламідійною інфекцією – $Me=0,07$ у.о. ($25\%=0,04$, $75\%=0,13$; $p<0,01$) порівняно зі здоровими особами – $Me=0,04$ у.о. ($25\%=0,01$, $75\%=0,25$). При цьому рівень молекули *miR155* був у 6,29 рази вищим у групі пацієнтів з РеА з комбінованою інфекцією порівняно з хворими на РеА лише з *C. trachomatis*, ($p<0,05$). На основі проведення дослідження взаємозв'язку рівнів молекул *miR146a*, *miR155* та BART-13 і BART-15 в групі пацієнтів з РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ) була виявлена позитивна кореляція між рівнями BART-15 та *miR155* ($r=0,79$; $p<0,05$) та між BART-13 та *miR146a* ($r=0,62$, $p<0,05$), що може вказувати на вплив BART на *miR146a* та *miR155*, в результаті якого можливе посилення дисрегуляторних процесів.

Проведено аналіз експресії TLR9 на клітинах крові у хворих на РеА та РА залежно від активності хронічної ВЕБ-інфекції. У пацієнтів з РеА лише з *C. trachomatis* експресія TLR9 на моноцитах ($0,06\pm0,01\%$) виявилась в 1,50 рази меншою порівняно з хворими на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) ($0,09\pm0,01\%$; $p<0,05$). Експресія TLR9 на лімфоцитах була більшою в 1,33 рази у хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) ($1,62\pm0,15\%$) порівняно з аналогічними даними хворих на РеА лише *C. trachomatis* ($1,22\pm0,34$; $p>0,05$). У пацієнтів з РА, залежно від стадії активності хронічної ВЕБ-інфекції експресія TLR9 на моноцитах не відрізнялась порівняно з хворими як на РеА з комбінованою інфекцією *C. trachomatis* + ВЕБ (відповідно $0,09\pm0,01\%$ і $0,12\pm0,03\%$; $p>0,05$), так і на РеА лише з *C. trachomatis* (відповідно $0,06\pm0,01\%$ і $0,09\pm0,02\%$; $p>0,05$). Число

TLR9+CD123+-лімфоцитів виявилося більшим на 23,2% у хворих на РА ($2,11 \pm 0,11\%$), порівняно з пацієнтами з РеА з комбінованою інфекцією *C. trachomatis* + ВЕБ ($1,62 \pm 0,15$; $p < 0,05$). Таким чином, рівень експресії TLR9+CD123+ на моноцитах та лімфоцитах був більш виражений у групі хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) порівняно з хворими на РеА з *C. trachomatis*.

Фагоцитарний показник нейтрофілів виявився підвищеним у хворих на РеА з *C. trachomatis* ($7,41 \pm 0,46\%$; $p < 0,05$) та РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) ($8,28 \pm 1,18\%$; $p < 0,05$) порівняно зі здоровими особами ($5,19 \pm 0,84\%$). Поглинаюча здатність моноцитів також була підвищена у хворих на РеА з *C. trachomatis* – $17,6 \pm 2,58\%$ та з РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis*+ВЕБ) – $21,7 \pm 4,34\%$, порівняно зі здоровими особами ($10,2 \pm 1,23\%$; $p < 0,05$). Після стимуляції *E.coli* спостерігалось зниження в 1,3 рази поглинальної здатності нейтрофілів лише у групі хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) – $74,5 \pm 8,02\%$, порівняно зі здоровими особами ($96,5 \pm 6,14\%$; $p < 0,05$), що свідчить про недостатній резервний запас поглинаючої здатності цих клітин. Резервна здатність поглинальної активності моноцитів у всіх групах хворих на РеА була достовірно зниженою порівняно зі здоровими особами ($p < 0,05$).

Здатність нейтрофілів до перетравлення виявилась високою у всіх групах хворих на РеА порівняно зі здоровими особами ($p < 0,05$). Природня стимуляція оксидативної активності нейтрофілів була знижена у пацієнтів з РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) – $74,8 \pm 8,41\%$ порівняно з групою здорових осіб ($97,4 \pm 5,83\%$; $p < 0,05$). Оксидативна здатність моноцитів як в абсолютних, так і відносних показниках у всіх групах хворих на РеА виявилась вищою порівняно із здоровими особами ($p < 0,05$). Природня стимуляція оксидативної здатності моноцитів була меншою у хворих на РеА з комбінованою інфекцією *C. trachomatis* + ВЕБ ($64,1 \pm 4,47\%$; $p < 0,01$) і на РеА хламідійного генезу ($68,4 \pm 4,65\%$; $p < 0,05$) порівняно зі здоровими особами ($83,5 \pm 5,65\%$). У групі хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) спостерігалось зростання в

1,66 рази оксидативної здатності моноцитів при використанні слабого фізіологічного стимулятора – N-формілметіоніл-лейцил-фенілаланіну (fMLP) ($7,38 \pm 1,29$ %) порівняно з хворими на РеА з *C. trachomatis* ($4,45 \pm 0,60$ %; $p < 0,05$).

На основі аналізу фенотипічних особливостей лімфоцитів та їх активізаційних маркерів виявлено зниження відносної кількості CD3-CD16+/56+ у групі пацієнтів з РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ) – $9,62 \pm 0,43$ %, порівняно з хворими на РеА з *C. trachomatis* ($14,5 \pm 1,12$ %; $p < 0,001$) та з контрольною групою осіб ($12,0 \pm 0,50$ %; $p < 0,05$). Встановлено зниження відносної кількості CD3+CD8+ у хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis*+ВЕБ) – $20,1 \pm 1,73$ % порівняно зі здоровими ($27,0 \pm 1,36$ %; $p < 0,01$). Зниження кількості відповідних лімфоцитів у хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis*+ВЕБ) може свідчити про послаблення протівірусного захисту (Kimura Н., 2017). Підвищення абсолютної та відносної кількості В-клітин CD3-CD19+ в групі хворих на РеА з комбінованою інфекцією *C. trachomatis*+ВЕБ ($20,2 \pm 1,91$ %; $0,55 \pm 0,07$ Г/л) порівняно з хворими на РеА з *C. trachomatis* ($14,4 \pm 1,64$ %; $0,31 \pm 0,02$ Г/л; $p < 0,05$) та з контрольною групою здорових осіб ($14,8 \pm 0,90$ %; $0,37 \pm 0,05$ Г/л; $p < 0,05$) можна пояснити персистенцією ВЕБ в цих клітинах з активацією гуморальної ланки імунної системи з ймовірністю формуванням аутоімунних реакцій за вказаним типом. Збільшення маркеру пізньої активації на лімфоцитах CD3+/HLA-DR+ у групах хворих на РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis* + ВЕБ) – $16,2 \pm 2,70$ %; $0,40 \pm 0,09$ Г/л порівняно з хворими на РеА з *C. trachomatis* ($12,7 \pm 1,82$ %; $0,31 \pm 0,07$ Г/л; $p > 0,05$) та з групою здорових осіб ($12,3 \pm 1,84$ %; $0,31 \pm 0,03$ Г/л; ($p > 0,05$) може вказувати на значну і довготривалу активацію імунокомпетентних клітин, що може сприяти аутоагресії. Окрім цього у хворих на РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis* + ВЕБ) виявлено збільшення експресії на лімфоцитах антигенів CD3-/HLA-DR+ – $24,3 \pm 2,05$ %, $0,11 \pm 0,02$ Г/л порівняно з хворими на РеА з *C. trachomatis* ($21,2 \pm 3,92$ %; $0,09 \pm 0,01$ Г/л; $p > 0,05$) та зі здоровими особами ($20,4 \pm 3,51$ %; $0,08 \pm 0,02$ Г/л; $p > 0,05$). Маркер активації,

пов'язаний з експресією рецептору до інтерлейкіну-2 на CD4+/CD25+ був знижений у відносних та абсолютних значеннях у групах хворих на РеА з комбінованим інфікуванням *C. trachomatis* + ВЕБ ($p>0,05$), що може вказувати на зниження кількості регуляторних Т-клітин, а відповідно і можливий ризик зриву імунної толерантності.

Проведене порівняння синтезу цитокінів у сироватці крові досліджуваних груп хворих. Рівень TNF- α був підвищений у всіх досліджуваних групах хворих на РеА: у 1,82 рази при хламідійній інфекції – $18,4\pm 3,56$ пг/мл, у 1,76 рази у пацієнтів з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis* + ВЕБ) – $17,5\pm 3,03$ пг/мл порівняно із здоровими особами – $9,96\pm 2,03$ пг/мл ($p<0,05$). Концентрація IL-17 була підвищеною у всіх досліджуваних групах пацієнтів з РеА: у 2,08 рази при *C. trachomatis* – $3,45\pm 0,78$ пг/мл та у 1,98 рази у пацієнтів з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis* + ВЕБ) – $3,29\pm 0,73$ пг/мл порівняно із здоровими – $1,66\pm 0,15$ пг/мл ($p<0,05$), що може вказувати на провідну роль IL-17 у формуванні запальних реакцій. Підвищений рівень IL-22 визначався у всіх досліджуваних групах пацієнтів з РеА: у 1,97 рази у хворих на РеА з *C. trachomatis* ($4,45\pm 0,68$ пг/мл; $p<0,05$), у 2,19 рази в пацієнтів з РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis* + ВЕБ) – $4,92\pm 0,84$ пг/мл ($p<0,01$) порівняно із здоровими – $2,25\pm 0,53$ пг/мл. Рівень IL-23 був підвищений у 1,58 рази лише у групі пацієнтів з РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis* + ВЕБ) – $2,69\pm 0,24$ пг/мл порівняно із здоровими особами ($1,70\pm 0,13$ пг/мл, $p<0,001$). Виявлено підвищений рівень у 3,05 рази IFN- γ у пацієнтів з РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis* + ВЕБ) – $1,13\pm 0,14$ пг/мл порівняно зі здоровими ($0,37\pm 0,09$ пг/мл; $p<0,0001$) та в 1,71 рази в порівнянні з хворими на РеА з *C. trachomatis* – $0,66\pm 0,11$ пг/мл ($p<0,05$). Як відомо, порушення функціонування системи IFN- γ може призвести до розвитку не лише інфекційних (вірусних чи бактерійних) захворювань, але й аутоімунної патології. Рівень IL-10 був зниженим у 3,54 рази в групі хворих на РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ) – $0,44\pm 0,04$ пг/мл порівняно зі здоровими ($1,56\pm 0,29$

пг/мл, $p < 0,001$) та в 1,64 рази порівняно з пацієнтами з РеА з *C. trachomatis* – $0,72 \pm 0,09$ пг/мл ($p < 0,01$). Отримані дані можуть вказувати на більш агресивний перебіг та тривалий запальний процес на тлі зниження клітинного імунітету та порушення імунної регуляції у хворих на реактивний артрит з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis* + ВЕБ). Очевидно в цих хворих існує висока ймовірність трансформації захворювання в ревматоїдний артрит або іншу аутоімунну патологію.

При оцінці рівня кінцевих продуктів глікації в сироватці крові спостерігалось достовірне зростання концентрації AGEs у 4,07 рази ($216,6 \pm 15,4$ мкг/мл; $p < 0,0001$) у пацієнтів з РеА хламідійного генезу та у 6,60 рази ($351,1 \pm 42,4$ мкг/мл; $p < 0,0001$) у хворих на РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis* + ВЕБ) порівняно з контрольною групою осіб ($53,2 \pm 10,3$ мкг/мл). У хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) концентрація кінцевих продуктів глікації в крові була вищою в 1,62 рази порівняно з хворими на РеА лише з *C. trachomatis* ($p < 0,01$). Також виявлена значна експресія AGEs у хворих на РА, що у 10,8 рази перевищувала показники контрольної групи і складала $576,1 \pm 94,1$ мкг/мл проти $53,2 \pm 10,3$ мкг/мл ($p < 0,0001$). Найбільш висока концентрація AGE у хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) може вказувати на інтенсивність запального процесу з ймовірністю його хронізації та формуванням аутоімунних ускладнень.

Проведено математичне моделювання на основі даних молекулярно-генетичних та імунологічних досліджень, що дало змогу визначити ризик трансформації реактивного артрити з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) в ревматоїдний артрит. Отримані дані дозволяють більш цілеспрямовано впливати на тактику лікування та профілактичні заходи для попередження розвитку трансформації РеА у важку аутоімунну патологію.

На основі отриманих нами результатів можна зробити висновки, що у хворих на РеА з комбінацією *C. trachomatis* та ВЕБ призводить до значних змін вродженого та адаптивного імунітету, що потребує застосування імуномодуючої терапії. У зв'язку з цим, ми пропонуємо до застосування

лейкоцитарний імуномодулятор Імодин. Схема лікування Імодином передбачала застосування 5-ти доз: чотири основні дози (одна доза один раз на тиждень), п'ята доза вводилася через один місяць. На основі клінічних (індекс DAREА) та імунологічних (фенотипічні властивості лімфоцитів та активність фагоцитарної системи) показників досліджено ефективність та безпеку терапії супроводу Імодином у хворих на реактивний артрит з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ). Індекс DAREА у хворих до лікування становив $13,6 \pm 1,45$, а застосування Імодину сприяло покращенню клінічної ефективності в 8 разів (індекс DAREА $1,72 \pm 0,62$), що був в 2,51 рази менший порівняно з хворими на РеА, які отримували лише етіотропну та протизапальну терапії (індекс DAREА $4,31 \pm 0,91$; $p < 0,05$). Після застосування препарату Імодин оцінка субпопуляційного складу лімфоцитів дозволила встановити збільшення Т-цитотоксичних лімфоцитів ($p < 0,01$), зменшення кількості В-лімфоцитів ($p < 0,05$) та збільшення NK-клітин на тлі зниження Т-хелперів та підвищення Т-регуляторних лімфоцитів ($p > 0,05$), що можна розцінити як зменшення аутоагресії на тлі підвищення протівірусного захисту. Після призначення препарату Імодин посилилась поглинальна здатність та окисно-залежний процесінг нейтрофілів та моноцитів. На основі клінічних та загальних лабораторних параметрів була проведена оцінка безпеки застосування Імодину в комплексній терапії РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ).. Встановлено, що перенесення Імодину за оцінкою хворих та лікарів було однаковим і становило: «добре» – 90 % та «задовільно» – 10%.

Ключові слова: реактивний артрит, *Chlamydia trachomatis*, Епштейна-Барр вірус, ревматоїдний артрит, лімфоцити, цитокіни, miR155, miR146a, BART 13, BART 15, TLR9, AGE, імуномодуюча терапія.

ABSTRACT

Lomikovska M. P. Immunopathogenesis of infectious reactive arthritis in the background of activated obligate infections (*Chlamydia trachomatis* and Epstein-Barr virus), patient surveillance. - As manuscript.

The thesis for the scientific degree of the candidate of medical sciences in specialty 14.03.08 – Immunology and Allergology. – Danylo Halytsky Lviv National Medical University, V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, 2021.

The thesis is dedicated to the study of the effect of infectious obligate infections *Chlamydia trachomatis* and Epstein-Barr virus on the reactive arthritis development, of their further effect on its further transformation into rheumatoid arthritis as well as patient surveillance.

Reactive arthritis diagnosis in the background of *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) or in combination with Epstein-Barr virus (EBV) has been verified on the basis of clinical, general laboratory data, molecular and genetic studies aimed at the detection of the DNA of *C. trachomatis* (in blood serum and in the urinogenital scraping) and Epstein-Barr virus (in blood, saliva, mucous membrane of the posterior pharyngeal wall scraping) as well as specific molecules of immunoglobulin M and immunoglobulin G (IgM, IgG) to causative antigens. Knowledge of the activity of the phagocytic system of neutrophils and monocytes, peculiarities of the population and subpopulation composition of lymphocytes, their activation markers, synthesis of cytokines TNF- α , IL-17, IL-22, IL-23, IFN- γ and IL-10 in the researched patient groups has been expanded. The expression of the regulatory molecules of the system of micro-ribonucleic acid (miR) – miR155 and miR146a as well as miR of Epstein-Barr virus BART-13, BART-15 in the blood of patients with reactive arthritis has been researched for the first time. Comparative study of the degree of TLR9 expression in the blood cells of patients with reactive and rheumatoid arthritis depending on the EBV reactivation stage has been conducted for the first time. For the first time the rate of AGE glycation products in the blood serum of patients with ReA in the background of *C. trachomatis* and EBV has been researched. The mathematical model for forecasting the risks of reactive arthritis transformation in the background of combined infection (*C. trachomatis*+EBV) into rheumatoid arthritis has been suggested for the first time on the basis of immunological as well as molecular and genetic studies. An additional immunomodulatory support therapy

with lyophilized dialysate of leukocytes 'Immodin' for patients with reactive arthritis in the background of combined infection (*C. trachomatis*+EBV) has been suggested, clinical and immunological assessment of the efficiency and safety of the medication has been made.

Using clinical, general laboratory, biochemical, molecular and genetic, immunological, instrumental methods, 88 patients with infectious reactive arthritis have been examined: 45 patients with reactive arthritis caused by *C. trachomatis* (1st group), 43 patients with reactive arthritis in the background of combined *C. trachomatis* and EBV infection (2nd group), 31 patients with rheumatoid arthritis (3rd group), and 25 healthy individuals. The patients with RA were examined for the sake of development of the mathematical model of forecasting ReA transformation into RA using the logistic regression method. In order to assess the efficiency and safety of the drug Immodin, patients of the 2nd group with ReA with combined infection (*C. trachomatis*+EBV) were randomly divided into 2 subgroups: subgroup 2A (23 patients) for which only etiotropic and anti-inflammatory therapy was prescribed; subgroup 2B (20 patients) for which lyophilized dialysate of leukocytes 'Immodin' as the support therapy in the background of etiotropic and anti-inflammatory treatment was prescribed. The scheme of treatment with Immodin presupposed administration of 5 doses: four main doses (one dose once a week), and the fifth dose to be administered after a month. The patients of the 2nd group were examined after the treatment and after 90 days.

Clinical assessment of patients with ReA was made on the basis of complaints, general examination, DAREA activity index test (the number of aching and swollen joints, assessment of pain and the general patient's condition, the level of C-reactive protein). Epstein-Barr virus was verified using polymerase chain reaction (PCR) with the set of 'AmpliSens' reagents (Russia) in order to detect DNA of EBV simultaneously in three biological environments (blood, saliva, posterior pharyngeal wall scraping), by the level of production of specific IgM and IgG to capsid (VCA) and IgG to nuclear (EBNA) viral antigens in the blood serum. Chlamydial infection was identified using PCR to detect DNA of *C.*

trachomatis in the blood serum and urinogenital scraping as well as by the level of synthesis of specific classes of immunoglobulins IgM, IgG, IgA in the blood serum. Detection of specific immunoglobulins was performed using the immunoenzymometric method with test systems 'Vektor-Best' (Russia). To determine expression of miR146a, miR155, BART-13, BART-15 the PCR method following the Taqman methodology and using 'Rotor Gene 6000' (Corbett Research, Australia) was applied. Expression of TLR9 in blood cells was assessed using the flow cytometry method with respective monoclonal antibodies. Assessment of phagocytal and oxidative activity, phenotyping of lymphocytes and their activation markers were performed using flow cytofluorometry method by cytometre FACS Calibur 'Becton Dickinson' (USA), using the respective 'Becton Dickinson' test systems. The level of cytokines in blood was assessed through the BioPlex 200 platform with HRF (Bio-Rad, USA), using Luminex xMAP technology. Final glycation products (AGE) were detected via EIA method, with the help of Stat Fax 4300 Chromate (USA). All statistical calculations were made via RStudio v. 1.1.442 and R Commander v.2.4-4 software. The average values and their standard errors as well as the difference probability were assessed using the Mann-Whitney method and Student's criterion, and the correlation factors between the figures in different groups of patients were determined.

Among patients with ReA young patients dominated in all groups (28.4 ± 8.39). No reliable age difference has been traced in the researched groups ($p > 0.05$). As far as gender distribution is concerned, men prevailed in all groups of patients with ReA. The rate of activity of the inflammatory process under the DAREA index was 1.40 times higher in patients with ReA with combined infection (13.6 ± 1.45 , $p < 0.05$) as compared to the group of patients with ReA with *C. trachomatis* (9.71 ± 1.23). Besides the articular syndrome, low-grade fever could be traced in 53.5% of patients with ReA with combined infection, lymphadenopathy – in 34.9% of patients, recurrent tonsillitis was not a rare case – in 32.6% of individuals; in patients with ReA of chlamydial and combined genesis – uveitises, affected lower parts of the urinogenital system could be traced, respectively, in 62.2% and 55.9% of patients. Blood sedimentation rate and C-

reactive protein were higher in all researched groups of patients with ReA as compared to healthy individuals ($p<0.05$). Relative lymphocytosis and monocytosis were found in patients with ReA with combined infection (*C. trachomatis*+EBV).

The frequency of DNA occurrence in the urinogenital scraping was 1.47 times higher than in blood in patients with ReA with isolated chlamydial infection and 1.67 times – in patients with combined infection (*C. trachomatis*+EBV). In the groups of patients with ReA with chlamydial and combined infections higher levels of specific IgG to *C. trachomatis* were detected, respectively, in 93.0% and 96.7% of individuals, of IgM – in 35.6% and 39.5% of patients, and of IgA – in 84.5% and 79.0% of patients. In patients with ReA and combined infection (*C. trachomatis*+EBV) EBV DNAs were found in 32.6% of patients in the posterior pharyngeal wall scraping, in 4.65% – in saliva, and in 62.8% of patients simultaneously in several biological environments in different combinations: saliva + mucous membrane scraping – in 55.8%, blood, saliva and scraping – in 6.98% of patients. As far serological studies of EBV infection in patients with ReA with combined infection (*C. trachomatis* + EBV) are concerned, in all patients a 6-times higher titre of IgG class antibodies to nuclear EBV antigen (IgG EBNA) and to capsid antigen (IgG VCA) was detected.

In the group of patients with ReA with combined infection (*C. trachomatis* + EBV) a change in the level of EBV miR BART-13 and BART-15 was detected. In patients of other groups BART-13 and BART-15 molecules were not present. Thus, in patients with ReA with combined infection (*C. trachomatis* + EBV) a higher level of molecules BART-13 – Me=7.01 c.u. was detected (25%=0.05; 75%=53.5), ($p<0.01$), while the level of BART-15 in the same group of patients was – Me=0.56 c.u. (25%=0.01; 75%=6.33), ($p<0.01$). Significant changes in the miR146a and miR155 expression were traced in the researched groups of patients. The miR146a level was the highest in patients with ReA with combined infection (*C. trachomatis* + EBV) – Me=66.8 c.u. (25%=12.0, 75%=82.0; $p<0.01$) and higher in the group of patients with ReA with chlamydial infection Me=8,67 c.u. (25%=4.39, 75%=17.0; $p<0.01$) as compared to healthy individuals Me=0,18 c.u.

(25%=0.04, 75%=0.48), while miR146a expression level was 7.71 times higher in the group of patients with ReA with combined infection as compared to patients with ReA only with *C. trachomatis* ($p<0.05$). The miR155 level was the highest and increased in patients with ReA with combined infection (*C. trachomatis* + EBV) – Me=0.44 c.u. (25%=0.04, 75%=0.66; $p<0.01$) and higher in the group of patients with ReA with chlamydial infection – Me=0.07 c.u. (25%=0.04, 75%=0.13; $p<0.01$) as compared to healthy individuals – Me=0.04 c.u. (25%=0.01, 75%=0.25). And the level of the miR155 molecule was 6.29 times higher in the group of patients with ReA with combined infection as compared to patients with ReA only with *C. trachomatis* ($p<0.05$). In the study of the interaction of the molecule levels of miR146a, miR155 and BART-13 and BART-15 the group of patients with ReA with combined infection (*C. trachomatis*+EBV) showed positive correlation between BART-15 and miR155 levels ($r=0.79$; $p<0.05$) and between BART-13 and miR146 levels ($r=0.62$, $p<0.05$), which fact may be pointing to the effect of BART on miR146a and miR155, which may result in possible dysregulation process intensification.

Analysis of TLR9 expression in the blood cells of patients with ReA and RA depending on the activity of chronic EBV infection was made. In patients with ReA only with *C. trachomatis* TLR9 expression on monocytes ($0.06\pm0.01\%$) turned out to be 1.50 times lower as compared to patients with ReA with combined infection (*C. trachomatis* + EBV) ($0.09\pm0.01\%$; $p<0.05$). TLR9 expression on lymphocytes was 1.33 times higher in patients with ReA with combined infection (*C. trachomatis* + EBV) ($1.62\pm0.15\%$) as compared to similar data of patients with ReA only with *C. trachomatis* (1.22 ± 0.34 ; $p>0.05$). In patients with RA, depending on the stage of activity of chronic EBV infection, TLR9 expression on monocytes did not differ from that of patients with both ReA with combined infection *C. trachomatis* + EBV (respectively, $0.09\pm0.01\%$ and $0.12\pm0.03\%$; $p>0.05$), and with ReA only with *C. trachomatis* (respectively, $0.06\pm0.01\%$ and $0.09\pm0.02\%$; $p>0.05$). The number of TLR9+CD123+ lymphocytes turned out to be 23.2% higher in patients with RA ($2.11\pm0.11\%$) as compared to patients with ReA with combined infection *C. trachomatis* + EBV (1.62 ± 0.15 ; $p<0.05$). Thus,

the level of expression of TLR9+CD123+ on monocytes and lymphocytes was more vividly expressed in the group of patients with ReA with combined infection (C. trachomatis + EBV) as compared with patients with ReA with C. trachomatis.

The phagocytal neutrophile indicator turned out to be higher in patients with ReA with C. trachomatis ($7.41 \pm 0.46\%$; $p < 0.05$) and ReA with combined infection C. trachomatis + EBV ($8.28 \pm 1.18\%$; $p < 0.05$) as compared to healthy individuals ($5.19 \pm 0.84\%$). The absorbing capacity of monocytes was also higher in patients with ReA with C. trachomatis – $17.6 \pm 2.58\%$ and ReA with combined infection (C. trachomatis+EBV) – $21.7 \pm 4.34\%$ as compared to healthy individuals ($10.2 \pm 1.23\%$; $p < 0.05$). After E.coli stimulation the absorbing capacity of neutrophiles reduced 1.3 times only in the group of patients with ReA with combined infection (C. trachomatis + EBV) – $74.5 \pm 8.02\%$ as compared to healthy individuals ($96.5 \pm 6.14\%$; $p < 0.05$), which fact testifies to the insufficient absorbing capacity reserve of those cells. The reserve absorbing capacity of monocytes in all groups of patients with ReA was definitely lower as compared with healthy individuals ($p < 0.05$).

The capacity of neutrophiles to digestion turned out to be high in all groups of patients with ReA as compared to healthy individuals ($p < 0.05$). Natural stimulation of the oxidative activity of neutrophiles was lower in patients with ReA with combined infection (C. trachomatis + EBV) – $74.8 \pm 8.41\%$ as compared with the group of healthy individuals ($97.4 \pm 5.83\%$; $p < 0.05$). The oxidative capacity of monocytes both in absolute and in relative figures in all groups of patients with ReA turned out to be higher as compared to healthy individuals ($p < 0.05$). Natural stimulation of the oxidative capacity of monocytes was lower in patients with ReA with combined infection C. trachomatis + EBV ($64.1 \pm 4.47\%$; $p < 0.01$) and with ReA of chlamydial genesis ($68.4 \pm 4.65\%$; $p < 0.05$) as compared to healthy individuals ($83.5 \pm 5.65\%$). In the group of patients with ReA with combined infection (C. trachomatis + EBV) increase in the oxidative capacity of monocytes by 1.66 times could be traced in case a weak physiological stimulator was used – N-formyl-methionine-leucine-phenylalanine (fMLP) ($7.38 \pm 1.29\%$) as compared to patients with ReA with C. trachomatis ($4.45 \pm 0.60\%$; $p < 0.05$).

On the basis of the analysis of phenotypic peculiarities of lymphocytes and their activation markers reduction of the relative number of CD3-CD16⁺/56⁺ in the group of patients with ReA with combined infection (C. trachomatis+EBV) could be traced – $9.62 \pm 0.43\%$ as compared to patients with ReA with C. trachomatis ($14.5 \pm 1.12\%$; $p < 0.001$) and with the control group of individuals ($12.0 \pm 0.50\%$; $p < 0.05$). Reduced relative number of CD3⁺CD8⁺ in patients with ReA with combined infection (C. trachomatis+EBV) – $20.1 \pm 1.73\%$ – was traced as compared to healthy individuals ($27.0 \pm 1.36\%$; $p < 0.01$). Reduced number of respective lymphocytes in patients with ReA with combined infection (C. trachomatis+EBV) could probably testify to the weakening of the antiviral protection (Kimura H., 2017). Increased absolute and relative number of B-cells of CD3-CD19⁺ in the group of patients with ReA with combined infection C. trachomatis+EBV ($20.2 \pm 1.91\%$; 0.55 ± 0.07 G/l) as compared to patients with ReA with C. trachomatis ($14.4 \pm 1.64\%$; 0.31 ± 0.02 G/l; $p < 0.05$) and the control group of healthy individuals ($14.8 \pm 0.90\%$; 0.37 ± 0.05 G/l; $p < 0.05$) could be accounted for by the EBV persistence in those cells, with activation of the humoral unit of the immune system with possible development of the autoimmune reaction of the given type. Increased late activation marker on the lymphocytes CD3⁺/HLA-DR⁺ in the groups of patients with ReA with combined infection (C. trachomatis + EBV) – $16.2 \pm 2.70\%$; 0.40 ± 0.09 G/l) as compared to patients with ReA with C. trachomatis ($12.7 \pm 1.82\%$; 0.31 ± 0.07 G/l; $p > 0.05$) and the group of healthy individuals ($12.3 \pm 1.84\%$; 0.31 ± 0.03 G/l; ($p > 0.05$) could be pointing to a considerable and long-term activation of immune competent cells, that could contribute to auto-aggression development. Besides that, in patients with ReA with combined infection (C. trachomatis + EBV) increased expression on the lymphocytes of antigens CD3-/HLA-DR⁺ – $24.3 \pm 2.05\%$, 0.11 ± 0.02 G/l as compared to patients with ReA with C. trachomatis ($21.2 \pm 3.92\%$; 0.09 ± 0.01 G/l; $p > 0.05$) and with healthy individuals ($20.4 \pm 3.51\%$; 0.08 ± 0.02 G/l; $p > 0.05$) was traced. Activation marker connected to the expression of the receptor to interleukin-2 on CD4⁺/CD25⁺ was lower in relative and absolute figures in the groups of patients with ReA with combined infection C. trachomatis + EBV

($p>0.05$), which could be pointing to reduced number of regulatory T-cells, and, respectively, the possible risk of immune tolerance undermining.

The comparison of the cytokine synthesis in the blood serum of the researched groups of patients has been made. The TNF- α level was higher in all the researched groups of patients with ReA: 1.82 times in case of chlamydial infection – 18.4 ± 3.56 pg/ml, 1.76 times – in patients with combined infecting (C. trachomatis + EBV) – 17.5 ± 3.03 pg/ml as compared to healthy individuals – 9.96 ± 2.03 pg/ml ($p<0.05$). IL-17 concentration was higher in all researched groups of patients with ReA: 2.08 times – in C. trachomatis – 3.45 ± 0.78 pg/ml and 1.98 times in patients with combined infection (C. trachomatis + EBV) – 3.29 ± 0.73 pg/ml as compared to healthy individuals – 1.66 ± 0.15 pg/ml ($p<0.05$), and this may be pointing to the leading role of IL-17 in the inflammatory reaction development. Higher IL-22 level was traced in all the researched groups of patients with ReA: 1.97 times – in patients with ReA with C. trachomatis (4.45 ± 0.68 pg/ml; $p<0.05$), 2.19 times – in patients with ReA with combined infection (C. trachomatis + EBV) – 4.92 ± 0.84 pg/ml ($p<0.01$) as compared to healthy individuals – 2.25 ± 0.53 pg/ml. The IL-23 level was 1.58 higher only in the group of patients with ReA with combined infection (C. trachomatis + EBV) – 2.69 ± 0.24 pg/ml as compared to healthy individuals (1.70 ± 0.13 pg/ml, $p<0.001$). The level of IFN- γ in patients with ReA with combined infection (C. trachomatis + EBV) was 3.05 times higher – 1.13 ± 0.14 pg/ml as compared to healthy individuals (0.37 ± 0.09 pg/ml; $p<0.0001$) and 1.71 times higher as compared to patients with ReA with C. trachomatis – 0.66 ± 0.11 pg/ml ($p<0.05$). As it is known, disorder in the IFN- γ system functioning may lead to development of not just infectious (viral or bacterial) diseases, but autoimmune pathology as well. The IL-10 level was 3.54 lower in the group of patients with ReA with combined infection (C. trachomatis+EBV) – 0.44 ± 0.04 pg/ml as compared to healthy individuals (1.56 ± 0.29 pg/ml, $p<0.001$) and 1.64 times as compared to patients with ReA with C. trachomatis – 0.72 ± 0.09 pg/ml ($p<0.01$). The data obtained may be pointing to a more aggressive course and more long-lasting inflammatory process in the background of reduced cell immunity and disorder in the immune regulation of

patients with reactive arthritis with combined infection (*C. trachomatis* + EBV). Obviously, there is a high probability of the disease transformation into rheumatoid arthritis or any other autoimmune pathology for these patients.

In the assessment of the rate of final glycation products in the blood serum reliable growth in the AGEs concentration by 4.07 times could be traced (216.6 ± 15.4 mkg/ml; $p < 0.0001$) in patients with ReA of chlamydial genesis and by 6.60 times (351.1 ± 42.4 mkg/ml; $p < 0.0001$) in patients with ReA with combined infection (*C. trachomatis* + EBV) as compared to the control group of individuals (53.2 ± 10.3 mkg/ml). In patients with ReA with combined infection (*C. trachomatis* + EBV) the concentration of final glycation products in the blood was 1.62 times higher as compared to patients with ReA only with *C. trachomatis* ($p < 0.01$). Also, considerable AGEs expression was found in patients with RA, and it exceeded the figures in the control group by 10.8 times and made 576.1 ± 94.1 mkg/ml against 53.2 ± 10.3 mkg/ml ($p < 0.0001$). The highest AGE concentration in the patients with ReA with combined infection (*C. trachomatis* + EBV) may be pointing to the intensity of the inflammatory process, with the possibility of its becoming a chronic one and autoimmune complication development.

Mathematical modeling has been conducted on the basis of the data of molecular and genetic as well as immunological studies, this enabling to determine the risk of transformation of reactive arthritis with combined infection (*C. trachomatis* + EBV) into rheumatoid arthritis. The data obtained enables to more purposefully modify the treatment strategy and preventive measures to prevent ReA transformation into a severe autoimmune pathology.

On the basis of the results obtained by us a conclusion can be drawn that ReA in patients with the combination of *C. trachomatis* and EBV leads to considerable changes in the inborn and adaptive immunity, this requiring immunomodulatory therapy application. Due to this, we suggest using the leukocyte Immodin immunomodulator. The scheme of treatment with Immodin presupposes administration of 5 doses: four main doses (one dose once a week), with the fifth dose administered after one month. On the basis of clinical (DAREA index) and immunological (phenotypic properties of lymphocytes and phagocytal

system activity) indicators the efficiency and safety of the Immodin support therapy in patients with reactive arthritis with combined infection (*C. trachomatis* + EBV) has been studied. The DAREA index in patients before treatment was 13.6 ± 1.45 , while Immodin application contributed to clinical efficiency improved by 8 times (DAREA index 1.72 ± 0.62), that was 2.51 times lower as compared to patients with ReA who underwent only etiotropic and anti-inflammatory therapy (DAREA index 4.31 ± 0.91 ; $p < 0.05$). After Immodin application assessment of the subpopulation composition of lymphocytes enabled to detect increase in the number of T-cytotoxic lymphocytes ($p < 0.01$), reduced number of B-lymphocytes ($p < 0.05$) and increased number of NK cells in the background of reduced number of T helpers and increased number of T-regulatory lymphocytes ($p > 0.05$), which can be considered to be pointing to reduced auto-aggression in the background of antiviral protection improvement. Immodin prescription enhanced the absorbing capacity as well as oxygen-depending processing of neutrophils and monocytes. On the basis of clinical and general laboratory parameters the safety of Immodin application in the comprehensive treatment of ReA with combined infection (*C. trachomatis* + EBV) was assessed. It has been established that the tolerance of Immodin, in the patients' and doctor's opinion, was the same, with the grade: 'good' – 90 % and 'satisfactory' – 10%.

Key words: reactive arthritis, *Chlamydia trachomatis*, Epstein-Barr virus, rheumatoid arthritis, lymphocytes, cytokines, miR155, miR146a, BART 13, BART 15, TLR9, AGE, immunomodulatory therapy.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

Наукові праці, опубліковані у фахових виданнях України

1. Чопяк В. В., Гайдучок І. Г., Ломіковська М. П. Експериментальний хламідіоз. *Пробл. екол. та мед. генетики і клін. імунології*. 2012. №6. С. 105–116. (Дисертантом зібрано та проаналізовано літературні джерела, підготовлено матеріал до друку).
2. Зубченко С. О., Потьомкіна Г. О., Ломіковська М. П. Дослідження асоціативних зв'язків хронічної Епштейна-Барр вірусної інфекції в стадії реплікативної активності у пацієнтів з алергопатологією. *Імунологія та алергологія: наука і практика*. 2016. № 1–2. С. 49. (Автором проведено огляд сучасних літературних джерел з даної проблеми, узагальнення та тлумачення отриманих результатів).
3. Ломіковська М. П., Кріль І. Й., Чопяк В. В. Особливості лімфоцитарного пулу крові пацієнтів з реактивним артритом на тлі Епштейна-Барр вірусної та хламідійної інфекцій. *Експерим. та клін. фізіологія і біохімія*. 2019. Вип. 3, Т. 87. С. 44–50. (Здобувачем проведено аналіз даних літератури, проведено клінічне обстеження хворих та узагальнення результатів).
4. Ломіковська М. П., Кріль І. Й., Чопяк В. В. Фагоцитарна активність нейтрофілів та моноцитів у пацієнтів з реактивним артритом, спричиненим хламідійною та Епштейна-Барр вірусною інфекціями. *Львів. мед. часопис*. 2019. № 4, Т. 25. С. 30–35. (Автором проаналізовано дані літератури, проведено підбір, аналіз та узагальнення даних, підготовлено матеріал до друку).
5. Ломіковська М., Кріль І., Потьомкіна Г., Чопяк В. Цитокінний профіль у пацієнтів з реактивним артритом, спричиненим *Chlamydia trachomatis* та вірусом Епштейна-Барра. *Праці Наук. товариства імені Шевченка. Медичні науки*. 2019. Т. 57, № 2. С. 122–127. (Дисертантом сформовані групи

обстеження, аналіз та узагальнення отриманих результатів, підготовлено матеріал до друку).

6. Зубченко С. О., Маруняк С. Р., Ломіковська М. П. Дослідження впливу хронічної Епштейна-Барр вірусної інфекції на рівень експресії miR-146a та miR-155 у пацієнтів з алергопатологією. *Укр. журн. медицини, біології та спорту*. 2019. Т. 4, № 4. С. 77–83. (Здобувачем проведено огляд сучасних літературних джерел з даної проблеми, підготовлено матеріал до друку).

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації у журналах, що входять до міжнародних наукометричних баз Scopus або Web of Science

1. Zubchenko S. O., Chopyak V. V., Havrylyuk A. M., Potemkina G. O., Lomikovska M. P. Investigation of miR-BART 13 and 15 in patients with allergopathy in combination with chronic Epstein-Barr viral infection. *World of Medicine and Biology*. 2019. № 2(68). P.054–060. WEB OF SCIENCE (Автором проведено узагальнення отриманих результатів, підготовлено текст статті до друку).

2. Zubchenko S., Potemkina G., Havrylyuk A., Lomikovska M., Sharikadze O. Analysis of the level of cytokines with antiviral activity in patients with allergopathology in active and latent phases of chronic persistent Epstein-Barr infection. *Georgian Med. News*. 2019. Is. 289. P. 158–162. SCOPUS (Дисертантом проведено огляд сучасних літературних джерел з даної проблеми, узагальнення і тлумачення отриманих результатів).

3. Lomikovska M. P., Hayduchok I. G., Potomkina H. O., Zubchenko S. O., Kril I. Y., Ishcheykin K. Y., Chopyak V. V. Peculiarities of TLR9 expression on immune competent cells in reactive arthritis patients with chronic Epstein-Barr virus infection. *World of Medicine and Biology*. 2020. № 1(71). P. 083–088. WEB OF SCIENCE (Автором сформовані групи обстеження, зібрано матеріал, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовлено матеріал до друку).

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

1. Чоп'як В. В., Потьомкіна Г. О., Ліщук-Якимович Х. О. Порівняльна характеристика вмісту кріоглобулінів у хворих на реактивний та

- ревматоїдний артрит. *Імунологія та алергологія: наука і практика (додаток)*. 2012. № 3. С. 36–37. (Автором зібрано матеріал, проаналізовано отримані результати).
2. Чоп'як В. В., Потьомкіна Г. О., Кріль І. Й. Скринінг студентської молоді на поширеність хламідійної інфекції. *Імунологія та алергологія: наука і практика (додаток)*. 2012. № 3. С. 57–59. (Здобувачем зібрано матеріал, проведено статистичну обробку та аналіз отриманих результатів).
3. Потьомкіна Г. О., Чоп'як В. В., Ломіковська М. П., Кріль І. Й. Поширеність реактивного артриту на тлі Епштейна-Барр вірусної інфекції серед студентської молоді. *Досвід, реалії і перспективи розвитку систем охорони здоров'я* : тези доп. Укр.-Пол. симпозиуму. Львів, 2013. С. 540–542. (Дисертантом зібрано матеріал, проведено статистичну обробку та аналіз отриманих результатів).
4. Ломіковська М. П. Реактивні артрити на тлі Епштейна-Барр вірусної інфекції. *Контроверсійні питання сучасної клінічної медицини* : тези 2-ої загальноунів. наук.-практ. конф. молодих вчених і спеціалістів. Львів, 2013. С. 47–48. (Автором проведено клінічне дослідження, аналіз та систематизація матеріалу).
5. Ломіковська М. П., Потьомкіна Г. О., Горбаль Н. М. Клініка, діагностика та стан імунної системи у хворих на реактивний артрит на тлі вірусної інфекції Епштейн-Барр. *Український ревматологічний журнал (матеріали конференції)*. 2015. № 3(61). С. 91. (Здобувачем проведено клінічне дослідження, статистичну обробку, сформульовано висновки)
6. Ломіковська М. П., Потьомкіна Г. О., Ліщук-Якимович Х. О., Горбаль Н. М. Оцінка ефективності препарату Імодину у хворих на Епштейн-Барр вірусний реактивний артрит. *Хронічні неінфекційні захворювання: заходи профілактики і боротьби з ускладненнями* : матеріали конф. 2015. С. 223. (Дисертантом сформовано групи обстеження, проведено клінічне обстеження хворих та узагальнення отриманих результатів).
7. Ломіковська М. П., Потьомкіна Г. О. Вивчення ефективності застосування ліофілізованого діалізату лейкоцитів у хворих на реактивний

артрит викликаний Епштейна-Барр вірусом. *Медикаментозна алергія: мультидисциплінарний підхід* : матеріали наук.-практ. конф. 2017. С. 12–14. (Автором проведено клінічне обстеження хворих, статистичну обробку та узагальнення результатів).

8. Lomikovska M. Clinical picture, diagnostics and condition of immune system in patients with reactive arthritis against the background of Epstein-Barr virus infection. *11th International Conference of Allergy, Asthma and Clinical Immunology*: conference materials. Edinburgh (Scotland), 2017. P. 67 (Здобувачем проведено набір хворих, узагальнення і тлумачення отриманих результатів).

9. Lomikovska M., Zubchenko S., Lishchuk-Yakymovych K. Clinical and immunological features of reactive arthritis on the background of the Epstein-Barr virus. *Allergy*. 2018. No. 73. P. 763. (Дисертантом проведено клінічне обстеження хворих, узагальнення отриманих результатів, сформульовано висновки).

10. Zubchenko S., Lomikovska M., Lishchuk-Yakymovych K. Peculiarities of the Epstein-Barr virus prevalence among patients with pollen allergy. *Allergy*. 2018. No. 73. P. 583. (Автором проведено огляд сучасних літературних джерел з даної проблеми та аналіз отриманих даних).

11. Lomikovska M., Chopyak V., Potomkina H., Kril I. Peculiarities of TLR9 expression on immunocompetent cells in patients with the reactive arthritis induced by the Epstein-Barr viral infection and the rheumatoid arthritis. *Allergy*. 2019. No. 74. P. 466. (Здобувачем зібрано матеріал, проаналізовано та узагальнено отримані результати).

ЗМІСТ

ЗМІСТ.....	26
ВСТУП.....	29
РОЗДІЛ 1. СУЧАСНІ АСПЕКТИ ПОШИРЕННЯ, ІМУНОПАТОГЕНЕЗУ, ДІАГНОСТИКИ ТА ЛІКУВАННЯ РЕАКТИВНОГО АРТРИТУ (аналітичний огляд літератури).....	35
1.1 Реактивний артрит, спричинений <i>Chlamydia trachomatis</i> , загальна характеристика.....	35
1.2 Вплив Епштейна-Барр вірусної інфекції на розвиток реактивного артриту.....	39
1.3 Вірус Епштейна Барр та <i>Chlamydia trachomatis</i> у розвитку ревматоїдного артриту.....	41
1.4 МікроРНК у патогенезі реактивного артрити.....	44
1.5 Роль Toll-подібних рецепторів при формуванні реактивного та ревматоїдного артритів.....	47
1.6. Роль цитокінів у розвитку реактивного артрити.....	49
1.7 AGE (кінцеві продукти глікації) як новітній маркер гострого та хронічного запалення.....	51
1.8 Сучасні підходи до терапії реактивного артрити.....	54
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	57
2.1 Протокол дослідження: об'єкт дослідження, розподіл за групами, характеристика груп хворих.....	57
2.2 Лабораторні методи обстеження.....	60
2.2.1 Визначення видоспецифічних імуноглобулінів класів М, G, А до <i>Chlamydia trachomatis</i>	60
2.2.2 Визначення імуноглобулінів класів М, G до антигенів ВЕБ.....	61
2.2.3 Виявлення вірусу Епштейна-Барр за допомогою полімеразно- ланцюгової реакції (ПЛР) у цільній крові, слині та мазках з ротоглотки.....	63

2.2.4 Оцінка експресії miR-146a та miR-155, BART-13 та BART-15 за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції у режимі реального часу.....	64
2.2.5 Визначення фагоцитарної активності гранулоцитів та моноцитів у гепаринізованій крові у пацієнтів з РеА.....	65
2.2.6 Дослідження оксидативних процесів у гранулоцитах та моноцитах гепаринізованої крові пацієнтів з РеА.....	66
2.2.7 Кількісне визначення внутрішньоклітинного TLR-9 маркера лімфоцитів за допомогою методу проточної цитометрії.....	66
2.2.8 Кількісне визначення популяцій та субпопуляцій лімфоцитів за допомогою методу проточної цитометрії.....	67
2.2.9 Кількісне визначення активізаційних маркерів лімфоцитів (CD3/CD HLA-DR, CD4/CD25) за допомогою методу проточної цитометрії.....	68
2.2.10 Визначення рівня цитокінів за допомогою BioPlex 200.....	68
2.2.11 Визначення кінцевих продуктів глікації (AGE) за допомогою методу ІФА.....	69
2.3 Статистичні методи дослідження.....	70
РОЗДІЛ 3. ХАРАКТЕРИСТИКА ЗМІН ПРИ РЕКТИВНОМУ АРТРИТІ, ЯКИЙ СПРИЧИНЕНИЙ CHLAMYDIA TRACHOMATIS ТА ЕПШТЕЙНА-БАРР ВІРУСНОЮ ІНФЕКЦІЄЮ.....	73
3.1 Клінічні та загально лабораторні показники у хворих на РеА.....	73
3.2 Зміни молекулярно-генетичних показників у хворих на реактивний артрит	78
3.3 Зміна експресії miR-146a та miR-155, BART-13 та BART-15 при реактивному артриті, який спричинений Chlamydia trachomatis та Епштейна-Барр вірусною інфекцією.....	81
3.4 Функціональний стан нейтрофілів та моноцитів та особливості експресії TLR9 на імунокомпетентних клітинах при реактивному артриті, який спричинений Chlamydia trachomatis та Епштейна-Барр вірусною інфекцією.....	88

3.5 Фенотипічні особливості лімфоцитів при реактивному артриті, який спричинений <i>Chlamydia trachomatis</i> та Епштейна-Барр вірусною інфекцією.....	102
3.6 Рівень цитокінів у хворих на реактивний артрит, який спричинений <i>Chlamydia trachomatis</i> та Епштейна-Барр вірусною інфекцією.....	107
3.7 Особливості рівня AGEs при реактивному артриті, який спричинений <i>Chlamydia trachomatis</i> та Епштейна-Барр вірусною інфекцією.....	111
РОЗДІЛ 4. ПРОГНОСТИЧНА МОДЕЛЬ НА ОСНОВІ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ ТА ІМУНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ РИЗИКУ ТРАНСФОРМАЦІЇ РЕАКТИВНОГО АРТРИТУ, ЯКИЙ СПРИЧИНЕНИЙ КОМБІНОВАНОЮ ІНФЕКЦІЄЮ <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i> ТА ЕПШТЕЙНА-БАРР ВІРУСОМ В РЕВМАТОЇДНИЙ АРТРИТ.....	115
РОЗДІЛ 5. ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ НА РЕАКТИВНИЙ АРТРИТ НА ТЛІ КОМБІНОВАНОЇ ІНФЕКЦІЇ <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i> ТА ЕПШТЕЙНА-БАРР ВІРУСУ.....	119
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	134
ВИСНОВКИ.....	143
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ.....	145
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	146
ДОДАТКИ	167

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Реактивний артрит (РеА) – важлива медико-соціальна проблема сучасності у зв'язку з високою розповсюдженістю серед людей різних вікових груп, особливо серед осіб працездатного віку (20-40 років) [147]. Думки дослідників сходяться у тому, що ця хвороба є найбільш частим видом гострого артриту в молодих чоловіків і жінок. У середньому, розповсюдженість РеА становить 30-200 випадків на 100 тисяч населення за даними різних авторів [8,131,73]. У даний час РеА розглядається як мультифакторне захворювання, пов'язане з хронічною інфекцією, у розвитку якого значну роль відіграють не тільки мікроорганізми, але й стан імунної системи. При цьому інфекційний агент у порожнині суглоба може не виявлятися, виконуючи роль пускового механізму хвороби.

Роль *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) у розвитку РеА не викликає сумнівів. Це пов'язано з широкою розповсюдженістю хламідійної інфекції, особливостями шляхів її передачі, циклом розвитку хламідій та реакцією організму пацієнта на лікування. У розвитку РеА відіграють важливу роль безпосереднє ураження органа-мішені *C. trachomatis* і неадекватна імунна відповідь [141]. В останні роки особлива увага науковців приділялася ролі вірусної інфекції в розвитку та перебігу РеА [115]. Сьогодні недооцінені наслідки дії активації вірусу Епштейна-Барр (ВЕБ) у хворих на РеА, який відноситься до групи γ -герпесвірусів і асоціюється з лімфопроліферативними, аутоімунними хворобами, синдромом хронічної втоми тощо. Імунопатогенетичні аспекти РеА активно вивчаються і становлять значний науково-практичний інтерес, проте вплив ВЕБ на функцію імунної системи при розвитку РеА залишається відкритим [53,59,88].

Актуальність проблеми РеА також пов'язана зі складністю діагностики, а саме з тим, що по-перше, не досягнуто консенсусу щодо діагностичних критеріїв; по-друге, РеА може розвиватися після уrogenітальних, кишкових чи респіраторних інфекцій, які часто мають

субклінічний перебіг і тому не діагностуються; по-третє, нез'ясованими залишаються критерії оцінки ступеню імунорегуляторних порушень у пацієнтів з РеА. Існують суперечливі дані щодо механізмів регуляції імунної відповіді в пацієнтів з імунозалежними інфекціями, зокрема у комбінації хламідійної та ВЕБ-інфекцій та не вивчено ризики трансформації в більш важкі системні аутоімунні хвороби, такі як ревматоїдний артрит (РА) [65,80]. Актуальними є питання доцільності та особливостей застосування імуномодуючої терапії на тлі доказової базової терапії у хворих на РеА комбінованого генезу.

Отже, проблеми пов'язані з високою частотою РеА, складностями діагностики, залученням багатьох органів і систем та недостатньо ефективним лікуванням вимагають свого вирішення. Відсутній структурований комплексно-диференційований підхід до діагностичної та терапевтичної тактики хворих на РеА, що підтверджує доцільність подальшого вивчення молекулярно-генетичних, імунологічних механізмів хвороби з метою прогнозування перебігу, тактики ведення таких хворих та попередження розвитку важких системних ускладнень.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація є фрагментом планової комплексної науково-дослідної роботи кафедри клінічної імунології та алергології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (ЛНМУ) на тему «Прогнозування розвитку вірус-індукованих фенотипів імунозалежних хвороб з персоніфікацією їх діагностики та лікування» (Державний реєстраційний № 0118U000110).

Мета дослідження. Підвищення ефективності лікування та раннього прогнозування ризиків трансформації реактивного артрит у ревматоїдний артрит шляхом вивчення особливостей імунопатогенезу інфекційного реактивного артрит на тлі колонізації хламідійної і реактивації ВЕБ-інфекції. Для досягнення поставленої мети були поставлені **наступні завдання:**

1. Визначити клінічні та скринінгові лабораторно-імунологічні критерії

ранньої діагностики інфекційного реактивного артрити на тлі *C. trachomatis* і ВЕБ-інфекції.

2. Вивчити особливості рівня BART-13 та BART-15 ВЕБ; miR155 та miR146a, оцінити їх вплив на імунорегуляторні процеси у досліджуваних групах хворих.
3. Порівняти рівень експресії TLR9 на клітинах крові та провести аналіз особливостей фагоцитарної активності імунокомпетентних клітин у досліджуваних групах хворих.
4. Проаналізувати фенотипування лімфоцитів, їх активізаційних маркерів і визначити наявність взаємозв'язків між імунологічними показниками у хворих на реактивний артрит залежно від етіологічного чинника.
5. Визначити рівні синтезу цитокінів: TNF- α , IL-17, IL-22, IL-23, IFN- γ та IL-10 в сироватці крові та вивчити їх патогенетичне значення в розвитку реактивного артрити.
6. Вивчити рівень кінцевих продуктів глікації в сироватці крові (AGE) у досліджуваних групах хворих.
7. Запропонувати математичну модель ризиків розвитку трансформації інфекційного реактивного артрити в ревматоїдний артрит.
8. Оцінити клінічну та імунологічну ефективність, безпеку та перенесення імуномодуючої терапії ліофілізованого діалізату лейкоцитів "Імодин" на тлі етіотропної та протизапальної терапії хворими на реактивний артрит на тлі комбінованої інфекції (*C. trachomatis*+ВЕБ).

Об'єкт дослідження: реактивний артрит спричинений *C. trachomatis* та комбінацією *C. trachomatis* з вірусом Епштейна-Барр.

Предмет дослідження: комплекс імунологічних, молекулярно-генетичних, серологічних, біохімічних та клінічних параметрів у хворих на реактивний артрит спричинений *C. trachomatis* та в комбінації з вірусом Епштейна-Барр, ефективність та безпечність імуномодуючої терапії.

Методи дослідження: загально-клінічні, загально-лабораторні (цитологічні, біохімічні), молекулярно-генетичні, імунологічні, статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. На підставі комплексного

дослідження імунологічних, серологічних, молекулярно-генетичних досліджень розширено знання щодо участі фагоцитарних, лімфоцитарних, цитокінових механізмів у розвитку реактивного артрити на тлі *C. trachomatis* і вірусу Епштейна-Барр.

Вперше досліджено експресію молекул BART-13, BART-15 вірусу Епштейна-Барр та регуляторних молекул miR155 та miR146a у хворих на реактивний артрит на тлі *C. trachomatis* і Епштейна-Барр вірусної інфекції.

Доведено наявність кореляційної залежності між експресією молекул BART-13, BART-15 ВЕБ та регуляторних молекул miR155 та miR146a у хворих на реактивний артрит на тлі комбінованої інфекції (*C. trachomatis*+ВЕБ).

Вперше у хворих на РеА на тлі *C. trachomatis* і Епштейна-Барр вірусної інфекції досліджено рівень продуктів глікації AGE.

Доведена клінічна ефективність та безпечність у якості додаткової імуномодуючої терапії застосування ліофілізованого діалізату лейкоцитів «Імодин» у хворих на реактивний артрит на тлі комбінованої інфекції (*C. trachomatis*+ВЕБ).

На підставі комплексного вивчення імунологічних та молекулярно-генетичних параметрів запропоновано математичну модель прогнозування ризиків трансформації реактивного артрити в ревматоїдний артрит.

Особистий внесок здобувача в одержаних наукових результатах. Дисертація є самостійною науковою працею здобувача. Разом із науковим керівником визначено тему та завдання наукових досліджень. Автор самостійно проведено патентно-інформаційний пошук та аналіз джерел літератури за темою дисертації, обстежено 88 хворих на реактивний артрит, 31 хворий на ревматоїдний артрит, та 25 пацієнтів контрольної групи; визначено й здійснено комплексну діагностично-лікувальну програму, виконано статистичну обробку отриманих результатів, написано усі розділи дисертації, підготовлено до друку наукові публікації, забезпечено впровадження результатів дисертаційної роботи в клінічну практику. Проведено низку імунологічних досліджень хворих у співпраці з відділом інфекційної імунології

Інституту імунології та експериментальної терапії Польської академії наук (Вроцлав, Польща), молекулярно-генетичних досліджень – з відділом загальної та молекулярної патофізіології інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України. Спільно з науковим керівником систематизовані та проаналізовані отримані результати, сформульовано основні положення, висновки та розроблено практичні рекомендації.

Апробація результатів дисертації. Результати та головні положення дисертаційного дослідження представлені на засіданнях кафедри клінічної імунології та алергології ЛНМУ ім. Д. Галицького (2016-2020); планових науково-практичних семінарах клінічних імунологів Львівської області (2016-2019); II Міжнародному симпозіумі «Захворювання кістково-м'язової системи та вік» (Львів, 2016); міжнародних читаннях з імунології та алергології «Від науки до практики» (Львів, 2017); всеукраїнській науково-практичній конференції «Медикаментозна алергія: мультидисциплінарний підхід» (Львів, 2017), 11th International Conference of Allergy, Asthma and Clinical Immunology (Едінбург, Великобританія, 2017); науково - практичній конференції «Імунодіагностика та імунотерапія для практичної медицини» (Львів, 2018); ЕААСІ конгрес (Мюнхен, Німеччина, 2018); науково - практичній конференції «Ревматичні хвороби: модифікація імунного статусу та запального процесу» (Київ, 2019); ЕААСІ конгрес (Лісабон, Португалія, 2019); науково-практичній конференції «Сучасні питання алергології» (Дніпро, 2019); науково-практичній конференції «Інновації в імунології та алергології» (Львів, 2019).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 20 наукових праць, у тому числі 9 статей: 6 – у наукових фахових виданнях, внесених до переліку МОН України, 1 – у журналах, зареєстрованих в наукометричній базі Scopus, 2 – у журналах, зареєстрованих у міжнародній наукометричній системі Web of Science та 11 тез доповідей на наукових конференціях, з них 4 – у матеріалах міжнародних конгресів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається з вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, розділу

власних досліджень, аналізу та обговорення отриманих результатів, висновків, практичних рекомендацій, списку використаної літератури, додатків. Загальний обсяг роботи складає 184 сторінки, з них 115 сторінок основного тексту. Робота ілюстрована 19 таблицями, 23 рисунками. Список використаної літератури включає 173 джерел, з них – 35 кирилицею та 138 – латиною.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Реактивний артрит, спричинений *Chlamydia trachomatis*, загальна характеристика

Реактивний артрит (РеА) – системне захворювання, яке розвивається внаслідок хламідійної або (значно рідше) іншої інфекції у осіб з генетичною схильністю. До реактивних артритів відносять запальні негнійні захворювання суглобів, які розвиваються внаслідок імунних порушень після перенесеної урогенітальної, кишкової чи респіраторної інфекцій [13,33,90]. З імунологічної точки зору реактивний артрит – це проліферативна відповідь синовіальних мононуклеарних клітин на подразнення інфекційних збудників [114,133]. Одним із прототипів РеА є хламідій-асоційований артрит. Окремою формою реактивного артриту вважають синдром Рейтера, який характеризується поєднанням асиметричного артриту, уретриту/цервіциту, пошкодженням очей, ураженням шкіри/слизових оболонок (баланіт, виразки слизової оболонки ротової порожнини або кератодерма) [49,157]. Труднощі діагностики пов'язані з відсутністю єдиних загальноприйнятих діагностичних критеріїв, а також з широкою розповсюдженістю клінічно стертих форм захворювання, коли одні його симптоми відсутні, а інші слабо виражені [31,86]. Усі види хламідій є obligatними внутрішньоклітинними бактерійними паразитами, і всі вони патогенні для різних господарів [117,127,141]. *C. Trachomatis* і *C. pneumoniae*, поширюються з місць первинної інфекції, щоб надалі існувати у віддалених анатомічних місцях. Обидва види можуть викликати потужну імунну відповідь, що призводить до різних патологічних станів, одним з яких є запальний артрит [2,157]. У деяких осіб з гострим хламідій-асоційованим артритом, хвороба може набувати хронічного перебігу [27,73,91].

Усі хламідії проходять класичний двофазний цикл розвитку. На першому етапі інфекційна позаклітинна форма мікроорганізму (елементарне тіло [ЕТ]) локалізується і приєднуються до відповідної еукаріотичної клітини-господаря, якими, зазвичай, є епітеліальні клітини, хоча інші типи

клітин також можуть бути інфіковані. Після того як хламідії приєдналися до рецепторів клітини-господаря, мікроорганізм утворює мембранозв'язуюче цитоплазматичне включення, в межах якого він реорганізовується в метаболічно активну форму — ретикулярне тіло (РТ). Під час цієї внутрішньоклітинної фази, РТ зазнають кілька циклів поділу, після яких більшість РТ реорганізуються назад у форму ЕТ і звільняються з клітини-господаря шляхом лізису або екзоцитозу. Виділені ЕТ знаходять нові клітини господаря для розповсюдження інфекції. Дані про активний ріст, як представлено стандартним циклом розвитку від ЕТ до РТ і назад до ЕТ, можуть бути, в першу чергу, необхідні для тривалого високого рівня трансмісії мікроорганізмів [68,73]. Проте, існують певні особливості проходження *C. trachomatis* циклу розвитку, а їх метаболічні характеристики відрізняються від тих, при яких відбувається активний ріст хламідійної інфекції. Цей модифікований біологічний стан називається "персистенція". Персистенція — термін, що вказує на змінені метаболічні та інші характеристики, що лежать в основі зміненого циклу розвитку, і відображає тенденцію мікроорганізмів до тривалого інфікування в місцях їх розповсюдження [49]. У цьому стані блокується експресія гена, який припиняє завершення циклу розвитку і мікроорганізми проявляють незвичайні морфологічні, транскрипційні та інші властивості. На додаток до транскрипційної системи, система хламідійних протеїнів виявляє відмінності в фазі персистенції [157]. Одним з найважливіших відкриттів було виявлення зниження зовнішньомембранного протеїну (OMP1) при персистуючій інфекції, наголошуючи на відмінній морфології персистуючих хламідій, які знаходяться в артритичному суглобі. Іншою знахідкою була збільшена регуляція гена протеїну теплового шоку (HSP-60), що кодує високоімуногенні протеїни, сприяючи прозапальній відповіді імунної системи [32]. Персистенція хламідій викликає сильну імунну відповідь, хоча механізми її розвитку вивчені недостатньо [123,149]. Персистуючі *C. trachomatis* перебувають більшою мірою в моноцитах/макрофагах синовіальної тканини, і в цьому стані вони є метаболічно активні, але

морфологічно аберантні [141]. Більше того, персистуючі *C. trachomatis* значно знижують продукцію нових інфекційних ЕТ, вказуючи на те, що збудник знаходиться на пізній стадії циклічного розвитку. Гени, чиї продукти залучаються в реплікацію ДНК, експресуються протягом активного росту і стадії персистенції *C. Trachomatis*, але гени, чиї продукти необхідні для цитокінезу, знижують регуляторну функцію на пізній стадії. Цікаво, що експресія генів, які кодують ферменти для *C. trachomatis* гліколітичного і пентозофосфатного шляхів знижують регуляцію під час персистенції. Ці особливості без сумніву пояснюють значущі адаптаційні можливості хламідій для підтримання довготривалої інфекції. Т-лімфоцити активуються бактерійними фрагментами в системному кровообігу, такими як ліпополісахариди та нуклеїнові кислоти і, як наслідок, атакують синовіальну оболонку та власні антигени. Окрім цього, у випадку хламідій-асоційованого артрити цей збудник переходить в синовіальну тканину [32,49]. Це підтверджується виявленням транскриптів рибосомних РНК *C. trachomatis* і *C. Pneumoniae*, продуктів бактерійної деградації в синовіальній тканині та рідині [129]. Докази наявності попередньої інфекції можна визначити приблизно у 60% випадків ReA. ДНК хламідій, мРНК, рРНК та інтактних хламідія-подібних клітин були виявлені в синовіальних тканинах і периферичній крові. Хронічна персистенція бактерійних антигенів у межах суглобового простору може сприяти довготривалій перспективі розвитку ускладнення [141]. Деякі випадки захворювання спонтанно завершуються выздоровленням, але у 30-63% хворих розвивається хронічний реактивний артрит з симптомами тривалістю більше 6 місяців. Більшість пацієнтів мають активну клінічну ремісію протягом 6 місяців після інфікування.

Хронізація захворювання супроводжується періодичними рецидивами і ремісіями, незважаючи на наявність стійкої бактеріємії в суглобі. На сьогоднішній день немає пояснення клінічної гетерогенності, але це, ймовірно, пов'язано як з генетичним статусом господаря, так і з бактерійними факторами, такими як здатність *C. trachomatis* модифікувати свій життєвий цикл [74,132].

Завдяки інтенсивному вивченню імунопатогенезу реактивного артриту нинішній погляд на механізм захворювання загалом базується на потенційній ролі імунної відповіді. Дисбаланс цитокінів і взаємодія між *C. trachomatis* і HLA-B27 вважається основним фактором у неспроможності ліквідувати мікробні антигени, що призводить до маніфестації захворювання і хронізації запального процесу [59,141]. РеА, викликаний *C. trachomatis*, розвивається насамперед у генетично схильних осіб (носіїв HLA-B27). Було встановлено, що антитіла до низки мікроорганізмів перехресно реагують з HLA-B27. Це пояснюється феноменом молекулярної мімікрії, коли білки клітинної стінки хламідій мають структурну подібність з окремими ділянками молекули HLA-B27 [47,156]. Вважається, що присутність HLA-B27 потенціює розвиток реактивного артриту, презентуючи бактерійні антигени Т-клітинам, змінюючи толерантність імунної системи, підвищуючи продукцію TNF- α [5,6,130]. Поширеність HLA-B27 при реактивному артриті оцінюється від 30% до 50% у пацієнтів з реактивним артритом, хоча це число широко варіює. При госпітальних дослідженнях пацієнтів з важким перебігом РеА повідомлялося про частоту від 60% до 80%. Наявність алелі HLA-B27 не пов'язують з початком РеА, однак серед HLA-B27-позитивних пацієнтів більше хворих на важкий артрит зі схильністю його переходу в хронічну стадію з більшими шансами на розвиток позасуглобових симптомів. Деякі дослідники вказують, що *C. trachomatis* може активізувати аутореактивні Т-цитотоксичні лімфоцити з специфічністю до HLA-B27 [33,41,147].

Хламідія здатна знижувати регуляцію експресії основного комплексу гістосумісності (МНС) в інфікованих клітинах. Вважається, що антибактерійна цитокінова відповідь особливо порушується при реактивному артриті, що призводить до зниження елімінації бактерій. Нещодавні дослідження показали, що інтерферон- γ знижує рівень триптофану, який відіграє важливу роль у рості хламідій за рахунок зниження активності ферменту. Ліпополісахарид хламідій у синовіальній тканині є потужним стимулятором макрофагів і може індукувати прозапальні цитокіни, головним чином через ядерний транскрипційний фактор NF- κ B. Ліпополісахарид

також індукує моноцитарний хемотактичний протеїн-1 (MCP-1), що, в свою чергу, посилює секрецію нейтрофілами хемотактичного активуючого цитокіну IL-8 з хондроцитів, а також знижує експресію C5aR на моноцитах. Це спричиняє персистенцію активованих макрофагів у синовіальній оболонці та подальше хронічне запалення [59,73,90].

1.2 Вплив Епштейна-Барр вірусної інфекції на розвиток реактивного артрити

Епштейна-Барр вірусна інфекція є однією з найбільш поширених інфекцій у світі. Епштейн-Барр вірусом (ЕБВ) інфіковано більше 98% людської популяції віком до 40 років. ЕБВ - це ДНК-місткий герпесвірус людини типу 4, який відносять до підродини гамагерпесвірусів; містить досить великий геном і кодується 87 протеїнами, 72 функції яких повністю з'ясовані. Первинна ЕБВ -інфекція виникає в дитинстві, спричиняючи або інфекційний моноклеоз (ІМ), або незначну асимптоматичну інфекцію. У підлітків ЕБВ частіше спричиняє ІМ у 30-70% випадків, у яких близько 20% В-клітин є інфікованими цим вірусом. В останні роки ЕБВ при первинному інфікуванні часто викликає стерті, симптоматичні форми захворювання з тенденцією до хронізації. ЕБВ здатний позитивно персистувати в організмі людини [62,80,127]. У разі проникнення ЕБВ в організм відбувається інфікування епітелію слизових оболонок, переважно мигдаликів, з подальшим або, можливо, одночасним інфікуванням лімфоцитів. Більшість дослідників стверджують, що при первинній ЕБВ-інфекції вражаються В-лімфоцити, а при хронічній – додатково відбувається інфікування Т-лімфоцитів та НК-клітин. Доведено, що ЕБВ виявляється також у моноцитах/макрофагах, нейтрофілах, ендотеліюцитах судин, епітелії слинних залоз, верхніх дихальних шляхів, шлунково-кишкового каналу, гепатоцитах, кардіоміоцитах тощо [76,151]. Під час первинної інфекції спостерігається масова поліклональна експансія В-лімфоцитів, з наступною активацією CD8⁺-Т-лімфоцитів. Після первинної літичної стадії інфекції, ЕБВ персистує в В-клітинах пам'яті в неактивному стані протягом усього життя людини.

Поки він латентний у В-клітині його вірусний геном інтактний, і більшість вірусних генів не активні. У латентному стані геномна ДНК ВЕБ піддається реплікації разом з хромосомною системою ДНК господаря, що призводить до рестриктивної експресії вірусних генів і приховування вірусу від імунної системи господаря [146]. Під час латентного стану максимум дев'ять генів експресуються, включаючи ядерні антигени ВЕБ (EBNA1, -2, -3А, -3В і -3С), головний протеїн (LP) і латентні протеїни мембрани (LMP1, -2А і -2В). EBNA1 - єдиний протеїн, необхідний для підтримки вірусного геному, що служить як реплікативний фактор. Коли В-клітини інфікуються протягом тривалого періоду, ВЕБ експресує тільки EBNA1. EBNA2 є важливий транскрипційний фактор під час латентної стадії в якості контролю експресії всіх інших латентних вірусних генів [82,116,120]. LMP1 і LMP2А захищають інфіковані В-клітини від апоптозу, оскільки доставляють сигнал, який зазвичай надходить з CD40 шляхом трансдукції сигналу, ініційованого за допомогою CD4⁺-Т-клітин. Протеїни, які утворюються при цьому відповідальні за пригнічення апоптозу і блокування протівірусних ефектів інтерферону-γ на ВЕБ-трансформовані В-клітини [110,128,138]. ВЕБ також кодує імуносупресивний вірусний цитокін IL-10 і рецептор вірусного колінієстимулюючого фактору 1, сприяючи уникненню імунного нагляду. Також В-клітини, трансформовані ВЕБ, посилюють експресію ВЕБ - індукованого гену 3 (EBI3), який кодує синтез IL-12, що відповідальний за ініціацію Th1-типу імунної відповіді. Клітинна імунна відповідь господаря є відповідальною за контроль латентної ВЕБ інфекції в В-клітинах [70].

Під час первинного інфікування і ранньої інфекційної фази мононуклеозу, з'являються антитіла проти ВЕБ проти вірусного капсидного антигену (VCA) і раннього антигенного комплексу - дифузного (EA-D). Пізніше, через кілька тижнів або місяців після початку захворювання, з'являються антитіла проти ядерного ВЕБ -антигену (EBNA) і виникає ранній обмежений (EA-R) антигенний комплекс. Спочатку виявляються антитіла проти EBNA-2, які знижуються протягом декількох тижнів, після чого зростає рівень EBNA-1 антитіл, що, зазвичай, зберігаються на стабільному

рівні протягом всього життя. Таким чином, у нормальної дорослої людини латентна ВЕБ-інфекція характеризується наявністю помірного, стабільного і висококорельованого рівня антитіл IgG до VCA, EBNA-1 і EA-R, з дуже низьким або незначним вмістом нтитіл до EBNA-2 і EA-D [23,24,52].

Однак, у випадках зниження клітинного імунітету періодично відбувається реактивація ЕБВ-інфекції з переходом від латентного стану до активного літичного циклу [53]. При цьому часто підвищуються IgG-VCA, IgG-EBNA-2 і IgG-EA антитіла. ВЕБ може реплікуватися і поширюватися, незважаючи на наявність антитіл, при цьому титри антитіл корелюють з вірусною активністю [52]. Тривале існування ВЕБ часто ідентифікується в циркулюючих клітинах крові. Періодичне інфікування відбувається в епітеліальних клітинах слизової навіть у здорових людей. Доведено, що клітини слизової оболонки інфікуються по чергово через циркулюючі клітини крові після локальної реактивації прихованого вірусу. Це може відбуватись в місцях хронічного або періодичного запалення. Клітини, інфіковані ВЕБ можуть мігрувати в внутрішні ділянки запалення, такі як синовіальна оболонка суглоба. Реактивація вірусу в цих ділянках, спричиняє запалення, провокує розвиток захворювання або посилення запального процесу [136]. Цитотоксичні пошкодження тканини, індуковані цитотоксичними Т-клітинами або внаслідок літичної вірусної інфекції, призводять до запального процесу. Існують дані, що від 10^5 до 10^6 В-клітин містять ВЕБ у латентній стадії у здорових дорослих осіб [39,46]. Деякі дослідження показали, що кількість ВЕБ-специфічних $CD8^+$ -Т-клітин позитивно корелює з вірусним навантаженням, що може призвести до тяжких імунопатологічних порушень [80]. Імуномодуючі функції ВЕБ роблять його добрим кандидатом для ініціації аутоімунних захворювань і загострення прогресування захворювання. [53].

1.3 Вірус Епштейна Барр та *Chlamydia trachomatis* у розвитку ревматоїдного артриту

Ревматоїдний артрит (РА) – найбільш часта хронічна системна

аутоімунна хвороба, яка проявляється запальним поліартритом з переважним ураженням дрібних суглобів рук і ніг [80]. Імунопатогенез РА характеризується надлишковою синовіальною гіперплазією та інфільтрацією лімфоцитами, моноцитами, макрофагами і фібробластами. Активація Т-клітин є найбільш раннім етапом розвитку РА, а $CD4^+$ -Т-клітини, а саме $CD4^+$ -Т-хелпери типу 1 (Th1), в свою чергу, стимулюють моноцити і макрофаги до продукції прозапальних цитокінів, а саме інтерлейкінів IL-1, IL-6, фактору некрозу пухлини (TNF- α) та протеолітичних ензимів, що руйнують синовіальну оболонку, хрящ і кістку. Активовані Т-клітини також сигналізують В-лімфоцитам до надмірної продукції імуноглобулінів, включаючи ревматоїдний фактор (РФ). Аутореактивні В-клітини також відіграють центральну роль у розвитку РА, продукуючи аутоантитіла, які можуть бути залучені до пошкодження тканин при [52].

Існує гіпотеза, що інфікування певними облігатними інфекціями (герпесвірусами або хламідіями) може сприяти розвитку чи посиленню аутоімунних хвороб людини в умовах імунодефіцитних порушень. Хламідійна чи герпесвірусна інфекції, можуть мати один з трьох механізмів впливу на аутоімунну хворобу: по-перше, вона може посилити складність захворювання, що призводить до більш тяжкого і тривалого перебігу; по-друге, може викликати рецидив; або, по-третє, може призвести до формування хронічної прогресуючої часто рецидивуючої хвороби [39,52,66,111]. Інфекційні агенти дуже часто розглядаються як пускові фактори розвитку аутоімунних хвороб, в тому числі РА. У пацієнтів з ревматоїдним артритом запальна реакція господаря може контролювати персистенцію як хламідійної, так і герпесвірусної інфекції, хоча механістичні деталі різняться. Присутність прозапальних цитокінів в синовіальній оболонці, може сприяти місцевій персистенції хламідій [101,136]. Цитокіни і хемокіни можуть неспецифічно впливати на запалення. Однак, інфекція може також вивільнити секвестовані аутоантигени, збільшуючи репертуар цільових аутоантигенів, що сприяє розвитку чи посиленню аутоімунного процесу [136,166].

Можливий зв'язок між ВЕБ та ревматоїдним артритом вперше було розглянуто на основі високих титрів ВЕБ-специфічних антитіл, які виявили у деяких пацієнтів з РА. Були виявлені також високі показники ВЕБ-специфічних CD8⁺-Т-клітин в уражених суглобах, які корелювали з вірусним навантаженням. Деякі дослідження показали, що вірус може діяти як ад'ювант щодо розвитку аутоімунітету, неспецифічно стимулюючи вроджений імунітет, включаючи дендритні клітини, Toll-like рецептори і рецептори комплементу [4,80]. Певними дослідженнями виявлено 10-кратне підвищення частоти ВЕБ-інфікованих В-клітин у пацієнтів з РА порівняно зі здоровими донорами. ДНК ВЕБ знаходяться в багатьох плазматичних клітинах синовіальної тканини пацієнтів з РА, що продукують ССР-антитіла. У пацієнтів з РА виявлено дефектну ІФН- γ -відповідь на протеїни ВЕБ. Тому, ВЕБ може вважати одним з факторів розвитку системних аутоімунних хвороб (САХ) [4,48].

Існує кілька механізмів, що пов'язані з індукцією аутоімунітету за допомогою ВЕБ. Перший вплив ВЕБ на імунну систему господаря полягає в безпосередньому інфікуванні лімфоцитів (наприклад, В-лімфоцитів), що призводить до проліферації плазмобластів, посилення антитілоутворення і формування гіперімунокомплексемії. Інший шлях - опосередковано через експресію численних імуномодуючих протеїнів ВЕБ, що беруть участь в ухиленні вірусу від імунної системи господаря та пригніченні апоптозу трансформованих інфікованих лімфоцитів. Вказані механізми призводять до втрати імунологічної толерантності і, як наслідок, до розвитку аутоімунітету [160]. Окрім цього, встановлена активація та накопичення аутореактивних Т-клітин, що виникає внаслідок вірус-індукованого локального запалення посиленням місцевої продукції цитокінів. У хворих на РА інфіковані ВЕБ клітини в синовіальних суглобах піддаються частим реактиваціям, включаючи ВЕБ-інфіковані плазматичні клітини, які продукують ССР-аутоантитіла [53]. Реактивація ВЕБ призводить до продукції протеїнів літичного циклу, що викликає імунні реакції зі сторони господаря, що сприяють запаленню і руйнуванню суглобів у хворих на РА. При реактивації

ВЕБ спостерігається збільшення кількості ВЕБ -інфікованих клітин, що призводить до збільшення кількості клітинних відходів і, таким чином, стимуляції аутореактивних В-клітин з подальшою продукцією аутоантитіл, що призводить до загострення хвороби. Після кожної реактивації кількість ВЕБ -інфікованих клітин, що не елімінувалися, збільшується аналогічно до збільшення рівня антиапоптичних молекул, що, в свою чергу, призводить до формування порочного кола з посиленням активності хвороби [53,65]. ВЕБ, завдячуючи здатності до молекулярної мімікрії, шляхом поліклональної активації В-клітин може стати тригером для розвитку РА в генетично схильних осіб. Існує гіпотеза, що, вроджений або набутий імунний дефект Т-клітинної ланки у вказаних осіб може викликати здатність організму контролювати латентну ВЕБ інфекцію [52, 164]. Нажаль й надалі залишається питання без достовірної відповіді: «Чи є вірус етіологічним фактором у розвитку аутоімунних хвороб, чи імунні порушення призводять до дизрегуляції латентної ВЕБ -інфекції?» [52,66].

1.4 МікроРНК у патогенезі реактивного артрити

МікроРНК (miRNA) - це великий клас малих некодуючих РНК довжиною 21-23 нуклеотиди, які відіграють важливу роль у регуляції генів. MiRNA здатні до пост-транскрипційного контролю генної експресії шляхом зв'язування з цільовою мРНК [135]. У геномі людини закодовано понад 2000 miRNA, які, регулюють понад 60% наших генів. [135,161].

До найбільш вивчених miRNA людини відносяться miR-146a й miR-155. miR-146a є важливим модулятором вроджених і адаптивних клітин імунітету [100,102,134,167]. Численні дослідження встановили критичну роль miR-146a у запаленні та імунітеті. Транскрипційні фактори, медіатори запалення, включаючи ядерний фактор каппа-ланцюга-енхансер активованих В-клітин (NF-κB) і мікробні компоненти, можуть активувати експресію miR-146a шляхом негативного зворотнього зв'язку для запобігання неконтрольованого запалення, пригнічуючи сигнальні шляхи TLR шляхом націлювання на рецептор фактора некрозу пухлини 6 (TRAF6) і рецептор-

асоційовану кіназу 1 (IRAK1) на різні клітини вродженого імунітету [119]. Зміни експресії miR-146a спостерігаються при запальних та аутоімунних хворобах, вірусних інфекціях, сепсисі, при поліорганній недостатності і онкопатології [60].

Аномальна експресія miR-RNAs у хворих на РА була задокументована більше, ніж у десяти дослідженнях, більшість з яких зосереджувалася навколо Т-клітинної диференціації (Th17), продукування запальних цитокінів та активації В-клітин. Виявлена кореляція між експресією miR-146a та активністю захворювання у хворих на РА [121].

miR-155 - це багатofункціональна miRNA, збагачена клітинами імунної системи і незамінна для імунної відповіді. Однак при порушенні регуляції miR-155 сприяє розвитку хронічного запалення, аутоімунітету, раку та фіброзу. Експресія miR-155 швидко збільшується у відповідь на інфекцію або травму. Індукуючими факторами є PAMPs/DAMPs, тривожні сигнали (наприклад, вплив IL-1 α) та запальні подразники, наприклад, TNF, IL-1 β , інтерферони та гіпоксія. На відміну від цього, експресія miR-155 знижується під впливом протизапальних цитокінів та посттранскрипційних негативних регуляторів; і ця знижена експресія miR-155 є важливою частиною механізму негативних зворотних зв'язків, що гальмують імунні реакції. Дані літератури свідчать про те, що miR-155 є ключовим посередником хронічної активації вродженого та адаптаційного імунітету при РА [38,103].

ВЕРБ був першим виявленим вірусом людини, що експресує miRNA і кодує більше miRNA, ніж будь-який інший людський вірус [64]. На сьогоднішній день встановлено, що ВЕРБ кодує близько 44 miRNA, які безпосередньо націлені на клітинні або вірусні miRNA. Ці miRNA належать до трьох кластерів: фрагмент А BamH I правий транскрипт (the BamH I fragment A rightward transcript - BART) - кластер 1, BART 2 - кластер 2 і фрагмент I BamH права відкрита рамка зчитування (the BamH I fragment H rightward open reading frame 1 - BHRF1) – кластер. miRNA ВЕРБ BART розташовані між інтронами латентних BART транскриптів, які експресуються у всіх типах ЕВВ. miRNA BART можуть виявлятися у всіх латентних та

літичній формах та відображати подібну експресію до BART транскриптів [69,162,165]. Ці miRNA орієнтовані як на вірусні, так і на клітинні гени, що беруть участь у всьому життєвому вірусному циклі, включаючи вірусну реплікацію, імунну відповідь, регуляцію клітинного циклу, апоптоз та клітинну проліферацію [77,125,128,161]. Насамперед miRNA ВЕБ використовуються вірусом для контролю власної генної експресії. Таким чином, вірус може регулювати перехід латентної або латентно/літичної фази і обмежувати презентацію його антигенів імунній системі господаря. Латентна інфекція ВЕБ також регулює експресію великої кількості клітинних miRNA, більше того ВЕБ-кодовані miRNA надлишково експресуються у латентно інфікованих клітинах і виконують важливу функцію при розвитку вірусної інфекції в організмі [67,124]. Оскільки ВЕБ експресує високий рівень miRNA протягом усіх етапів його життєдіяльності, то це дозволяє цим miRNA залучатися у взаємодію між ВЕБ та імунною системою господаря. При цьому ВЕБ miRNA інгібує експресію вірусних антигенів, дозволяючи інфікованим клітинам уникати імунного розпізнавання. Окрім цього, ВЕБ miRNA безпосередньо пригнічує антивірусний імунітет господаря, втручаючись в антигенну презентацію та активацію імунних клітин [81,161]. Ці miRNA можуть сприяти патогенетичному впливу ВЕБ через націлення мРНК та мРНК господаря та втручання в важливі клітинні механізми, такі як імунний нагляд, клітинну проліферацію, метаболізм та апоптоз [54]. Націлюючись як на клітинні, так і на власні компоненти, miRNA ВЕБ можуть забезпечити вірус додатковими засобами для ухилення впливу імунної системи. miR-BART 15 взаємодіє з мРНК сімейства NLR пірин-домен-вмісним 3 (NLRP3). Ця взаємодія впливає на асоційований запальний комплекс, який включається в контроль вірусної інфекції і, як правило, відіграє певну роль у стимуляції імунної відповіді через продукцію ІЛ-1 β та ІЛ-18. Інтерферон-регуляторні фактори (IRF), які є важливими гравцями у вродженій імунній відповіді, а особливо IRF7 та IRF5, які індукуються ІФН I типу, можуть негативно регулювати експресію BART miRNA. Таким чином, орієнтуючись на ці шляхи, BART miRNA погіршують стан вроджений імунітет, а також

гарантують експресію власних та деяких латентних протеїнів [54,81,125]. ВЕБ miRNA володіє глобальним впливом на клітинну експресію miRNA в В-лімфоцитах та епітеліальних клітинах [150].

ВЕБ здатний впливати на експресію великої кількості клітинних miRNA, включаючи miR-155, miR-146a, miR-21, miR-29, і miR-34a. Зокрема, сигнальний шлях ЕБВ LMP1 (латентний мембранний протеїн 1) індукує miR-155, miR-146a, miR-21, які виявляють важливу роль в ухиленні від імунного контролю, орієнтуючись на LMP1, TLR, Jak-STAT і апоптоз. ЕБВ не кодує miR-155 ортологічно; натомість miR-155 індукується LMP1 через NFκB та AP1, LMP2A і стабілізує латентний статус вірусу. Як і miR-155, miR-146a також кодується одиничним геном, і його експресія може бути індукована NFκB шляхом зниження TNFα, IL1β і TLR-сигнального шляху в імунній відповіді. У свою чергу, miR-146a націлюється на IRAK1, IRAK2 та TRAF6 - компоненти, критичні для цих сигнальних шляхів, і тому контролює ці шляхи через регулятивний цикл негативного зворотного зв'язку. Відомо, що LMP1 ВЕБ індукує miR-146a, а EBNA2 негативно впливає на експресію даної miRNA. Таким чином ВЕБ через мішені IRAK1 та TRAF6 здатний уникати імунного нагляду природженим імунітетом [142,161].

Хоча ідентифікація вірусної miRNA є ключовим кроком у розумінні її патологічної ролі, стало відомо, що одна окрема мРНК може бути орієнтована на кілька miRNA, які передбачають формування комплексу miRNA – miRNA, ефект яких може бути сумарним/синергічним [43,125,143]. Вірусні miRNA не є винятком, і цей феномен може поширюватися і на клітинні транскрипти за рахунок вірусних та клітинних дерегульованих miRNA у присутності вірусу [122,125,163]. Більше того, ці маленькі молекули потенційно можуть бути використані як молекулярні маркери.

1.5 Роль Toll-подібних рецепторів при формуванні реактивного та ревматоїдного артритів

Toll-подібні рецептори (TLRs) — це сімейство трансмембранних рецепторних білків, які знаходяться на клітинах вродженого імунітету і

здатні розпізнавати та реагувати на різні агенти, а саме: 1) пов'язані з різними видами інфекційних патогенів - патоген-асоційовані молекулярні комплекси (PAMPs); 2) агенти, пов'язані з патологічною загибеллю клітин і руйнуванням міжклітинного матриксу – це молекулярні паттерни, асоційовані з пошкодженими тканинами (при запаленні, травмі, некрозі) - DAMPs [3,106]. Залучення TLR x їхніми відповідними лігандами ініціюють багатогранну відповідь, що включає антигенну презентацію, поверхневу експресію коstimулюючих молекул, а також синтез і вивільнення цитокінів, які, в свою чергу, стимулюють специфічну адаптивну відповідь за участю Т- і В-лімфоцитів [93].

TLRs розміщені як на мембрані клітини, так і на внутрішній поверхні ендосом. TLR1, 2, 4, 5, 6, 11 експресуються на позаклітинній поверхні, а TLR3, 7, 8 і 9 в основному - в ендосомах. Ці рецептори експресуються на моноцитах, фагоцитах, дендритних клітинах та В-лімфоцитах. Власне TLR9 є важливим внутрішньоклітинним рецептором; активується неметильованими CpG послідовностями в молекулах ДНК; експресується на дендритних клітинах, макрофагах, природних кілерних клітинах та інших імунокомпетентних клітинах; переважно зв'язує ДНК, що присутня в бактеріях та вірусах; запускає сигнальні каскади, що приводять до прозапальної відповіді цитокінів [3]. Імунна відповідь, стимульована TLR9, чітко контролюється. Специфічний контроль включає регульовану надлишкову активацію TLR9-відповіді на різних рівнях сигналізу і цитокінової індукції, ускладнюючи імунну активацію, опосередковану через TLR9. Внутрішньоклітинна локалізація TLR9 створює TLR9-асоційований компартмент, що ламає вірусну структуру чи бактерійну стінку для виходу їх ДНК [42,98].

Бактерійна ДНК, яка є сильним стимулятором TLR9 та міститься всередині мікроорганізмів, стає доступною для розпізнавання тільки після лізису в фаголізосомах. Ендосомальне розташування TLR9 відображає потребу в фагоцитозі та мікробіальній деструкції для вивільнення ДНК [78,97]. Іншим аспектом функції TLR9 є те, що він розпізнає не тільки

бактерійну, а й вірусну ДНК [144,159]. Виявлено, що зв'язування вірусів з антигенами II-го класу системи МНС за допомогою ендосомального каналу та залучення TLR-9, є процесом, який не вимагає реплікації віруса, але є необхідним для синтезу IFN- α дендритними клітинами, що викликається інтактними вірусами [57,79,145]. Це важливо, тому, що В-лімфоцити можуть функціонувати як антигенпрезентуючі клітини, TLR9-експресія може впливати на імунну відповідь проти вірусів [45,93]. Встановлено що ВЕБ - інфекція характеризується посиленою експресією некодованих малих РНК (EBER), які розпізнаються TLR3 і TLR7 і передаються інфікованим В-лімфоцитам та плазматичним дендритним клітинам. Активація вродженого імунітету при цьому залежить від того, як ВЕБ програмує інфіковані клітини. Це припущення також підтверджується спостереженнями щодо посилення експресії TLR3 і TLR9 в інфікованих моноцитах [6,92]. На дендритних клітинах ВЕБ активує сигнальний шлях TLR9, що призводить до індукції синтезу IFN- α та активації NK-клітин і CD3⁺-лімфоцитів з подальшою продукцією IFN- γ [63,87,128].

При певних патологічних станах власне ДНК стимулює TLR9 і активація сигнального каскаду може сприяти розвитку аутоімунних хвороб. Дослідженнями було доведено, що TLRs активно беруть участь у формуванні аутоімунних хвороб шляхом прямої та непрямої активації Т-клітин, активації аутореактивних В-клітин [25]. Так, у хворих на РА отримані дані щодо відносної участі TLRs з DAMPs в патогенезі аутоімунних хвороб. Активація TLR9 є другим сигналом, який подає неметильовані молекули CpG і призводить до аутореактивної активації В-клітин та секреції РФ-антитіл. При цьому, макрофаги починають активно продукувати прозапальні цитокіни в присутності лігандів IgG-TLR, збільшуючи поляризацію в сторону Th17, що є критичним у патогенезі РА. Активація TLRs виконує кілька ролей при загостренні процесу та прогресуванні пошкодження суглобів, що пов'язано із зростанням числа поліморфізму в TLRs. Дослідженнями доведено також, що відсутність експресії TLR9 сприяє загостренню й прогресуванню аутоімунних хвороб [25,57].

1.6 Роль цитокінів у розвитку реактивного артрити

Цитокіни регулюють розвиток захисних реакцій у тканинах за участі різних типів клітин крові, ендотелію, сполучної тканини та епітелію. Захист на місцевому рівні розвивається шляхом формування запальної реакції у відповідь на проникнення в тканини патогенів за участі прозапальних цитокінів (IL-1, IL-6, IL-23, TNF- α) і хемокинів (IL-8), що синтезуються у вогнищі запалення, головним чином, макрофагальними клітинами, активованими компонентами клітинної стінки патогенів, а також у відповідь на пошкодження тканин [56,84,137,155]. При РеА спостерігається дисбаланс в продукції цитокінів та змінена імунна відповідь. Порушується баланс між різними лініями Т-хелперів – Th-1, Th2, Th3 і Th17, які секретують IFN- γ , IL-4, TGF- β і IL17. Оскільки Th1-клітини, секретуючи IFN- γ і TNF- α , відповідальні за елімінацію внутріклітинних збудників, дефектна Th1-відповідь може сприяти персистенції більшою мірою внутрішньоклітинних патогенів. Значне зниження експресії Th1-цитокінів було виявлено в HLA-B27 позитивних пацієнтів [22]. Однак, багато інших дослідників підтвердили, що концентрація TNF- α у синовіальній рідині пацієнтів з РеА значно зростає, викликаючи запалення [169]. Описано, що при хронічному РеА продукція TNF- α була вищою, а TNF- α -позитивні та IFN- γ -позитивні CD3⁺-клітини були значно підвищеними, що свідчить про домінуючу Th1-відповідь у хронічній фазі РеА, порівняно з гострою фазою. Деякі дослідники припускають, що Т-клітини відіграють домінуючу роль у патогенезі РеА шляхом впливу Th1-цитокінів і високою продукцією TNF- α та IFN- γ . Результати вказаних досліджень необхідно інтерпретувати у світлі того, що анти-TNF- α -терапія може бути ефективною при лікуванні хронічного РеА [138,169]. При РеА може інколи переважати і Th2-цитокіновий профіль з можливою подальшою активацією В-лімфоцитів та підвищеною продукцією антитіл. Дисбаланс між Th1 і Th2 та продукцією їх цитокінів або зниження цитокінової відповіді також є важливими чинниками при розвитку РеА. З іншого боку, певну патогенну роль у розвитку РеА можуть мати і Th17-клітини, зважаючи на їх внесок у патогенез хронічних запальних

захворювань. Відомо, що рівень IL-17 позитивно корелює з деструкцією колагену, збільшенням ресорбції кісток, знищенням хряща, а також з активацією синовіальних фібробластів щодо продукції прозапальних цитокінів [14,59].

При інфікуванні герпесвірусами в рамках протівірусної імунної відповіді відбувається посилена продукція певних цитокінів певними клітинами: 1) дендритними клітинами синтезуються IL-12 та IL-15, які активують NK-клітини на початку інфікування; 2) лейкоцити продукують хемокіни CX3CR1 і CXCR3, які стимулюють міграцію NK-клітин у місце зараження; 3) лімфоцити продукують IFN- γ , який стимулює виділення макрофагами оксиду азоту (NO), що інгібує реплікацію вірусу в уже заражених клітинах аналогічно, як IFN- γ . TNF- α та IFN- γ впливають на антигенпрезентуючі клітини і запускають протівірусну специфічну імунну відповідь. Ці цитокіни посилюють експресію молекул МНС, костимулюючих молекул, а також певних протеаз, внаслідок чого стає більш ефективною презентація прихованих антигенних епітопів і активація Т-лімфоцитів, здатних до їх розпізнавання. Це може започаткувати запальний аутоімунний процес [70,96].

1.7 AGE (кінцеві продукти глікації) як новітній маркер гострого та хронічного запалення

Однією з важливих і характерних ознак старіння є модифікація білків шляхом неферментативної глікації. Глікація – це процес взаємодії цукру з білками в організмі. Прості цукри осідають на молекули білків і призводять до їх склеювання. Внаслідок цього утворюються кінцеві продукти глікації (AGEs - (advanced glycation products) – гідрофобні частини, які міцно зв'язуються з колагеном та еластином. Продукти кінцевої глікації, накопичуючись у васкулярному матриксі, звужують просвіт судин; спричиняють дисфункцію ендотелію, що створює прокоагулянтний стан, провокують вазоконстрикцію, деградацію ліпопротеїдів низької щільності, оксидативний стрес; активують моноцити [71,83,104].

Неензиматична глікація - це посттрансляційна модифікація протеїнів, викликана спонтанною конденсацією відновних цукрів вільних аміногруп з залишками лізину або аргініну з утворенням кінцевих продуктів глікації (AGE) в результаті реакції Майяра. Прекурсорами, що викликають хімічну модифікацію білків, є не тільки глюкоза та реактивні карбонільні проміжні продукти, отримані в результаті реакції Майяра, а також продукти окислення цукрів та перекисного окислення ліпідів. Це різноманіття реакційних шляхів приводить до утворення різноманітних хімічних структур AGEs. Деякі AGEs є аддуктами протеїнів, а інші можуть презентувати зшивки протеїн-протеїн. Сформовані AGE не можуть бути видалені з протеїнів, і тому вони залишають тканину лише тоді, коли протеїни розщеплюються. Модифікація AGE може призвести до пошкодження тканин через зміни структури та функції тканинного білка та стимулює реакції клітин, опосередковані специфічним рецептором (RAGE) [55,83].

RAGE - муьтилігандний член родини клітинних поверхневих молекул імуноглобуліну, присутній на різноманітних типах клітин і бере участь у запальних та імунних реакціях [71,153]. Завдяки здатності розпізнавати тривимірну структуру, а не специфічні амінокислотні послідовності, RAGE здатний залучати різноманітний клас лігандів, у яких відсутні подібні послідовності. Експресія RAGE може бути індукована акумуляцією лігандів та медіаторів запалення. Недавні дослідження показали, що посилення експресії RAGE у ряді гострих та хронічних запальних захворювань, вказують на їхню участь у сприянні запальної реакції [44]. Цей рецептор при зв'язуванні AGE сприяє формуванню хронічних запальних хвороб, пов'язаних з віком та діабетом, таких як атеросклероз, астма, артрит, інфаркт міокарда, нефропатія, ретинопатія, періодонтити та нейропатія [51,170]. RAGE був ідентифікований на численних імунокомпетентних клітинах, які відіграють ключову роль у підтримці імунної відповіді, а саме на нейтрофілах, Т- і В-лімфоцитах, моноцитах, макрофагах, а також дендритних клітинах. Описано в літературі, що багато позаклітинних лігандів, які запускають RAGE сигналінг, були задіяні в гострих та хронічних імунних

реакціях. Sessa та інші (2004) обговорювали та підтвердили роль RAGE та його лігандів, включаючи HMGB1, білки S100, пептид амілоїд-бета та AGEs у запаленні [140,148]. Автори підсумували, що кожен із цих лігандів може чітко активізувати RAGE-сигналінг, що, в свою чергу, підтримує імунну та запальну реакцію за рахунок активації кількох внутрішньоклітинних сигнальних молекул, таких як NF- κ B, молекул адгезії та MAP-кіназ. Висока експресія RAGE на імунних клітинах вказує на їх вагомую роль у запальному процесі [50,153].

Хоча RAGE є причетні як до гострих, так і до хронічних імунних реакцій, точний регуляторний механізм цього рецептора при індукції гострого та хронічного запалення залишається незрозумілим. На сьогоднішній день запропоновано дві можливі стратегії для відповіді на це питання. У дослідженні Герольда (R. Ramasamy, S. F. Yan, K. Herold, R. Clynes, and A. M. Schmidt, 2008) було запропоновано, що олігомерні ліганди мають більшу афінність до RAGE і, тому, здатні індукувати стійку сигналізацію, що призводить до хронічного запалення [37,140]. Навпаки, мономерні ліганди з низькою афінністю до RAGE можуть викликати лише гостру відповідь. Отже, рецептор індукує хронічне запалення, коли піддається стійким ендогенним сигналам небезпеки. Навпаки, структури екзогенних лігандів мають низьку афінність до RAGE і, таким чином, викликають гостре запалення. Тіан та його колеги (J. Tian, A. M. Avalos, S.-Y. Mao, 2007) припустили, що RAGE може працювати разом з Toll-like рецепторами, для отримання гострої відповіді та швидкого очищення [102].

Наявність RAGE та його ліганд AGEs виявлено в синовіальній тканині, імунних клітинах уражених суглобів пацієнтів з остеоартритом (OA), так і з РА. Накопичення AGEs було виявлено в хрящовому колагені OA, і ці накопичені ліганди здатні змінювати механічні властивості та метаболізм хряща через RAGE сигналінг. Дослідження показали, що підвищений рівень AGEs у хрящах значно збільшує жорсткість хряща, що може спричинити неспроможність хряща протистояти пошкодженню. Отже, активація RAGE на хондроцитах накопиченими AGE може спричинити більш жорстку

матрицю та погіршити синтетичну здатність клітин. Вважається, що активація RAGE при ОА може не тільки відігравати роль у ініціації хвороби (змінений синтез матриці хондроцитами та змінені біомеханічні властивості), а також може впливати на прогресування захворювання шляхом активації фібробластів [75,153].

Крім зміни активності хондроцитів, активація RAGE впливає на активність синовіоцитів і таким чином сприяє прогресуванню запального процесу в суглобах. Усі ці результати свідчать про те, що RAGE відіграє важливу роль у розвитку та прогресуванні РА [126].

Оксидативний стрес відіграє важливу роль при гострих та хронічних запальних захворюваннях, включаючи ревматоїдний артрит (РА). Нещодавно дослідження підтвердили, що рівень AGE зростає в суглобовому хрящі, у сироватці крові та в синовіальній рідині хворих на РА. N-карбоксиметилізін (CML) - це AGE, який може бути використаний в якості маркера окисного стресу. У пацієнтів з РА спостерігаються запальні зміни та руйнування суглобів. Нагромадження CML у синовіальній тканині хворих з РА може бути результатом окислювального стресу під час локального та системного запалення. AGE - це неминучий процес *in vivo*; але, з іншого боку, наслідки запалення, такі як окислювальний стрес, можуть викликати різні «метаболічні зміни», що призводять до мутації ключових регуляторних генів, сприяючи хронізації запального процесу. У патогенезі РА тригерні фактори імунологічного процесу досі невідомі, і досі специфічний антиген відсутній. Ян та співавтори (Yang C, Acil Y, Muller PK., 1994) показали, що у пацієнтів літнього віку AGEs представляють нові епітопи та містять нові антигенні структури, можливо, сприяючи ініціації аутоімунних реакцій. Цю теорію підтримують результати дослідження Miyata et al. (1996) та Takahashi et al. (1997), які виявили співвідношення між запальною активністю та концентрацією AGEs, провівши дослідження їх вмісту в сечі та крові пацієнтів з РА [55,71,104].

Незважаючи на те, що існують відмінності між імунопатогенезом і клінікою ОА і РА, отримані на теперішній час дані дають підставу висунути

інтригуючу гіпотезу про те, що активація RAGE та підвищення рівня її лігандів сприяють деградації хряща і при ОА, і при РА [50].

1.8 Сучасні підходи до терапії реактивного артрити

Лікування реактивного артрити є однією з актуальних проблем в ревматології. Специфічної терапії цього захворювання не існує, оскільки патогенез його недостатньо вивчений. Лікування РеА розпочинається з елімінації мікроорганізму а також усунення запального процесу в суглобах та позасуглобових проявів. Відповідно до сучасних рекомендацій лікування РеА застосовують антибактеріальні, протівірусні, нестероїдні протизапальні, імуномодуючі препарати, кортикостероїди та базисні лікарські засоби [33]. Антибіотикотерапію, як стандарт, призначають при наявності достовірно виявленої активної *C. trachomatis* з метою припинення росту мікроорганізму [157]. При виявленні хламідій в уrogenітальному тракті призначають 10-14 денне антибактеріальне лікування. Проте, воно є неефективне при персистенції м\о в синовіальному просторі та при артриті у хронічній фазі, завдяки його зміненому метаболічному стану, оскільки стандартні концентрації ліків сприяють переходу м\о в персистуючу стадію розвитку, ніж сприяють очищенню організму [141]. Усі хворі повинні отримувати на першій стадії лікування нестероїдні протизапальні засоби, такі як диклофенак, ібупрофен для полегшення і знаття больового синдрому. Ефективним є внутрішньосуглобове введення кортикостероїдів, а системне призначення їх не рекомендоване [74,127]. Якщо протягом 6 міс не досягнуто ефекту від лікування то доцільно застосовувати базові лікарські засоби, типу сульфасалазин. При хронічному перебігу РеА призначають метотрексат або азатіоприн [2,26,68]. З іншого боку для зниження хламідійної RNA полімерази та HSP-60 використання рифампіцину доцільне. Антибактеріальні препарати доксициклін чи азітроміцин гальмують синтез бактеріальних протеїнів. Можливо комбінація антимікробних препаратів сприятиме переходу хламідій з персистуючої стадії і активному знищенню бактерій [7,49]. Переключення імунної відповіді з продукції прозапальних

цитокінів (меншої продукції IFN γ та TNF α) на антизапальні (збільшеної продукції IL-4, IL-10 чи TGF β) є в останні роки актуальним [49]. Коли розвивається сильний артрит і немає відповіді на стандартну схему лікування справедливим є використання в терапії інгібіторів TNF α (напр. інфліксимаб). Біологічні агенти сприяють не лише покращенню стану периферійних суглобів і спондиліту, але і дактилітів чи увеїту [1]. Використання блокаторів IL-6 (тоцилізумаб) сприяє клінічній ремісії та виявляє непрямий вплив на диференціацію наївних Т-клітин в Th17. Таким чином IL-6 може використовуватися для альтернативного лікування [59].

Якщо вірусний артрит проявляється до 6 тижнів, то проводиться симптоматичне лікування. Нестероїдні протизапальні засоби (НПЗП) є основою лікування для елімінації симптомів РеА та уникнення погіршення стану, щоб не спричинити знищення суглоба або втрата працездатності. Застосовувати кортикостероїди не варто, якщо немає проблемних симптомів і протипоказань до НПЗП або можливий короткий курс низької дози (<10 мг преднізону щодня) може бути розумним [76].

Таким чином, більше детальне знання про взаємодію інфекційного агента-господаря має вирішальне значення для розвитку більш ефективних та нових терапевтичних підходів.

Висновки до розділу 1.

1. Здійснено порівняльний аналіз етіологічних чинників розвитку реактивного артриту.
2. Проаналізовано вплив хламідійної та ВЕБ-інфекцій на функцію імунної системи при розвитку реактивного артриту..
3. Встановлено роль цитокінів, TLR, AGEs та miRNA в імунопатогенезі реактивного артриту.
4. Проведено аналіз різних методів лікування РеА.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Протокол дослідження: об'єкт дослідження, розподіл за групами, характеристика груп хворих

Науковим дослідженням охоплено 88 пацієнтів з реактивним артритом (ReA) та 31 хворий на ревматоїдний артрит, які перебували на стаціонарному лікуванні в ревматологічному відділенні Львівської обласної клінічної лікарні або амбулаторному лікуванні в центрі клінічної імунології та алергології Львівського обласного клінічного діагностичного центру протягом 2015-2019 років.

За результатами планової диспансеризації контрольну групу становили 25 практично здорових осіб, які на момент дослідження були клінічно здорові (без хронічних захворювань, не мали ревматологічної патології в сімейному анамнезі, їм не проводились профілактичні щеплення, не призначались імуноотропні препарати протягом останнього місяця, не мали обтяженого генетичного, алергологічного та імунологічного анамнезів). Серед контрольної групи обстежено 13 жінок у віці від 24 до 35 років (середній вік $29,5 \pm 5,21$ років) і 12 чоловіків у віці від 21 до 30 років (середній вік $25,1 \pm 5,45$ років). При аналізі результатів лабораторних досліджень їх показники не виходили за межі діапазону референтних значень.

Автор висловлює подяку за сприяння в роботі та обробці матеріалу кандидатської роботи науковому керівнику, професору В.В. Чопяк, завідувачу ревматологічного відділення ЛОКЛ О.В. Синенькому.

Верифікація діагнозу реактивного артриту ґрунтувалась на протоколі надання медичної допомоги хворим на реактивний артрит (наказ МОЗ України № 676 від 12.10.2006 р), який включають діагностичні програми, перелік необхідних консультацій суміжних спеціалістів та регламентують лікувальну тактику для різних ступенів тяжкості хвороби [94].

При обстеженні пацієнтів клінічний діагноз реактивного артриту встановлювали, аналізуючи скарги, анамнез хвороби, життя та результати повного огляду, динаміку захворювання та вплив рекомендованого лікування, дані якості життя пацієнта. Нами враховувались наступні клінічні прояви: ураження суглобів: асиметричний артрит з ураженням невеликої кількості суглобів (рідко більше 6); переважне ураження суглобів нижніх кінцівок: гомілковоступневих, колінних, суглобів пальців (особливо великих) стоп; ураження суглобів будь-якої іншої локалізації, але симптоматика з боку суглобів нижніх кінцівок обов'язково була присутня; ентезити; ураження слизових оболонок (кон'юнктивіт, уретрит, цервіцит, ерозії (безболісні) у порожнині рота); оцінка загального стану (загальна слабкість, підвищення температури тіла).

Критерії ступеня активності запального процесу у хворих на РеА оцінювали на основі індексу активності (DAREA), де враховувались такі показники: кількість набряклих суглобів, кількість болючих суглобів, оцінка болю, загального стану пацієнта (за шкалою від 1 до 3), рівень С-реактивного білка та виведенням відповідних балів в подальшому [58]. Для підтвердження діагнозу проводили такі лабораторні обстеження: загальний аналіз крові, ревмопроби.

Верифікацію ДНК Епштейна-Барр вірусу проводили за допомогою ПЛР аналізу в трьох біологічних середовищах, рівнем синтезу молекул IgM та IgG до капсидного та нуклеарного антигенів вірусу в сироватці крові. Ідентифікацію хламідійної інфекції проводили за допомогою ПЛР аналізу з метою виявлення ДНК *C. trachomatis* в крові та урогенітальному зішкрябі, рівнем синтезу специфічних антитіл IgM, IgG, IgA в сироватці крові. Для виключення наявності інших типів герпесвірусів проводили визначення специфічних IgM та ДНК вірусів 1,2 типу, цитомегаловірусу та вірусу герпесу 6 типу людини трьох біологічних середовищах.

Залежно від інфекційного збудника пацієнтів поділили на наступні групи: 45 хворих з реактивним артритом хламідійного генезу (РеА з *C. trachomatis*) – група порівняння – перша; 43 хворих з реактивним артритом з

комбінацією хламідійної та Епштейна-Барр вірусної інфекції (РеА з *C. trachomatis*+ВЕБ) – група порівняння – друга; 31 хворий на ревматоїдний артрит – група порівняння – третя.

У групі пацієнтів з РеА з *C. trachomatis* було – 37 (82%) чоловіків у віці 24-36 років (середній вік $30,8 \pm 5,7$) та 8 жінок (18%) – від 28 до 40 років (середній вік $34,1 \pm 6,62$). Серед пацієнтів з РеА комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ) – 19 (42,4%) жінок у віці 20-35 років (середній вік $27,1 \pm 7,9$) та 24 (57,6%) у віці 20-30 років (середній вік $25,8 \pm 5,7$). Серед 31 хворого на РА чоловіки становили 12 (38,7%), жінки - 19 (61,3%), віком 18-54 роки (середній вік $38,2 \pm 6,9$).

Пацієнти з РеА отримували лікування згідно з протоколом надання медичної допомоги хворим на реактивний артрит (наказ МОЗ України № 676 від 12.10.2006 р). З метою вивчення ефективності препарату Імодин як терапії супроводу хворі другої групи (РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ) були поділені випадковим способом на 2 підгрупи:

- 2А (23 хворих) підгрупа пацієнтів, яким застосовували лише протизапальну та етіотропну терапію;
- 2В (20 хворих) підгрупа хворих, які додатково до протизапальної та етіотропної приймали Імодин як терапію супроводу.

Традиційна терапія хворих на реактивний артрит 2А підгрупи згідно з рекомендаціями передбачала застосування доксацикліну 100 мг двічі на день протягом 7 днів, валацикловіру 1000 мг з рази на день протягом 21 дня; протизапальних засобів залежно від активності процесу.

Пацієнти в підгрупі 2В до традиційної лікування як терапію супроводу отримували імуномодулюючий препарат Імодин підшкірно по одній дозі один раз на тиждень №4, потім одну дозу через місяць.

Право на обстеження та лікування підтверджувалося письмовою інформованою згодою пацієнтів. Протокол обстеження відповідав етичним стандартам і був дозволений комісією з етики ЛНМУ імені Данила Галицького, де порушень морально-етичних норм при проведенні досліджень не було виявлено (протокол № 5 від 16 травня 2016 року).

2.2 Лабораторні методи обстеження

Лабораторні дослідження проводили на базі імунологічної лабораторії Львівського національного медичного університету імені Д. Галицького, в науковій лабораторії відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, в науковій лабораторії відділення інфекційної імунології Інституту імунології та експериментальної терапії Польської академії наук (Вроцлав, Польща), лабораторії «Ескулаб» та у клінічній лабораторії Львівського обласного клінічного діагностичного центру.

Матеріалом для лабораторних методів (гематологічних, біохімічних, імунологічних, молекулярно-генетичних) слугувала венозна кров, слина та зішряб епітелію задньої стінки глотки або урогенітального каналу. Кров забирали натщесерце з ліктьової вени за допомогою вакуумної системи забору крові, яка містить антикоагулянт K_3EDTA або без антикоагулянта - у першу добу госпіталізації чи при амбулаторному зверненні. Перед відбором слини пацієнтам рекомендували не приймати їжу продовж 4-х годин. Слину забирали в одноразові сухі стерильні пробірки об'ємом 2 мл в кількості не менше 1,0 мл. Пробірку щільно закривали кришкою та одразу ж маркували. Забір матеріалу з епітелію слизових забирали спеціальними стерильними щіточками обертальними рухами двічі у стерильну пробірку. Пробірку обов'язково одразу щільно закривали кришкою та маркували.

Загально лабораторні дослідження здійснювали за загально відомими стандартизованими методами.

2.2.1 Визначення видоспецифічних імуноглобулінів класів M, G, A до *Chlamydia trachomatis*

Визначення імуноглобулінів класу M, G, A до *C. trachomatis* проводили за допомогою методу імуноферментного аналізу згідно інструкції до наборів реагентів ХламіБест *C. trachomatis* – IgM (D-1966), ХламіБест *C. trachomatis* – IgA (D-1968), ХламіБест *C. trachomatis* – IgG (D-1964) (Вектор-бест, Росія). Матеріалом дослідження слугувала сироватка крові хворих, яку розводили у

100 разів розчином для попереднього розведення сироватки (для виявлення IgM), у 5 разів (для виявлення IgA та IgG). На першій стадії аналізу досліджувані та контрольні зразки інкубували в лунках планшета з рекомбінантними іммобілізованими антигенами при 37°C протягом 30 хв. Незв'язані антитіла видаляли п'ятикратним відмиванням. Зв'язані антитіла виявляли за інкубації з кон'югатом при 37°C протягом 30 хв. Після другого відмивання кількість зв'язаного кон'югата визначалася кольоровою реакцією з використанням субстрату пероксидази – перекису водню і хромогену – тетраметилбензидину (ТМБ) протягом 20 хв при 20-25°C у темряві. Реакцію зупиняли додаванням стоп-реагенту (розчин сірчаної кислоти) і вимірювали оптичну щільність розчину в лунках за допомогою зчитувача мікропланшетів Sunrise (Tecan, Австрія) у двоххвильовому режимі: при 450 нм (основний фільтр) та 640 нм (референс-фільтр).

Для оцінки результатів аналізу обчислювався контрольний рівень оптичної щільності ОЩ_{крит} :

для виявлення IgM - $\text{ОЩ}_{\text{крит}} = \text{ОЩ}_{\text{негК-}} + 0,25$,

для виявлення IgA та IgG - $\text{ОЩ}_{\text{крит}} = \text{ОЩ}_{\text{негК-}} + 0,2$,

де ОЩ_{негК-} оптична щільність в лунках з негативним контролем.

Для виявлення IgM - позитивними вважалися проби від $2 \times \text{ОЩ}_{\text{крит}}$ до $5 \times \text{ОЩ}_{\text{крит}}$. Негативними вважали проби від 0 до $\text{ОЩ}_{\text{крит}} - 0,05$.

Для виявлення IgA та IgG – позитивними вважали, якщо значення ОЩ у відповідній лунці було рівно або перевищувало ОЩ_{крит}. Результат аналізу вважали негативним, якщо значення ОЩ у відповідній лунці було нижче ОЩ_{крит}. [30] .

2.2.2 Визначення імуноглобулінів класів IgM, IgG до капсидних антигенів ВЕБ

Визначення імуноглобулінів класів IgM, IgG до капсидних антигенів (VCA IgG, VCA IgM) вірусу Епштейна-Барр проводили за допомогою методу імуноферментного аналізу згідно інструкції до наборів реагентів ВектоВЕБ-VCA IgG (D-2184) і ВектоВЕБ-VCA IgM (D-2176) (Вектор-бест, Росія).

Сироватка пацієнтів слугувала матеріалом для дослідження. На першому етапі аналізу зразки розводили в 10 разів розчином для попереднього розведення сироватки. У лунках планшетів з іммобілізованим антигеном ВЕБ зразки пацієнтів та контрольні зразки інкубували 30 хв при 37°C. Антитіла з сироватки пацієнтів зв'язувалися з іммобілізованим антигеном ВЕБ. Незв'язані компоненти сироватки п'ять разів відмивали. Антитіла людини до IgG/IgM виявляли за допомогою кон'югату, міченого пероксидазою хрому під час інкубації протягом 30 хв при 37°C. Після цього лунки промивали п'ять разів і додавали субстрат пероксидази - перекис водню та хромоген - ТМВ. Лунки планшета інкубували протягом 20 хв при 20-25°C у темряві. Реакцію зупиняли додаванням стоп-реагенту і вимірювали оптичну щільність у лунках при 450 нм (основний фільтр) та 640 нм (референс-фільтр), використовуючи зчитувач мікропланшетів Sunrise (Tecan, Австрія). Інтенсивність забарвлення була пропорційною кількості антитіл до капсидних антигенів ВЕБ у досліджуваному зразку. Для оцінки результатів розраховували критичне значення оптичної щільності (ОЩкрит):

Результати для IgG VCA ВЕБ - $\text{ОЩкрит} = \text{ОЩсерК-} + 0,1$, де - ОЩсерК- - оптична щільність у лунках з негативним контролем. Результати вважають негативними, коли значення $\text{ОЩсир} \leq 0,8 \times \text{ОЩкрит}$ – тобто Ig G до капсидного антигену EBV не виявлені. Результати вважають позитивними, коли $\text{ОЩсир} > \text{ОЩкрит}$. Якщо значення оптичної щільності досліджуваної сироватки знаходиться в межах від $0,8 \times \text{ОЩкрит}$ до ОЩкрит («сіра зона») то результат дослідження вважається сумнівним і його слід повторити.

Результати для IgM VCA ВЕБ - $\text{ОЩкрит} = \text{ОЩсерК-} + 0,2$, де - ОЩсерК- - оптична щільність у лунках з негативним контролем. Результати вважають негативними, коли значення $\text{ОЩсир} \leq 0,8 \times \text{ОЩкрит}$. Результати вважають позитивними, коли $\text{ОЩсир} > \text{ОЩкрит}$. Якщо значення оптичної щільності досліджуваної сироватки знаходиться в межах від $0,8 \times \text{ОЩкрит}$ до ОЩкрит («сіра зона») то результат дослідження вважається сумнівним і його слід повторити.

2.2.3 Виявлення вірусу Епштейна-Барр за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) у цільній крові, слині та мазках з ротоглотки

Виявлення ВЕБ в крові, слині та ротоглотці проводили методом полімеразної ланцюгової реакції з використанням набору для ПЛР AmpliSens® ВЕБ скрін/монітор-FRT (Росія) з використанням «Rotor Gene 6000» (Corbett Research, Австралія). Комплект реагентів AmpliSense® EBV-скрін/монітор-FRT був розроблений для виявлення та кількісного визначення ДНК ВЕБ шляхом ампліфікації конкретного фрагмента ДНК вірусу для виявлення гібридизованих, флуоресцентно-мічених продуктів ампліфікації. Матеріалом для ПЛР були зразки ДНК, виділені з цільної крові, слини та мазків з ротоглотки. Виявлення ВЕБ за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції ґрунтувалося на ампліфікації специфічної області геному патогена за допомогою спеціальних праймерів ВЕБ. Коротко, перед виділенням ДНК потрібно попередньо обробити кров. 1,0 мл гемолітичного 137-СЕ обробляли 0,25 мл цільної крові у 1,5-мл пробірці типу Еппендорф та інкубували її протягом 10 хв при періодичному перемішуванні. Після промивання завис лейкоцитів лізували, додаючи 300 мкл розчину для лізису, а потім ДНК екстрагували згідно з RIBO-препаратом. Екстракцію ДНК кожного клінічного зразка проводили у присутності внутрішнього контролю STI-87. Загальний об'єм реакції становив 25 мкл, об'єм зразка ДНК - 10 мкл. Для міксу PCR-суміш-2-FRT і полімерази (TaqF) використовують 30 мкл полімерази (TaqF). PCR-мікс скрін/монітор -1-FL змішували з PCR-мікс-2-FRT і полімеразою (TaqF), підготовленими раніше в індивідуальній пробірці, у такій пропорції: 10 мкл PCR-міксу-1-FL EBVскрін/монітор, 5 мкл міксу PCR-мікс-2-FRT і полімерази (TaqF). 15 мкл підготовленої суміші змішують з 10 мкл ДНК, отриманої при екстракції ДНК, і переносять у кожную пробірку. Програма ампліфікації з флуоресцентним детектуванням була відповідно до таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Програма AmpliSens-1 для Rotor-Gene 6000

Крок	Температура, °C	Час	Виявлення за допомогою флуоресценції	Кількість циклів
Розігрів	95	15 хв	-	1
цикл 1	95	5 сек	-	5
	60	20 сек	-	
	72	15 сек	-	
цикл 2	95	5 сек	-	40
	60	20 сек	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange	
	72	15 сек	-	

Аналіз результатів проводився програмним забезпеченням Rotor-Gene 6000 версія 1.7 для вимірювання накопичення флуоресцентного сигналу в трьох каналах:

- сигнал каналу ампліфікації продукту ампліфікації ДНК β -глобіну (IC Glob) виявлявся на каналі для флуорофору FAM;
- сигнал ампліфікації продукту ампліфікації ДНК ВЕБ (позитивний контроль ДНК EBV та людської ДНК) на каналі для флуорофору JOE;
- сигнал ампліфікації внутрішнього контролю STI-87 (IC) ДНК виявлено на каналі для флуорофору ROX.

Результати були інтерпретовані програмним забезпеченням шляхом перетину (або не перетину) кривої флуоресценції з пороговою лінією [11].

2.2.4 Оцінка експресії miR-146a та miR-155, miR-BART-13 та miR-BART-15 за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції у режимі реального часу

Визначення експресії miR146a та miR155 та miR-BART-13 і miR-BART-15 у зразках сироватки проводили наступним чином: тотальну РНК

виділяли з використанням mirVanaTM PARISTM (Ambion, США); miRNAs визначали методом зворотної транскрипції і ПЛР у реальному часі. Зворотну транскрипцію проводили з використанням набору High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, США), специфічних праймерів для кожної miRNAs і 10 нг тотальної РНК [34,72]. Кількісну ПЛР у реальному часі проводили з використанням TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystems, США): U6 snRNA (як ендogenous контроль). Температурний режим: ініціальна денатурація 95°C - 10 хв.; 45 циклів 95°C - 15 с і 60°C - 60 секунд. Рівень miRNA розраховували за формулою ($2^{\Delta C_t} \cdot 100$), нормалізували до U6 snRNA і представляли в умовних одиницях (yo). Ампліфікацію проводили на 7500 Fast Real_time PCR (Applied Biosystems, США). Отримані дані були проаналізовані за допомогою програмного забезпечення 7500 Fast Real_time PCR. Дослідження проводились у відділі загальної та молекулярної патофізіології інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАН України.

2.2.5 Визначення фагоцитарної активності гранулоцитів та моноцитів у гепаринізованій крові у пацієнтів з РеА

Дослідження проводили за інструкцією виробника Phagotest (LOT 16779, Glycotope Biotechnology, ФРН) [112]. Для цього, попередньо охолоджену на протязі 10 хв, цільну гепаринізовану кров (100 мкл на одну пробірку) змішували з 20 мкл бактеріями *Escherichia coli*, які опсонізовані з антитілами і комплементом, збагаченої сироватки у двох пробірках. Гепаринізовану кров інкубували у водяній бані з FITC-міченими бактеріями *E.coli* при 37°C протягом 10 хв, негативний контроль залишався на льоді. Фагоцитоз зупиняли додаванням 100 мкл нейтралізуючого розчину. Після двох етапів відмивки, еритроцити лізували за допомогою лізуючого розчину FACS Lysing Solution ("Becton Dickinson", США) протягом 20 хвилин. Для виключення з аналізу артефактів додавали ДНК-мічений розчин (200 мкл). Дослідження проводили на проточному цитофлуориметрі FACSCalibur

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

2.2.6 Дослідження оксидативних процесів у гранулоцитах та моноцитах гепаринізованої крові пацієнтів з РеА

Дослідження виконували з використанням набору Phagoburst (LOT 16749, Glycotope Biotechnology, ФРН) за описаною методикою [112]. На одне дослідження використовували 4 пробірки. В охолоджену протягом 10 хв, цільну гепаринізовану кров (100 мкл на одну пробірку) додавали: в першу пробірку забуферений фізіологічний розчин (негативний контроль); у другу - немічені опсонізовані бактерії *Escherichia coli*; у третю – хемотаксичний пептид N-formyl-MetLeuPhe (fMLP), в якості «низького» фізіологічного стимулу; у четверту – ліганд протеїнкінази C phorbol 12-myristate 13-acetate (РМА), в якості «сильного» стимулу. Досліджувані зразки інкубувалися протягом 10 хв. при 37°C на водяній бані. До усіх пробірок додавали флюорогенний субстрат дигідрородаміну (DHR) 123, який після стимуляції гранулоцитів і моноцитів, які продукували активні форми кисню (АФО), перетворювався у родамін (R) 123. Зупинка реакції відбувалася шляхом лізування еритроцитів. Клітини відмивали двічі та для виключення з аналізу артефактів додавали охолоджений ДНК-мічений розчин. Дослідження проводили на проточному цитофлуориметрі FACSCalibur (Becton Dickinson, США), використовуючи програмне забезпечення CellQuest Pro (Becton Dickinson, США) для збору та аналізу даних.

2.2.7 Кількісне визначення внутрішньоклітинного TLR-9 маркера лімфоцитів за допомогою методу проточної цитометрії

Дослідження виконували з використанням набору реагентів (моноклональних антитіл CD123, TLR9 (CD289), CD HLA-DR) (ФРН) за описаною методикою [36]. Забір крові у хворого проводили натщесерце з вени у пробірки для забору крові КЗЕДТА ("Becton Dickinson", США). Для дослідження використовували суспензію лімфоцитів. Для цього на

початковому етапі виділяли PBMC шляхом нашарування розведеної фосфат-забуференим фізрозчином (PBS) крові на градієнт фікол-верографіну (1,067). Клітини двічі відмивали PBS. Розводили клітини за допомогою Stain Buffer (FBS) до концентрації 10 млн клітин в 1 мл. Для фіксації клітин ресуспендували осад в залишковому об'ємі буферу і потім додали 250 мкл Fixation/Permeabilization solution. Змішали та інкубували в темноті 20 хв при 4°C. Для відмивання клітин додали 1 мл робочого розчину Perm/Wash Buffer та осадили лейкоцити центрифугуванням при 500g 5 хв, видаливши надосад. Для пермеабілізації клітин ресуспендували осад в залишковому об'ємі буферу і потім додали 0,5 мл робочого розчину Perm/Wash Buffer. Змішали та інкубували в темноті 15 хв при кімнатній температурі. Для відмивання клітин ресуспендували осад у 2 мл Stain Buffer (FBS) та центрифугували при 500g 5 хв кімнатної температури. Видалили буфер і здійснили повторне відмивання. Видалили буфер. Додали моноклональні антитіла CD123, TLR9 (CD289), CD HLA-DR у відповідній концентрації до ресуспендованого осаду. Змішували та інкубували в темноті 30 хв при 4°C. Ресуспендували клітини у буфері та аналізували одразу на проточному цитометрі FACS Calibur (Becton Dickinson, США), використовуючи програмне забезпечення Cell Quest Pro (Becton Dickinson, США) для збору та аналізу даних.

2.2.8 Кількісне визначення популяцій та субпопуляцій лімфоцитів за допомогою методу проточної цитометрії

Метод ґрунтується на взаємодії моноклональних антитіл, мічених флюорисцентними мітками, з поверхневими антигенами лімфоцитів і наступним аналізом зразків на проточному цитофлюориметрі FACSCalibur ("Becton Dickinson", США). Дослідження виконували використовуючи набір моноклональних антитіл BD Multitest IMK Kit (Cat. No. 340503). Забір крові у хворого проводили натщесерце, з вени в пробірки VACUTAINER К₃ЕДТА ("Becton Dickinson", США). У дві пробірки TruCOUNT дозатором лабораторним вносили по 100 мкл цільної крові хворого. У першу пробірку додали 20 мкл CD3/CD8/CD45/CD4 моноклональних антитіл ("Becton

Dickinson", США), у другу – 20 мкл CD3/CD16+56/CD45/CD19 моноклональних антитіл ("Becton Dickinson", США). Зразки перемішували на вортексі та інкубували в темноті 15-30 хв при кімнатній температурі, уникаючи попадання прямого сонячного проміння. У кожную пробірку додавали 450 мкл лізуючого розчину FACS Lysing Solution ("Becton Dickinson", США). Перемішували на вортексі V-1 plus ("Biosan", США) і інкубували в темноті 10-12 хв. при кімнатній температурі. Аналіз зразків проводили на проточному цитофлуориметрі FACSCalibur ("Becton Dickinson", США) за допомогою програмного забезпечення MultiSET [29,118].

2.2.9 Кількісне визначення активізаційних маркерів лімфоцитів (CD3/CD HLA-DR, CD4/CD25) за допомогою методу проточної цитометрії

Метод ґрунтується на взаємодії моноклональних антитіл, мічених флюорисцентними мітками, з поверхневими антигенами лімфоцитів і наступним аналізом зразків на проточному цитофлюориметрі FACSCalibur ("Becton Dickinson", США). Забір крові у хворого проводили натщесерце з вени у пробірки для забору крові К₃ЕДТА ("Becton Dickinson", США). У дві пробірки (1 - CD3/CD HLA, 2 - CD4/CD25) вносили по 20 мкл моноклональних антитіл та додавали по 100 мкл крові з К₃ЕДТА. Зразки перемішували на вортексі та інкубували в темноті 15-30 хв при кімнатній температурі. Для лізування еритроцитів вносили в кожную пробірку по 2 мкл лізуючого розчину FACS Lysing Solution ("Becton Dickinson", США), перемішували на вортексі V-1 plus ("Biosan", США) та інкубували в темноті 10-12 хв. при кімнатній температурі. Осаджували лейкоцити центрифугуванням при 1000 об/хв 5 хв та видаляли надосад. Осад двічі відмивали 2 мл забуференого фізіологічного розчину з 0,1% азидом натрію або розчином для промивання CellWASH. Аналіз зразків проводили на проточному цитофлуориметрі FACSCalibur ("Becton Dickinson", США) за допомогою програмного забезпечення MultiSET [29,61,118].

2.2.10 Визначення рівня цитокінів за допомогою BioPlex 200

Кров пацієнтів набирали за допомогою венепункції у стерильних умовах. Відібрана кров згорталася протягом 30 хвилин, потім її центрифугували (15 хв., 720×g), сироватку збирали, порціювали і зберігали замороженою при -80 ° С до моменту дослідження. Циркулюючі цитокіни оцінювали у дублікатах у сироватці крові методом проточної цитометрії, використовуючи магнітні мікросфери, кон'юговані з моноклональними антитілами, за допомогою платформи BioPlex 200 з HRF (Bio-Rad, США), використовуючи технологію Luminex xMAP® та відповідні спеціальні набори, що дозволяють одночасне вимірювання IL-1 β , IL-8, IL-10, IL-12 (p70), IL-17, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-33, TNF- α та IFN- γ . Біопроби проводилися згідно інструкцій виробника. Коротко, в одній лунці 96-лункового планшета змішували одночасно різні мікросфери, які є специфічні для певних цитокінів і їх може бути до 100. Мікросфери інкубували із досліджуваним зразком, який містить цитокіни-мішені. Після відмивання видаляли незв'язані протеїни та додавали біотинільовані антитіла для виявлення цитокінів (специфічні для кожного цитокіну). Потім додавали стрептавідин-фікоеритрин (Strep-PE), який зв'язується з біотинільованими антитілами в лунці. Стандартним контролем була відома концентрація цитокінів у додаткових лунках [89]. Стандартні криві були зображені за допомогою логістичної регресії 4- або 5-PL і дані були проаналізовані за допомогою програмного забезпечення BioPlex Manager 6.0 (Bio-Rad, США) [85,89].

2.2.11 Визначення кінцевих продуктів глікації (AGE) в сироватці крові за допомогою методу імуноферментного аналізу (ІФА)

Визначення концентрації AGE проводили згідно інструкції виробника [99,113,152] з використанням мишачого анти-AGE моноклонального антитіла, отриманого в Інституті імунології та експериментальної терапії (Польща, Вроцлав). Для визначення AGE зразки сироватки крові (50 мкл) попередньо обробляли протеїназою К (Sigma) (в якості інгібітора) для

вивільнення AGE. Збільшення концентрації синтетичного стандарту AGE було використано для отримання калібрувальної кривої в діапазоні 0-1,6 мкг. Продукт AGE, відповідний антигену, до якого спрямовано антитіло, отримували високотемпературним мікрохвильовим синтезом та виділяли за допомогою рідкої хроматографії (колонка з гелем HW-55S у 0,01 М буфері ацетату амонію). Моноклональні антитіла проти AGE у супернатантах розбавляли TBS у розведенні 1:100. Після 2,5 годинної інкубації при кімнатній температурі планшет промивали і обробляли розчином вторинних антитіл: анти-мишачий IgG, кон'югований з пероксидазою (Jackson ImmunoResearch Labs Cat # 111-035-045, RRID: AB_2337938) при розведенні 1:10 000. Крім того, було проведено контрольний тест, в якому не було реакції з первинними антитілами. Концентрацію вимірювали, використовуючи StatFax 4300 ChroMate (США). На основі стандартних кривих обчислювали кількість AGE у сироватці крові та потім конвертували на 1 мл сироватки [95,99].

2.3 Статистичні методи дослідження

Отримані первинні дані ми вносили до спеціально розроблених таблиць в програмі Microsoft Excel 2011 (входить до пакету Microsoft Office), що дало змогу згрупувати отримані дані та провести найпростіші розрахунки в цій програмі.

Першим етапом статистичної обробки отриманих даних був розрахунок щодо того, чи отримані вибіркові сукупності є та який вид розподілу даних є для них характерним. Проведені розрахунки засвідчили, що кількість спостережень є достатньою, а відтак отримані результати можна перенести на генеральну сукупність з вірогідністю помилки менше 5% ($p < 0,05$). Розрахунок критерію Шапіро-Франсіа засвідчив нормальний (гаусівський) характер розподілу отриманих варіаційних рядів при порівнянні одних показників, відтак, при виконанні статистичної обробки отриманих даних було використано аналіз варіаційних рядів – розрахунок середнього арифметичного значення та його середньої похибки ($M \pm m$).

Оцінку вірогідності різниці отриманих результатів у порівнюваних групах проводили за допомогою критерію Стюдента (оскільки порівнювали лише дві групи з нормальним розподілом) та методом Манна-Уїтні.

При порівнянні групи показників, у всіх варіаційних рядах яких був встановлений негаусівський розподіл, опис проведено за допомогою медіани та 25-ого і 75-ого перцентилів: Me (25%; 75%). Значущість різниці між значеннями аналізованих показників у двох групах визначалась за допомогою U-критерію Манна-Уїтні. Різниця вважалась достовірною при $p < 0,05$.

Кореляційні залежності вимірювались за допомогою коефіцієнта лінійної кореляції Пірсона.

Для побудови прогностичної моделі ймовірності трансформації реактивного артриту в ревматоїдний артрит нами застосовано метод логістичної регресії. Вказаний метод дозволяє визначати ймовірність даної трансформації одночасно від значень декількох ознак, а також зробити прогноз від різноманітних значень ознак, які включені у регресійну модель.

Ймовірність трансформації реактивного артриту в ревматоїдний артрит (Т) залежно від вибраних нами факторів обчислювалась за формулою 2.1:

$$T = \frac{1}{1 + e^{-R}} * 100\% \quad (2.1)$$

де $e = 2,718...$ – основа натуральних логарифмів,

R – величина, обчислена за формулою 2.2:

$$R = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_n x_n + K, \quad (2.2)$$

де K – константа,

β_i – коефіцієнти при кожному факторі,

x_i – значення факторів.

Теоретично T може приймати значення від 0% (неможлива подія) до 100% (подія відбувається завжди). Межею, яка розділяє ймовірність на високу і низьку прийнято 50%.

Згідно даних літератури та власних спостережень нами було відібрано 15 чинників, які могли би впливати на трансформацію реактивного артриту в

ревматоїдний артрит. Критеріями віднесення ознак до високого ризику були: достовірне ($p < 0,05$) збільшення індикаторних показників більше, ніж у півтори рази з вектором до значень у хворих з ревматоїдним артритом.

Для встановлення чинників, які при поєднаній дії мають достовірний вплив, нами було застосовано покроковий метод логістичної регресії з поступовим виключенням недостовірних ознак за методом Вальда. Отримані коефіцієнти моделі аналізувалися за допомогою критерію ксі-квадрат (Chi-square). Для визначення тої частки дисперсії, яку можна пояснити за допомогою включених у регресійну модель чинників, нами аналізувався R-квадрат Наделькеркеса (R Square Nadelkerkes).

Розрахунки проводились із використанням програмного забезпечення RStudio v. 1.1.442 та R Commander v.2.4-4.

Висновки до розділу 2.

1. Показано протокол дослідження, розподіл за групами пацієнтів та характеристика груп хворих.
2. Показано усі методики для лабораторних методів дослідження, які були використані при виконанні дисертаційної роботи.
3. Побудовано прогностичну модель ймовірності трансформації реактивного артриту в ревматоїдний артрит.

РОЗДІЛ 3

ХАРАКТЕРИСТИКА ЗМІН ПРИ РЕКТИВНОМУ АРТРИТІ, ЯКИЙ СПРИЧИНЕНИЙ CHLAMYDIA TRACHOMATIS ТА ЕПШТЕЙНА-БАРР ВІРУСНОЮ ІНФЕКЦІЄЮ

3.1 Клінічні та загально лабораторні показники у хворих на РеА

Завданням даного розділу було з'ясувати особливості перебігу РеА за клінічною симптоматикою, індексом активності хвороби, змінами гострофазових показників. Під нашим спостереженням знаходилося 119 пацієнтів: 45 хворих з реактивним артритом хламідійного генезу, 43 хворих з реактивним артритом з комбінацією хламідійної та Епштейна-Барр вірусної інфекції.

Демографічні особливості хворих на реактивний артрит та ревматоїдний артрит представлено на рис. 3.1-3.2.

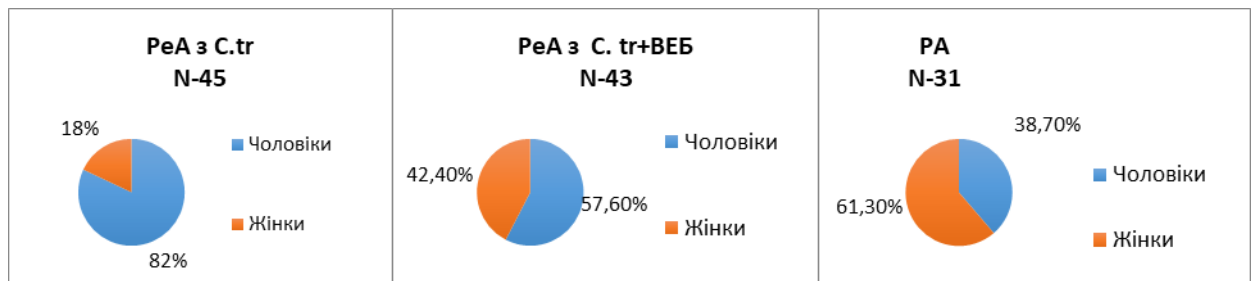


Рис. 3.1 Розподіл хворих за статтю в групах хворих на реактивний та ревматоїдний артрит

Щодо гендерного розподілу в досліджуваних групах ми спостерігали такі закономірності: у контролі – 13 (52%) жінок та 12 (48%) чоловіків, у групі пацієнтів з РеА з *C. trachomatis* – 8 (18%) жінок та 37 (82%) чоловіків, у групі пацієнтів з РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis* + ВЕБ) – 19 (42,4%) жінок та 24 (57,6%) чоловіків, у групі пацієнтів з РА – 19 (61%) жінок та 12 (38,70%) чоловіків. Отже у всіх групах хворих з реактивним

артритом спостерігалось переважання осіб чоловічої статі, а у пацієнтів з ревматоїдним артритом переважали жінки.

Як бачимо на рис. 3.2 у всіх групах хворих на реактивний артрит домінував молодий вік, при цьому не спостерігалось достовірної різниці між групами ($p>0,05$).

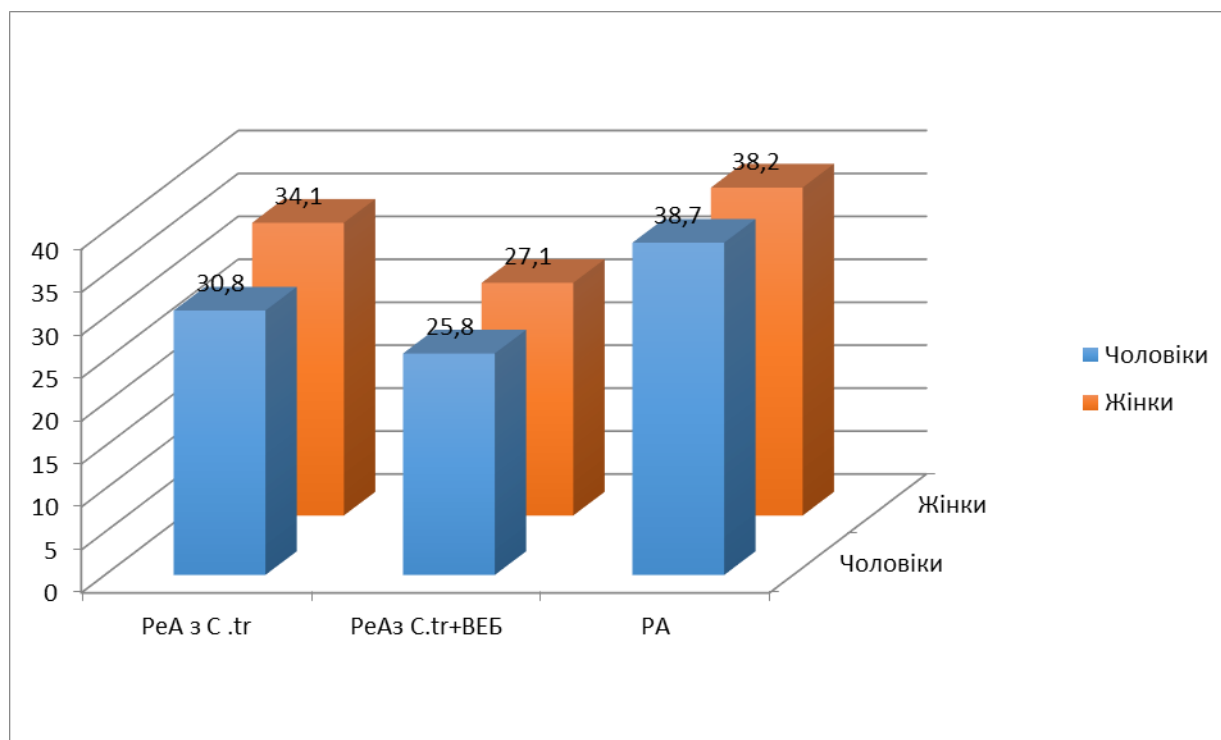


Рис. 3.2 Поділ хворих на реактивний та ревматоїдний артрит за віком

Для оцінки клінічних особливостей перебігу реактивного артриту ми використали індекс активності DAREA, розрахунок якого показано в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1

Індекс активності реактивного артриту DAREA ($M \pm m$)

Показник	Пацієнти РеА з C. trachomatis	Пацієнти РеА з C . trachomatis + БЕБ
	n - 45	n - 43
Кількість набряклих суглобів	2,11±0,91	3,15±0,85
Кількість болючих суглобів	2,37±0,53	3,74±0,61

Продовження таблиці 3.1

Оцінка болю пацієнтом	2,14±0,45	2,47±0,53
Оцінка загального стану пацієнта	1,15±0,32	1,65±0,28
С-реактивний білок mg dl	1,94±0,42	2,59±0,45
Індекс DAREA	9,71±1,23	13,6±1,45*

Примітка: * $p < 0,05$ - достовірність показників між групами хворих

Як видно з таблиці 3.1 індекс DAREA був достовірно вищий в 1,40 рази у групі хворих з РеА комбінованого генезу (С. trachomatis+ВЕБ) - $13,6 \pm 1,45$ порівняно з групою хворих на РеА хламідійного генезу - $9,71 \pm 1,23$ ($p < 0,05$). У групі пацієнтів з РеА з С. trachomatis зафіксовано артрит одного суглоба у 6 людей (13,3%), двох суглобів - у 14 осіб (31,1%), трьох і більше - у 25 пацієнтів (55,5%). У патологічний процес втягувалися в більшості випадків колінні, гомілкові, кульшові та дрібні суглоби стопи. Окрім артритичного синдрому в чотирьох (8,89%) пацієнтів із РеА з С. trachomatis виявлено гарячковий синдром або тривалий субфебрильний стан, у 13 пацієнтів (28,9%) - ураження очей різного характеру, у 15 осіб (33,3%) - патологічні прояви різного характеру з боку нижніх відділів сечостатевої системи.

Серед 43 пацієнтів з РеА з комбінованою інфекцією (С. trachomatis + ВЕБ) зафіксовано артрит одного суглобу в трьох осіб (6,98%), двох суглобів - у 13 (30,2%), трьох і більше - у 27 пацієнтів (62,8%). У патологічний процес втягувалися плечові, колінні, кульшові, гомілкові та дрібні суглоби стопи. Окрім артритичного синдрому у 23 (53,5%) пацієнтів даної групи виявлено гарячковий синдром або тривалий субфебрильний стан, у 36 (83,7%) пацієнтів спостерігався синдром хронічної втоми, у 14 пацієнтів (32,6%) - хронічний тонзиліт, у 15 осіб (34,9%) була лімфаденопатія здебільшого шийних, підщелепних та пахвинних лімфатичних вузлів, у 11 (25,6%)

пацієнтів - ураження очей різного характеру, у 13 (30,3%) осіб - різні прояви з боку сечостатевої системи.

Для оцінки функціонального стану життєво важливих органів пацієнтам були проведені загально-клінічні дослідження крові в (таблиця 3.2).

Таблиця 3.2

Загально-клінічні показники крові у здорових, хворих на РеА та РА
($M \pm m$)

	Здорові	Пацієнти РеА з <i>C. trachomatis</i>	Пацієнти РеА з <i>C. trachomatis</i> + ВЕБ	Пацієнти РА
	n=25	n=45	n=43	n=31
Лейкоцити, $\times 10^9$ Г/л	6,51 $\pm$ 0,70	8,10 $\pm$ 1,31	6,81 $\pm$ 0,92	8,92 $\pm$ 1,19
Нейтрофіли %	61,4 $\pm$ 3,20	60,2 $\pm$ 3,82	42,3 $\pm$ 2,31 ^{**$\circ$}	50,6 $\pm$ 5,91
Моноцити, %	6,10 $\pm$ 1,12	7,01 $\pm$ 3,04	10,1 $\pm$ 1,14 [*]	8,55 $\pm$ 1,14
Лімфоцити, %	30,2 $\pm$ 3,74	28,5 $\pm$ 4,15	44,4 $\pm$ 4,81 ^{*$\circ$}	38,7 $\pm$ 4,81
ШОЕ, %	8,20 $\pm$ 2,40	20,4 $\pm$ 4,91 [*]	23,5 $\pm$ 4,54 ^{**}	29,6 $\pm$ 3,22 ^{**}
СРБ, мг/л	4,12 $\pm$ 1,61	19,4 $\pm$ 4,45 [*]	25,9 $\pm$ 4,14 ^{**}	32,4 $\pm$ 5,23 ^{**}

Примітки: * $p < 0,05$ - порівняно із здоровими особами, ** $p < 0,01$ - порівняно із здоровими особами

[°] $p < 0,05$ - порівняно з хворими на РеА з *C. trachomatis*, ^{°°} $p < 0,01$ - порівняно з хворими на РеА з *C. trachomatis*

Не спостерігалось достовірно значущих змін щодо клінічного аналізу крові у розподілі лейкоцитів в усіх досліджуваних групах пацієнтів. Що стосується відносної кількості нейтрофілів (паличкоядерні та сегментоядерні), то достовірно нижча кількість була в групі пацієнтів з РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis*+ВЕБ) – 42,3 $\pm$ 2,31% порівняно з хворими на РеА з *C. trachomatis* та здоровими відповідно (60,2 $\pm$ 3,82, 61,4 $\pm$ 3,20%; $p < 0,01$) У групі пацієнтів з РеА з комбінованою інфекцією *C.*

trachomatis+ВЕБ ($10,1 \pm 1,14\%$) спостерігалось достовірно зростання відносної кількості моноцитів порівняно з контрольною групою здорових ($6,10 \pm 1,12\%$, $p < 0,05$). Відносна кількість лімфоцитів була достовірно збільшена у групі пацієнтів РеА з комбінованою інфекцією *C. trachomatis*+ВЕБ ($44,4 \pm 4,81\%$) порівняно з хворими на РеА з *C. trachomatis* та здоровими відповідно ($28,5 \pm 4,15$, $30,2 \pm 3,74\%$; $p < 0,05$). ШОЕ була достовірно підвищена в усіх досліджуваних групах пацієнтів: РеА з *C. trachomatis* – $20,4 \pm 4,91$ мм/год, РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ) – $23,5 \pm 4,54$ мм/год та у хворих на ревматоїдний артрит – $29,6 \pm 3,22$ мм/год порівняно з контрольною групою здорових ($8 \pm 2,4$ мм/год, $p < 0,01$). Підвищений рівень гострофазового протеїну СРБ спостерігався в усіх досліджуваних групах пацієнтів: у пацієнтів РеА з *C. trachomatis* – $19,4 \pm 4,45$ мг/л, у пацієнтів групи РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ) – $25,9 \pm 4,14$ мг/л, у пацієнтів з РА – $32,4 \pm 5,23$ мг/л порівняно з контрольною групою ($4,12 \pm 1,61$ мг/л, $p < 0,01$). Антитіла до стрептолізину бета-гемолітичного стрептококу групи А (АСЛО) спостерігалися у 7 (15%) пацієнтів РеА з *C. trachomatis*, у 8 (18,6%), пацієнтів групи РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ) та у 9 (29%) хворих на РА. Ревматоїдний фактор виявлявся у 3 (6,97%) пацієнтів групи РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ) та у 23 (74,19%) хворих на РА.

Таким чином у хворих на реактивний артрит переважав молодий вік ($28,4 \pm 8,39$ роки), що достовірно не відрізнявся в досліджуваних групах ($p < 0,05$). Щодо гендерного розподілу в усіх групах хворих на РеА переважали особи чоловічої статі, а в групі хворих на РА переважали жінки. Активність запального процесу за індексом DAREA була вищою в хворих з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis*+ВЕБ) в 1,40 рази порівняно з хворими на РеА з *C. trachomatis*. Щодо лабораторних ознак запального процесу встановлено зростання ШОЕ та СРП у всіх досліджуваних групах хворих, відносний лімфоцитоз та моноцитоз виявлено у хворих на РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ) [15,17,28,35].

3.2 Зміни молекулярно-генетичних показників у хворих на реактивний артрит

Для верифікації хламідійної інфекції усім пацієнтам з РеА були проведені визначення класів імуноглобулінів (Ig) до *C. trachomatis*. Як зображено на рис. 3.3. серед групи пацієнтів на РеА з *C. trachomatis* було виявлено підвищені IgA до *C. trachomatis* у 38 (84,5%) пацієнтів, у пацієнтів з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ) – у 34 (79,0%) осіб. Рівень IgG до *C. trachomatis* був підвищений у 40 (93,0%) у групі пацієнтів з РеА з *C. trachomatis*, а у пацієнтів РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ) – у 42 (96,7%) осіб. Підвищений рівень IgM до *C. trachomatis* у групі пацієнтів з РеА з *C. trachomatis* був у 16 (35,6%), а у пацієнтів РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ) – у 17 (39,5%) осіб.

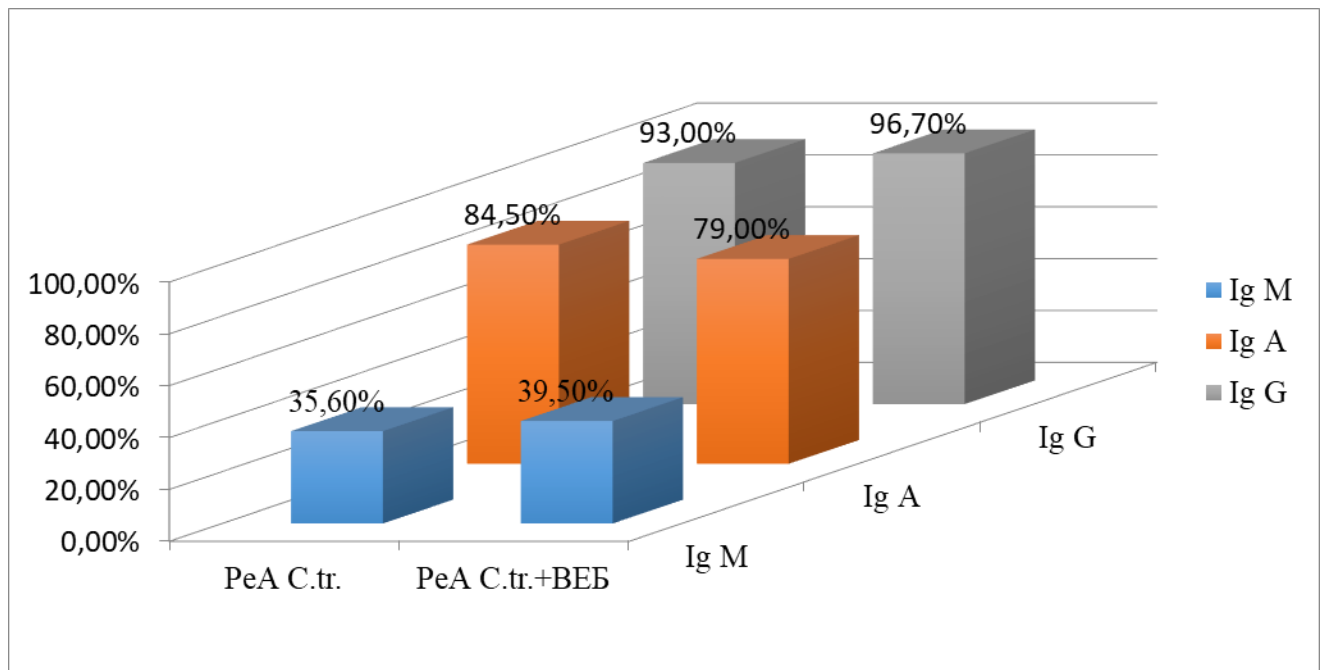


Рис. 3.3 Відсотковий рівень виявлення підвищення специфічних антитіл до *C. trachomatis* у групах хворих на реактивний артрит

Пацієнтам були проведені молекулярно-генетичні дослідження периферійної крові та слизової уrogenітального зішкрябу (рис. 3.4). ПЛР у

крові пацієнтів з РеА з *C. trachomatis* виявила ДНК хламідії у 15 (33,3%) хворих, а з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ) – у 12 (27,9%) осіб. ДНК *C. trachomatis* у групі пацієнтів з РеА з *C. trachomatis* в уrogenітального зішкрябу була виявлена у 22 (48,9%) осіб, а у пацієнтів з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ) – у 20 (46,5%).

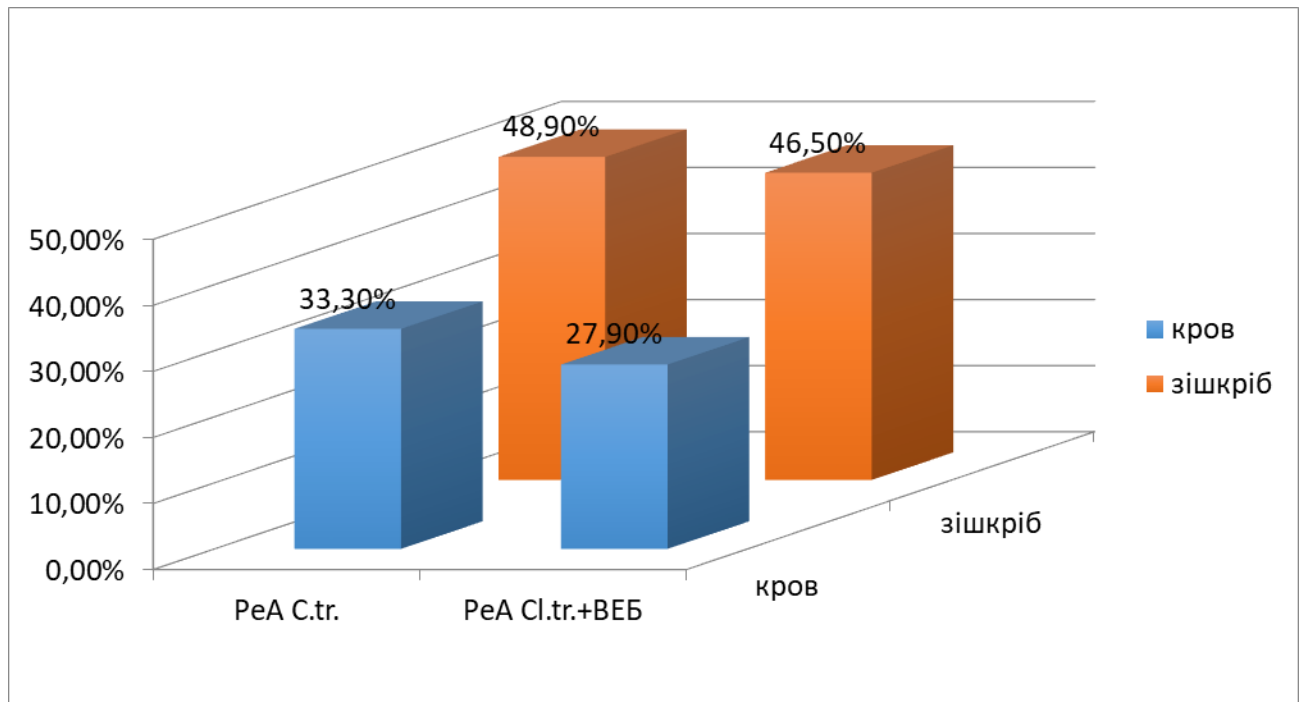


Рис. 3.4 Відсотковий вміст виявлення ДНК *C. trachomatis* в різних біологічних середовищах у групах хворих на реактивний артрит

Таким чином, при проведенні серологічних та молекулярно-генетичних досліджень *C. trachomatis* у групах хворих з хламідійною та комбінованою інфекціями (*C. trachomatis*+ВЕБ) рівень специфічних антитіл IgG було виявлено відповідно у 93,0% та 96,7%, IgM - 35,6% та 39,5%, а IgA - 84,5% та 79,0%, а відсотковий рівень виявлення ДНК становив від 27,9 до 48,9% в різних біологічних середовищах.

У всіх пацієнтів з РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ) були виявлені антитіла до ядерного антигена вірусу Епштейна-Барр (IgG EBNA) та підвищені антитіла класу IgG в 6 разів і більше норми до капсидного антигену (IgG VCA). При цьому підвищений

рівень IgM-VCA ВЕБ був зафіксований у семи хворих (16,3%) в групі хворих РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ).

Ми проаналізували особливості виявлення ДНК Епштейна-Барр вірусу в хворих на РеА. У хворих з РеА з *C. trachomatis* ДНК ВЕБ не виявлено в жодному біологічному середовищі. Як видно на рис 3.5, у пацієнтів з РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis*+ВЕБ) виявлено ДНК ВЕБ одночасно у крові, слині та зішкрябі слизової задньої стінки глотки у 3 (6,98%) осіб, одночасно у слині та зішкрябі слизової задньої стінки глотки - у 24 (55,8%), у зішкрябі слизової задньої стінки глотки - 14 (32,6%) та лише в слині - у двох хворих (4,65%).

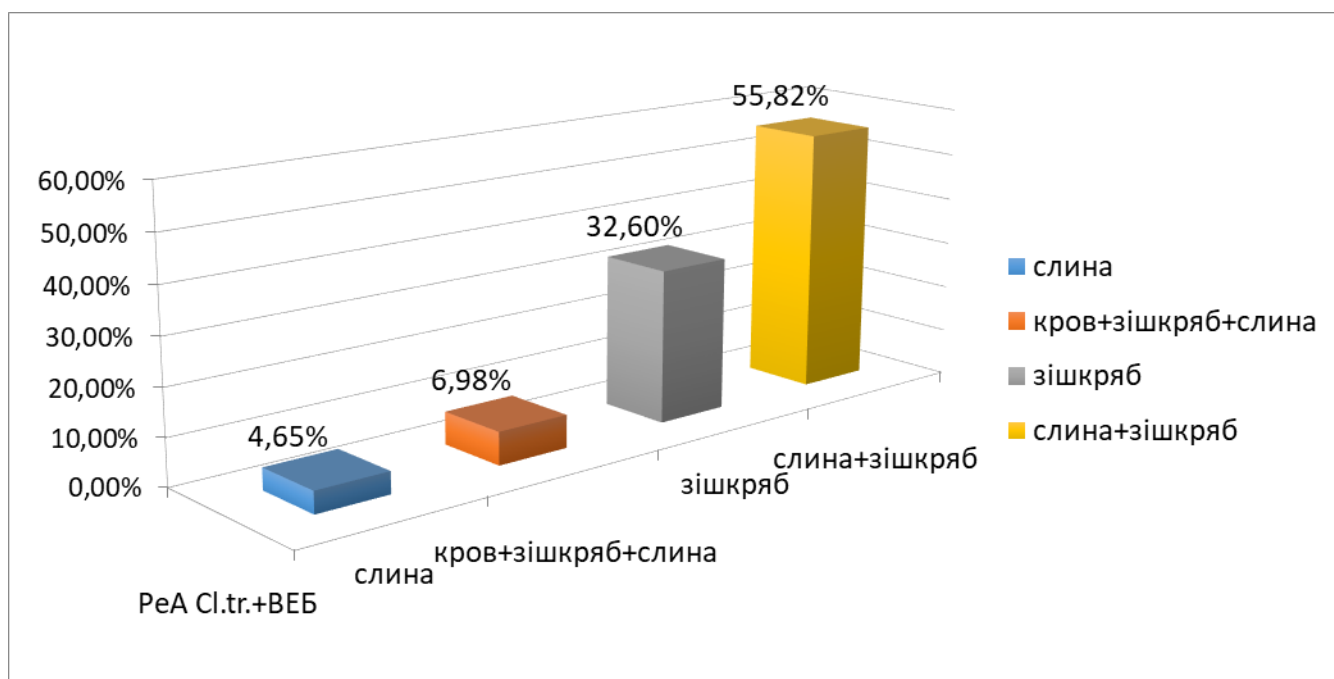


Рис. 3.5 Відсотковий вміст ДНК ВЕБ в різних біологічних середовищах у групах хворих на реактивний артрит з комбінованою (*C. trachomatis*+ВЕБ) інфекцією

Таким чином, при проведенні серологічних та молекулярно-генетичних досліджень Епштейна-Барр вірусної інфекції в хворих на РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ) у всіх пацієнтів виявлено підвищений титр антитіл класу IgG більше ніж в 6 разів до ядерного

антигена вірусу Епштейна-Барр (IgG EBNA) та до капсидного антигену (IgG VCA), а ДНК (*C. trachomatis*+ВЕБ) частіше виявлялася одночасно в декількох біологічних середовищах (кров, слина, слизова), однак найчастіша була комбінація - слина +зішкріб слизової: у 55,8% хворих - при РеА комбінованою інфекцією (*C. trachomatis*+ВЕБ) [10,171].

3.3 Зміна рівня BART-13, BART-15 та miR155, miR146a в при реактивному артриті, який спричинений *Chlamydia trachomatis* та Епштейна-Барр вірусною інфекцією

ВЕБ кодує близько 44 miRNA, які безпосередньо націлені як на власні, так і на клітинні miRNA господаря. BART - це miRNA ВЕБ, які виявляють як у літичній фазі, так і у всіх типах латенції вірусу. На сьогоднішній день встановлено, що BART ВЕБ мають вплив на імунну відповідь, регуляцію клітинного циклу, апоптоз та клітинну проліферацію [63,87].

Тому, нашим завданням було проаналізувати рівень BART-13 і BART-15 у пацієнтів з реактивним артритом, що відображено у таблиці 3.3. Нами було виявлено достовірну ($p<0,01$) зміну рівня BART-13 у групі хворих з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis*+ВЕБ) $Me=7,01$ у.о. ($25\%=0,05$; $75\%=53,5$). В інших досліджуваних групах та в здорових осіб рівень BART-13 не виявлявся.

Таблиця 3.3

Серединні значення BART-13*10⁶ [медіана (25-ий%; 75-ий%)]

Групи	n	Серединні значення BART 13*10 ⁶
Здорові	25	0,00 (0,00; 0,01)
РеА <i>C. trachomatis</i> +ВЕБ	43	7,01 (0,05; 53,5)*
РеА <i>C. trachomatis</i>	45	0,00 (0,00; 0,00) °

Примітка:

* - вірогідна різниця порівняно з здоровими ($p<0,01$)

° - вірогідна різниця порівняно з групою РеА *C. trachomatis*+ВЕБ ($p<0,01$)

Також ми проаналізували рівень BART-15 у досліджуваних групах пацієнтів з реактивним артритом (таблиця 3.4). Нами були виявлено достовірне ($p<0,01$) підвищення експресії BART-15 у групі пацієнтів РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ) $Me=0,56$ у.о. ($25\%=0,01$; $75\%=6,33$). В інших досліджуваних групах та контролі достовірність значень була відсутня.

Таблиця 3.4

Серединні значення BART-15*10⁶ [медіана (25-ий%; 75-ий%)]

Групи	n	Серединні значення BART-15*10 ⁶
Здорові	25	0,00 (0,00; 0,00)
РеА <i>C. trachomatis</i> +ВЕБ	30	0,56 (0,01; 6,33)*
РеА <i>C. trachomatis</i>	45	0,00 (0,00; 0,00) °

Примітка:

* - вірогідна різниця порівняно з здоровими ($p<0,01$)

° - вірогідна різниця порівняно з групою РеА з *C. trachomatis*+ВЕБ ($p<0,01$)

MiRNA людини беруть участь у багатьох життєво важливих процесах (проліферація, диференціювання, апоптоз, регуляція імунної відповіді тощо). Транскрипційні фактори, медіатори запалення, включаючи ядерний фактор каппа-ланцюга-енхансер активованих В-клітин (NF-κB), і мікробні компоненти, можуть активувати експресію miRNA. MiR146a та miR155 є важливим модуляторами вроджених і адаптивних реакцій імунної відповіді, і відіграють критичну роль у розвитку запалення [42,93,98,106]. Тому нашим завданням було вивчити зміни рівня miR155, miR146a, у хворих на РеА, який спричинений *C. trachomatis* та ВЕБ. При проведенні статистичних розрахунків у всіх варіаційних рядах було встановлено негаусівський розподіл, тому аналіз статистичних показників ми проводили за допомогою медіани та 25-ого і 75-ого перцентилів: Me (25%; 75%).

Нами були виявлені значні зміни рівня miR146a у досліджуваних групах пацієнтів порівняно зі здоровими (рисунок 3.6). Так, експресія

miR146a була достовірно підвищена ($p<0,01$) у пацієнтів з РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ) $Me=66,8$ у.о. ($25\%=12,01$, $75\%=82,0$) та у групі пацієнтів з РеА з хламідійною інфекцією $Me=8,67$ у.о. ($25\%=4,39$, $75\%=17,0$), порівняно з здоровими $Me=0,18$ у.о. ($25\%=0,04$, $75\%=0,48$), при цьому miR146a була у 7,71 рази вищою ($p<0,05$) у хворих на РеА з комбінованим інфікуванням в порівнянні з хворими на РеА з *C. trachomatis*. При оцінці рівня miR146a у хворих на РА виявлено достовірне її підвищення ($p<0,01$) у $Me=73,1$ у.о. ($25\%=38,9$, $75\%=96,2$) порівняно з пацієнтами з РеА з хламідійною інфекцією $Me=8,67$ у.о. ($25\%=4,39$, $75\%=17,0$) та зі здоровими $Me=0,18$ у.о. ($25\%=0,04$, $75\%=0,48$). miR146a кодується одиничним геном і відіграє центральну роль в імунних реакціях. Оскільки в літературі описано, що регуляція miR-146a спостерігалася у відповідь на прозапальні цитокіни ($TNF\alpha$, $IL-1\beta$) при стимуляції LPS в клітинах моноцитів людини, ймовірно підвищення рівня спостерігалось у відповідь на виражений запальний процес в організмі. В літературі описана кореляція між рівнями miR146a та активністю захворювання в хворих на РА [99]. Відповідно можливо рівень miR146a можна використовувати як оцінку активності запального процесу і фактор ризику трансформації в РА.

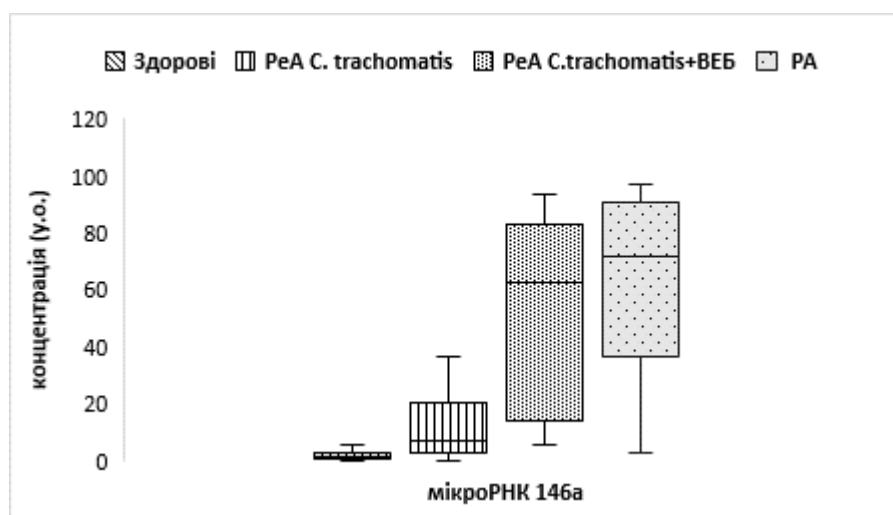


Рисунок 3.6 Медіани розподілу концентрації miR146a у пацієнтів з РеА та РА
(— -медіана, - 25–75 %, ↑ - Min-Max)

Нами були виявлені також значні зміни експресії miR155 у досліджуваних групах пацієнтів порівняно з здоровими (Рисунок 3.7).

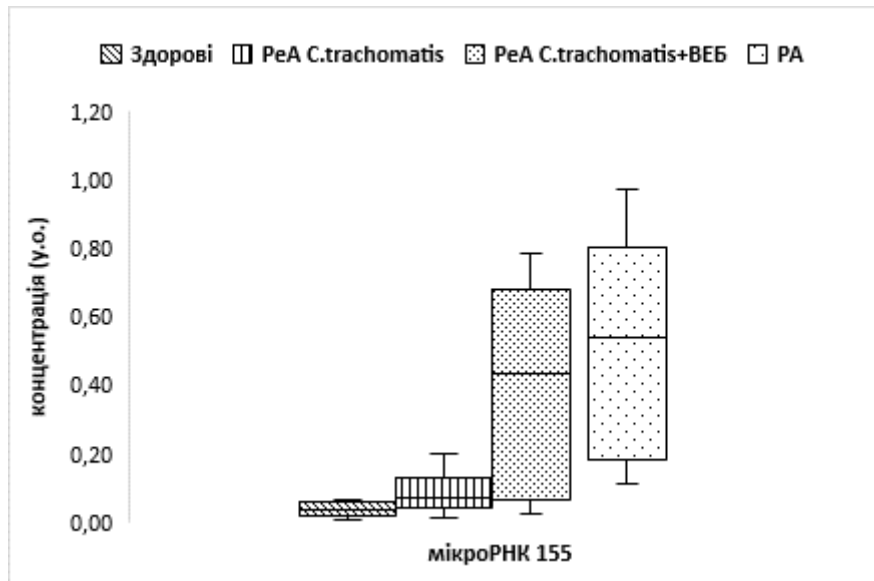


Рисунок 3.7 Медіани розподілу концентрації miR155 у пацієнтів з РеА, спричиненим різними збудниками (— -медіана, - 25–75 %, ↑ - Min-Max)

miR155 була ($p < 0,05$) достовірно збільшена у хворих на РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+BEБ) $Me = 0,44$ у.о. (25%=0,04, 75%=0,66) та у групі пацієнтів з РеА з *C. trachomatis* $Me = 0,07$ у.о. (25%=0,04, 75%=0,13) порівняно з здоровими $Me = 0,04$ у.о. (25%=0,01, 75%=0,25). При цьому рівень miR155 був у 6,29 рази вищим у хворих на РеА з комбінованою інфекцією, порівняно з РеА лише з *C. trachomatis*. У хворих на РА вивлено достовірно вищий рівень miR155 $Me = 0,55$ у.о. (25%=0,21, 75%=0,83) порівняно зі здоровими. Рівень miR155 збільшується після активації вроджених факторів імунної системи на вірусні та бактерійні нуклеотиди. Існують дані, що miR155 позитивно регулює експресію прозапальних цитокінів в процесі вродженої імунної відповіді. Дизрегуляція miR155 сприяє розвитку хронічного запалення, аутоімунітету, раку та фіброзу. У літературі описано докази патогенної ролі miR155 у активізації аберрантної активації імунної системи при ревматоїдному артриті [139,154]. Тому, високі рівні miR155 у

хворих на РеА можуть бути ознакою вираженого запального процесу та дизрегуляції імунної відповіді

Оскільки ми виявили підвищення рівнів BART-13, BART-15 та miR146a, miR155 в досліджуваних групах хворих на РеА, нашим наступним завданням було дослідження можливих кореляційних зв'язків між BART-13, BART-15 та miR146a, miR 155.

У контрольній групі пацієнтів (таблиця 3.5) жодних кореляційних зв'язків між miRNA та BART не було виявлено.

Таблиця 3.5

Кореляційна матриця контрольної групи

	BART-13	BART-15	miR146	miR155
BART-13	1,00	-0,14	-0,12	-0,15
BART-15	-0,14	1,00	0,04	-0,19
miR146	-0,12	0,04	1,00	-0,13
miR155	-0,15	-0,19	-0,13	1,00

У групі пацієнтів з РеА з *C. trachomatis* (таблиця 3.6) не спостерігалось жодних кореляційних зв'язків між miRNA та BART.

Таблиця 3.6

Кореляційна матриця у групі пацієнтів з РеА з *C. trachomatis*

	BART-13	BART-15	miR146	miR155
BART-13	1,00	-0,08	-0,06	-0,03
BART-15	-0,08	1,00	-0,07	-0,07
miR146	-0,06	-0,07	1,00	-0,01
miR155	-0,03	-0,07	-0,01	1,00

У групі пацієнтів РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ) (таблиця 3.7, рисунок 3.8-3.9) був виявлений сильний позитивний зв'язок між BART-15 та miR155 ($r=0,79$, $p<0,05$) і також між BART-13 та miR146 ($r=0,62$, $p<0,05$).

Таблиця 3.7

**Кореляційна матриця у групі пацієнтів РеА з комбінованим
інфікуванням
C. trachomatis+ВЕБ**

	BART-13	BART-15	miR146	miR155
BART-13	1,00	0,20	0,62*	-0,22
BART-15	0,20	1,00	-0,11	0,79*
miR146	0,62*	-0,11	1,00	-0,11
miR155	-0,22	0,79*	-0,11	1,00

Примітка: * - коефіцієнт кореляції достовірний ($p < 0,05$)

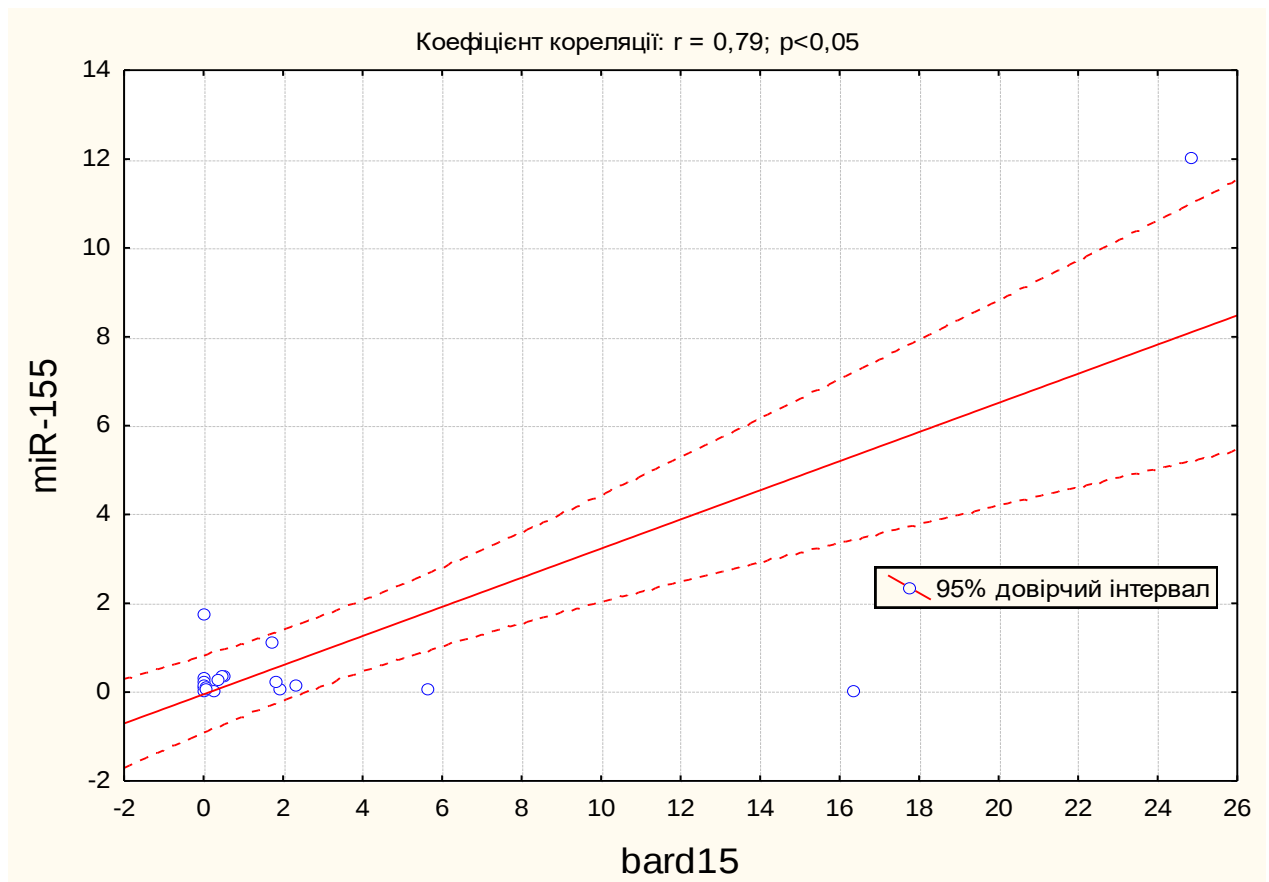


Рисунок 3.8 Взаємозв'язок між miR155 (у.о. $\times 10^3$) та BART-15 (у.о. $\times 10^6$) у групі пацієнтів РеА з комбінованим інфікуванням (C. trachomatis+ВЕБ)

Таким чином, у групі хворих на РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ) виявлено рівень BART-13 (7,01 у.о.) та BART-15 (0,56 у.о) порівняно з відсутнім рівнем цих міР ВЕБ в інших групах, що є ознакою посиленої вірусної реплікації.

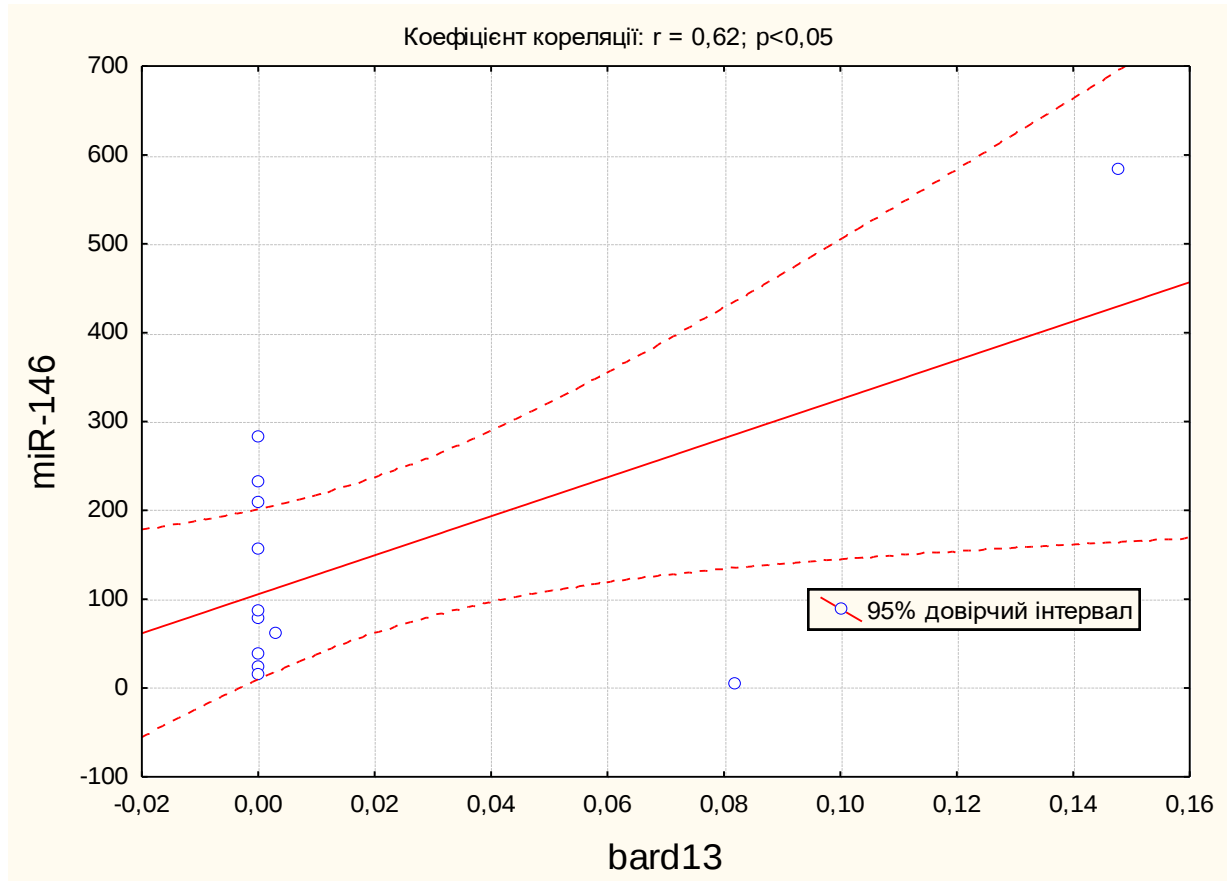


Рисунок 3.9 Взаємозв'язок між miR146a (у.о $\times 10^3$) та BART-13 (у.о $\times 10^6$) у групі РеА з комбінованим інфікуванням *C. trachomatis*+ВЕБ.

Рівень регуляторних молекул системи міР був вищим, зокрема, miR146 – у 7,71 рази ($p < 0,05$), а miR155 – в 6,29 рази у хворих на РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ) порівняно з групою пацієнтів з РеА лише з *C. trachomatis*, що може вказувати на зниження протівірусної активності Т-цитотоксичних лімфоцитів, негативну регуляцію прозапальних цитокінів, збільшення кількості Т-хелперів з розвитком аутоімунних реакцій за гуморальним типом на тлі посиленого апоптозу Т-лімфоцитів. У пацієнтів з РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ) виявлено сильний позитивний зв'язок між BART-15 та miR155 ($r=0,79$; $p < 0,05$) і між BART-13 та miR146 ($r=0,62$; $p < 0,05$), що може

вказувати на вплив BART на miR146, miR155 і сприяти дизрегуляції імунної відповіді [9,173].

3.4 Функціональний стан нейтрофілів та моноцитів та особливості еспресії TLR9 на імунокомпетентних клітинах при реактивному артриті, який спричинений *Chlamydia trachomatis* та Епштейна-Барр вірусною інфекцією

Наступним етапом даної роботи було вивчення активності імунокомпетентних клітин при різних стадіях запального процесу, спричиненого *Chlamydia trachomatis* та Епштейна-Барр вірусною інфекцією. Нейтрофіли належать до імунокомпетентних клітин і є першою лінією захисту імунної системи. Нейтрофіли периферійної крові відносяться до короткоживучих клітин, що швидко підлягають апоптозу. Активовані нейтрофіли у тканинах зазнають молекулярних змін, що збільшують тривалість їхнього життя, змінюючи їх властивості, що дозволяє їм здійснювати різні захисні функції.

Тому, метою даного розділу була оцінка стану фагоцитарної ланки нейтрофілів та моноцитів у пацієнтів з РеА, спричиненим різними інфекційними агентами. Нами проведено дослідження фагоцитарної активності пацієнтів РеА з хламідійною, комбінованою (*C. trachomatis* +ВЕБ) інфекціями (таблиця 3.8, рисунки 3.10-3.13). Отримані нами результати свідчать про зміни функціональних характеристик нейтрофілів та моноцитів периферійної крові у хворих на реактивний артрит.

Встановлено достовірне ($p<0,05$) зростання відносної та абсолютної фагоцитарної активності нейтрофілів без стимуляції у пацієнтів з РеА з *C. trachomatis* ($7,41\pm0,46\%$, $0,36\pm0,05$ Г/л), у пацієнтів з РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis* +ВЕБ) – $8,28\pm1,18\%$, $0,35\pm0,04$ Г/л порівняно з групою здорових осіб ($5,19\pm0,84\%$, $0,21\pm0,05$; $p<0,05$).

Після стимуляції *E.coli* фагоцитарна відносна активність нейтрофілів була достовірно знижена у 1,3 рази лише у пацієнтів з РеА з комбінованим

інфікуванням (*C. trachomatis* +ВЕБ) – $74,5 \pm 8,02\%$, порівняно з групою здорових осіб ($96,5 \pm 6,14\%$; $p < 0,05$).

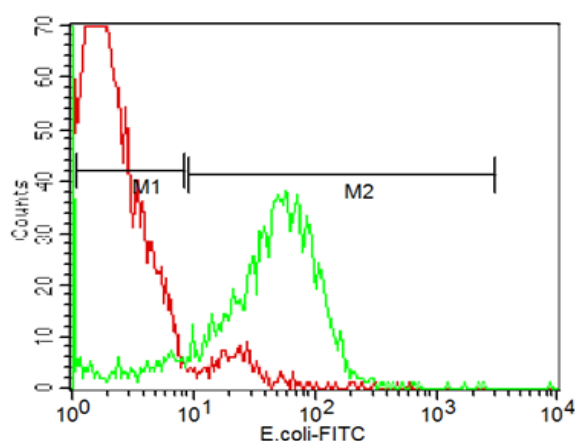


Рис. 3.10 Результати проточної цитофлуориметрії нейтрофілів при спонтанній (M1-червона лінія) та стимульованій *E.coli* (M2-зелена лінія) за інтенсивністю флуоресценції на каналі FL1 (вісь ординат – число клітин, вісь абсцис – інтенсивність, відн.од) у пацієнтів з РеА з комбінованою інфекцією

Фагоцитарна відносна та абсолютна активність моноцитів без стимуляції достовірно зростала ($p < 0,05$) у групі пацієнтів з РеА з *C. trachomatis* – $17,6 \pm 2,58\%$, $0,10 \pm 0,02$ Г/л та у групі пацієнтів з РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis* +ВЕБ) – $21,7 \pm 4,34\%$, $0,16 \pm 0,06$ Г/л порівняно з зі здоровими ($10,2 \pm 1,23\%$, $0,04 \pm 0,01$ Г/л; $p < 0,05$). Відносна фагоцитарна активність моноцитів після стимуляції *E.coli* була достовірно знижена у 1,3 рази у групі пацієнтів з РеА з *C. trachomatis* ($59,7 \pm 6,73\%$) та у 1,4 рази у пацієнтів з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis* +ВЕБ) – $55,6 \pm 8,49\%$ порівняно з групою здорових осіб ($80,3 \pm 5,68\%$; $p < 0,05$).

При оцінці фагоцитарної активності нейтрофілів і моноцитів периферійної крові пацієнтів з РА спостерігалися зміни, які відображені у таблиці 3.8 та на рисунку 3.14.

Таблиця 3.8

Фагоцитарна активність нейтрофілів і моноцитів у хворих на РеА з хламідійною, комбінованою (*C. trachomatis* +ВЕБ) інфекціями, РА та практично здорових осіб ($M \pm m$)

Показники		Здорові	Пацієнти РеА з <i>C. trachomatis</i>	Пацієнти РеА з (<i>C. trachomatis</i> +ВЕБ)	Пацієнти з РА
		n=25	n=45	n=43	n=31
Нейтрофіли, фагоц. акт. без стимуляції, %	%	5,19±0,84	7,41±0,46*	8,28±1,18*	10,4±1,56**
	Г/л	0,21±0,05	0,36±0,05*	0,35±0,04*	0,51±0,06**
Нейтрофіли, фагоц. акт, стимуляція <i>E.coli</i>	%	96,5±6,14	76,7±8,92	74,5±8,02*	91,2±3,74
	Г/л	3,83±0,27	3,70±0,61	3,13±0,81	4,51±1,11
Моноцити, фагоцитарна активність без стимуляції	%	10,2±1,23	17,6±2,58*	21,7±4,34*	16,7±1,48*
	Г/л	0,04±0,01	0,10±0,02*	0,16±0,05*	0,08±0,03
Моноцити, фагоцитарна активність, стимуляція <i>E.coli</i>	%	80,3±5,68	59,7±6,73*	55,6±8,49*	71,5±4,38
	Г/л	0,31±0,04	0,34±0,05	0,42±0,06	0,33±0,06

Примітка: * - $p < 0,05$ порівняно з здоровими особами,

** - $p < 0,01$ порівняно з здоровими особами

У пацієнтів з РА спонтанна фагоцитарна активність нейтрофілів була вищою у 2 рази ($10,4 \pm 1,56\%$, $0,51 \pm 0,06$ Г/л) порівняно зі здоровими ($5,19 \pm 0,84\%$, $0,21 \pm 0,05$ Г/л; $p < 0,05$), а моноцитів – у 1,63 рази ($16,7 \pm 1,48\%$, $0,08 \pm 0,03$ Г/л) порівняно зі здоровими ($10,2 \pm 1,23\%$, $0,04 \pm 0,01$ Г/л; $p < 0,05$). Використовуючи критерій узгодженості Колмогорова-Смирнова (рисунок 3.14) виявлена статистично достовірна різниця між спонтанною та стимульованою фагоцитарною активністю нейтрофілів у хворих на РА ($D=0,81$; $p < 0,001$). Після стимуляції *E.coli* фагоцитарна активність нейтрофілів та моноцитів у пацієнтів з РА незначно знижувалась, проте без достовірно різниці ($p > 0,05$).

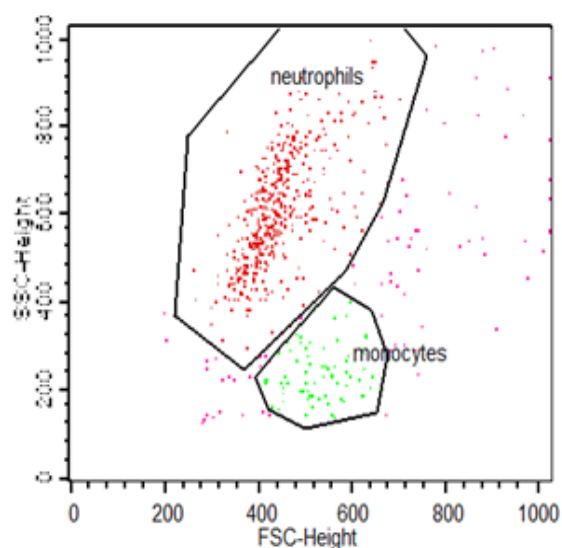


Рис. 3.11 Результати проточної цитофлуориметрії. Dot plot – ідентифікація популяції нейтрофілів та моноцитів у пацієнтів РеА з *S. trachomatis* на двох каналах світлорозсіювання: FSC (Forward Scatter Channel – вісь абсцис, відн. од.) та SSC (Side Scatter Channel – вісь ординат, відн. од.) (розмір та гранулярність клітин)

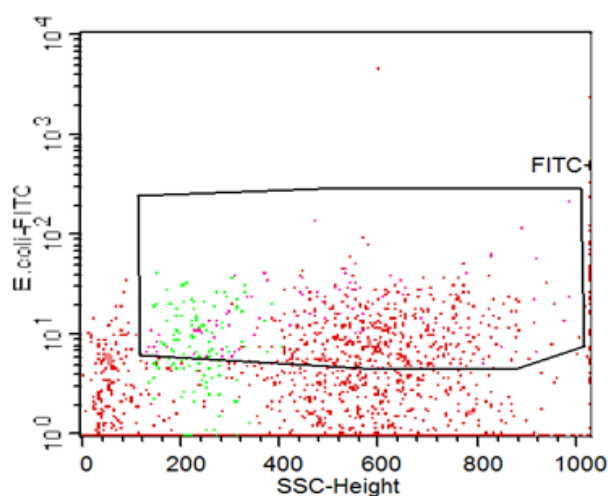


Рис. 3.12 Результати проточної цитофлуориметрії. Dot plot – ідентифікація популяції нейтрофілів та моноцитів без стимуляції в пацієнтів з РеА з комбінованою інфекцією на двох каналах світлорозсіювання – *E.coli* – (вісь ординат, інтенсивність, відн.од) та SSC – (вісь абсцис, відн.од, гранулярність клітин)

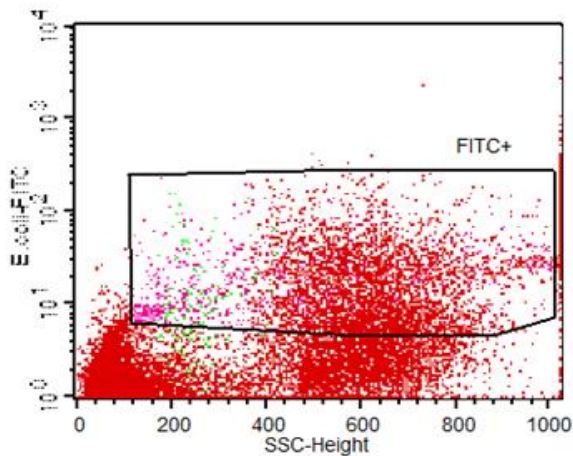


Рис. 3.13 Результати проточної цитофлуориметрії. Dot plot – ідентифікація популяції нейтрофілів та моноцитів після стимуляції *E.coli* пацієнтів з РеА з комбінованою інфекцією на двох каналах світлорозсіювання – (вісь ординат, інтенсивність, відн.од) та SSC – (вісь абсцис, відн.од, гранулярність клітин)

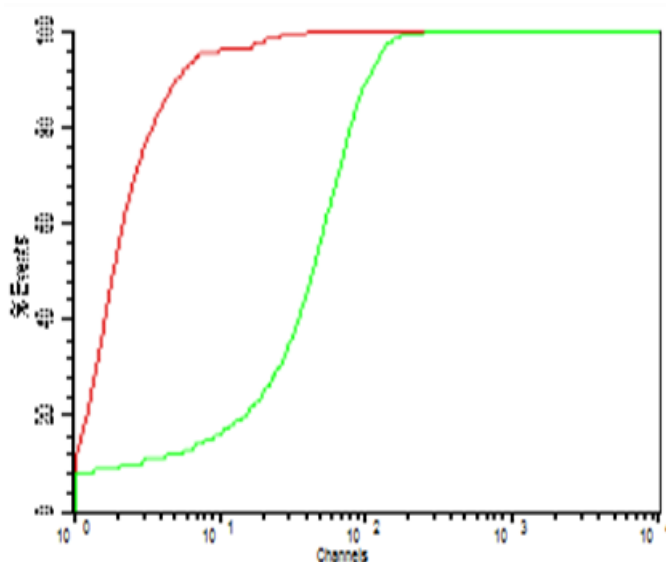


Рис. 3.14 Статистичний критерій узгодженості Колмогорова-Смирнова фагоцитарної активності нейтрофілів при спонтанній (червона лінія) та стимульованій *E.coli* (зелена лінія) у пацієнтів з РА (вісь ординат – відсоток подій, вісь абсцис – канали флюоресценції)

Наступним завданням було визначити рівень окисдаивних процесів фагоцитуючих клітин у пацієнтів з РеА, спричиненим різними інфекційними агентами. Взаємодія патогену з поверхнею фагоцита спричиняє його активацію, і проявляється перебудовою метаболізму клітини, в тому числі ознаками зростання споживання кисню. Це явище називають «оксидативний вибух».

Проведені нами дослідження відображають зміни інтенсивності оксидативних процесів у нейтрофілах та моноцитах периферійної крові в досліджуваних групах пацієнтів з РеА, які відображені в таблиці 3.9 та на рисунках 3.15 та 3.16 .

Таблиця 3.9

Активність «оксидативного вибуху» нейтрофілів і моноцитів у периферичній крові у хворих на РеА з хламідійною та комбінованою (*C. trachomatis* +ВЕБ) інфекціями, РА та практично здорових осіб, (M±m)

Показники		Здорові	Пацієнти РеА з <i>C. trachomatis</i>	Пацієнти РеА з <i>C. trachomatis</i> +ВЕБ	Пацієнти з РА
		n=25	n=45	n=43	n=31
Нейтрофіли, оксидативна акт. без стимуляції	%	3,33±0,45	8,13±2,03*	10,2±2,64*	6,77±0,39*
	Г/л	0,13±0,04	0,40±0,12*	0,43±0,14*	0,33±0,05*
Нейтрофіли, оксидативна акт., стимуляція <i>E.coli</i>	%	97,4±5,83	79,5±9,12	74,8±8,41*	75,6±4,64**
	Г/л	3,87±0,42	3,72±1,19	3,14±1,02	3,73±0,83
Нейтрофіли, оксидативна акт, стимуляція fMLP	%	6,32±0,51	8,57±1,53	9,74±2,21	13,3±2,29**
	Г/л	0,25±0,04	0,42±0,09	0,41±0,12	0,66±0,11**
Нейтрофіли, оксидативна акт., стимуляція РМА	%	98,2±4,50	86,5±7,86	89,7±6,53	92,7±3,89
	Г/л	3,89±0,62	4,20±1,03	3,77±0,91	4,58±0,98

Продовження таблиці 3.9

Моноцити, оксидативна акт. без стимуляції	%	5,55±0,24	10,5±2,33*	14,4±2,66**	9,12±1,39*
	Г/л	0,02±0,01	0,06±0,01*	0,11±0,04*	0,04±0,01
Моноцити, оксидативна акт., стимуляція E.coli	%	83,5±5,65	68,4±4,65*	64,1±4,47**	61,2±3,57**
	Г/л	0,33±0,05	0,39±0,06	0,49±0,10	0,28±0,04
Моноцити, оксидативна акт, стимуляція fMLP	%	6,04±0,53	4,45±0,60	7,38±1,29°	10,1±1,15**°°
	Г/л	0,03±0,01	0,03±0,01	0,06±0,01*°	0,05±0,02
Моноцити, оксидативна акт, стимуляція РМА	%	91,3±6,97	80,7±8,69	72,5±5,8*	77,5±5,76
	Г/л	0,36±0,06	0,46±0,07	0,55±0,08	0,35±0,09

Примітка: * – $p < 0,05$ достовірність показників між дослідними групами та здоровими особами;

:** – $p < 0,01$ достовірність показників між дослідними групами та здоровими особами;

° – $p < 0,05$ достовірність показників порівняно з групою РеА з *C. trachomatis*;

°° – $p < 0,05$ достовірність показників порівняно з групою РеА з *C. trachomatis*

Оксидативна активність нейтрофілів (відносна та абсолютна) без стимуляції достовірно зростала ($p < 0,05$) в усіх групах хворих на РеА: у пацієнтів з хламідійною інфекцією – $8,13 \pm 2,03\%$, $0,40 \pm 0,12$ Г/л, з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ) – $10,2 \pm 2,64\%$, $0,43 \pm 0,14$ Г/л порівняно зі здоровими особами ($3,33 \pm 0,45\%$, $0,13 \pm 0,04$ Г/л; $p < 0,05$). Проте, відносна оксидативна активність нейтрофілів після стимуляції *E.coli* була достовірно знижена у групі пацієнтів з РеА та комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) – $74,8 \pm 8,41\%$, ($p < 0,05$) та без достовірної різниці у пацієнтів з РеА та *C. trachomatis* ($79,5 \pm 9,12\%$; $p \geq 0,05$) порівняно зі здоровими ($97,4 \pm 5,83\%$). При використанні слабкого фізіологічного стимулятора – N-формілметіоніл-лейцил-фенілаланіну (fMLP) спостерігалася тенденція до зростання відносної та абсолютної активності нейтрофілів у пацієнтів з РеА з хламідійною інфекцією ($8,57 \pm 1,53\%$, $0,42 \pm 0,09$ Г/л) та з РеА з комбінованою інфекцією *C. trachomatis*+ВЕБ ($9,74 \pm 2,21\%$, $0,41 \pm 0,12$ Г/л) порівняно з практично здоровими особами ($6,32 \pm 0,51\%$, $0,25 \pm 0,04$ Г/л; $p > 0,05$). При використанні сильного стимулятора – форбол-12-міристан-13-ацетату (РМА) не спостерігалось достовірних змін відносної та абсолютної активності оксидативного вибуху нейтрофілів у всіх досліджуваних групах хворих на РеА порівняно зі здоровими ($p > 0,05$).

При дослідженні **моноцитарної** ланки імунного захисту хворих на РеА (рисунок 3.16) відносна та абсолютна оксидативна активність без стимуляції достовірно зростала як у пацієнтів з хламідійною інфекцією – $10,5 \pm 2,33\%$, $0,06 \pm 0,01$ Г/л ($p < 0,05$), так і з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ) – $14,4 \pm 2,66\%$, $0,11 \pm 0,04$ Г/л; $p < 0,01$) порівняно зі здоровими особами ($5,55 \pm 0,24\%$, $0,02 \pm 0,01$ Г/л; $p < 0,05$). Оксидативна активність моноцитів після стимуляції *E.coli* була достовірно знижена у групі пацієнтів РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) – $64,1 \pm 4,47\%$ ($p < 0,01$) та у пацієнтів з РеА та *C. trachomatis* – $68,4 \pm 4,65\%$ ($p < 0,05$) порівняно з групою здорових осіб ($83,5 \pm 5,65\%$).

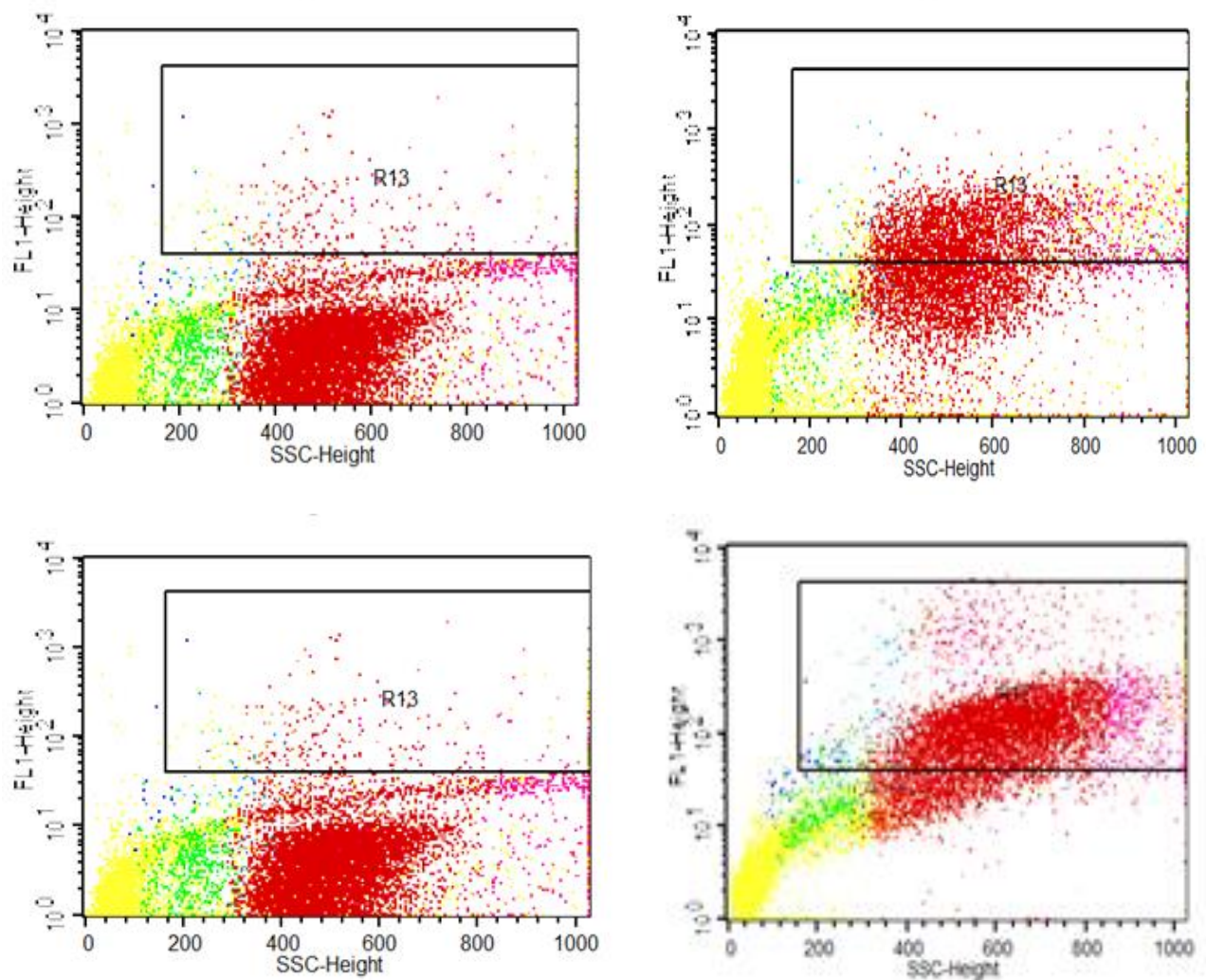


Рис. 3.15 Результати проточної цитофлюориметрії інтенсивності оксидативних процесів у нейтрофілах пацієнтів з РеА з комбінованою інфекцією - *S. trachomatis*+ВЕБ: 1 – без стимуляції, 2 – стимуляція *E.coli*, 3 – стимуляція хемотаксичним пептидом fMLP, 4- активатор протеїнкінази С (РМА) на двох каналах світлорозсіювання - FL1 (вісь ординат, інтенсивність, відн.од) та SSC – (вісь абсцис, відн.од, гранулярність клітин)

При використанні слабого фізіологічного стимулятора fMLP спостерігалась тенденція до зниження оксидативної активності у групі пацієнтів з РеА з *S. trachomatis* ($4,45 \pm 0,60\%$) порівняно зі здоровими ($6,04 \pm 0,53\%$; $p > 0,05$). У групі хворих РеА з комбінованою інфекцією (*S. trachomatis* + ВЕБ) спостерігалось достовірне зростання оксидативної здатності моноцитів при використанні fMLP в 1,66 рази ($7,38 \pm 1,29\%$; $p < 0,05$) порівняно

з хворими на РеА з *C. trachomatis* ($4,45 \pm 0,60\%$). При використанні сильного стимулятора РМА спостерігалось достовірне зниження відносної активності оксидативного вибуху моноцитів у групі пацієнтів РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) – $72,5 \pm 5,8\%$ порівняно з групою здорових осіб ($91,3 \pm 6,97\%$; $p < 0,05$). Абсолютна оксидативна активність моноцитів зростала при використанні сильного стимулятора РМА у пацієнтів з РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) у 1,53 рази ($0,55 \pm 0,08$ Г/л) порівняно з групою здорових осіб ($0,36 \pm 0,06$ Г/л), проте без достовірної різниці ($p > 0,05$).

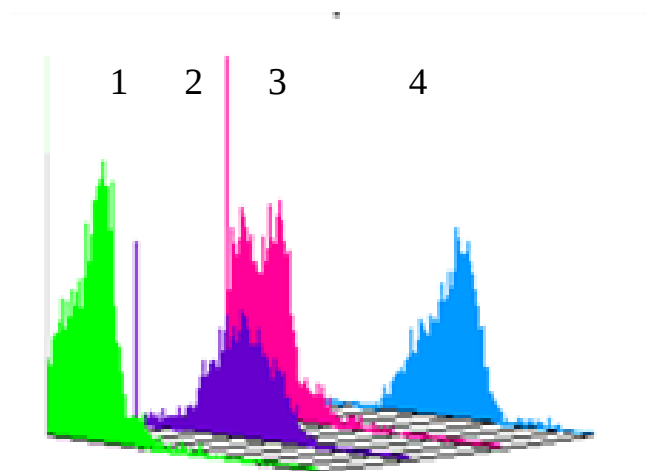


Рис.3.16 3D-график оксидативних процесів моноцитів. 1 - без стимуляції, 2 – стимуляція *E.coli*, 3 – слабка стимуляція fMLP, 4 – сильна стимуляція РМА за інтенсивністю флюоресценції (вісь ординат – число клітин, вісь абсцис – інтенсивність, відн.од) у пацієнтів з РеА з комбінованою інфекцією

При дослідженні «оксидативного вибуху» без стимуляції у нейтрофілах та моноцитах пацієнтів з РА спостерігалися достовірні зміни активності, які відображені у таблиці 3.9 та рисунках 3.17.

Спонтанна відносна та абсолютна оксидативна активність нейтрофілів у пацієнтів з РА була достовірно підвищена практично в 2 рази ($6,77 \pm 0,39\%$, $0,33 \pm 0,05$ Г/л) порівняно зі здоровими пацієнтами ($3,33 \pm 0,45\%$, $0,13 \pm 0,04$ Г/л; $p < 0,05$). Після стимуляції *E.coli* оксидативна активність нейтрофілів була достовірно меншою ($75,6 \pm 4,64\%$) порівняно зі здоровими особами ($97,4 \pm 5,63\%$ $p < 0,01$). При стимуляції хемотаксичним пептидом fMLP, спостерігалось

достовірно зростання рівня активності нейтрофілів як у відносних ($13,3 \pm 2,29\%$), так і абсолютних показниках ($0,66 \pm 0,11$ Г/л), порівняно зі здоровими особами ($6,32 \pm 0,51\%$, $0,25 \pm 0,04$ Г/л; $p < 0,01$). Використання сильного стимулятора РМА достовірно не відрізнялося в досліджуваній групі і в контролі.

Рівень оксидативних процесів моноцитів без стимуляції був достовірно підвищений у 1,6 рази у пацієнтів з РА ($9,12 \pm 1,39\%$) порівняно зі здоровими ($5,55 \pm 0,24\%$; $p < 0,05$). Після стимуляції *E.coli* оксидативні процеси у моноцитах периферійної крові пацієнтів з РА достовірно знизилися у 1,34 рази ($61,2 \pm 3,57\%$) порівняно зі здоровими ($83,5 \pm 5,65\%$; $p < 0,01$). Використовуючи критерій узгодженості Колмогорова-Смирнова (рисунок 3.17) встановлена статистично достовірна різниця між спонтанною та стимульованою оксидативною активністю моноцитів ($D=0,80$, $P < 0,001$). Стимуляція fMLP призвела до достовірного зростання активності моноцитів у 1,67 рази у крові пацієнтів з РА ($10,1 \pm 1,15\%$) порівняно зі здоровими ($6,04 \pm 0,23\%$; $p < 0,01$). Моноцитарна оксидативна активність, стимульована РМА підвищувалась, проте не досягла контрольних значень здорових осіб.

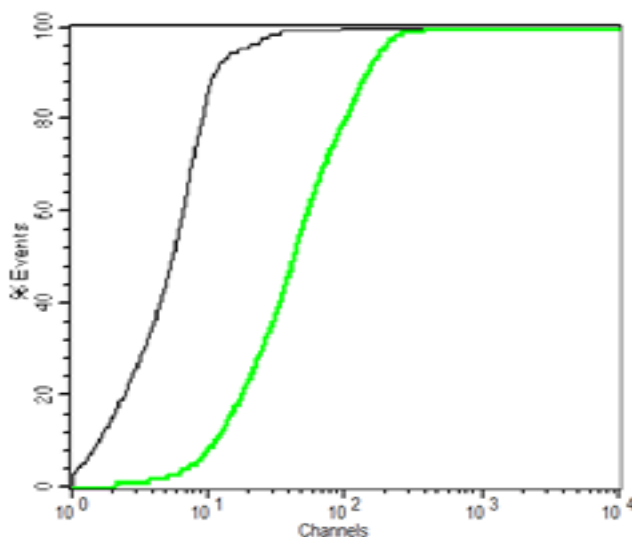


Рис. 3.17 Статистичний критерій узгодженості Колмогорова-Смирнова «оксидативного вибуху» моноцитів при спонтанній (чорна лінія) та стимульованій *E.coli* (зелена лінія) у пацієнтів з РА (вісь ординат – відсоток подій, вісь абсцис – канали флюоресценції)

Таким чином, поглинальна здатність як нейтрофілів, так і моноцитів у всіх групах хворих на РеА була підвищеною на тлі зниженої резервної

здатності після природньої стимуляції. Спонтанна оксидативна здатність моноцитів та нейтрофілів була достовірно підвищеною, а стимульована мала тенденцію до зниження у всіх групах хворих. При цьому оксидативна здатність моноцитів при використанні слабкого фізіологічного стимулятора fMLP була достовірно підвищена в 1,66 рази ($p < 0,05$) у хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) порівняно з хворими на РеА з *C. trachomatis*, що свідчить про порушення функції фагоцитарних лейкоцитів цими інфекційними агентами і може призвести до негативного розвитку захворювання та подальшого погіршення стану пацієнта [21].

Провідною системою яка забезпечує розпізнавання інфекцій, зокрема вірусів, є система Toll-подібні рецептори (TLRs), а саме TLR9. Власне TLR9 є важливим внутрішньоклітинним рецептором, який експресується на імунокомпетентних клітинах, переважно зв'язує ДНК, яка присутня в бактеріях та вірусах та запускає сигнальні каскади, що приводить до прозапальної відповіді цитокінів. Виявлено різну взаємодію ВЕБ з TLRs, які експресовані на різних клітинах. Дослідженнями доведено, що TLRs активно беруть участь у формуванні аутоімунних захворювань шляхом прямої та непрямой активації Т-клітин, активації аутореактивних В-клітин. Активація TLRs виконує декілька ролей при загостренні та прогресуванні пошкодження суглобів, що пов'язано із зростанням числа поліморфізму в TLRs. Дослідженнями доведено також, що відсутність експресії TLR9 сприяє загостренню й прогресуванню аутоімунних захворювань. Тому, нами було поставлено завдання більш досконало вивчити імунопатогенетичні механізми розвитку РеА за участю TLR9 та ризик його трансформації в РА.

У таблиці 3.10 та рисунках 3.18 та 3.19 подані дані щодо експресії TLR9 на лімфоцитах та моноцитах периферійної крові в хворих на реактивний артрит на тлі *C. trachomatis* та Епштейна-Барр вірусу та в хворих на ревматоїдний артрит на тлі активної та латентної фази ВЕБ-інфекції. Для визначення наявності активної чи латентної фази ВЕБ-інфекції проводили ідентифікацію

ДНК ВЕБ методом ПЛР в трьох біологічних середовищах (кров, слина, ротоглотковий зішкріб).

Таблиця 3.10

Активність експресії TLR9⁺ CD123⁺ на моноцитах і лімфоцитах у хворих на РеА на тлі *C. trachomatis* та Епштейна-Барр вірусу та РА залежно від реактивованої та латентної фази хронічної ВЕБ -інфекції (M±m)

	Здорові	Пацієнти РеА з <i>C. trachomatis</i>	Пацієнти РеА з <i>C. trachomatis</i> + ВЕБ	Пацієнти РА ВЕБ -	Пацієнти РА ВЕБ +
	n=25	n=45	n=43	n=19	n=14
Моноцити, TLR 9 ⁺ CD 123 ⁺ , %	0,03±0,01	0,06±0,01*	0,09±0,01* ^o	0,09±0,02*	0,12±0,03*
Лімфоцити, TLR 9 ⁺ CD123 ⁺ , %	0,80±0,12	1,22±0,34	1,62±0,15 *	1,50±0,12*	2,11±0,11* ^{o^}

Примітки: *p < 0,05 – достовірність різниці між показниками здорових осіб та хворих на РеА та РА

^op < 0,05 – достовірність різниці показників між хворими на РеА *C. trachomatis* та РеА *C. trachomatis* + ВЕБ та РА ВЕБ (+) та ВЕБ (-)

[^]p < 0,05 – достовірність різниці показників між хворими на РеА *C. trachomatis* та РА ВЕБ (-) і хворих на РеА *C. trachomatis* + ВЕБ та РА ВЕБ (+)

Як видно з поданих даних таблиці 3.10, експресія TLR 9⁺CD123⁺ на моноцитах у хворих на РеА й РА була достовірно вищою порівняно з показниками здорових осіб (p < 0,05). Порівняно із показниками здорових осіб експресія TLR 9⁺CD123⁺ на лімфоцитах була також достовірно вищою (p < 0,05) у хворих на РА в латентній та реактивованій фазах хронічної ВЕБ-

інфекції, а в пацієнтів з ReA -тільки при комбінованій інфекції (*C. trachomatis*+ВЕБ).

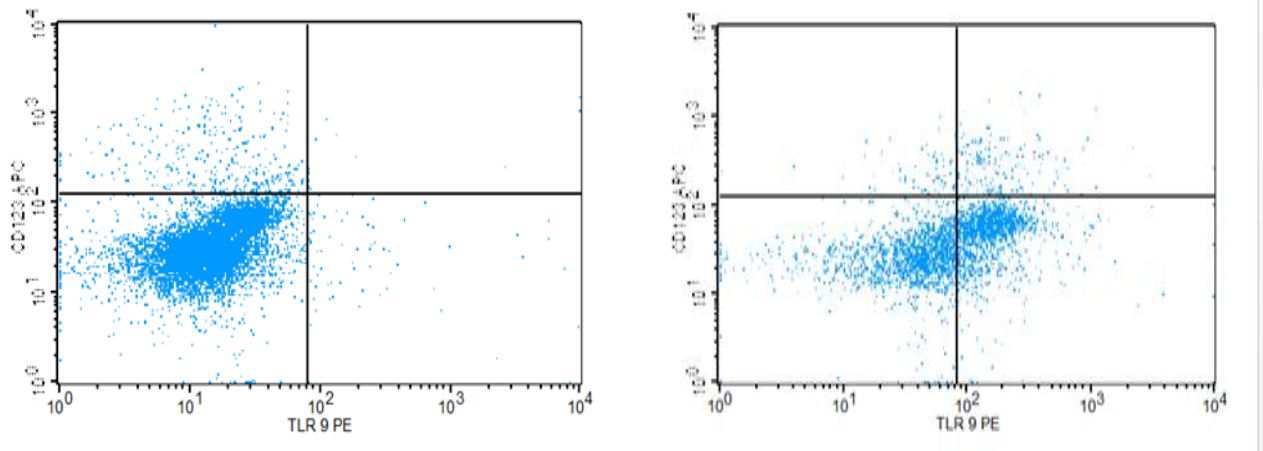


Рис. 3.18 Результати проточної цитофлюориметрії. Dot plot – ідентифікація популяції лімфоцитів у периферичній крові здорових осіб (зліва) та пацієнтів з ReA (справа) на двох каналах світлорозсіювання FL1 та FL2 (вісь ординат і вісь абсцис – інтенсивність флуоресценції, відн.од)

У пацієнтів з ReA з *C. trachomatis* експресія TLR9 на моноцитах ($0,06 \pm 0,01\%$) виявилась достовірно в 1,5 рази меншою порівняно з хворими на ReA з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis*+ВЕБ) ($0,09 \pm 0,01\%$; $p < 0,05$). Експресія TLR9 на лімфоцитах цих пацієнтів достовірно не відрізнялася в хворих на ReA з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis*+ВЕБ) ($1,62 \pm 0,15\%$) порівняно з пацієнтами з ReA з *C. trachomatis* ($1,22 \pm 0,34$; $p > 0,05$).

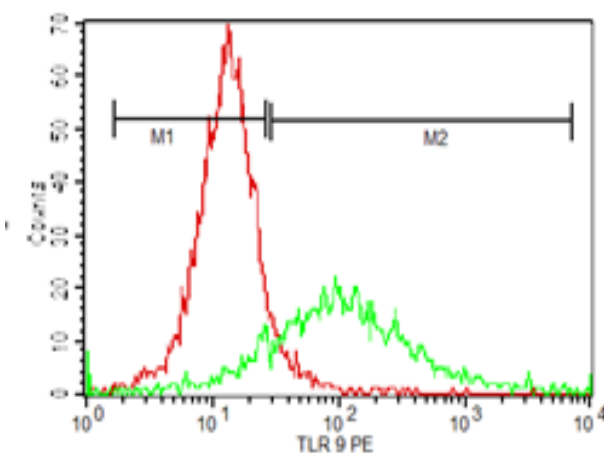


Рис 3.19 Результати проточної цитофлюориметрії моноцитів у здорових осіб (M1-червона лінія) та пацієнтів з РА (M2-зелена лінія) за інтенсивністю флуоресценції на каналі FL1 (вісь ординат – число клітин, вісь абсцис – інтенсивність, відн.од)

У пацієнтів з ревматоїдним артритом експресія TLR9⁺CD123⁺ на моноцитах достовірно не відрізнялась в фазі реактивації ВЕБ-інфекції (0,12±0,03%), порівняно з хворими в латентній фазі ВЕБ-інфекції (0,09±0,02%; $p>0,05$). Експресія TLR9 на лімфоцитах у пацієнтів з РА в латентній фазі інфекційного процесу (1,50±0,12%) виявилась вірогідно на 28,9% меншою порівняно з хворими в фазі реактивації ВЕБ-інфекції (2,11±0,11%; $p<0,05$).

У пацієнтів з РА експресія TLR9 на моноцитах достовірно не відрізнялась порівняно з хворими на РеА при комбінованій інфекції (відповідно 0,09±0,01% і 0,12±0,03%; $p>0,05$), як і при РеА лише з *S. trachomatis* (відповідно 0,06±0,01% і 0,09±0,02%; $p>0,05$). Число TLR9⁺CD123⁺-лімфоцитів виявилось більшим на 23,2 % у хворих на РА з активною фазою хронічної ВЕБ-інфекції (2,11±0,11%), порівняно з пацієнтами з РеА з комбінованою інфекцією (1,62±0,15; $p<0,05$) [106,108].

Узагальнюючи результати наших досліджень, можемо припустити, що хронічна активна ВЕБ-інфекція сприяє широкому інфікуванню імунокомпетентних клітин (в першу чергу моноцитів/макрофагів, лімфоцитів), що в кінцевому результаті призводить до аутоагресії. Посилення експресії на лімфоцитах у хворих на РА з активною ВЕБ-інфекцією порівняно з РеА з комбінованою інфекцією (*S. trachomatis*+ВЕБ) може бути підґрунтям для трансформації реактивного артрити в ревматоїдний артрит.

3.5 Фенотипічні особливості лімфоцитів при реактивному артриті, який спричинений *S. trachomatis* та Епштейна-Барр вірусною інфекцією

Тривала персистенція внутрішньоклітинної інфекції *S. trachomatis* призводить до змін функціонального стану людського організму та імунної системи, а додаткова реактивація Епштейна-Барр вірусної інфекції посилює порушення регуляції між різними імунокомпетентними клітинами. Тому, метою дослідження було визначення фенотипічних особливостей лімфоцитів при реактивному артриті, який спричинений *S. trachomatis* та РеА в її комбінації з Епштейна-Барр вірусною інфекцією.

Згідно наших досліджень, які відображені у таблиці 3.11, спостерігалось достовірне зниження відносної кількості Т-цитотоксичних лімфоцитів $CD3^+CD8^+$ у 1,34 рази у групі пацієнтів РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ) – $20,1 \pm 1,73\%$ порівняно зі здоровими ($27,0 \pm 1,36\%$; $p < 0,01$).

Відносна кількість клітин $CD3^+CD4^+$ достовірно не відрізнялася в досліджуваних групах порівняно з здоровими особами, проте абсолютна їх кількість була достовірно збільшена до $1,37 \pm 0,05$ Г/л у групі пацієнтів РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ) порівняно з контрольною групою здорових пацієнтів $1,15 \pm 0,08$ Г/л ($p < 0,05$).

Відносна кількість NK-клітин $CD3^-CD16^+/56^+$ була достовірно знижена у групі пацієнтів з РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis* +ВЕБ) ($9,62 \pm 0,43\%$) порівняно з групою пацієнтів з РеА з *C. trachomatis* ($14,5 \pm 1,12\%$) та з контрольною групою здорових осіб ($12,1 \pm 0,50\%$; $p < 0,01$). Відносна та абсолютна кількість В-лімфоцитів була достовірно підвищена в групі пацієнтів з РеА при комбінованому інфікуванні (*C. trachomatis* +ВЕБ) – $20,2 \pm 1,91\%$ $0,55 \pm 0,07$ Г/л ($p < 0,05$) порівняно з групою пацієнтів з РеА з *C. trachomatis* ($14,4 \pm 1,64\%$, $0,31 \pm 0,02$ Г/л) та з контрольною групою здорових пацієнтів ($14,8 \pm 0,90\%$, $0,37 \pm 0,05$ Г/л).

Експресія маркера пізньої активації на $CD3^+$ -лімфоцитах ($CD3^+/HLA-DR^+$) (відносна та абсолютна кількість) мала тенденцію до підвищення у групі пацієнтів РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis* +ВЕБ) – $16,2 \pm 2,70\%$, $0,40 \pm 0,09$ Г/л порівняно з групою здорових осіб ($12,3 \pm 1,84\%$, $0,31 \pm 0,03$ Г/л; $p > 0,05$). Такі ж зміни спостерігалися і на $CD3^-/HLA\ DR^+$ -лімфоцитах: у дослідних групах експресія цього маркера мала тенденцію до підвищення в пацієнтів РеА з *C. trachomatis* – $21,2 \pm 3,92\%$, $0,09 \pm 0,01$ Г/л, та у хворих на РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ) – $24,3 \pm 2,05\%$, $0,11 \pm 0,02$ Г/л порівняно зі здоровими особами ($20,4 \pm 3,51\%$, $0,08 \pm 0,02$ Г/л; $p > 0,05$).

Таблиця 3.11

Фенотипові особливості лімфоцитів у хворих на реактивний та ревматоїдний артрит (M±m)

Показники		Здорові	Пацієнти РеА з C.trachomatis	Пацієнти РеА з C.trachomatis+ВЕБ	Пацієнти РА
		n=25	n=45	n=43	n=31
CD45+	Г/л	2,50±0,21	2,18±0,31	2,72±0,34	2,05±0,29
лімфоцити	%				
	Г/л				
CD3+	%	73,1±10,9	71,1±11,9	70,2±12,7	70,5±13,3
	Г/л	1,83±0,15	1,55±0,61	1,91±0,76	1,44±0,54
CD3+CD8+	%	27,0±1,36	22,3±1,64	20,1±1,73**	24,1±2,50
	Г/л	0,68±0,03	0,49±0,03	0,55±0,04	0,49±0,07*
CD3+CD4+	%	46,1±3,63	48,8±5,07	50,1±4,31	46,4±4,14
	Г/л	1,15±0,08	1,06±0,04	1,37±0,05*	0,95±0,08
CD3-CD16+/56+	%	12,0±0,50	14,5±1,12	9,62±0,43*** ^{o o}	10,3±2,12
	Г/л	0,30±0,01	0,32±0,01	0,26±0,01	0,21±0,04
CD3-CD19+	%	14,8±0,90	14,4±1,64	20,2±1,91* ^o	19,2±1,61*
	Г/л	0,37±0,05	0,31±0,02	0,55±0,07* ^o	0,40±0,09
CD3+/HLA DR+	%	12,3±1,84	12,7±1,82	16,2±2,70	16,1±1,71
	Г/л	0,31±0,03	0,31±0,07	0,40±0,09	0,33±0,12
CD3-/HLA DR+	%	20,4±3,51	21,2±3,92	24,3±2,05	24,3±4,04
	Г/л	0,08±0,02	0,09±0,01	0,11±0,02	0,15±0,07
CD4+/CD25+	%	8,16±1,90	9,00±2,91	7,84±2,12	13,8±1,67*

Показники		Здорові	Пацієнти РеА з C.trachomatis	Пацієнти РеА з C.trachomatis+ВЕБ	Пацієнти РА
	Г/л	0,05±0,01	0,06±0,01	0,04±0,01	0,13±0,03*
CD4+/CD25-	%	38,4±3,53	35,3±2,91	40,5±5,81	32,5±2,81
	Г/л	0,26±0,06	0,28±0,06	0,37±0,09	0,30±0,07

Примітка: * – $p < 0,05$ достовірність показників між дослідними групами та здоровими особами;

** – $p < 0,01$ достовірність показників між дослідними групами та здоровими особами;

° ° – $p < 0,05$ достовірність показників порівняно з групою РеА з C. trachomatis

° ° – $p < 0,01$ достовірність показників порівняно з групою РеА з C. trachomatis

Число CD4⁺/CD25⁺ клітин мало тенденцію до зниження (відносна та абсолютна кількість) у групах хворих на РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis* +ВЕБ) – $7,84 \pm 2,12\%$, $0,04 \pm 0,01$ Г/л порівняно зі здоровими особами ($8,16 \pm 1,90\%$, $0,05 \pm 0,01$ Г/л; $p \geq 0,05$). Кількість не активованих CD4⁺/CD25-клітин достовірно не змінювалася у дослідних групах у порівнянні з групою здорових осіб ($p \geq 0,05$).

При аналізі фенотипічних властивостей лімфоцитів при РА нами виявлено достовірне зниження абсолютної кількості CD3⁺CD8⁺-лімфоцитів – $0,49 \pm 0,07$ Г/, порівняно зі здоровими пацієнтами ($0,68 \pm 0,03$ Г/л; $p < 0,05$) та достовірне підвищення відносної кількості В-лімфоцитів – $19,2 \pm 1,61\%$ порівняно з контрольною групою ($14,8 \pm 0,90\%$; $p < 0,05$). Маркер пізньої активації CD3⁺/HLA-DR⁺ мав тенденцію до підвищення у пацієнтів з РА як на CD3⁺лімфоцитах – $16,1 \pm 1,71\%$, так і на CD3-лімфоцитах – $24,3 \pm 4,04\%$, порівняно з здоровими відповідно ($12,3 \pm 1,84\%$, $20,4 \pm 3,51\%$; $p > 0,05$). Маркер активації, пов'язаний з експресією рецептору до інтерлейкіну-2, який експресується на регуляторних клітинах субпопуляції Т-хелперів - CD4⁺/CD25⁺ був достовірно підвищений у відносній та абсолютній кількості у пацієнтів з РА ($13,8 \pm 1,67\%$, $0,13 \pm 0,03$ Г/л) порівняно зі здоровими ($8,16 \pm 1,90\%$, $0,05 \pm 0,01$ Г/л; $p < 0,05$). Абсолютна та відносна кількість не активованих Т-хелперів (CD4⁺/CD25-) достовірно не змінювалася у РА порівняно з групою здорових осіб ($p \geq 0,05$). У пацієнтів з РА спостерігається достовірне підвищення кількості В-лімфоцитів – продуцентів антитіл, маркерів ранньої та пізньої активації лімфоцитів, що свідчить про тривалу дію медіаторів запалення.

Таким чином, у хворих з РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* +ВЕБ) виявлено суттєві зміни клітинного імунітету в порівнянні з ідентичними показниками хворих на РеА лише з *C. trachomatis*, які полягають у достовірному зниженні кількості НК-клітин CD3⁺CD16⁺/56⁺ ($p < 0,001$) та підвищенні кількості В-лімфоцитів CD3⁺CD19⁺ ($p < 0,05$) на тлі тенденції до підвищення експресії пізніх маркерів активації HLA DR⁺ та зниження числа регуляторних клітин CD4⁺25⁺, що вказує на зниження противірусного захисту,

функціональної здатності лімфоцитів та ризику формування аутоімунної реакції за гуморальним типом [20,105,109].

3.6 Рівень цитокінів у хворих на реактивний артрит

Запальний процес у суглобах при реактивному артриті пов'язаний із впливом цитокінів на розвиток захворювання. Цитокіни, зв'язуючись зі специфічними рецепторами на поверхні клітин-мішеней, володіють широким спектром дії, ініціюючи каскад реакцій, які викликають посилення запального процесу. У малій концентрації цитокіни викликають потужні біологічні ефекти. Однак при гіперпродукції вони можуть викликати значні системні реакції та діяти разом з іншими цитокінами синергічно чи антагоністично. Тому, нашим завданням було оцінити зміну рівня цитокінів (прозапальних і антизапальних) у хворих на РеА та РА (рисунок 3.20).

Нами було виявлено значні зміни рівня цитокінів при РеА, залежно від патологічного чинника. TNF- α бере участь у процесах системного запалення, є одним з цитокінів що формують реакцію гострої фази. Фактор некрозу пухлин синтезується переважно активованими макрофагами, меншою мірою іншими типами клітин (CD4⁺-лімфоцити, NK-клітини, нейтрофіли та ін). Локалізований у клітинній мембрані рівень прозапального цитокіну TNF- α був достовірно підвищений у всіх досліджуваних групах: у 1,76 рази у пацієнтів з РеА комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ) – $17,5 \pm 3,03$ пг/мл, у 1,82 рази у хворих на РеА з *C. trachomatis* – $18,4 \pm 3,56$ пг/мл), порівняно зі здоровими ($9,96 \pm 2,03$ пг/мл; $p < 0,05$).

IL-17 секретується в основному активованими Т-клітинами і виконує одну з центральних ролей при запальних захворюваннях. Інтерлейкін 17, взаємодіючи з іншими прозапальними цитокінами, індукує NF- κ B, який контролює експресію генів імунної відповіді, апоптозу і клітинного циклу, а також експресію численних NF- κ B-залежних генів. Відомо, що IL-17A часто діє спільно з TNF α [60]. Нами виявлено достовірно підвищений рівень IL-17 у 1,98 рази у пацієнтів з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis* +ВЕБ) – $3,29 \pm 0,73$

пг/мл, у 2,08 рази у хворих на РеА з *C. trachomatis* – $3,45 \pm 0,78$ пг/мл, порівняно зі здоровими ($1,66 \pm 0,15$ пг/мл; $p < 0,05$). Ці результати вказують на ведучу роль ІЛ-17 у запальних станах.

ІЛ-22 належить до Th1-медіаторів. Експресія ІЛ-22 специфічна для Т-лімфоцитів, а НК-клітини продукують його в невеликих кількостях з поступовим зростанням концентрації. Велику кількість ІЛ-22 виділяють CD4+-клітини та активовані Т-клітини пам'яті. ІЛ-22 виконує важливу роль у розвитку запалення, що підтверджується стимуляцією продукції генів білків гострої фази, таких як сироватковий амілоїд А, $\alpha 1$ -антихімотрипсин, гаптоглобін.

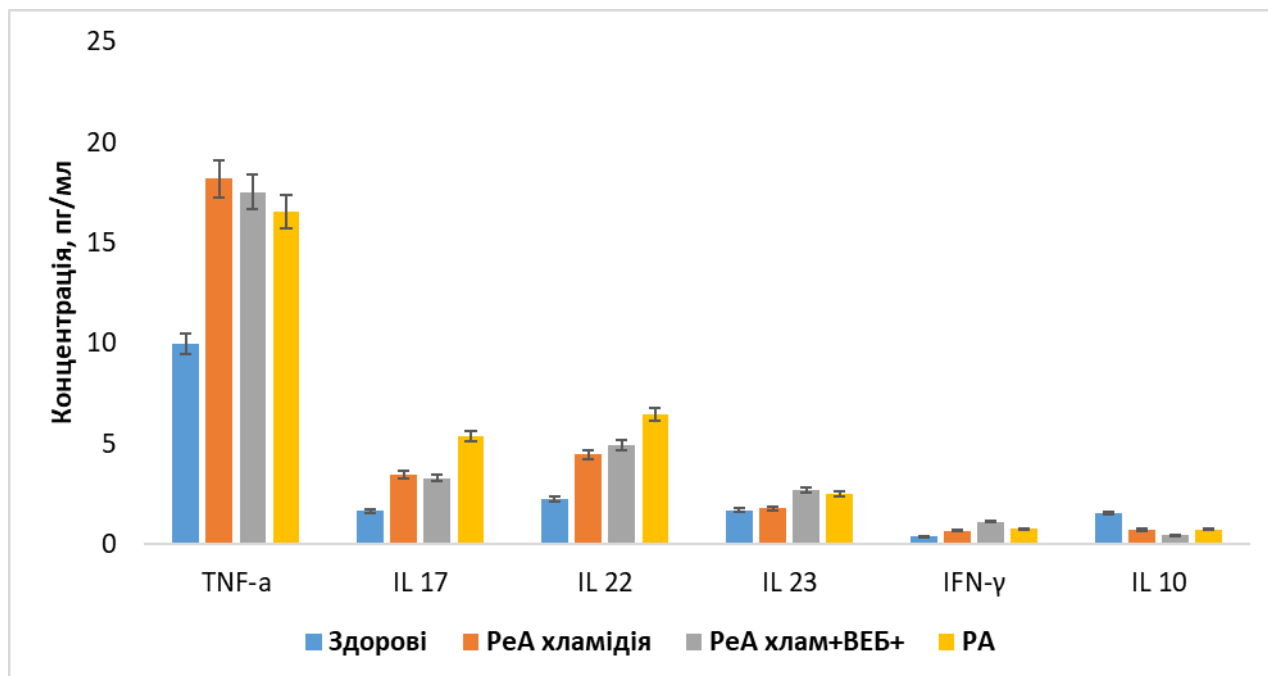


Рис. 3.20 Рівень TNF- α , IL-17, IL-22, IL-23, IFN- γ та IL-10 у пацієнтів з реактивним артритом, спричиненим *C. trachomatis* та ВЕБ та РА

У наших дослідженнях рівень Підвищений рівень ІЛ-22 визначався у всіх досліджуваних групах пацієнтів з РеА: у 1,97 рази у хворих на РеА з *C. trachomatis* ($4,45 \pm 0,68$ пг/мл; $p < 0,05$), у 2,19 рази в пацієнтів з РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis* + ВЕБ) – $4,92 \pm 0,84$ пг/мл ($p < 0,01$) порівняно із здоровими – $2,25 \pm 0,53$ пг/мл. Ці результати можуть вказують на участь ІЛ-22 у запальній та імунній відповіді.

IL-23 є прозапальним, імунорегуляторним цитокіном та ключовим для підтримки та поширення Th17. IL-23 дозволяє Th17 належним чином функціонувати та вивільняти ефективні цитокіни, такі як IL-17, IL-21, IL-22, які опосередковують захист від позаклітинних паразитів (грибів та бактерій) та беруть участь у бар'єрному імунітеті. NK-клітини також експресують рецептор IL-23, які реагують на підвищену секрецію IFN- γ та посилену антитілозалежну клітинну цитотоксичність. IL-23 сприяє індукції хронічного запалення та утворенню IFN- γ CD4⁺ та CD8⁺ Т-клітинами. У нашому дослідженні IL-23 був достовірно підвищений у 1,58 рази у групі пацієнтів з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ) – $2,69 \pm 0,24$ пг/мл порівняно зі здоровими ($1,70 \pm 0,13$ пг/мл, $p < 0,05$). Враховуючи, що IL-23 приймає участь у підтриманні клітинного імунітету та є координатором між вродженим та набутим імунітетом, суттєві зміни його рівня в сироватці крові можуть свідчити про дизрегуляцію між вродженою та набутою імунною відповіддю, і як наслідок посилення запального процесу.

Секреція IFN- γ відбувається під впливом практично будь-яких антигенів Клітинами-продуцентами ендогенного IFN- γ є Т-хелпери, клітини імунологічної пам'яті, Т-супресори, NK-клітини та В-лімфоцити.. IFN- γ активує також антитілозалежну клітинну цитотоксичність; може або посилювати, або пригнічувати В-клітинну імунну відповідь. Під дією IFN- γ , за рахунок індукції експресії Fc-рецепторів, активується диференціювання моноцитів, функція нейтрофілів, посилюється фагоцитоз, тощо. У нашому дослідженні ми спостерігали значне підвищення рівня IFN- γ у групі пацієнтів з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ) у 3,05 рази ($1,13 \pm 0,14$ пг/мл; $p < 0,0001$), у хворих РеА з *C. trachomatis* – в 1,78 рази ($0,66 \pm 0,11$ пг/мл порівняно зі здоровими ($0,37 \pm 0,09$ пг/мл, $p < 0,05$). При цьому рівень IFN- γ був в 1,71 рази вищим у хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis*+ВЕБ) в порівнянні з хворими на РеА лише з *C. trachomatis*. А порушення функціонування системи IFN- γ може призвести до розвитку не лише

інфекційних (вірусних чи бактерійних) захворювань, але і аутоімунної патології.

IL-10 модулює експресію цитокінів, розчинних медіаторів і інгібує продукцію прозапальних цитокінів. IL-10 впливає на Th1 та Th2 імунну відповідь та інгібує проліферацію CD4⁺ Т-клітин, пригнічуючи функцію антигенпрезентуючих клітин. IL-10 стимулює CD8⁺Т-клітини, індуючи їх залучення в розвиток імунної відповіді, цитотоксичну активність та здатність до проліферації. IL-10 є потужним стимулятором NK-клітин, необхідних для елімінації патогенів, сприяє антигенному сприйняттю загиблих клітин для їх презентації АПК, забезпечуючи зв'язок між вродженим і набутим імунітетом. IL-10 блокує вивільнення активних метаболітів кисню. У нашому дослідженні при РеА виявлено значне зниження рівня у 3,54 рази з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis* +ВЕБ) – $0,44 \pm 0,04$ пг/мл ($p < 0,001$), у 2,16 рази з РеА з *C. trachomatis* – $0,72 \pm 0,09$ пг/мл, порівняно з здоровими ($1,56 \pm 0,29$ пг/мл, $p < 0,01$). При цьому рівень IL-10 був у 1,64 рази меншим у хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis*+ВЕБ) в порівнянні з хворими на РеА лише з *C. trachomatis* ($p < 0,01$). Таким чином, блокуючі ефекти IL-10 на продукцію прозапальних цитокінів у хворих на РеА знижені за рахунок низької концентрації, що сприяло розвитку потужної імунозапальної відповіді.

Вплив цитокінів спостерігався нами і на розвиток ревматоїдного артриту у пацієнтів. Хронічний аутоімунний запальний процес при РА розвивається не лише в синовіальній рідині а й у периферійній крові. Нашими дослідженнями був встановлений значний дисбаланс прозапальних, імунорегуляторних та антизапальних цитокінів у пацієнтів з РА. Так у пацієнтів з РА рівень TNF- α , який відображає активну форму хвороби, був підвищений у 1,66 рази ($16,54 \pm 3,76$ пг/мл), порівняно з контрольною групою здорових осіб ($9,96 \pm 2,03$ пг/мл; $p > 0,05$). Рівень IL-17, який може безпосередньо брати участь у руйнуванні хрящової тканини був достовірно підвищений у 3,23 рази ($5,37 \pm 1,53$ пг/мл), порівняно з контрольною групою осіб ($1,66 \pm 0,15$ пг/мл; $p < 0,05$). Рівень IL-22, який виконує важливу роль в розвитку запалення, був достовірно

підвищений у 2,86 рази ($6,44 \pm 2,01$ пг/мл) порівняно з контрольною групою здорових осіб ($2,25 \pm 0,53$ пг/мл; $p < 0,05$). Рівень IL-23, який необхідний для індукції хронічного запалення, був підвищений у 1,48 рази ($2,52 \pm 0,56$ пг/мл) порівняно з контрольною групою здорових осіб ($1,70 \pm 0,43$ пг/мл; $p > 0,05$). Рівень IFN- γ , який задіяний у протівірусному імунітеті був достовірно підвищений у 2,08 рази ($0,77 \pm 0,09$ пг/мл) порівняно зі здоровими особами ($0,37 \pm 0,09$ пг/мл; $p < 0,01$). Рівень IL-10, який блокує Т-клітинну відповідь на специфічні антигени, був достовірно знижений у 2,2 рази ($0,73 \pm 0,06$ пг/мл) порівняно з контрольною групою здорових осіб ($1,56 \pm 0,29$ пг/мл; $p < 0,01$).

Узагальнюючи результати наших досліджень, можна зробити висновок, що найбільший рівень TNF- α , IL-17, IL-22, IL-23, IFN- γ та найменший рівень IL-10 були виявлені в хворих з РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ). При чому в хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) при дослідженні рівня цитокінів у сироватці крові виявлено підвищення ІФН- γ в 1,71 рази та зниження рівня ІЛ-10 в 1,64 рази порівняно з хворими на РеА лише з *C. trachomatis*, що може вказувати на більш агресивний перебіг РеА у цих хворих з тривалим запальним процесом на тлі зниження клітинного імунітету та порушення імунної регуляції з високою ймовірністю трансформації захворювання в ревматоїдний артрит [19,172].

3.7 Особливості рівня AGEs при реактивному артриті, який спричинений *Chlamydia trachomatis* та Епштейна-Барр вірусною інфекцією

Кінцеві продукти глікації (AGEs) виникають при різних патологічних станах старіння, окисному стресі, діабеті чи атеросклерозі. Модифікації AGEs призводять до тканинного пошкодження через зміну структури тканинних протеїнів і стимулюють клітинну відповідь. Хронічне запалення в суглобах також може призвести до утворення кінцевих продуктів глікації. Окисний стрес посилює їх формування та змінює хімічну структуру протеїнів, що ще більше впливає на стан артритичних змін при гострому чи хронічному запальному

процесі. Ці зміни включають пошкодження екстрацелюлярного матриксу, виникнення запалення синовіальної оболонки, залучення й продукції імунокомпетентними клітинами прозапальних цитокінів, що ще більше сприяє погіршенню стану не лише локального, а й до системного. Клітини експресують рецептори, які здатні зв'язувати AGEs і модулювати клітинну функцію. Найкраще вивченим рецептором є RAGE. RAGE експресується різними типами клітинним, включаючи моноцити/макрофаги, ендотеліальні клітини, м'язеві, нейрональні та ін.

Тому, нашим завданням було оцінити рівень продукції AGEs у пацієнтів з РеА хламідійною та ВЕБ інфекціями.

Проведені нами дослідження вказують на статистично достовірні зміни рівня AGEs у пацієнтів з РеА РА, які відображені на рисунку 3.21.

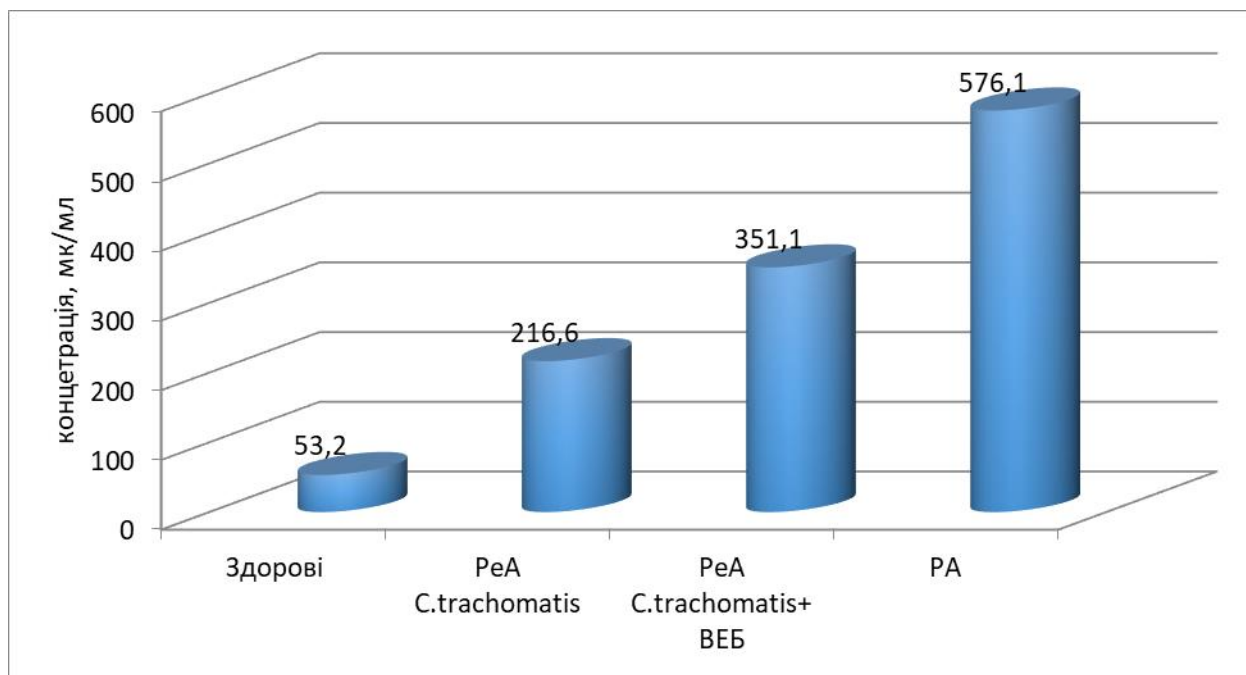


Рис. 3.21 Рівень AGEs при РеА, який спричинений *Chlamydia trachomatis* та Епштейна-Барр вірусною інфекцією та РА

Нами було виявлено значні зміни рівня AGEs при РеА. Так, у сироватці крові пацієнтів з РеА, спричиненого *C. trachomatis* рівень AGE виявився більшим у 4,07 рази ($216,6 \pm 15,4$ мкг/мл; $p < 0,0001$), при РеА, спричиненим

комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ) – у 6,60 рази ($351,1 \pm 42,4$ мкг/мл; $p < 0,0001$) порівняно зі здорових особами ($53,2 \pm 10,3$ мкг/мл). У хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) концентрація кінцевих продуктів глікації у крові була вищою в 1,62 рази порівняно з хворими на РеА лише з *C. trachomatis* ($p < 0,01$). Також було виявлено значне підвищення рівня AGEs при РА, що у 10,8 разів ($576,1 \pm 94,1$ мкг/мл) порівняно з контрольною групою ($53,2 \pm 10,3$ мкг/мл; $p < 0,0001$).

Таким чином, можна зробити висновок про значні зміни рівня AGEs у пацієнтів з артритичними порушеннями. Збільшена висока концентрація AGE в 1,6 рази у хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis*+ВЕБ), порівняно з хворими на РеА лише з *C. trachomatis* може вказувати на більш інтенсивний запальний процес з ймовірністю хронізації та формування ускладнень.

Висновки до розділу 3.

1. У хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) ДНК ВЕБ виявлялась у 32,6% хворих лише в зішкрябах слизової задньої стінки глотки, у 4,65% – лише у слині, і у 62,8% пацієнтів одночасно в кількох середовищах: слина + зішкряб слизової – у 55,8% кров, слина і зішкряб – у 6,98% хворих; клініко-лабораторний індекс DAREА у цих хворих був вищим в 1,40 рази у порівнянні з хворими на РеА лише з *C. trachomatis*.

2. У групі хворих на РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ) виявлено збільшення рівня молекул BART-13 (7,01 у.о.) та BART-15 (0,56 у.о) у порівнянні з відсутністю цих молекул у хворих на РеА з *C. trachomatis*; рівень регуляторних молекул системи miR був вищим: miR155 – в 6,29, а miR146 – у 7,71 рази, порівняно з пацієнтами з РеА лише з *C. trachomatis*; у хворих на РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ) встановлено позитивні кореляції між молекулами BART-15 та miR155 ($r=0,79$; $p < 0,05$), BART-13 та miR146 ($r=0,62$; $p < 0,05$).

3. Антигенпрезентуюча здатність TLR9⁺ моноцитів була вищою в 1,50 рази та лімфоцитів в 1,33 рази у групі хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) у порівнянні з хворими на РеА лише з *C. trachomatis*; оксидативна здатність моноцитів за умов стимуляції слабким фізіологічним стимулятором – N-формілметіоніл-лейцил-фенілаланіну (fMLP) була достовірно підвищена в 1,66 рази у хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) в порівнянні з хворими на РеА з *C. trachomatis*.

4. За умов оцінки фенотипування лімфоцитів у хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) виявлено знижену в 1,51 рази відносну кількість НК-клітин CD3⁻CD16⁺/56⁺ та підвищення в 1,40 рази відносної кількості В-лімфоцитів CD3⁻CD19⁺ порівняно з хворими на РеА на тлі *C. trachomatis*.

5. Визначено підвищення ІФН- γ в 1,71 рази та зниження рівня ІЛ-10 в 1,64 рази у сироватці крові хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) порівняно з хворими на РеА лише з *C. trachomatis*.

6. У хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) концентрація кінцевих продуктів глікації у сироватці крові була вищою в 1,62 рази порівняно з хворими на РеА лише з *C. trachomatis*.

Основні положення цього розділу викладені у публікаціях автора [9,15,17,19,20,21,28,35,10,173].

РОЗДІЛ 4

ПРОГНОСТИЧНА МОДЕЛЬ НА ОСНОВІ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ ТА ІМУНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ РИЗИКУ ТРАНСФОРМАЦІЇ РЕА З КОМБІНОВАНОЮ ІНФЕКЦІЄЮ (С. TRACHOMATIS+ВЕБ) В РЕВМАТОЇДНИЙ АРТРИТ

У ході виконання роботи нами за методом логістичної регресії було виокремлено із 20-ти аналізованих чинників сім, які при поєднаній дії мають вплив на ймовірність трансформації реактивного артрит у ревматоїдний артрит, про що відображено у таблиці 4.1.

Таблиця 4.1

Результати коефіцієнтів регресії щодо ймовірності трансформації реактивного артрит у ревматоїдний артрит за методом логістичної регресії

№ з/п	Фактори	Умовні позначення	Коефіцієнти регресії (β_i)
1	ПЛР ВЕБ слина (копій ДНК/мл)	V1	0,0000004
2	ПЛР ВЕБ слизова (копій ДНК/мл)	V2	0,0000047
3	ПЛР ВЕБ кров (копій ДНК/мл)	V3	0,0006563
4	CD19%	V4	1,3351909
5	miR146	V5	2,6359443
6	BART-13	V6	0,6934980
7	BART-15	V7	0,0090555
8	Константа		-68,6610581

Таким чином лінійне рівняння для визначення R (2.2) матиме наступний вигляд (4.1):

$$R = 0,0000004 \cdot V1 + 0,0000047 \cdot V2 + 0,0006563 \cdot V3 + 1,3351909 \cdot V4 + 2,6359443 \cdot V5 + 0,6934980 \cdot V6 + 0,0090555 \cdot V7 - 68,6610581 \quad (4.1)$$

Достовірність обчислених коефіцієнтів моделі (p) становить менше 0,0001. R-квадрат Наделькеркеса (R Square Nadelkerkes) складає 0,999, тобто

99,9% дисперсії щодо ймовірності трансформації реактивного артриту в ревматоїдний артрит можна пояснити за допомогою включених у регресійну модель чинників, а інші 0,1% залежать від чинників, які не включались в регресійний аналіз.

Перевірка результатів прогнозування згідно отриманих коефіцієнтів у наявній базі даних дозволяє констатувати, що ймовірність того, що пацієнти з наявним високим ризиком матимуть математично підтверджений високий ризик трансформації реактивного артриту в ревматоїдний артрит, тобто чутливість нашої моделі становить 100,0%; ймовірність не мати даної трансформації при низькому ризику, тобто специфічність становить 100,0%, а точність (зважена середня арифметична поміж чутливістю та специфічністю) – теж 100,0%.

Для кращого розуміння функціонування запропонованої моделі можемо навести клінічний приклад №1 (Пацієнт Н., №9 з вкладки «високий ризик»). Пацієнт з реактивним артритом має наступні аналізовані показники: ПЛР ВЕБ в слині – 400 000 ДНК копій/мл, ПЛР ВЕБ в слизовій – 30 000 ДНК копій/мл, ПЛР ВЕБ в крові – 100 ДНК копій/мл, CD19 – 21,7%; miR146 – 15,4; BART13 – 24,35; BART15 – 1,87.

Підставивши дані у рівняння (4.1 та 2.1) отримуємо:

$$R = 0,0000004 \cdot 400\,000 + 0,0000047 \cdot 30\,000 + 0,0006563 \cdot 100 + 1,3351909 \cdot 21,7 + 2,6359443 \cdot 15,4 + 0,6934980 \cdot 24,35 + 0,0090555 \cdot 1,87 - 68,6610581 = 18,18$$

Тобто згідно обчислень у такого пацієнта існує високий ризик (99,9%) трансформації реактивного артриту в ревматоїдний артрит. При порівнянні із базою даних – у даного пацієнта дійсно через 3 роки з'явилися клінічні прояви ревматоїдного артриту тобто наш прогноз справдився.

Клінічний приклад №2 (Пацієнт М. №29 з вкладки «низький ризик»). Пацієнт з реактивним артритом має наступні аналізовані показники: ПЛР ВЕБ в слині – 20 000 ДНК копій/мл, ПЛР ВЕБ в слизовій – 200 ДНК копій/мл, ПЛР

ВЕБ в крові – 0 (негативний), CD19 – 18,9%; miR146a – 8,1; BART13 – 6,01; BART15 – 0,07. Підставивши дані у рівняння (4.1 та 2.1) отримуємо:

$$R = 0,0000004 \cdot 20\,000 + 0,0000047 \cdot 200 + 0,0006563 \cdot 0 + 1,3351909 \cdot 18,9 + 2,6359443 \cdot 8,1 + 0,6934980 \cdot 6,01 + 0,0090555 \cdot 0,07 - 68,6610581 = -17,90$$

$$T = \frac{1}{1 + e^{-17,90}} \cdot 100\% = 0,01\%$$

Тобто згідно даних обчислень у такого пацієнта існує низький ризик (0,01%) трансформації реактивного артрити в ревматоїдний артрит. При порівнянні із базою даних – даний пацієнт дійсно не має жодних проявів ревматоїдного артрити через 3 роки, тобто наш прогноз теж справдився.

З'ясовано, що у групі пацієнтів з високим ризиком трансформації реактивного артрити в ревматоїдний артрит (рис. 4.1) рівень ПЛР ВЕБ в крові поєднується зі збільшенням показників BART-13 та BART-15.

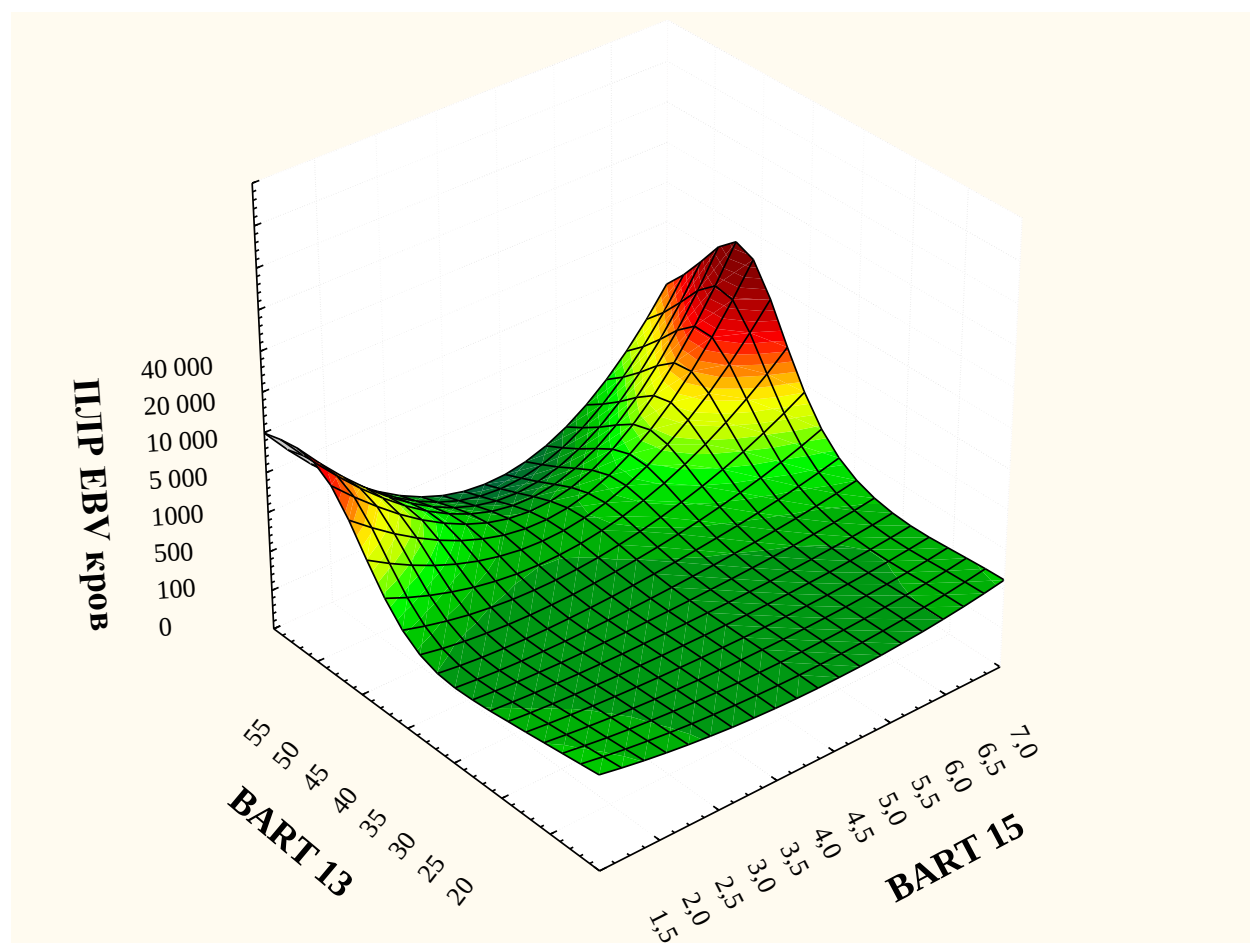


Рис.4.1 Взаємозв'язок поміж ПЛР ВЕБ в крові, BART-13 та BART-15 у пацієнтів з високим ризиком трансформації реактивного артрити в ревматоїдний артрит.

Висновок до Розділу 4.

На основі методу логістичної регресії запропоновано прогностичну математичну модель ризику трансформації реактивного артрити з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) в ревматоїдний артрит; факторами ризику є кількість копій ДНК ВЕБ в різних середовищах одночасно, відносне число CD19⁺ -лімфоцитів, рівні молекул BART-13, BART-15, miR146, в сироватці крові.

РОЗДІЛ 5

ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ НА РЕАКТИВНИЙ АРТРИТ НА ТЛІ КОМБІНОВАНОЇ ІНФЕКЦІЇ *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* ТА ЕПШТЕЙНА-БАРР ВІРУСУ

Лікування реактивного артриту є однією з актуальних проблем в ревматології. Розпочинається лікування РеА з елімінації причинного збудника, який спричинив хворобу та усунення запального процесу в суглобах та позасуглобових проявів. При лікуванні РеА, викликаного *C. trachomatis*, обов'язковим є застосування антибактерійної терапії. Найчастіше використовують макроліди, тетрацикліни, фторхінолони. Відповідно до сучасних рекомендацій у схемі лікування РеА застосовують нестероїдні протизапальні препарати, при вираженій активності та хронізації процесу - кортикостероїди та базисні лікарські засоби. При реактивації ВЕБ-інфекції рекомендовано застосовувати противірусну терапію. На даний час загальноприйнятих схем лікування ВЕБ-інфекції не існує. Однак сучасні уявлення про вплив ВЕБ на організм людини та дані про наявний ризик розвитку серйозних ускладнень свідчать про необхідність проведення терапії та диспансерного спостереження. Обсяг противірусної терапії хворих із РеА спричиненого *C. trachomatis* на тлі реактивації ВЕБ-інфекції може різнитися залежно від тривалості захворювання, тяжкості стану та імунних розладів. У середньотяжких і тяжких випадках в лікуванні препаратами вибору є аномальні нуклеотиди — валацикловір, ганцикловір або фамцикловір. Застосування противірусних препаратів не завжди є ефективним для повної елімінації вірусу. Існують літературні дані, що при терапії ВЕБ-інфекції аномальними нуклеозидами рівень вірусної реплікації знижується, але повертається до вихідного рівня після припинення лікування [32, 149]. Тому, важливу роль у лікуванні відіграє імуномодуюча терапія, скерована на нормалізацію, насамперед, клітинної ланки імунітету, яка відіграє ключову роль в противірусному захисті. Одними з таких препаратів є лейкоцитарні

імуностимулятори, основними показами до застосування яких є порушення клітинної ланки, і як наслідок зниження або порушення балансу між різними популяціями лімфоцитів. До таких препаратів відноситься Імодин.

Препарат «Імодин», виробництва Севафарма (Чеська Республіка) випускається в ампулах у вигляді ліофілізованого порошку для приготування розчину для ін'єкцій (1 доза містить кількість діючої речовини, що міститься у 200 млн лейкоцитів донора, яку розчиняють в 4 мл води для ін'єкцій і вводять підшкірно). Препарат містить більше 200 імуномодуючих компонентів: цитокіни (інтерлейкіни, інтерферони, колонієстимулюючі фактори та ін.), специфічні ділянки антигенів, рецепторів (епітопи), за допомогою яких взаємодіють імунокомпетентні клітини, формуючи адекватну імунну відповідь («сума імунного досвіду» донорів, за визначенням G. Pizza, 2004). Активні речовини, які містить лікарський засіб Імодин, впливають на проліферацію і диференціацію різних видів клітин.

Імуномодуючий ефект Імодину полягає в прискоренні проліферації, дозріванні і диференціації попередників імунокомпетентних клітин; стимуляція експресії рецепторів цитокінів; стимуляція реакцій клітин імунної системи на міжклітинні молекулярні сигнали; стимуляція функцій фагоцитів [12]. Проведеними дослідженнями доведено, що ліофілізований діалізат лейкоцитів покращує клітинну імунну відповідь та сприяє запобіганню реактивації ВЕБ-інфекції [40,158]. Тому нами було запропоновано в загальну схему лікування РеА спричиненого *C. trachomatis* на тлі реактивації ВЕБ включити лейкоцитарний імуномодулятор Імодин з оцінкою його клінічної та імунологічної ефективності, безпеку та переносимості препарату при застосуванні.

У дослідженні взяли участь 43 хворих на реактивний артрит на тлі комбінованої інфекції (*C. trachomatis*+ВЕБ). Усіх хворих у випадковому порядку було поділено на 2 групи. Групи були однорідними за статтю, віком, діагнозом і функціональним станом органів і систем та статистично репрезентативні за кількістю.

1-а група - 23 пацієнти, які приймали антибактерійну терапію хламідійної інфекції, протівірусну терапію (валацикловір 1000 мг 3 рази на день протягом 21 дня, протизапальну терапію залежно від інтенсивності симптомів. 2-а група - 20 пацієнтів, які отримували антибактерійну терапію хламідійної інфекції, протівірусну терапію (валацикловір 1000 мг 3 рази на день 21 день, протизапальну терапію залежно від інтенсивності симптомів та Імодин. Схема лікування Імодином передбачала прийом 5 доз: чотири основні дози (1 доза 1 раз на тиждень), п'ята доза вводилася через 1 місяць.

Результат лікування оцінювали після завершення лікування лейкоцитарним імуномодулятором з використанням критеріїв: клініко-лабораторний індекс активності (DAREА) та імунологічні показники. Критерії ефективності і перенесення досліджуваного препарату оцінювалися відповідно до запропонованої шкали, статистично оброблялися і порівнювалися в контрольній і дослідній групах. На основі отриманих результатів зроблені висновки про ефективність і перенесення лікарського препарату.

Критерії ступеня клінічної ефективності лікування хворих на РеА на тлі Епштейна-Барр вірусу оцінювали на основі індексу активності (DAREА), де враховувались такі показники: кількість набряклих суглобів, кількість болючих суглобів, оцінка болю, загального стану пацієнтом (за шкалою від 1 до 3) та рівень С-реактивного білка (табл. 5.1, рис. 5.1) з виведенням відповідних балів в подальшому.

Таблиця 5.1

Індекс активності DAREА у хворих на РеА з комбінованою інфекцією (С . trachomatis + ВЕБ) до та після лікування

Показник	Пацієнти з РеА з С . trachomatis + ВЕБ до лікування	Пацієнти РеА з С . trachomatis + ВЕБ після лікування	
		базова терапія + Імодин	базова терапія
Кількість	n=43	n=20	n=23

Продовження таблиці 5.1

Кількість набряклих суглобів	3,15±0,85	0,32±0,13	0,80±0,41
Кількість болючих суглобів	3,74±0,61	0,48±0,31	0,93±0,42
Оцінка болю пацієнтом	2,47±0,53	0,23±0,15	0,88±0,30
Оцінка загального стану пацієнта	1,65±0,28	0,28±0,17	0,89±0,83
С-реактивний білок mg dl	2,59±0,45	0,41±0,24	0,81±0,51
Індекс DAREA	13,6±1,45	1,72±0,62**	4,31±0,91** °

Примітка: * $p < 0,01$ достовірність різниці між показниками хворих на РеА до та після лікування; ** $p < 0,01$ достовірність різниці між показниками хворих на РеА до та після лікування; ° $p < 0,05$ достовірність різниці між показниками хворих на РеА з комбінованою інфекцією після лікування з та без Імодину

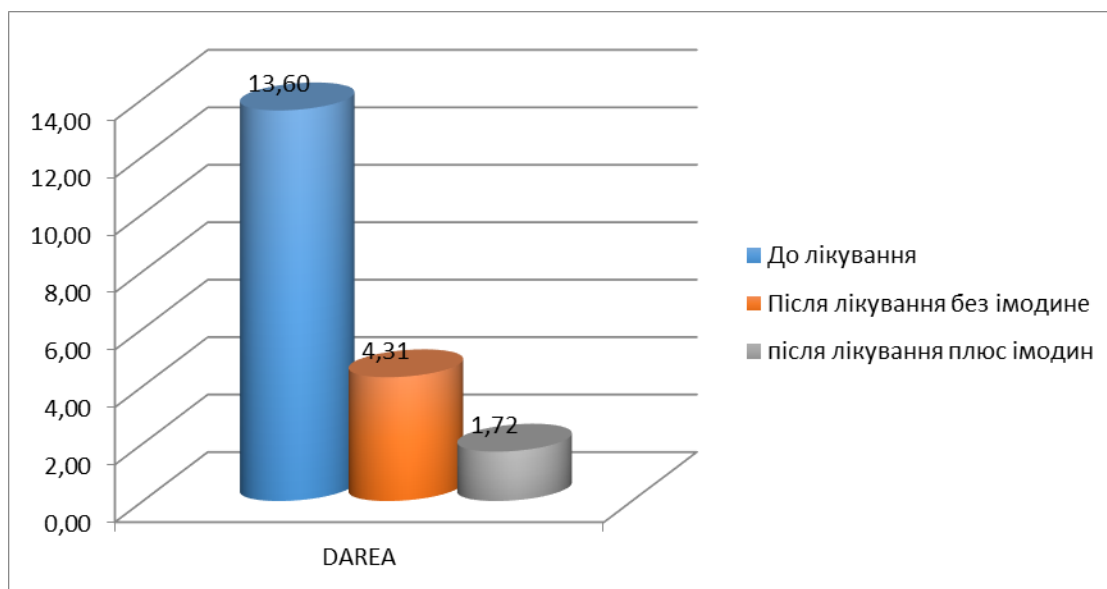


Рис. 5.1 Клінічна оцінка ефективності рекомендованого лікування досліджуваних хворих за індексом DAREA

У хворих, які отримували Імодин в комплексній терапії хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) індекс DAREА знизився з $13,6 \pm 1,45$ до $1,72 \pm 0,62$ ($p < 0,01$), а за умов застосування лише етіотропної та протизапальної терапії з $13,6 \pm 1,45$ до $4,31 \pm 0,91$ ($p < 0,01$). При цьому виявлено достовірне ($p < 0,05$) зменшення індексу DAREА в 2,51 рази у хворих із застосуванням Імодину порівняно з хворими, яким застосовували лише етіотропну та протизапальну терапію.

Проведений порівняльний аналіз імунологічних показників у здорових осіб та хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ), які отримували комплексну антибактерійну, противірусну та протизапальну терапію з та без Імодину до, після лікування. Порівняльну оцінку ефективності лікування Імодином на основі аналізу фенотипових особливостей лімфоцитів подано в таблиці 5.2.

Таблиця 5.2

Фенотипові особливості лімфоцитів у хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) до та після лікування ($M \pm m$)

Показники		Здорові	Пацієнти РеА з C.trachomatis + +ВЕБ до лікування	Пацієнти РеА з C.trachomatis + +ВЕБ після лікування	
				базова терапія + імодин	базова терапія
		n=25	n=43	n=20	n=23
CD45+ лімфоцити	Г/л	2,50±0,21	2,72±0,34	2,59±0,24	2,45±0,28
CD3+	%	73,1±10,9	70,2±12,7	73,2±13,5	70,7±11,3
	Г/л	1,83±0,15	1,91±0,76	1,89±0,36	1,73±0,75
CD3+CD8+	%	27,0±1,36	20,1±1,73**	26,6±1,70 ^{oo}	21,4±1,40**^
	Г/л	0,68±0,03	0,55±0,04	0,69±0,03 ^{oo}	0,52±0,03^^
CD3+CD4+	%	46,1±3,63	50,2±4,31	46,6±2,4	49,3±4,7
	Г/л	1,15±0,08	1,37±0,05*	1,21±0,07	1,21±0,16
CD3-CD16+/56-	%	12,0±0,50	9,62±0,43**	11,8±1,34	10,1±2,32
	Г/л	0,30±0,01	0,26±0,01	0,30±0,03	0,25±0,03
CD3-CD19+	%	14,8±0,90	20,2±1,91*	15,0±0,87 ^o	19,2±1,80*^
	Г/л	0,37±0,05	0,55±0,07*	0,39±0,02 ^o	0,47±0,07*
CD3+/HLA DR-	%	12,3±1,84	16,2±2,70	13,0±2,70	13,9±2,40
	Г/л	0,31±0,03	0,40±0,09	0,34±0,02	0,35±0,03
CD3-/HLA DR+	%	20,4±3,51	24,3±2,05	19,9±2,05	21,3±1,95
	Г/л	0,08±0,02	0,11±0,02	0,08±0,02	0,09±0,02

Продовження таблиці 5.2.

CD4+/CD25+	%	8,16±1,90	7,84±2,12	8,0±2,15	7,55±1,12
	Г/л	0,05±0,01	0,04±0,01	0,05±0,02	0,04±0,01
CD4+/CD25-	%	38,4±3,53	40,5±5,81	39,1±11,8	38,5±15,8
	Г/л	0,26±0,06	0,37±0,09	0,36±0,09	0,34±0,05

Примітка : * $p < 0,05$ достовірність різниці між показниками здорових осіб та хворих на РеА з комбінованою інфекцією (С. trachomatis + ВЕБ); ** $p < 0,01$ достовірність різниці між показниками здорових осіб та хворих на РеА з комбінованою інфекцією (С. trachomatis + ВЕБ)

^o $p < 0,05$ достовірність різниці між показниками хворих на РеА з комбінованою інфекцією (С. trachomatis + ВЕБ) до та після лікування; ^o $p < 0,05$ достовірність різниці між показниками хворих на РеА з комбінованою інфекцією (С. trachomatis + ВЕБ) до та після лікування

[^] $p < 0,05$ достовірність різниці між показниками хворих двох дослідних груп після лікування; [^] $p < 0,05$ достовірність різниці між показниками хворих двох дослідних груп після лікування;

Згідно наших досліджень було виявлено зменшення абсолютної кількості лімфоцитів після лікування як в групі хворих з протизапальною та етіотропною терапією (2,45±0,28 Г/л) так і в групі з додатковим застосуванням Імодину (2,59±0,24 Г/л), порівняно з хворими на РеА з комбінованою інфекцією (С. trachomatis + ВЕБ) до лікування (2,72±0,34Г/л; $p > 0,05$), проте без достовірної різниці. Щодо CD3⁺-лімфоцитів, то не спостерігалось достовірних змін ні у відносних, ні у абсолютних показниках. Після лікування знижена відносна та абсолютна кількість цитотоксичних CD3⁺CD8⁺-лімфоцитів (20,1±1,73%, 0,55±0,04Г/л) до лікування достовірно зросла у групі хворих з додатковим застосуванням Імодину (26,6±1,70%, 0,69±0,03 Г/л; $p < 0,01$) та не змінилась у групі хворих з базовою терапією (21,4±1,40%, 0,52±0,03 Г/л; $p < 0,05$). Кількісні зміни цих клітин можуть свідчити про збільшення активності специфічного противірусного захисту у вказаних хворих. Кількість CD3⁺CD4⁺-лімфоцитів як у відносних, так і в абсолютних цифрах достовірно не змінювалась, проте мала тенденцію до зменшення. Кількість NK-клітин CD3-CD16⁺/56⁺ після лікування Імодином збільшилась порівняно з хворими до лікування, проте без достовірної різниці. Як видно з поданих даних Таблиці 5.2 підвищена відносна і абсолютна кількість В-лімфоцитів у хворих до лікування (20,2±1,91%, 0,55±0,07 Г/л)

достовірно знизилась у 1,3 рази у групі хворих з додатковим використанням імуномодуючої терапії відповідно ($15,0 \pm 0,87\%$, $0,39 \pm 0,02$ Г/л; $p < 0,05$) і була достовірно нижчою порівняно з хворими лише на базовій терапії ($19,2 \pm 1,80\%$, $0,47 \pm 0,07$ Г/л; $p < 0,05$), що може свідчити про зменшення ризику аутоагресії за гуморальним типом.

Маркер пізньої активації на CD3-лімфоцитах (CD3⁺/HLA-DR⁺) (відносна та абсолютна кількість) мав тенденцію до зменшення у досліджуваних групах пацієнтів після лікування Імодином ($13,0 \pm 2,70\%$, $0,34 \pm 0,02$ Г/л) порівняно з групою хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) до лікування ($16,2 \pm 2,70\%$, $0,40 \pm 0,09$ Г/л; $p > 0,05$). Такі ж зміни спостерігалися щодо CD3⁺/HLA DR⁺-лімфоцитів: у групі пацієнтів після лікування Імодином спостерігалось тенденція до зменшення експресії маркера пізньої активації у відносних та абсолютних цифрах ($19,9 \pm 2,05\%$, $0,08 \pm 0,02$ Г/л) порівняно з показниками до лікування ($24,3 \pm 2,05\%$, $0,11 \pm 0,02$ Г/л; $p > 0,05$). Зниження експресії маркера пізньої активації HLA-DR⁺ на лімфоцитах свідчить про нормалізацію активності імунокомпетентних клітин після лікування Імодином.

Маркер активації, пов'язаний з експресією рецептору до інтерлейкіну-2, який експресується на регуляторних клітинах CD4⁺/CD25⁺ мав тенденцію до підвищення після додаткового лікування Імодином, проте без достовірної різниці. Кількість не активованих CD4⁺/CD25⁻клітин достовірно не змінювалася у досліджуваних групах до та після лікування ($p \geq 0,05$). Відомо, що при певних патологічних станах CD4⁺CD25⁺ набувають гальмуючої активності, які обмежують силу аутоагресії. Тому збільшення кількості цих клітин дозволяє попередити розвиток важких аутоімунних захворювань.

Таким чином, при лікуванні хворих на РеА додаткове використання Імодину на тлі проізапальної та етіотропної терапії сприяло стабілізації імунних механізмів, формуванню адекватної імунної відповіді, а саме збільшення Т-цитотоксичних лімфоцитів (CD3⁺CD8⁺), як ознака посилення противірусного захисту та зменшення кількості В-лімфоцитів на тлі

підвищення CD4⁺/CD25⁺-клітин (CD3+CD4⁺) як ознака зменшення аутоагресії.

Нами проведено дослідження поглинаючої та оксидативної активності нейтрофілів і моноцитів у хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) до та після лікування (Таблиці 5.3, 5.4).

Таблиця 5.3

**Фагоцитарна активність нейтрофілів і моноцитів у хворих
на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ)
до та після лікування (M±m)**

Показники		Здорові	Пацієнти РеА з <i>C. trachomatis</i> + ВЕБ до лікування	Пацієнти РеА <i>C. trachomatis</i> + ВЕБ після лікування	
				базова терапією + імодин	базова терапія
		n=25	n=43	n=20	n=23
Нейтрофіли, фагоц. акт. без стимуляції,	%	5,19±0,84	8,28±1,18*	6,18±1,65	7,02±0,78
	Г/л	0,21±0,05	0,35±0,04*	0,18±0,08 ^o	0,2±0,07
Нейтрофіли, фагоц. акт, стимуляція <i>E.coli</i> , %	%	96,5±6,14	74,5±8,02*	87,5±6,64	79,5±5,66
	Г/л	3,83±0,27	3,13±0,81	3,48±0,78	2,72±0,48
Моноцити, фагоц. акт. без стимуляції, %	%	10,2±1,23	21,7±4,34*	11,3±2,14 ^o	15,7±1,34
	Г/л	0,04±0,01	0,16±0,05*	0,05±0,01 ^o	0,12±0,03
Моноцити, фагоц. акт, стимуляція <i>E.coli</i> , %	%	80,3±5,68	55,6±8,49*	79,5±6,99 ^o	62,6±5,49
	Г/л	0,31±0,04	0,42±0,06	0,39±0,04	0,33±0,04

Примітка : * p <0,05 достовірність різниці між показниками здорових осіб та хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ); ** p <0,01 достовірність різниці між показниками здорових осіб та хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ)

^o p <0,05 достовірність різниці між показниками хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) до та після лікування; ^o p <0,05 достовірність різниці між показниками хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) до та після лікування

При порівнянні показників поглинаючої та оксидативної активності

нейтрофілів та моноцитів хворих на РеА до та після лікування з використанням базової терапії достовірних змін не виявлено ($p \geq 0,05$). Встановлено тенденцію до збільшення поглинаючої відносної активності нейтрофілів ($87,5 \pm 6,64\%$; $p \geq 0,05$) та достовірне її зростання серед моноцитів після стимуляції *E.coli* у групі пацієнтів після лікування Імодином ($79,5 \pm 6,99\%$; $p < 0,05$) порівняно з хворими до лікування відповідно ($55,6 \pm 8,49\%$).

При оцінці рівня оксидативних процесів (табл.5.4) у хворих на РеА з комбінованою інфекцією виявлена підвищена відносна ($10,2 \pm 2,64\%$) та абсолютна ($0,43 \pm 0,14$ Г/л) оксидативна активність нейтрофілів без стимуляції після лікування із застосуванням Імодину нормалізувалась ($3,90 \pm 1,24\%$, $0,15 \pm 0,05$ Г/л; $p < 0,05$). Після лікування Імодином оксидативна активність нейтрофілів після стимуляції *E.coli* була достовірно вищою ($95,1 \pm 5,49\%$; $p < 0,05$), а при використанні сильного стимулятора – форбол-12-міристат-13-ацетату (РМА) мала тенденцію до підвищення ($97,5 \pm 4,19\%$; $p > 0,05$) порівняно з хворими до лікування відповідно ($74,8 \pm 8,40\%$, $89,7 \pm 5,53\%$). При дослідженні моноцитарної ланки імунного захисту хворих на РеА з комбінованою інфекцією підвищена оксидативна активність моноцитів без стимуляції у хворих на РеА з комбінованою інфекцією ($14,4 \pm 2,66\%$) після лікування Імодином достовірно зменшилась ($6,1 \pm 0,66\%$; $p < 0,05$) і практично нормалізувалась до рівня показників здорових осіб ($5,55 \pm 0,24\%$). Знижена оксидативна активність моноцитів після стимуляції *E.coli* ($64,1 \pm 4,47\%$) та сильного стимулятора РМА ($72,5 \pm 5,80\%$) була достовірно підвищена у групі, яким застосовували Імодин відповідно ($78,1 \pm 5,08\%$, $90,5 \pm 5,65\%$; $p < 0,05$).

Таблиця 5.4

Активність «оксидативного вибуху» нейтрофілів і моноцитів у хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) до та після лікування ($M \pm m$)

Показники		Здорові	Пацієнти РеА з <i>C. trachomatis</i> + ВЕБ до лікування	Пацієнти РеА <i>C. trachomatis</i> + ВЕБ після лікування	
				базова терапія + Імодин	базова терапія
		n=25	n=43	n=20	n=23
Нейтрофіли, оксидативна акт. без стимуляції	%	3,33±0,45	10,2±2,64*	3,90±1,24 ^o	6,04±2,12
	Г/л	0,13±0,04	0,43±0,14*	0,15±0,05 ^o	0,21±0,06
Нейтрофіли, оксидативна акт., стимуляція <i>E.coli</i>	%	97,4±5,83	74,8±8,40*	95,1±5,49 ^o	89,8±7,49
	Г/л	3,87±0,42	3,14±1,02	3,83±0,16	3,45±0,60
Нейтрофіли, оксидативна акт., стимуляція fMLP	%	6,32±0,51	9,74±2,21	7,04±0,82	8,74±0,79
	Г/л	0,25±0,04	0,41±0,12	0,28±0,03	0,29±0,04
Нейтрофіли, оксидативна акт., стимуляція РМА	%	98,2±4,50	89,7±5,53	97,5±4,19	93,9±5,53
	Г/л	3,89±0,62	3,77±0,91	3,85±0,31	3,15±0,69
Моноцити, оксидативна акт. без стимуляції	%	5,55±0,24	14,4±2,66**	6,1±0,66 ^{o o}	8,10±1,86
	Г/л	0,02±0,01	0,11±0,04*	0,05±0,01	0,04±0,01
Моноцити, оксидативна акт., стимуляція <i>E.coli</i>	%	83,5±5,65	64,1±4,47**	78,1±5,08 ^o	74,1±4,39
	Г/л	0,33±0,05	0,49±0,10	0,41±0,06	0,35±0,05
Моноцити, оксидативна акт., стимуляція fMLP	%	6,04±0,53	7,38±1,29	7,01±1,09	8,05±1,04
	Г/л	0,03±0,01	0,06±0,01*	0,04±0,01	0,05±0,01
Моноцити, оксидат. акт., стимуляція РМА	%	91,3±6,97	72,5±5,80*	90,5±5,65 ^o	83,5±6,13
	Г/л	0,36±0,06	0,55±0,08	0,44±0,06	0,37±0,07

Примітка : * $p < 0,05$ достовірність різниці між показниками здорових осіб та хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ); ** $p < 0,01$ достовірність різниці між показниками здорових осіб та хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ)

^o $p < 0,05$ достовірність різниці між показниками хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) до та після лікування; ^{o o} $p < 0,05$ достовірність різниці між показниками хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) до та після лікування

Таким чином, застосування Імодину сприяло посиленню поглинаючої здатності нейтрофілів та моноцитів при стимуляції *E.coli*, та збільшенню активності оксидативного вибуху при використанні сильних стимуляторів, що може свідчити про посилення резервних можливостей фагоцитуючих клітин. Окрім цього, достовірне зниження до показників здорових осіб підвищеної оксидативної активності як нейтрофілів, так і моноцитів у хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis*+ВЕБ) свідчить про нормалізацію роботи гіперактивованих хронічною інфекцією факторів природженого імунітету [16,18].

Перенесення препарату оцінювалось на підставі суб'єктивних скарг, що повідомлялися хворими (пацієнтами), об'єктивних даних, які були отримані дослідником в ході проведення дослідження (вимірювання ЧД, ЧСС, АТ, температури тіла, огляд шкіри і слизових, пальпація, перкусія та аускультация внутрішніх органів). Враховувалася динаміка даних лабораторних обстежень (загальний аналіз крові), а також частота виникнення і характер побічних реакцій (Таблиця 5.5).

Таблиця 5.5

Шкала оцінки перенесення препарату

Види переносимості	Об'єктивна оцінка відхилень від фізіологічної норми
Добра	При об'єктивному огляді не спостерігаються будь-які патологічні зміни або клінічно значущі відхилення, не відбувається посилення вираженості суб'єктивних скарг пацієнта, дані лабораторного обстеження достовірно не змінюються і не виходять за межі норми, пацієнт не зазначає появи побічних явищ.
Задовільна	При об'єктивному огляді в динаміці виявляються незначні зміни, які носять перехідний характер і не вимагають зміни схеми лікування і проведення додаткових медичних заходів, і/або дані лабораторного обстеження незначно відхиляються від меж норми /або спостерігаються незначні побічні явища, що не завдають серйозних проблем пацієнту і не потребують відміни препарату

Незадовільна	При об'єктивному огляді в динаміці виявляються патологічні зміни, що вимагають відміни препарату і проведення додаткових медичних заходів і/або дані лабораторного обстеження зазнають клінічно значущих негативних змін, що тягне за собою необхідність додаткового обстеження та інтерпретації даних і/або має місце небажане побічне явище, яке має значний негативний вплив на стан хворого, що вимагає відміни препарату і застосування додаткових медичних заходів
--------------	--

Оцінка безпеки здійснювалася на підставі життєво важливих клінічних показників, результатів загальних лабораторних тестів, оцінки побічних реакцій; загальної оцінки перенесення, даної дослідником і пацієнтом (кожним окремо).

У хворих, які отримували Імодин спостерігалися наступні побічні реакції легкого ступеня, які не вимагали відміни препарату і проходили самостійно протягом 24 годин без призначення додаткового лікування. До них відносилися: біль в місці ін'єкції - в 2 (10 %) хворих, еритема в місці ін'єкції - 3 (15 %, біль голови - 2 (10%), субфебрильна температура протягом доби після ін'єкції - у 3 (15%) випадків.

Проведений порівняльний аналіз показників загального аналізу крові у групі хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis*+ВЕБ) до та після лікування Імодином порівняно зі здоровими особами (табл.5.6).

Аналіз безпечності застосування Імодину після проведеного лікування у хворих на РеА ми оцінювали на основі показників загального аналізу крові до та після лікування порівняно зі здоровими особами (Таблиця 5.6.) У хворих, які отримували Імодин кількість еритроцитів до і після лікування вірогідно не відрізнялося від показників здорових осіб ($p>0,05$) на тлі стабільно нормального рівня гемоглобіну, кількості лейкоцитів, еозинофілів та базофілів.

Порівняльний аналіз показників загального аналізу крові у групі хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis*+ВЕБ) до та після лікування Імодином порівняно зі здоровими особами ($M \pm m$)

Група хворих	Здорові	До лікування	Після лікування
Еритроцити, $10^{12}/л$	$4,53 \pm 0,54$	$4,63 \pm 0,42$	$4,43 \pm 0,52$
Гемоглобін, г/л	$131,1 \pm 14,13$	$128,1 \pm 19,91$	$130,1 \pm 19,91$
Лейкоцити, $10^9/л$	$6,51 \pm 0,70$	$6,81 \pm 0,92$	$7,02 \pm 0,59$
Нейтрофіли, %	$61,4 \pm 3,20$	$42,3 \pm 2,31^{**}$	$56,4 \pm 5,24$
Еозинофіли, %	$2,09 \pm 1,07$	$2,91 \pm 2,95$	$2,05 \pm 2,95$
Базофіли, %	$0,25 \pm 0,42$	$0,29 \pm 0,52$	$0,26 \pm 0,51$
Лімфоцити, %	$30,2 \pm 3,74$	$44,4 \pm 4,81^*$	$34,2 \pm 6,55$
Моноцити, %	$6,06 \pm 1,12$	$10,1 \pm 1,14^*$	$7,09 \pm 2,71$
ШОЕ, мм/год	$8,20 \pm 2,40$	$23,5 \pm 4,54^{**}$	$10,6 \pm 2,28$

Примітка. * - $p < 0,05$ порівняно з здоровими особами

Порівняно із здоровими особами знижена відносна кількість нейтрофілів до лікування ($42,3 \pm 2,31$) достовірно підвищилася після лікування ($56,4 \pm 5,24\%$; $p < 0,05$) і не відрізнялась від числа нейтрофілів у групі здорових осіб. У хворих відносна кількість лімфоцитів до лікування ($44,4 \pm 4,81\%$) була вірогідно вищою, ніж у здорових осіб ($30,2 \pm 3,74\%$), а після лікування - вірогідно зменшувалось до нормальних показників ($34,2 \pm 6,55\%$; $p < 0,05$). Кількість моноцитів у хворих до лікування була вірогідно вищою ($10,1 \pm 1,14\%$), ніж у здорових осіб ($6,06 \pm 1,12\%$; $p < 0,05$), а після лікування Імодином вірогідно знижувалася ($7,09 \pm 2,71\%$; $p < 0,05$). Аналогічні зміни спостерігалися щодо показників ШОЕ.

Таким чином у хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis*+ВЕБ) після лікування Імодином спостерігалось відновлення відносних показників нейтрофілів, лімфоцитів та моноцитів до рівня показників здорових осіб, що може слугувати ознакою хорошої переносимості та безпечності препарату

Проведена оцінка переносимості препарату Імодин на основі суб'єктивної оцінки пацієнтів та лікарів. Як видно з даних табл. 5.7 перенесення Імодину за оцінкою хворих виявилась однаковою за оцінкою лікарів і становило: «добре» – 90%, «задовільне» – 10%. Незадовільного перенесення відзначено не було.

Таблиця 5.7

**Оцінка перенесення препарату Імодин у комплексній терапії
хворих на РеА з комбінованою інфекцією (C. trachomatis+ВЕБ)
(за оцінкою хворих та висновками лікарів)**

Оцінка перенесення	Оцінка хворих		Оцінка лікарів	
	абс	%	абс	%
Добра	18	90,0	18	90,0
Задовільна	2	10,0	2	10,0
Незадовільна	0	-	0	-

Таким чином, окрім показників стану імунної системи (оцінка фенотипових властивостей лімфоцитів та активності фагоцитозу), запропонована нами система оцінки клінічної ефективності лікування хворих на РеА з комбінованою інфекцією (C. trachomatis+ВЕБ) з використанням показника індексу активності DAREА дала змогу оцінити ефективність лікування реактивного артрити. Отже застосування Імодину сприяло покращенню клінічної ефективності в 8 разів, натомість застосування лише етіотропної та протизапальної терапії сприяло покращенню клінічного стану хворих в 2,5 рази. Оцінка субпопуляційного складу лімфоцитів вказувала, що після курсу препаратом Імодин спостерігалось збільшення NK-клітин та Т-цитотоксичних - лімфоцитів на тлі зниження Т-хелперів та нормалізації Т-регуляторних лімфоцитів, що можна розцінити як посилення протівірусного захисту та зменшення аутоагресії. Після призначення препарату Імодин посилилась резервна поглинальна здатність та окисно-залежний процесінг нейтрофілів та моноцитів. Проведена оцінка безпеки застосування Імодину в

комплексній терапії реактивного артрити на тлі комбінованою інфекцією (*C. trachomatis*+ВЕБ) показала добру безпечність цього препарату. Перенесення Імодину за суб'єктивною оцінкою хворих та лікарів було однаковим і становило: «добре» – 90 % та «задовільне» – 10%.

Висновок до Розділу 5

Застосування Імодину в комплексній терапії у хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) показало клінічну ефективність за зниженням індексу DAREA в 2,51 рази та імунологічну ефективність - за нормалізацією відносної кількості Т-цитотоксичних лімфоцитів та В-лімфоцитів, у порівнянні з хворими, які отримували лише етіотропне та протизапальне лікування.

Основні положення цього розділу викладені у публікаціях автора [16,18]

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Реактивний артрит продовжує залишатись важливою медико-соціальною проблемою сучасності у зв'язку з високою розповсюдженістю серед людей різних вікових груп, особливо серед осіб молодого віку (20-40 років). У даний час РеА розглядається як мультифакторне захворювання, пов'язане з хронічною інфекцією, у розвитку якого значну роль відіграють не тільки мікроорганізми, але й стан імунної системи. При цьому інфекційний агент у порожнині суглоба може не виявлятися, однак він є лише пусковим механізмом хвороби. На сьогодні проблеми пов'язані з високою частотою РеА, складностями діагностики, залученням багатьох органів і систем та недостатньо ефективним лікуванням вимагають свого вирішення. Відсутній структурований комплексно-диференційний підхід до діагностичної та терапевтичної тактики хворих на реактивний артрит підтверджує доцільність подальшого вивчення молекулярно-генетичних, імунологічних механізмів хвороби з метою прогнозування перебігу, прийняття рішення щодо тактики ведення таких хворих та попередження розвитку важких системних ускладнень.

З використанням клінічних, загальних лабораторних, біохімічних, молекулярно-генетичних, імунологічних, інструментальних методів обстежено 88 пацієнтів з інфекційним реактивним артритом: 45 хворих з реактивним артритом спричиненим *C. trachomatis* (1-а група), 43 хворих з реактивним артритом на тлі комбінаційної інфекції *C. trachomatis* та ВЕБ (2-а група), 31 хворий на ревматоїдний артрит (3-група) та 25 здорових осіб. Обстеження хворих на РА проводилось з метою побудови математичної моделі прогнозування ризику трансформації РеА в РА за допомогою методу логістичної регресії. З метою оцінки ефективності та безпеки препарату Імодин хворих 2-ї групи на РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ) поділено випадковим способом на 2 підгрупи: 2А підгрупа (23 хворих), яким була призначена лише етіотропна та протизапальна терапія; 2В підгрупа (20

хворих), яким був призначений ліофілізований діалізат лейкоцитів "Імодин" як терапія супроводу на тлі етіотропного та протизапального лікування. Схема лікування Імодином передбачала застосування 5-ти доз: чотири основні дози (одна доза один раз на тиждень), п'ята доза вводилася через один місяць. Обстеження пацієнтів 2-ї групи проводились перед лікуванням та через 90 днів.

У хворих на РеА всіх груп переважав молодий вік ($28,4 \pm 8,39$). Вікової достовірної різниці у досліджуваних групах не виявлено ($p > 0,05$). Щодо гендерного розподілу в усіх групах хворих на РеА переважали чоловіки. Активність запального процесу за індексом DAREA була в 1,40 рази вищою у хворих на РеА з комбінованою інфекцією ($13,6 \pm 1,45$, $p < 0,05$) порівняно з групою хворих на РеА з *C. trachomatis* ($9,71 \pm 1,23$). Окрім суглобового синдрому в хворих на РеА з комбінованою інфекцією спостерігались субфебрилітет у 53,5% осіб, лімфаденопатія у 34,9% хворих, часто рецидивуючий тонзиліт у 32,6% осіб; у пацієнтів з РеА хламідійного та комбінованого генезу – увеїти, ураження нижніх відділів сечостатевої системи спостерігались відповідно у 62,2% та 55,9% хворих. ШОЕ та СРП були підвищеними в усіх досліджуваних групах пацієнтів з РеА порівняно зі здоровими ($p < 0,05$). Виявлено відносний лімфоцитоз та моноцитоз у хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis*+ВЕБ).

Частота виявлення ДНК в урогенітальному зішкрябі була більшою ніж у крові в 1,47 рази у хворих на РеА з ізольованою хламідійною інфекцією і в 1,67 рази – у хворих з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis*+ВЕБ). У групах хворих на РеА з хламідійною та комбінованою інфекціями підвищені рівні специфічних IgG до *C. trachomatis* були виявлені відповідно у 93,0% та 96,7% осіб, IgM – у 35,6% та 39,5% хворих, а IgA – у 84,5% та 79,0% пацієнтів. У хворих з РеА та комбінованою інфекцією (*C. trachomatis*+ВЕБ) ДНК ВЕБ виявлялась у 32,6% хворих в зішкрябах слизової задньої стінки глотки, у 4,65% – у слині, і у 62,8% пацієнтів одночасно у кількох біологічних середовищах в різних комбінаціях: слина + зішкряб слизової – у 55,8% кров, слина і зішкряб – у 6,98% хворих. Щодо серологічних досліджень ВЕБ-інфекції у хворих на РеА з

комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis* + ВЕБ), то у всіх пацієнтів виявлено підвищення в 6 разів титру антитіл класу IgG до ядерного антигену ВЕБ (IgG EBNA) та до капсидного антигену (IgG VCA).

У групі хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) виявлено зміну рівня miR ВЕБ BART-13 та BART-15. У хворих інших груп наявність молекул BART-13 та BART-15 була відсутньою. Так, у пацієнтів з РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) був виявлений збільшений рівень молекул BART-13 – Me=7,01 у.о. (25%=0,05; 75%=53,5), ($p<0,01$), а рівень BART-15 в цій же групі хворих становив – Me=0,56 у.о. (25%=0,01; 75%=6,33), ($p<0,01$). Виявлено значні зміни експресії miR146a та miR155 у досліджуваних групах хворих. Рівень miR146a був найбільшим та підвищеним у пацієнтів з РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis* + ВЕБ) – Me=66,8 у.о. (25%=12,0, 75%=82,0; $p<0,01$) та збільшеним у групі пацієнтів з РеА з хламідійною інфекцією Me=8,67 у.о. (25%=4,39, 75%=17,0; $p<0,01$) порівняно зі здоровими Me=0,18 у.о. (25%=0,04, 75%=0,48), при цьому рівень експресії miR146a був у 7,71 рази вищим у групі пацієнтів з РеА з комбінованою інфекцією порівняно з хворими на РеА лише з *C. trachomatis*, ($p<0,05$). Рівень miR155 був найвищим та збільшеним у пацієнтів з РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis* + ВЕБ) – Me=0,44 у.о. (25%=0,04, 75%=0,66; $p<0,01$) та збільшеним у групі пацієнтів з РеА з хламідійною інфекцією – Me=0,07 у.о. (25%=0,04, 75%=0,13; $p<0,01$) порівняно зі здоровими особами – Me=0,04 у.о. (25%=0,01, 75%=0,25). При цьому рівень молекули miR155 був у 6,29 рази вищим у групі пацієнтів з РеА з комбінованою інфекцією порівняно з хворими на РеА лише з *C. trachomatis*, ($p<0,05$). На основі проведення дослідження взаємозв'язку рівнів молекул miR146a, miR155 та BART-13 і BART-15 в групі пацієнтів з РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ) була виявлена позитивна кореляція між рівнями BART-15 та miR155 ($r=0,79$; $p<0,05$) та між BART-13 та miR146 ($r=0,62$, $p<0,05$), що може вказувати на вплив BART на miR146a та miR155, в результаті якого можливе посилення дисрегуляторних процесів.

Проведено аналіз експресії TLR9 на клітинах крові у хворих на РеА та РА залежно від активності хронічної ВЕБ-інфекції. У пацієнтів з РеА лише з *S. trachomatis* експресія TLR9 на моноцитах ($0,06 \pm 0,01\%$) виявилась в 1,50 рази меншою порівняно з хворими на РеА з комбінованою інфекцією (*S. trachomatis* + ВЕБ) ($0,09 \pm 0,01\%$; $p < 0,05$). Експресія TLR9 на лімфоцитах була більшою в 1,33 рази у хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*S. trachomatis* + ВЕБ) ($1,62 \pm 0,15\%$) порівняно з аналогічними даними хворих на РеА лише *S. trachomatis* ($1,22 \pm 0,34$; $p > 0,05$). У пацієнтів з РА, залежно від стадії активності хронічної ВЕБ-інфекції експресія TLR9 на моноцитах не відрізнялась порівняно з хворими як на РеА з комбінованою інфекцією *S. trachomatis* + ВЕБ (відповідно $0,09 \pm 0,01\%$ і $0,12 \pm 0,03\%$; $p > 0,05$), так і на РеА лише з *S. trachomatis* (відповідно $0,06 \pm 0,01\%$ і $0,09 \pm 0,02\%$; $p > 0,05$). Число TLR9+CD123+-лімфоцитів виявилось більшим на 23,2% у хворих на РА ($2,11 \pm 0,11\%$), порівняно з пацієнтами з РеА з комбінованою інфекцією *S. trachomatis* + ВЕБ ($1,62 \pm 0,15$; $p < 0,05$). Таким чином, рівень експресії TLR9+CD123+ на моноцитах та лімфоцитах був більш виражений у групі хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*S. trachomatis* + ВЕБ) порівняно з хворими на РеА з *S. trachomatis*.

Фагоцитарний показник нейтрофілів виявився підвищеним у хворих на РеА з *S. trachomatis* ($7,41 \pm 0,46\%$; $p < 0,05$) та РеА з комбінованою інфекцією *S. trachomatis* + ВЕБ ($8,28 \pm 1,18\%$; $p < 0,05$) порівняно зі здоровими особами ($5,19 \pm 0,84\%$). Поглинаюча здатність моноцитів також була підвищена у хворих на РеА з *S. trachomatis* – $17,6 \pm 2,58\%$ та з РеА з комбінованою інфекцією (*S. trachomatis*+ВЕБ) – $21,7 \pm 4,34\%$, порівняно зі здоровими особами ($10,2 \pm 1,23\%$; $p < 0,05$). Після стимуляції *E.coli* спостерігалось зниження в 1,3 рази поглинальної здатності нейтрофілів лише у групі хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*S. trachomatis* + ВЕБ) – $74,5 \pm 8,02\%$, порівняно зі здоровими особами ($96,5 \pm 6,14\%$; $p < 0,05$), що свідчить про недостатній резервний запас поглинаючої здатності цих клітин. Резервна здатність поглинальної активності моноцитів у всіх групах хворих на РеА була достовірно зниженою порівняно зі здоровими особами ($p < 0,05$).

Здатність нейтрофілів до перетравлення виявилась високою у всіх групах хворих на РеА порівняно зі здоровими особами ($p < 0,05$). Природня стимуляція оксидативної активності нейтрофілів була знижена у пацієнтів з РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) – $74,8 \pm 8,41\%$ порівняно з групою здорових осіб ($97,4 \pm 5,83\%$; $p < 0,05$). Оксидативна здатність моноцитів як в абсолютних, так і відносних показниках у всіх групах хворих на РеА виявилась вищою порівняно із здоровими особами ($p < 0,05$). Природня стимуляція оксидативної здатності моноцитів була меншою у хворих на РеА з комбінованою інфекцією *C. trachomatis* + ВЕБ ($64,1 \pm 4,47\%$; $p < 0,01$) і на РеА хламідійного генезу ($68,4 \pm 4,65\%$; $p < 0,05$) порівняно зі здоровими особами ($83,5 \pm 5,65\%$). У групі хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) спостерігалось зростання в 1,66 рази оксидативної здатності моноцитів при використанні слабого фізіологічного стимулятора – N-формілметіоніл-лейцил-фенілаланіну (fMLP) ($7,38 \pm 1,29\%$) порівняно з хворими на РеА з *C. trachomatis* ($4,45 \pm 0,60\%$; $p < 0,05$).

На основі аналізу фенотипічних особливостей лімфоцитів та їх активізаційних маркерів виявлено зниження відносної кількості CD3-CD16+/56+ у групі пацієнтів з РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ) – $9,62 \pm 0,43\%$, порівняно з хворими на РеА з *C. trachomatis* ($14,5 \pm 1,12\%$; $p < 0,001$) та з контрольною групою осіб ($12,0 \pm 0,50\%$; $p < 0,05$). Встановлено зниження відносної кількості CD3+CD8+ у хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis*+ВЕБ) – $20,1 \pm 1,73\%$ порівняно зі здоровими ($27,0 \pm 1,36\%$; $p < 0,01$). Зниження кількості відповідних лімфоцитів у хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis*+ВЕБ) може свідчити про послаблення противірусного захисту [88]. Підвищення абсолютної та відносної кількості В-клітин CD3-CD19+ в групі хворих на РеА з комбінованою інфекцією *C. trachomatis*+ВЕБ ($20,2 \pm 1,91\%$; $0,55 \pm 0,07$ Г/л) порівняно з хворими на РеА з *C. trachomatis* ($14,4 \pm 1,64\%$; $0,31 \pm 0,02$ Г/л; $p < 0,05$) та з контрольною групою здорових осіб ($14,8 \pm 0,90\%$; $0,37 \pm 0,05$ Г/л; $p < 0,05$) можна пояснити персистенцією ВЕБ в цих клітинах з активацією гуморальної ланки імунної

системи з ймовірністю формуванням аутоімунних реакцій за вказаним типом [39,46]. Збільшення маркера пізньої активації на лімфоцитах CD3+/HLA-DR+ у групах хворих на РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis* + ВЕБ) – $16,2 \pm 2,70\%$; $0,40 \pm 0,09$ Г/л порівняно з хворими на РеА з *C. trachomatis* ($12,7 \pm 1,82\%$; $0,31 \pm 0,07$ Г/л; $p > 0,05$) та з групою здорових осіб ($12,3 \pm 1,84\%$; $0,31 \pm 0,03$ Г/л; ($p > 0,05$)) може вказувати на значну і довготривалу активацію імунокомпетентних клітин, що може сприяти аутоагресії. Окрім цього у хворих на РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis* + ВЕБ) виявлено збільшення експресії на лімфоцитах антигенів CD3-/HLA-DR+ – $24,3 \pm 2,05\%$, $0,11 \pm 0,02$ Г/л порівняно з хворими на РеА з *C. trachomatis* ($21,2 \pm 3,92\%$; $0,09 \pm 0,01$ Г/л; $p > 0,05$) та зі здоровими особами ($20,4 \pm 3,51\%$; $0,08 \pm 0,02$ Г/л; $p > 0,05$). Маркер активації, пов'язаний з експресією рецептору до інтерлейкіну-2 на CD4+/CD25+ був знижений у відносних та абсолютних значеннях у групах хворих на РеА з комбінованим інфікуванням *C. trachomatis* + ВЕБ ($p > 0,05$), що може вказувати на зниження кількості регуляторних Т-клітин, а відповідно і можливий ризик зриву імунної толерантності [120].

Проведене порівняння синтезу цитокінів у сироватці крові досліджуваних груп хворих. Рівень TNF- α був підвищений у всіх досліджуваних групах хворих на РеА: у 1,82 рази при хламідійній інфекції – $18,4 \pm 3,56$ пг/мл, у 1,76 рази у пацієнтів з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis* + ВЕБ) – $17,5 \pm 3,03$ пг/мл порівняно із здоровими особами – $9,96 \pm 2,03$ пг/мл ($p < 0,05$). Концентрація IL-17 була підвищеною у всіх досліджуваних групах пацієнтів з РеА: у 2,08 рази при *C. trachomatis* – $3,45 \pm 0,78$ пг/мл та у 1,98 рази у пацієнтів з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis* + ВЕБ) – $3,29 \pm 0,73$ пг/мл порівняно із здоровими – $1,66 \pm 0,15$ пг/мл ($p < 0,05$), що може вказувати на провідну роль IL-17 у формуванні запальних реакцій [14,145]. Підвищений рівень IL-22 визначався у всіх досліджуваних групах пацієнтів з РеА: у 1,97 рази у хворих на РеА з *C. trachomatis* ($4,45 \pm 0,68$ пг/мл; $p < 0,05$), у 2,19 рази в пацієнтів з РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis* + ВЕБ) – $4,92 \pm 0,84$ пг/мл ($p < 0,01$) порівняно із здоровими – $2,25 \pm 0,53$ пг/мл. Рівень IL-23 був підвищений у 1,58

рази лише у групі пацієнтів з РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis* + ВЕБ) – $2,69 \pm 0,24$ пг/мл порівняно із здоровими особами ($1,70 \pm 0,13$ пг/мл, $p < 0,001$). Виявлено підвищений рівень у 3,05 рази IFN- γ у пацієнтів з РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis* + ВЕБ) – $1,13 \pm 0,14$ пг/мл порівняно зі здоровими ($0,37 \pm 0,09$ пг/мл; $p < 0,0001$) та в 1,71 рази в порівнянні з хворими на РеА з *C. trachomatis* – $0,66 \pm 0,11$ пг/мл ($p < 0,05$). Як відомо, порушення функціонування системи IFN- γ може призвести до розвитку не лише інфекційних (вірусних чи бактерійних) захворювань, але й аутоімунної патології. Рівень IL-10 був зниженим у 3,54 рази в групі хворих на РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ) – $0,44 \pm 0,04$ пг/мл порівняно зі здоровими ($1,56 \pm 0,29$ пг/мл, $p < 0,001$) та в 1,64 рази порівняно з пацієнтами з РеА з *C. trachomatis* – $0,72 \pm 0,09$ пг/мл ($p < 0,01$). Отримані дані можуть вказувати на більш агресивний перебіг та тривалий запальний процес на тлі зниження клітинного імунітету та порушення імунної регуляції у хворих на реактивний артрит з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis* + ВЕБ) [24]. Очевидно в цих хворих існує висока ймовірність трансформації захворювання в ревматоїдний артрит або іншу аутоімунну патологію.

При оцінці рівня кінцевих продуктів глікації в сироватці крові спостерігалось достовірне зростання концентрації AGEs у 4,07 рази ($216,6 \pm 15,4$ мкг/мл; $p < 0,0001$) у пацієнтів з РеА хламідійного генезу та у 6,60 рази ($351,1 \pm 42,4$ мкг/мл; $p < 0,0001$) у хворих на РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis* + ВЕБ) порівняно з контрольною групою осіб ($53,2 \pm 10,3$ мкг/мл). У хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) концентрація кінцевих продуктів глікації в крові була вищою в 1,62 рази порівняно з хворими на РеА лише з *C. trachomatis* ($p < 0,01$). Також виявлена значна експресія AGEs у хворих на РА, що у 10,8 рази перевищувала показники контрольної групи і складала $576,1 \pm 94,1$ мкг/мл проти $53,2 \pm 10,3$ мкг/мл ($p < 0,0001$). Найбільш висока концентрація AGE у хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) може вказувати на

інтенсивність запального процесу з ймовірністю його хронізації та формуванням аутоімунних ускладнень.

Проведено математичне моделювання на основі даних молекулярно-генетичних та імунологічних досліджень, що дало змогу визначити ризик трансформації реактивного артрити з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) в ревматоїдний артрит. Отримані дані дозволяють більш цілеспрямовано впливати на тактику лікування та профілактичні заходи для попередження розвитку трансформації РеА у важку аутоімунну патологію.

На основі отриманих нами результатів можна зробити висновки, що у хворих на РеА з комбінацією *C. trachomatis* та ВЕБ призводить до значних змін вродженого та адаптивного імунітету, що потребує застосування імуномодуючої терапії. У зв'язку з цим, ми пропонуємо до застосування лейкоцитарний імуномодулятор Імодин. Схема лікування Імодином передбачала застосування 5-ти доз: чотири основні дози (одна доза один раз на тиждень), п'ята доза вводилася через один місяць. На основі клінічних (індекс DAREА) та імунологічних (фенотипічні властивості лімфоцитів та активність фагоцитарної системи) показників досліджено ефективність та безпеку терапії супроводу Імодином у хворих на реактивний артрит з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ). Індекс DAREА у хворих до лікування становив $13,6 \pm 1,45$, а застосування Імодину сприяло покращенню клінічної ефективності в 8 разів (індекс DAREА $1,72 \pm 0,62$), що був в 2,51 рази менший порівняно з хворими на РеА, які отримували лише етіотропну та протизапальну терапії (індекс DAREА $4,31 \pm 0,91$; $p < 0,05$). Після застосування препарату Імодин оцінка субпопуляційного складу лімфоцитів дозволила встановити збільшення Т-цитотоксичних лімфоцитів ($p < 0,01$), зменшення кількості В-лімфоцитів ($p < 0,05$) та збільшення NK-клітин на тлі зниження Т-хелперів та підвищення Т-регуляторних лімфоцитів ($p > 0,05$), що можна розцінити як зменшення аутоагресії на тлі підвищення противірусного захисту. Після призначення препарату Імодин посилилась поглинальна здатність та окисно-залежний процесінг нейтрофілів та моноцитів. На основі клінічних та загальних

лабораторних параметрів була проведена оцінка безпеки застосування Імодину в комплексній терапії РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ).. Встановлено, що перенесення Імодину за оцінкою хворих та лікарів було однаковим і становило: «добре» – 90 % та «задовільно» – 10%.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі запропоновано теоретичне узагальнення імунопатогенезу інфекційного реактивного артрити на тлі колонізації хламідійної і реактивації ВЕБ-інфекції та нове вирішення підвищення ефективності лікування, раннього прогнозування ризиків трансформації реактивного артрити в ревматоїдний артрит.

1. У хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) ДНК ВЕБ виявлялась у 32,6% хворих лише в зішкрябах слизової задньої стінки глотки, у 4,65% – лише у слині, і у 62,8% пацієнтів одночасно в кількох середовищах, в тому числі в крові – у 6,98% хворих, а також слина + зішкряб слизової – у 55,82% хворих, а клініко-лабораторний індекс DAREA у цих хворих був вищим в 1,4 рази у порівнянні з хворими на РеА лише з *C. trachomatis*.

2. У групі хворих на РеА з комбінованим інфікуванням (*C. trachomatis*+ВЕБ) виявлено збільшення рівня експресії BART-13 (7,01 у.о.) та BART-15 (0,56 у.о) у порівнянні з відсутньою експресією у хворих на РеА з *C. trachomatis*; експресія регуляторних молекул системи miR була вищою: miR146 – у 7,7 рази ($p<0,05$), а miR155 – в 6,2 порівняно з групою пацієнтів з РеА лише з *C. trachomatis*; у цієї ж групи пацієнтів встановлено позитивні кореляції між молекулами BART-15 та miR155 ($r=0,79$; $p<0,05$), BART-13 та miR146 ($r=0,62$; $p<0,05$).

3. Оксидативна здатність моноцитів за умов стимуляції слабким фізіологічним стимулятором – N-формілметіоніл-лейцил-фенілаланіну (fMLP) була достовірно підвищена в 1,66 рази ($p<0,05$) у хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) в порівнянні з хворими на РеА з *C. trachomatis*; антигенпрезентуюча здатність TLR9⁺ моноцитів була вищою в 1,50 рази ($p<0,05$) та лімфоцитів в 1,33 рази у групі хворих на РеА з

комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) у порівнянні з хворими на РеА лише з *C. trachomatis*.

4. За умов оцінки фенотипування лімфоцитів у хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) виявлено знижену в 1,5 рази відносну кількість НК-клітин CD3⁻CD16⁺/56⁺ ($p < 0,05$) та підвищення в 1,4 рази відносної кількості В-лімфоцитів CD3⁻CD19⁺ ($p < 0,01$) порівняно з хворими на РеА на тлі *C. trachomatis*.

5. Визначено підвищення ІФН- γ в 1,3 рази та зниження рівня ІЛ-10 в 1,6 рази у сироватці крові хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) порівняно з хворими на РеА лише з *C. trachomatis*.

6. У хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) концентрація кінцевих продуктів глікації у сироватці крові була вищою в 1,6 рази порівняно з хворими на РеА лише з *C. trachomatis*.

7. На основі методу логістичної регресії запропоновано прогностичну математичну модель ризику трансформації реактивного артриту з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) в ревматоїдний артрит; факторами ризику, які при поєднаній дії мають вплив на ймовірність трансформації визначено: кількість копій ДНК ВЕБ в різних середовищах, CD19, miR146, BART-13, BART-15.

8. На основі зниження індексу DAREA в 2,5 рази встановлена клінічна ефективність та імунологічна ефективність - нормалізація кількості Т-цитотоксичних лімфоцитів та В-лімфоцитів, Імодину в комплексній терапії у хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) у порівнянні з хворими, які отримували лише етіотропне та протизапальне лікування.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Для верифікації вірусу Епштейна-Барр хворим на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) рекомендовано проводити в першу чергу молекулярно-генетичні дослідження з визначенням ДНК збудника (в першу чергу ВЕБ) в трьох біологічних середовищах (кров, слина, зішкряб слизової задньої стінки глотки), серологічні дослідження специфічного антитілоутворення.

2. Для визначення активності запального процесу у хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) рекомендуємо використовувати індекс активності DAREA.

3. З метою підвищення ефективності лікування на основі аналізу фенотипування ліфоцитів та консультації лікаря клінічного імунолога хворих на РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) запропоновано в якості терапії супроводу застосування імуномодуючого препарату Імодин 5 доз: (4 дози 1 раз в тиждень, 5-а - через місяць).

4. Запропоновано математичну модель прогнозування ризиків розвитку трансформації РеА з комбінованою інфекцією (*C. trachomatis* + ВЕБ) в ревматоїдний артрит.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Бадокин В. В. Основные симптомомодифицирующие препараты замедленного действия в терапии остеоартроза. *Consilium medicum*. 2010. Т. 12(9). С. 10–14.
2. Бойко Я. Є. Реактивний артрит — найчастіше ревматологічне захворювання дитячого віку. *Дитячий лікар*. 2009. № 1. С. 25–28.
3. Волков М. Ю. Роль Toll-подобных рецепторов и их эндогенных лигандов в патогенезе ревматоидного артрита (обзор литературы). *Науч.-практ. ревматология*. 2016. № 1(54). С. 78–85.
4. Грішина О. І. Ревматоїдний артрит та вірус Епштейна-Барр. *Annals of Mechnikov Institute*. 2008. № 4. С. 14–18.
5. Драннік Г. М., Дріянська В. Є., Гайсенюк Ф. З., Степанова Н. М., Руденко А. В., Савченко В. С., Кругліков В. Т., Калініна Н. А., Корніліна О. М., Лебідь Л. О., Лавренчук О. В., Сидоренко Є. В., Романенко О. А. Особливості імунітету у хворих на інфекції сечової системи та можливі механізми їх хронічного перебігу. *Імунологія та алергологія: наука і практика*. 2011. № 3. С. 61–71.
6. Железникова Г. Ф. Регуляторные Т-лимфоциты в иммунном ответе на инфекцию. *Журн. инфектологии*. 2011. № 3(1). С. 6–13.
7. Журавлёва М. О. Оценка эффективности и переносимости различных по длительности курсов применения азитромицина (сумамеда) при урогенном реактивном артрите. *Ревматология*. 2014. №1. С. 31–35.
8. Журавлёва М. О., Багирова Г. Г. Клиника и диагностика реактивного артрита. *Ревматология*. 2010. № 10(75). С. 65–71.
9. Зубченко С. О., Маруняк С. Р., Ломіковська М. П. Дослідження впливу хронічної Епштейна-Барр вірусної інфекції на рівень експресії miR-146a та miR-155 у пацієнтів з алергопатологією. *Укр. журн. медицини, біології та спорту*. 2019. Т. 4, № 4. С. 77–83.

10. Зубченко С. О., Потьомкіна Г. О., Ломіковська М. П. Дослідження асоціативних зв'язків хронічної Епштейна-Барр вірусної інфекції в стадії реплікативної активності у пацієнтів з алергопатологією. *Імунологія та алергологія: наука і практика*. 2016. № 1–2. С. 49.
11. Инструкция по применению набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК вируса Эпштейна-Барр (EBV) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) сгибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® EBV-скрин/монитор-FL»: утв. Приказом Росздравнадзора от 15.05.2012, № 2353-Пр/12 / Федерал. бюджет. учреждение науки «Центр. науч.-исслед. ин-т эпидемиологии». Москва, 2012.
URL: <https://www.amplisens.ru/upload/iblock/5ec/EBV-skrin-monitor-FL.pdf>
(дата обращения: 11.02.2021).
12. Корецкая Є. В. Динаміка рівня цитокінів під впливом діалізату лейкоцитів ліофілізованого (Імодину) на фоні алергоспецифічної імунотерапії (АСІТ) пилковими алергенами у хворих на поліноз. *Медичні перспективи*. 2018. № 23(1). С. 77–82.
13. Корнійчук О. П., Мельник О. В., Личковська Н. Е. Реактивні артрити та інфекційні чинники. *Клін. та експерим. патологія*. 2012. Т. 11, № 1(39). С. 181–185.
14. Костарева О. С., Габдулхаков А. Г., Коляденко И. А., Гарбер М. Б., Тищенко С. В. Интерлейкин-17: функциональные и структурные особенности; использование в качестве терапевтической мишени. *Успехи биол. химии*. 2019. Т. 59. С. 393–418.
15. Ломіковська М. П. Реактивні артрити на тлі Епштейна-Барр вірусної інфекції. *Контроверсійні питання сучасної клінічної медицини* : тези 2-ї загальноунів. наук.-практ. конф. молодих вчених і спеціалістів. Львів, 2013. С. 47–48.
16. Ломіковська М. П., Потьомкіна Г. О. Вивчення ефективності застосування ліофілізованого діалізату лейкоцитів у хворих на

- реактивний артрит, викликаний Епштейна-Барр вірусом. *Медикаментозна алергія: мультидисциплінарний підхід* : матеріали наук.-практ. конф. Львів, 2017. С.12–14.
17. Ломіковська М. П., Потьомкіна Г. О., Горбаль Н. М. Клініка, діагностика та стан імунної системи у хворих на реактивний артрит на тлі вірусної інфекції Епштейна-Барр. *Укр. ревматол. журн.* 2015. № 61(3): Стандартизовані підходи до діагностики та лікування ревматичних хвороб : тези наук. доп. VI наук.-практ. конф. Асоціації ревматологів України, 22–23 жовт. 2015 р, Київ. Київ, 2015. С. 91.
 18. Ломіковська М. П., Потьомкіна Г. О., Ліщук-Якимович Х. О., Горбаль Н. М. Оцінка ефективності препарату Імодин у хворих на Епштейна-Барр вірусний реактивний артрит. *Хронічні неінфекційні захворювання: заходи профілактики і боротьби з ускладненнями* : матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 5 листоп. 2015, м. Харків. 2015. С. 223.
 19. Ломіковська М., Кріль І., Потьомкіна Г., Чопяк В. Цитокіновий профіль у пацієнтів з реактивним артритом, спричиненим *Chlamydia trachomatis* та вірусом Епштейна-Барра. *Праці Наукового товариства імені Шевченка. Медичні науки.* 2019. Т. 57, № 2. С. 122–127.
 20. Ломіковська М. П., Кріль І. Й., Чопяк В. В. Особливості лімфоцитарного пулу у крові пацієнтів з реактивним артритом на тлі Епштейна–Барр вірусної та хламідійної інфекції. *Експерим. та клін. фізіологія і біохімія.* 2019. № 3(87). С. 44–50.
 21. Ломіковська М. П., Кріль І. Й., Чопяк В. В. Фагоцитарна активність нейтрофілів та моноцитів у пацієнтів з реактивним артритом, спричиненим хламідійною та Епштейна-Барр вірусною інфекціями. *Львів. мед. часопис.* 2019. Т. 25, № 4. С. 30-35. doi: 10.25040/am12019.04.030.
 22. Луцкий А. А, Жирков А. А, Лобзин Д. Ю., Рао М., Алексеева Л. А., Мейрер М., Лобзин Ю. В. Интерферон-γ: биологическая функция и значение для диагностики клеточного иммунного ответа. *Журнал*

- инфектологии. 2015. Т. 7, № 4. С. 10–22. [doi: 10.22625/2072-6732-2015-7-4-10-22](https://doi.org/10.22625/2072-6732-2015-7-4-10-22).
23. Лядова Т. И. Генотипы вируса Епштейна-Барр у пациентов с различными формами инфекции. *Сучасн. пробл. медицини*. 2017. № 4. С. 60–65.
 24. Лядова Т. И., Волобуєва О. В., Гололобова О. В., Шепелева Н. В. Типы иммунного ответа при различных формах Епштейна-Барр-вирусной инфекции. *Міжнар. мед. журн.* 2017. Т. 23, № 1. С. 70–76.
 25. Лядова Т. І. Дослідження поширеності поліморфізму гену TLR 9 типу у хворих на інфекційний мононуклеоз, викликаний вірусом Епштейна-Барр. *ScienceRise: Medical Science*. 2017. № 10(18). С. 24–28.
 26. Ногаева М. Г., Исаева Б. Г. Эффективность нестероидных противовоспалительных препаратов в купировании воспалительного процесса при реактивном артрите. *Клин. геронтология*. 2010. Т. 16, № 3–4. С. 15–19.
 27. Пострелко М. Д. Роль инфекций, передаваемых преимущественно половым путём, в развитии реактивного артрита. *Соврем. пробл. науки и образования*. 2013. № 2. С. 15–23.
 28. Потьомкіна Г. О., Чоп'як В. В., Ломіковська М. П., Кріль І. Й. Поширеність реактивного артриту на тлі Епштейн-Барр вірусної інфекції серед студентської молоді. *Досвід, реалії і перспективи розвитку систем охорони здоров'я* : тези доп. Укр.-поль. симпозіуму. Львів, 2013. С. 540–542.
 29. Райт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология : пер. с англ. Москва, 2000. С. 83–96.
 30. Руденко А. В., Кругликов В. Т. Иммуноферментный анализ: 30-летний опыт диагностической практики. *Лабор. диагностика*. 1999. № 3. С. 11–20.
 31. Сиротко О. В. Актуальные вопросы дифференциальной диагностики ревматоидного и реактивного артритов. *Вестн. Витеб. гос. мед. ун-та*. 2010. Т. 9, № 4. С. 75–84.

32. Сорока Н. Ф. Ревматоидный артрит, ассоциированный с хламидийной инфекцией. *Здравоохранение*. 2009. Т. 1. С. 4–9.
33. Спаська Г. О. Реактивный артрит: сучасний погляд на проблему. *Укр. мед. часопис*. 2011. № 6(86). С. 42–48.
34. Строй О. О., Банира О. Б., Досенко В. Є. Цінність мікро-РНК 508-3р у діагностиці раку нирки. *Укр. мед. часопис*. 2012. № 6(92). С. 118–121.
35. Чоп'як В. В., Потьомкіна Г. О., Кріль І. Й. Скринінг студентської молоді на поширеність хламідійної інфекції. *Імунологія та алергологія: наука і практика (додаток)*. 2012. №3. С. 57–59.
36. Akira S., Takeda K. Toll-like receptor signaling. *Nat. Rev. Immunol.* 2004. No. 4(7). P. 499–511. doi: 10.1038/nri1391.
37. Akirav E. M., Preston-Hurlburt P., Garyu J., Henegariu O., Clynes R., Schmidt A. M., Kevan C. H. RAGE Expression in Human T Cells: A link between environmental factors and adaptive immune responses. *PLoS ONE*. 2012. Vol. 7, No. 4. Article ID e34698. doi: 10.1371/journal.pone.0034698.
38. Alivernini S., Gremese E., McSharry C., Tolusso B., Ferraccioli G., McInnes I. B., Kurowska-Stolarska M. MicroRNA-155-at the critical interface of innate and adaptive immunity in arthritis. *Frontiers in Immunology*. 2018. Vol. 8. Article ID 1932. doi: [10.3389/fimmu.2017.01932](https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01932).
39. Amital H., Govoni M., Maya R., Meroni P. L., Ori B., Shoenfeld Y., Tincani A., Trotta F., Sarzi-Puttini P., Atzeni F. Role of infectious agents in systemic rheumatic diseases. *Clin. and Exp. Rheumatol.* 2008. No. 26. P. 27–32.
40. Arnaudov A., Kostova Z. Dialysable leukocyte extracts in immunotherapy. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2015. Vol. 29, Is. 6. P. 1017–1023.
41. Autoimmunity. From bench to bedside. Bogota : El Rosario University Press, 2013. 856 p.
42. Baiyee E. E., Flohe S., Lendemans S., Bauer S., Mueller N., Kreuzfelder E., Grosse-Wilde H. Expression and function of Toll-like receptor 9 in severely

- injured patients prone to sepsis. *Clin. and Exp. Immunol.* 2006. Vol. 145. P. 456–462. doi: [10.1111/j.1365-2249.2006.03160.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03160.x).
43. Baulina N. M., Kulakova O. G., Favorova O. O. MicroRNAs: The role in autoimmune inflammation. *Acta Naturae*. 2016. Vol. 8(28). P. 21–33.
 44. Bierhaus A., Stern D. M., Nawroth P. P. RAGE in inflammation: a new therapeutic target? *Curr. Opinion Inv. Drugs*. 2006. Vol. 7(11). P. 985–991.
 45. Bourke E., Bosisio D., Golay J., Polentarutti N., Mantovani A. The Toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. *Blood*. 2003. Vol. 102(3). P. 956–963. doi: 10.1182/blood-2002-11-3355.
 46. Burgos R., Ordoñez G., Vázquez-Mellado J., Pineda B., Sotelo J. Occasional presence of herpes viruses in synovial fluid and blood from patients with rheumatoid arthritis and axial spondyloarthritis. *Clin. Rheumatol.* 2015. Vol. 34. P. 1681–1686. doi:10.1007/s10067-015-2974-2.
 47. Byrne G. I. Chlamydia trachomatis strains and virulence: rethinking links to infection prevalence and disease severity. *JID*. 2010. Vol. 201 (Suppl 2). P. 126–131.
 48. Cañete J. D., Martínez S. E., Farrés J., Sanmartí R., Blay M., Gómez A., Salvador G., Munoz-Gomez J. Differential Th1/Th2 cytokine patterns in chronic arthritis: interferon γ is highly expressed in synovium of rheumatoid arthritis compared with seronegative spondyloarthropathies. *Ann. Rheum. Dis.* 2000. Vol. 59(4). P. 263–268. doi: [10.1136/ard.59.4.263](https://doi.org/10.1136/ard.59.4.263).
 49. Carter J. D., Hudson A. P. Chlamydia-induced reactive arthritis: the potential for eradication. *Int. J. Clin. Rheumatol.* 2010. Vol. 5(5). P. 505–508.
 50. Chuah Y. K., Basir R., Talib H., Tie T. H., Nordin N. Receptor for advanced glycation end products and its involvement in inflammatory diseases. *Int. J. Inflam.* 2013. Article ID 403460. doi: 10.1155/2013/403460.
 51. Clynes R., Moser B., Yan S. F., Ramasamy R., Herold K., Schmidt A. M., Receptor for AGE (RAGE): weaving tangled webs within the inflammatory response. *Curr. Mol. Med.* 2007. Vol. 7(8). P. 743–751.

52. Costenbader K. H., Karlson E. W. Epstein–Barr virus and rheumatoid arthritis: is there a link? *Arthritis Research & Therapy*. 2006. Vol. 8. P. 204–210. doi: 10.1186/ar1893.
53. Draborg A. H., Duus K., Houen G. Epstein-Barr virus in systemic autoimmune diseases. *Clin. Dev. Immunol.* 2013. Article ID-535738. doi: [10.1155/2013/535738](https://doi.org/10.1155/2013/535738).
54. Dreyfus D. H. Genetics and molecular biology of Epstein-Barr virus-encoded BART microRNA: a paradigm for viral modulation of host immune response genes and genome stability. *J. Immunol. Res.* 2017. Article ID 4758539. doi: [10.1155/2017/4758539](https://doi.org/10.1155/2017/4758539).
55. Drinda S., Franke S., Canet C. C., Petrow P., Bräuer R., Hüttich C., Stein G., Hein G. Identification of the advanced glycation end products Nε-carboxymethyllysine in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2002. Vol. 61. P. 488–492. doi: [10.1136/ard.61.6.488](https://doi.org/10.1136/ard.61.6.488).
56. Dudakov J. A., Hanash A. M., Brink M. R. M. van den. Interleukin-22: immunobiology and pathology. *Annu. Rev. Immunol.* 2015. Vol. 33. P. 747–785. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112123.
57. Eaton-Bassiri A., Dillon S. B., Cunningham M., Ryczyn M. A., Mills J., Sarisky R. T., Mbow M. L. Toll-Like receptor 9 can be expressed at the cell surface of distinct populations of tonsils and human peripheral blood mononuclear cells. *Infection and Immunity*. 2004. Vol. 72(12). P. 7202–7211.
58. Eberl G., Studnicka-Benke A., Hitzelhammer H., Gschnait F., Smolen J. S. Development of a disease activity index for the assessment of reactive arthritis (DAREA). *Rheumatology*. 2009. Vol. 2. P. 148–155.
59. Eliçabe R. J., Di Genaro M. S. Immunopathogenesis of reactive arthritis: role of the cytokines. *World J. Immunol.* 2014. Vol. 4(2). P. 78–87.
60. Elsayed H. M., Khater W. S., Ibrahim A. A., Hamdy M. S., Morshedy N. A. MicroRNA-146a expression as a potential biomarker for rheumatoid arthritis in Egypt. *Egypt J. Med. Hum. Gen.* 2017. Vol. 18. P. 173–179.

61. Evaluation of precision of quantitative measurements procedures; approved guideline. 3-rd ed. Wayne, PA : Clinical and laboratory standards institute; 2014. 120 p.
62. Farina A., Cirone M., York M., Lenna S., Padilla C., McLaughlin S., Faggioni A., Lafyatis R., Trojanowska M., Farina G. A. Epstein–Barr virus infection induces aberrant TLR activation pathway and fibroblast–myofibroblast conversion in scleroderma. *J. Inv. Dermatol.* 2014. Vol. 134(4). P. 954–964. doi: [10.1038/jid.2013.423](https://doi.org/10.1038/jid.2013.423).
63. Fiola S., Gosselin D., Takada K., Gosselin J. TLR9 contributes to the recognition of EBV by primary monocytes and plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* 2010. Vol. 185. P. 3620–3631. doi: [10.4049/jimmunol.0903736](https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903736).
64. Forte E., Luftig M. A. The role of microRNAs in Epstein-Barr virus latency and lytic reactivation. *Microbes Infect.* 2011. Vol. 13(14–15). P. 1156–1167. doi: [10.1016/j.micinf.2011.07.007](https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.07.007).
65. Fujiwara Sh., Takei M. Epstein-Barr virus and autoimmune diseases. *Clin. and Experim. Neuroimmunology.* 2015. Vol. 6(1). P. 38–48.
66. Füst G. The role of the Epstein-Barr virus in the pathogenesis of some autoimmune disorders – similarities and differences. *Eur. J. Microbiol. Immunol.* 2011. Vol. 1(4). P. 267–278.
67. Gao L., Ai J., Xie Z., Zhou Ch., Liu C., Zhang H., Shen K. Dynamic expression of viral and cellular microRNAs in infectious mononucleosis caused by primary Epstein-Barr virus infection in children. *Viol. J.* 2015. Vol. 12. P. 208–218. doi: [10.1186/s12985-015-0441-y](https://doi.org/10.1186/s12985-015-0441-y).
68. Gaston J. S. H. Immunological basis of chlamydia induced reactive arthritis. *Sex. Transm. Inf.* 2000. Vol. 76, Is. . P. 156–161. doi: [10.1136/sti.76.3.156](https://doi.org/10.1136/sti.76.3.156).
69. Gatto G., Rossi A., Rossi D., Kroening S., Bonatti S., Mallardo M. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 trans-activates miR-155 transcription through the NF- κ B pathway. *Nucleic Acids Research.* 2008. Vol. 36(20), P. 6608–6619. doi: [10.1093/nar/gkn666](https://doi.org/10.1093/nar/gkn666).

70. Golob J., Jakobisiak M., Lasek W., Stoklosa T. Immunologia. Warszawa : PWN, 2015. 498 s.
71. Groot L., Hinkema H., Westra J., Smit A. J., Kallenberg G. M., Bijl M., Posthumus M. D. Advanced glycation endproducts are increased in rheumatoid arthritis patients with controlled disease. *Arthritis Res. Ther.* 2011. Vol. 13(6). R 205. doi: [10.1186/ar3538](https://doi.org/10.1186/ar3538).
72. Gu L., Li H., Chen L., Ma X., Gao Y., Li X., Zhang Y., Fan Y., Zhang X. MicroRNAs as prognostic molecular signatures in renal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2015. Vol. 6 (32). P. 32545–32560. doi: [10.18632/oncotarget.5324](https://doi.org/10.18632/oncotarget.5324).
73. Gupta R., Misra R. Microbe-triggered arthropathies: reactive arthritis and beyond. *Int. J. Rheum. Dis.* 2016. Vol. 19. P. 437–439. doi: 10.1111/1756-185X.12920.
74. Hamdulay S. S., Glynne S. J., Keat A. When is arthritis reactive? *Postgrad Med. J.* 2006. Vol. 82. P. 446–453. doi: 10.1136/pgmj.2005.044057.
75. Hein G., Wiegand R., Lehmann G., Stein G., Franke S. Advanced glycation end-products pentosidine and N epsilon-carboxymethyllysine are elevated in serum of patients with osteoporosis. *Rheumatology*. 2003. Vol. 42(10). P. 1242–1246. doi: 10.1093/rheumatology/keg324.
76. Holland R., Barnsley L., Barnsley L. Viral arthritis. *Focus Rheumatology*. 2013. Vol. 42, No. 11. P. 770–773.
77. Huang R-Y., Wu J-Q., Liu Z-H., Sun S-L. MicroRNAs in rheumatoid arthritis: what is the latest with regards to diagnostics? *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2019. Vol. 19(5). P. 363–366. doi: 10.1080/14737159.2019.1599716.
78. Iskra S., Kalla M., Delecluse H. J., Hammerschmidt W., Moosmann A. Toll-like receptor agonists synergistically increase proliferation and activation of B cells by Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 2010. Vol. 84(7). P. 3612–3623. doi: 10.1128/JVI.01400-09.
79. Jackson S. W., Scharping N. E., Kolhatkar N. S., Khim S., Schwartz M. A., Li Q-Z., Hudkins K. L., Alpers C. E., Liggitt D., Rawlings D. Opposing impact

- of B cell intrinsic TLR7 and TLR9 signals on autoantibody repertoire and systemic inflammation. *J. Immunol.* 2014. Vol. 192(10). P. 4525–4532. doi: [10.4049/jimmunol.1400098](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400098).
80. Jassim N. S., Aboud R. S., Joda A. T., Fadil H. Y., Al_Humadani F. G., Ahmed D. M., Husaen M. A. Detection of Epstein-Barr virus capsid antigen (EBV CA) in sera of rheumatoid arthritis, reactive arthritis and ankylosing spondylitis patients. *Iraqi Journal of Science.* 2015. Vol. 56(4B). P. 3130–3134.
 81. Jesus O. de, Smith P. R., Spender L. C., Karstegl C. E., Niller H. H., Huang D., Farrell P. J. Updated Epstein-Barr virus (EBV) DNA sequence and analysis of a promoter for the BART (CST, BARF0) RNAs of EBV. *J. Gen. Virol.* 2003. Vol. 84(Pt 6). P. 1443–1450. doi: 10.1099/vir.0.19054-0.
 82. Kang M. S., Kieff E. Epstein-Barr virus latent genes. *Experimental & Molecular Medicine.* 2015. Vol. 47. Article ID 131. doi: [10.1038/emm.2014.84](https://doi.org/10.1038/emm.2014.84).
 83. Kellow N. J., Coughlan M. T. Effect of diet-derived advanced glycation end products on inflammation. *Nutr. Rev.* 2015. Vol. 73(11). P. 737–759. doi: [10.1093/nutrit/nuv030](https://doi.org/10.1093/nutrit/nuv030).
 84. Keyel P. A. How is inflammation initiated? Individual influences of IL-1, IL-18 and HMGB1. *Cytokine.* 2014. Vol. 69(1). P. 136–145. doi: 10.1016/j.cyto.2014.03.007.
 85. Khalifian S., Raimondi G., Brandacher G. The use of luminex assays to measure cytokines. *J. Invest. Dermatol.* 2015. Vol. 135(4). P. 1–5. doi: 10.1038/jid.2015.36.
 86. Kim T. H., Uhm W.-S., Inmanb R. D. Pathogenesis of ankylosing spondylitis and reactive arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2005. Vol. 17. P. 400–405. doi: 10.1097/01.bor.0000163447.44037.c4.
 87. Kim W.-U., Sreih A., Bucala R. Toll-like receptors in systemic lupus erythematosus prospects for therapeutic intervention. *Autoimmun. Rev.* 2009. Vol. 8(3). P. 204–208. doi: [10.1016/j.autrev.2008.07.046](https://doi.org/10.1016/j.autrev.2008.07.046).

88. Kimura H., Cohen J. I. Chronic active Epstein-Barr virus disease. *Front. Immunol.* 2017. Vol. 8. P. 1867. doi: 10.3389/fimmu.2017.01867.
89. Krzystek-Korpacka M., Diakowska D., Neubauer K., Gamian A. Circulating midkine in malignant and non-malignant colorectal diseases. *Cytokine.* 2013. Vol. 64(1). P. 158–164. doi: 10.1016/j.cyto.2013.07.008.
90. Kwiatkowska B., Filipowicz-Sosnowska A. Reactive arthritis. *Pol. archiw. med. wewn.* 2009. Vol. 119(1–2). P. 60–65.
91. Kwiatkowska B., Maślińska M. Postępy w diagnostyce i leczeniu reaktywnego zapalenia stawów. *Reumatologia.* 2011. Vol. 49(5). P. 354–360.
92. Lacerte P., Brunet A., Egarnes B., Duchêne B., Brown J. P., Gosselin J. Overexpression of TLR2 and TLR9 on monocyte subsets of active rheumatoid arthritis patients contributes to enhance responsiveness to TLR agonists. *Arthritis Res. Therapy.* 2016. Vol. 18. P. 10. doi: 10.1186/s13075-015-0901-1.
93. Lancaster G. I., Khan Q., Drysdale P., Wallace F., Jeukendrup A. E., Drayson M. T., Gleeson M. The physiological regulation of toll-like receptor expression and function in humans. *J. Physiol.* 2005. Vol. 563(Pt 3). P. 945–955. doi: [10.1113/jphysiol.2004.081224](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.081224).
94. Lanjouw E., Ouburg S., Vries H. J. de, Stary A., Radcliffe K., Unemo M. 2015 European guideline on the management of Chlamydia trachomatis infections. *Int. J. STD & AIDS.* 2016. Vol. 27(5). P. 333–348. doi: 10.1177/0956462415618837.
95. Lee J. S., Chung Y.-S., Chang S. Y., Jung Y. S., Kim S. H. Simple quantification of pentosidine in human urine and plasma by high-performance liquid chromatography. *Int. J. Anal. Chem.* 2017. Article ID 1389807. doi: 10.1155/2017/1389807.
96. Lee S. H., Kwon J. Y., Kim S.-Y., Jung K., Cho Ml. Interferon-gamma regulates inflammatory cell death by targeting necroptosis in experimental autoimmune arthritis. *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7(1). Article ID 10133. doi: 10.1038/s41598-017-09767-0.

97. Leifer C. A., Kennedy M. N., Mazzoni A., Lee Ch. W., Kruhlak M. J., Segal D. M. TLR9 is localized in the endoplasmic reticulum prior to stimulation. *J. Immunol.* 2004. Vol. 173. P. 1179–1183. doi: 10.4049/jimmunol.173.2.1179.
98. Leifer C. A., Brooks J. C., Hoelzer K., Lopez J., Kennedy M. N., Mazzoni A., Segal D. M. Cytoplasmic targeting motifs control localization of toll-like receptor 9. *J. Biol. Chem.* 2006. Vol 281(46). P. 35585–35592. doi: 10.1074/jbc.M607511200.
99. Leszek J., Malyszczak K., Bartys' A., Staniszevska M., Gamian A. Analysis of serum of patients with Alzheimer's disease for the level of advanced glycation end products. *Am. J. Alzheimer's Dis. Dem.* 2006. Vol. 21(5). P. 360–365.
100. Li L., Chen X.-P., Li Y.-J. MicroRNA-146a and human disease. *Scan. J. Immunol.* 2010. Vol. 71. P. 227–231. doi: 10.1111/j.1365-3083.2012.02383.x.
101. Li S., Yu Y., Yue Y., Zhang Zh., Su K. Microbial infection and rheumatoid arthritis. *J. Clin. Cell. Immunol.* 2013. Vol 4, Is 6. Article ID 1000174. doi: 10.4172/2155-9899.1000174.
102. Li X., Tian F., Wang F. Rheumatoid arthritis-associated microRNA-155 targets SOCS1 and upregulates TNF- α and IL-1 β in PBMCs. *Int. J. Mol. Sci.* 2013. Vol. 14. P. 23910–23921. doi: 10.3390/ijms141223910.
103. Linnstaedt S. D., Gottwein E., Skalsky R. L., Luftig M. A., Cullen B. R. Virally induced cellular microRNA miR-155 plays a key role in B-cell immortalization by Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 2010. Vol. 84(22). P. 11670–11678. doi: [10.1128/JVI.01248-10](https://doi.org/10.1128/JVI.01248-10).
104. Loeser R. F., Yammani R. R., Carlson C. S., Chen H., Cole A., Im H. J., Bursh L. S., Yan S. D. Articular chondrocytes express the receptor for advanced glycation end products: Potential role in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2005. Vol. 52(8). P. 2376–2385. doi: 10.1002/art.21199.
105. Lomikovska M. Clinical picture, diagnostics and condition of immune system in patients with reactive arthritis against the background of Epstein-Barr virus

- infection. *11th International conference of allergy, asthma and clinical immunology*, 7-8 Sept 2017, Edinburgh : conference materials. Edinburgh, 2017. P.23.
106. Lomikovska M. P., Hayduchok I. G., Potomkina H. O., Zubchenko S. O., Kril I. Y., Ishcheykin K. Y., Chopyak V. V. Peculiarities of TLR9 expression on immune competent cells in reactive arthritis patients with chronic Epstein-Barr virus infection. *World of Medicine and Biology*. 2020. No. 1. P. 083–088.
 107. Lomikovska M. P., Hayduchok I. G., Potomkina H. O., Zubchenko S. O., Kril I. Y., Ishcheykin K. Y., Chopyak V. V. Peculiarities of TLR9 expression on immune competent cells in reactive arthritis patients with chronic Epstein-Barr virus infection. *World of Medicine and Biology*. 2020. Vol. 1(71). P. 083–088.
 108. Lomikovska M., Chopyak V., Potomkina H., Kril I. Peculiarities of TLR9 expression on immunocompetent cells in patients with the reactive arthritis induced by the Epstein-Barr viral infection and the rheumatoid arthritis. *Allergy*. 2019. Vol. 74. P. 466.
 109. Lomikovska M., Zubchenko S., Lishchuk-Yakymovych K. Clinical and immunological features of reactive arthritis on the background of the Epstein-Barr virus. *Allergy*. 2018. N 73. P. 763.
 110. López J. R., Ortiz K. A., Carrión F. G., Castillo J. B. Reactive arthritis due to Epstein-Barr virus. *Revista Cubana de Reumatologia*. 2016. Vol 18(3). P. 287–290.
 111. Lossius A., Johansen J. N., Torkildsen O., Vartdal F., Holmøy T. Epstein-Barr virus in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and multiple sclerosis—association and causation. *Viruses*. 2012. Vol. 4(12). P. 3701–3730. doi: 10.3390/v4123701.
 112. Lun A., Schmitt M., Renz H. Phagocytosis and oxidative burst: reference values for flow cytometric assays independent of age. *Clin. Chem*. 2000. Vol. 46(11). P. 1836–1839.
 113. Łysenko L., Mierzczała M., Gamian A., Durek G., Kübler A., Kozłowski R., Śliwiński M. The effect of packed red blood cell storage on arachidonic acid

- and advanced glycation end-product formation. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* (Warsz). 2006. No. 54(5). P. 357–362.
114. Maness D. L., Martin M., Mitchel G. poststreptococcal illness: recognition and management. *Am. Fam. Physician.* 2018. Vol. 97(8). P. 517–522.
 115. Marks M., Marks J. L. Viral arthritis. *Clin. Med.* (Lond). 2016. Vol. 16(2). P. 129–134. doi: 10.7861/clinmedicine.16-2-129.
 116. Martorelli D., Muraro E., Merlo A., Turrini R., Fae D. A., Rosato A., Dolcetti R. exploiting the interplay between innate and adaptive immunity to improve immunotherapeutic strategies for Epstein-Barr-Virus-Driven disorders. *Clin. Dev. Immunol.* 2012. Vol. 3. Article ID 931952. doi: 10.1155/2012/931952.
 117. Mascellino M. T., Boccia P., Oliva A. Immunopathogenesis in chlamydia trachomatis infected women. *ISRN Obstet. Gynecol.* 2011. Article ID 436936. doi: 10.5402/2011/436936.
 118. Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline. 3-rd ed. CLSI document EP09-A3. Wayne, PA : Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013. 82 p.
 119. Moghimi B., Gharibi S., Yazd E. F/, Tahoori M. D., Kalantar S. M. Role of miR-146a in immune system and autoimmunity. *Int. J. Med. Lab.* 2016. Vol. 3(3). P. 150–158.
 120. Moradi B., Schnatzer Ph., Hagmann S., Rosshirt N., Gotterbarm T., Kretzer J. Ph., Thomsen M., Lorenz H.-M., Zeifang F., Tretter T. CD4⁺CD25^{+/high}CD127^{low/} – regulatory T cells are enriched in rheumatoid arthritis and osteoarthritis joints—analysis of frequency and phenotype in synovial membrane, synovial fluid and peripheral blood. *Arthritis Res. Ther.* 2014. Vol. 16(2). Article ID 97. doi: [10.1186/ar4545](https://doi.org/10.1186/ar4545).
 121. Moran-Moguel M. C., Rio S. P. del, Mayorquin-Galvan E. E., Zavala-Cerna M. G. Rheumatoid arthritis and miRNAs: a critical review through a functional view. *J. Immunol. Res.* 2018. Mar 29. Article ID 2474529. doi: 10.1155/2018/2474529.

122. Moss N. W., Lee N., Pimienta G., Steitz J. A. RNA families in Epstein-Barr virus. *RNA Biology*. 2014. Vol. 11(1). P. 10–17. doi: [10.4161/rna.27488](https://doi.org/10.4161/rna.27488).
123. Mukherjee S., Kar M. Reactive Arthritis: Current Perspectives. *J. Indian. Academy Clin. Med.* 2000. Vol. 1(3). P. 233–238.
124. Murer A., Rühl J., Zbinden A., Capaul R., Hammerschmidt W., Chijiok O., Muns C. MicroRNAs of Epstein-Barr virus attenuate T-cell-mediated immune control in vivo. *mBio*. 2019. Vol. 10(1). Article ID e01941-18. doi: [10.1128/mBio.01941-18](https://doi.org/10.1128/mBio.01941-18).
125. Navari M., Etebari M., Ibrahimi M., Leoncini L., Piccaluga P. P. Pathobiologic roles of Epstein–Barr virus-encoded microRNAs in human lymphomas. *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Vol. 19(4). Article ID 1168. doi: 10.3390/ijms19041168.
126. Newkirk M. M., Goldbach-Mansky R., Lee J., Hoxworth J., McCoy J., Yarboro Ch., Klippel J., El-Gabalawy H. S. Advanced glycation end-product (AGE)-damaged IgG and IgM autoantibodies to IgG-AGE in patients with early synovitis. *Arthritis Res. Ther.* 2003. Vol. 5(2). P. 82–90. doi: 10.1186/ar622.
127. Ngaruiya Ch. M., Martin J. B. K. A case of reactive arthritis: a great masquerader. *Am. J. Emergen. Med.* 2013. Vol. 31(1). P. 266.e5–266.e7. doi: 10.1016/j.ajem.2012.04.019.
128. Ning Sh. Innate immune modulation in EBV infection. *Herpesviridae*. 2011. Vol. 2. Article N 1. doi: 10.1186/2042-4280-2-1.
129. O’Connell C. M., Ionova I. A., Quayle A. J., Visintin A., Ingalls R. R. Localization of TLR2 and MyD88 to Chlamydia trachomatis inclusions. Evidence for signaling by intracellular TLR2 during infection with an obligate intracellular pathogen. *J. Bio. Chem.* 2006. Vol. 281(3). P. 1652–1659. doi: 10.1074/jbc.M10182200.
130. Oberti J. P. M., Breser M. L., Nun˜ez N., Maccioni M., Rodri˜guez N., Wantia N., Ertl T., Miethke T and Rivero V E. Chemokine response induced by Chlamydia trachomatis in prostate derived CD45C and CD45K cells. *Reproduction*. 2011. No. 142. P. 427–437.

131. Okamoto H. Prevalence of Chlamydia-associated reactive arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* 2017. Vol 46(5). P. 415–416. doi: 10.1080/03009742.2016.1231340.
132. Ostaszewska-Puchalska I., Zdrodowska-Stefanow B., Kuryliszyn-Moskal A., Bułhak-Kozioł V., Sokołowska M. Incidence of Chlamydia trachomatis infection in patients with reactive arthritis. *Reumatologia.* 2015. Vol. 53(2). P. 69–73. doi: 10.5114/reum.2015.51505.
133. Pathak H., Marshall T. Post-streptococcal reactive arthritis: where are we now. *BMJ Case Rep.* 2016. Aug 12. Article ID bcr2016215552. doi: 10.1136/bcr-2016-215552.
134. Pauley K. M., Cha S. MicroRNA-146a in rheumatoid arthritis: a new therapeutic strategy. *Immunotherapy.* 2011. Vol. 3, Is. 7. P. 829–831. doi: 10.2217/imt.11.70.
135. Piedade D., Azevedo-Pereira J. M. The Role of microRNAs in the pathogenesis of herpesvirus infection. *Viruses.* 2016. Vol. 8(6). Article ID 156. doi: 10.3390/v8060156.
136. Posnett D. N., Yarilin D. Amplification of autoimmune disease by infection. *Arthritis Res. Ther.* 2005. Vol. 7. P. 74–84. doi: 10.1186/ar1691.
137. Qazi B. S, Tang K., Qazi A. Recent advances in underlying pathologies provide insight into interleukin-8 expression-mediated inflammation and angiogenesis. *Int. J. Inflam.* 2011. Article ID 908468. doi: 10.4061/2011/908468.
138. Quan T. E., Roman R. M., Rudenga B. J., Holers V. M., Craft J. Epstein-Barr virus promotes interferon- α production by plasmacytoid dendritic cells. *Arthritis Rheum.* 2010. Vol. 62, Is. 6. P. 1693–1701. doi: 10.1002/art.27408.
139. Rajasekhar M., Olsson A. M., Steel K. J. A., Georgouli M., Ranasinghe U., Read C. B., Frederiksen K. S., Taams L. S. MicroRNA-155 contributes to enhanced resistance to apoptosis in monocytes from patients with rheumatoid arthritis. *J. Autoimmunity.* 2017. Vol. 79. P. 53–62. doi: [10.1016/j.jaut.2017.01.002](https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.01.002).

140. Ramasamy R., Yan S. F., Herold K., Clynes R., Schmidt A. M. Receptor for advanced glycation end products. Fundamental roles in the inflammatory response: winding the way to the pathogenesis of endothelial dysfunction and atherosclerosis. *An. NY Acad. Sci.* 2008. Vol. 1126, Is. 1. P. 7–13. doi: 10.1196/annals.1433.056.
141. Rihl M., Köhler L., Klos A., Zeidler H. Persistent infection of Chlamydia in reactive arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2006. Vol. 65, Is. 3. P. 281–284. doi: 10.1136/ard.2005.044966.
142. Rosato P., Anastasiado E., Garg N., Lenze D., Boccellato F., Vincenti S., Severa M., Coccia E., Bigi R., Cirone M., Ferretti E., Campese E., Hummel M., Frati L., Presutti C., Faggioni A., Trivedi P. Differential regulation of miR-21 and miR-146a by Epstein-Barr virus-encoded EBNA2. *Leukemia*. 2012. Vol. 26. P. 2343–2352.
143. Saba R., Sorensen D. R., Booth S. A. MicroRNA-146a: a dominant, negative regulator of the innate immune response. *Front. Immunol.* 2014. Nov 21. No. 5. Article ID 578. doi: 10.3389/fimmu.2014.00578.
144. Sabroe I., Parker L. C., Dower S. K., Whyte M. K. B. The role of TLR activation in inflammation. *J. Pathol.* 2008. Vol. 214. P. 126–135. doi: 10.1002/path.2264.
145. Salloum N., Hussein H. M., Jammaz R., Jiche S., Uthman I. W., Abdelnoor A. M., Rahal E. A. Epstein-Barr virus DNA modulates regulatory T-cell programming in addition to enhancing interleukin-17A production via Toll-like receptor 9. *PLoS ONE*. 2018. Vol. 13(7). Article ID e0200546. doi: 10.1371/journal.pone.0200546.
146. Savard M., Bélanger C., Tardif M., Gourde P., Flamand L., Gosselin J. Infection of primary human monocytes by Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 2000. Vol. 74(6). P. 2612–2619. doi: [10.1128/jvi.74.6.2612-2619.2000](https://doi.org/10.1128/jvi.74.6.2612-2619.2000).
147. Schmitt S. K. Reactive arthritis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 2017. Vol. 31(2). P. 265–277. doi: 10.1016/j.idc.2017.01.002.

148. Sessa L., Gatti E, Zeni F., Antonelli A., Catucci A., Koch M., Pompilo G., Fritz G., Raucci A., Bianchi M. E. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is only present in mammals, and belongs to a family of cell adhesion molecules (CAMs). *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9(1). Article ID e86903. doi: 10.1371/journal.pone.0086903.
149. Sibilia J., Limbach F.-X. Reactive arthritis or chronic infectious arthritis? *Ann. Rheum. Dis*. 2002. Vol. 61. P. 580–587. doi: 10.1136/ard.61.7.580.
150. Skalsky R. L. Analysis of viral and cellular microRNAs in EBV-infected cells. *Methods Mol. Biol*. 2017. Vol. 1532. P. 133–146. doi: 10.1007/978-1-4939-6655-4_9.
151. Stahl H.-D., Hubner B., Seidl B., Liebert U. G., Heijden I. M. van der, Wilbrink B., Kraan M. C., Emmrich F., Tak P. P. Detection of multiple viral DNA species in synovial tissue and fluid of patients with early arthritis. *Ann. Rheum. Dis*. 2000. Vol. 59. P. 342–346. doi: 10.1136/ard.59.5.342.
152. Staniszevska M., Jarosz S, Jon M, Gamian A. Advanced glycation end-products prepared in solution under high pressure contain epitopes distinct from those formed in the dry reaction at high temperature. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* (Warsz). 2005. Vol. 53(1). P. 71–78.
153. Steenvoorden M. M., Huizinga T. W. J., Verzijl N., Bank R. A., Roday H. K., Luning H. A. F., Lafeber F. P. J. G., Toes R. E. M., DeGroot J. Activation of receptor for advanced glycation end products in osteoarthritis leads to increased stimulation of chondrocytes and synoviocytes. *Arthritis Rheum*. 2006. Vol. 54(1). P. 253–263. doi: 10.1002/art.21523.
154. Su L.-Ch., Huang A. F., Jia H., Liu Y., Xu W. D. Role of microRNA-155 in rheumatoid arthritis. *Int. J. Rheum. Dis*. 2017. Vol. 20(11). P. 1631–1637. doi: 10.1111/1756-185X.13202.
155. Tang Ch., Chen S., Qian H., Huang W. Interleukin-23: as a drug target for autoimmune inflammatory diseases. *Immunology*. 2012. Vol. 35(2). P. 112–124. doi: 10.1111/j.1365-2567.2011.03522.x.

156. Vähämiko S., Penttinen M. A., Granfors K. Aetiology and pathogenesis of reactive arthritis: role of non-antigen-presenting effects of HLA-B27. *Arthritis Res. Ther.* 2005. Vol. 7(4). P. 136–141. doi: 10.1186/ar1762.
157. Villareal Ch., Whittum-Hudson J. A., Hudson A. P. Persistent Chlamydiae and chronic arthritis. *Arthritis Res.* 2002. Vol. 4(1). P. 5–9. doi: [10.1186/ar382](https://doi.org/10.1186/ar382).
158. Viza D., Fudenberg H. H., Palareti A., Ablashi D., Vinci C. de, Pizza G. Transfer factor: an overlooked potential for the prevention and treatment of infectious diseases. *Folia biologica*. 2013. Vol. 59, No. 2. P. 53–67.
159. Vollmer J., Krieg A. M. Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009. Vol. 61(3). P. 195–204. doi: 10.1016/j.addr.2008.12.008.
160. Wang H., Ward M. F., Fan H. G., Sama A. E., Li A. W. Potential role of high mobility group box 1 in viral infectious diseases. *Viral. Immunol.* 2006. Vol. 19(1). P. 3–9. doi: 10.1089/vim.2006.19.3.
161. Wang L., Ning S. H. Herpesviridae. 1st ed. Johnson City, TN 37614, USA,, 2017. Ch. 3: Viral and cellular microRNAs in regulation of EBV latency and oncogenesis. P. 2–41.
162. Wang M., Yu F., Wu W., Wang Y., Ding H., Qian L. Epstein-Barr virus-encoded microRNAs as regulators in host immune responses. *Int. J. Biol. Sci.* 2018. Vol. 14(5). P. 565–576. doi: 10.7150/ijbs.24562.
163. Wang Zh., Filgueiras L. R., Wang S., Serezani A. P. M., Peters-Golden M., Jancar S., Serezani C. H. Leukotriene B4 enhances the generation of proinflammatory microRNAs to promote MyD88-dependent macrophage activation. *J. Immunol.* 2014. Vol. 192(5). P. 2349–2356. doi: 10.4049/jimmunol.1302982.
164. Watson S. F., Knol L. I., Witteveldt J., Macias S. Crosstalk between mammalian antiviral pathways. [*Non-Coding RNA \(MDPI\)*](#). 2019. Vol. 5, Is. 1. Article ID 29. doi: 10.3390/ncrna5010029.
165. Wood C. D., Carvell T., Gunnell A., Ojeniyi O. O., Osborne C., West M. J. Enhancer control of microRNA miR-155 expression in Epstein-Barr virus-

- infected B cells. *J. Virol.* 2018. Vol. 92(19). P. 00716–00718. doi: 10.1128/JVI.00716-18.
166. Yamamoto K. Mechanisms of autoimmunity. Recent concept. *JMAJ.* 2004. Vol. 47, No. 9. P. 403–406.
 167. Yin Q., McBride J., Fewell C., Lacey M., Wang X., Lin Zh., Cameron J., Flemington E. K. MicroRNA-155 is an Epstein-Barr virus-induced gene that modulates Epstein-Barr virus-regulated gene expression pathways. *J. Virol.* 2008. Vol. 82(11). P. 5295–5306. doi: [10.1128/JVI.02380-07](https://doi.org/10.1128/JVI.02380-07).
 168. Yu H., Schwarzer K., Förster M., Kniemeyer O., Forsbach-Birk V., Straube E., Rödel J. Role of high-mobility group box 1 protein and poly(ADP-Ribose) polymerase 1 degradation in Chlamydia trachomatis-induced cytopathicity. *Infection and Immunity.* 2010. Vol. 78(7). P. 3288–3297. doi: [10.1128/IAI.01404-09](https://doi.org/10.1128/IAI.01404-09).
 169. Zeng H., Luo B., Zhang Y., Xie Zh., Ye Z. Treatment of reactive arthritis with biological agents: a review. *Biosci. Rep.* 2020. Vol. 40(2). Article ID BSR20191927. doi: [10.1042/BSR20191927](https://doi.org/10.1042/BSR20191927).
 170. Zhang L., Bukulin M., Kojro E., Roth A., Metz V. V., Fahrenholz F., Nawroth P. P., Bierhaus A., Postina R. Receptor for advanced glycation end products is subjected to protein ectodomain shedding by metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283(51). P. 35507–35516. doi: 10.1074/jbc.M806948200.
 171. Zubchenko S., Lomikovska M., Lishchuk-Yakymovych K. Peculiarities of the Epstein-Barr virus prevalence among patients with pollen allergy. *Allergy.* 2018. Vol. 73, No. S105. P. 583.
 172. Zubchenko S., Potemkina G., Havrylyuk A., Lomikovska M., Sharikadze O. Analysis of the level of cytokines with anti-viral activity in patients with allergopathology in active and latent phases of chronic persistent Epstein-Barr infection. *Georgian Med. News.* 2019. Vol. 289. P. 158–162.
 173. Zubchenko S. O., Chopyak V. V., Havrylyuk A. M., Potemkina G. O., Lomikovska M. P. Investigation of miR-BART 13 and 15 in patients with

allergopathy in combination with chronic Epstein-Barr viral infection. *World of Medicine and Biology*. 2019. No. 2(68). P. 054–060. doi: [0.26724/2079-8334-2019-2-68-54-60](https://doi.org/10.26724/2079-8334-2019-2-68-54-60).

ДОДАТКИ

Затверджую»

Керівник установи в якій впроваджена пропозиція

«08» 06 Синюта А.В.
2020 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Оцінка фенотипічних властивостей лімфоцитів у пацієнтів з реактивним артритом, спричиненим *Chlamydia trachomatis* та вірусом Епштейна-Барр

(найменування пропозиції для впровадження)

2. Установа, що розробила (поштова адреса) прізвище, ім'я, по батькові авторів: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького МОЗ України, м. Львів, вул. Пекарська, 69.
Ломіковська М.П., Чопяк В.В., Кріль І.Й., Бойко Я.Є., Синюта А.В.

3. Джерело інформації Стаття "Особливості лімфоцитарного пулу у крові пацієнтів з реактивним артритом на тлі Епштейна-Барр вірусної та хламідійної інфекцій" / Ломіковська М., Кріль І., Чопяк В. // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. - 2019. - 87 (3). (назва, рік видання метод. реком., інформаційного листа, вихідні дані статті, №.і.т.п.)

4. Впроваджено в:

Західноукраїнський спеціалізований дитячий медичний центр
(найменування лікувально-профілактичного закладу)

5. Термін впровадження з грудня 2019 р. – травень 2020 р.

6. Загальна кількість спостережень 9

7. Ефективність впровадження у відповідності з критеріями викладеними у джерелі інформації (п.3):

- позитивні – 7 (кількість спостережень)
- невизначені – 2 (кількість спостережень)
- негативні – 0 (кількість спостережень)

8. Зауваження, пропозиції – відсутні

«08» 06 2020 р.

Відповідальний за впровадження

Бойко Я.Є.

«Затверджую»
Керівник установи в якій впроваджена пропозиція
_____ Синюта А.В.
«08» _____ 2020 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1 Оцінка фагоцитарної активності нейтрофілів та моноцитів у пацієнтів з реактивним артритом, спричиненим Chlamydia trachomatis та вірусом Епштейна-Барр

(найменування пропозиції для впровадження)

2. Установа, що розробила (поштова адреса) прізвище, ім'я, по батькові авторів: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького МОЗ України, м. Львів, вул. Пекарська, 69.

Ломіковська М.П., Чопяк В.В., Кріль І.Й., Бойко Я Є., Синюта А.В.

3. Джерело інформації Стаття "Фагоцитарна активність нейтрофілів та моноцитів у пацієнтів з реактивним артритом, спричиненим хламідійною та Епштейна-Барр вірусною інфекціями" / Ломіковська М., Кріль І., Чопяк В. // Львівський медичний часопис. - 2019. - 25 (4). (назва, рік видання метод. реком., інформаційного листа, вихідні дані статті, №.і.т.п.)

4. Впроваджено в:

Західноукраїнський спеціалізований дитячий медичний центр
(найменування лікувально-профілактичного закладу)

5. Термін впровадження з грудня 2019 р. – травень 2020 р.

6. Загальна кількість спостережень 9

7. Ефективність впровадження у відповідності з критеріями викладеними у джерелі інформації (п.3):

- позитивні – 8 (кількість спостережень)
- невизначені – 1 (кількість спостережень)
- негативні – 0 (кількість спостережень)

8. Зауваження, пропозиції – відсутні

«08» _____ 2020 р.

Відповідальний за впровадження

Бойко Я Є.

Затверджую»

Керівник установи в якій впроваджена пропозиція

Синюта А.В.
2020 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Оцінка рівня прозапальних та антизапальних цитокінів у пацієнтів з реактивним артритом, спричиненим *Chlamydia trachomatis* та вірусом Епштейна-Барр

(найменування пропозиції для впровадження)

2. Установа, що розробила (поштова адреса) прізвище, ім'я, по батькові авторів: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького МОЗ України, м. Львів, вул. Пекарська, 69.

Ломіковська М.П., Чопяк В.В., Потьомкіна Г.О., Кріль І.Й., Бойко Я Є., Синюта А.В.

3. Джерело інформації Стаття "Цитокіновий профіль у пацієнтів з реактивним артритом, спричиненим *Chlamydia trachomatis* та вірусом Епштейна-Барра" / Ломіковська М., Кріль І., Потьомкіна Г., Чопяк В. // Праці Наукового товариства імені Шевченка. Медичні науки. - 2019. - 57 (2). (назва, рік видання метод. реком., інформаційного листа, вихідні дані статті, № і т.п.)

4. Впроваджено в:

Західноукраїнський спеціалізований дитячий медичний центр

(найменування лікувально-профілактичного закладу)

5. Термін впровадження з грудня 2019 р. – травень 2020 р.

6. Загальна кількість спостережень – 11

7. Ефективність впровадження у відповідності з критеріями викладеними у джерелі інформації (п.3):

- позитивні – 10 (кількість спостережень)
- невизначені – 1 (кількість спостережень)
- негативні – 0 (кількість спостережень)

8. Зауваження, пропозиції – відсутні

«09» 06 2020 р.

Відповідальний за впровадження
Бойко Я Є.

Керівник установи в якій впроваджена пропозиція

«05»



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Оцінка фенотипічних властивостей лімфоцитів у пацієнтів з реактивним артритом, спричиненим Chlamydia trachomatis та вірусом Епштейна-Барр (найменування пропозиції для впровадження)
2. Установа, що розробила (поштова адреса) прізвище, ім'я, по батькові авторів: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького МОЗ України, м. Львів, вул. Пекарська, 69. Ломіковська М.П., Чопяк В.В., Кріль І.Й., Горбаль Н.М., Синенький О.В., Гичка М.М.
3. Джерело інформації: Стаття "Особливості лімфоцитарного пулу у крові пацієнтів з реактивним артритом на тлі Епштейна-Барр вірусної та хламідійної інфекцій" / Ломіковська М., Кріль І., Чопяк В. // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. - 2019. – 87 (3). (назва, рік видання метод. реком., інформаційного листа, вихідні дані статті, №.і.т.п.)
(назва, рік видання метод. реком., інформаційного листа, вихідні дані статті, №.і.т.п.)
4. Впроваджено в: Львівська обласна клінічна лікарня
(найменування лікувально-профілактичного закладу)
5. Термін впровадження з грудня 2019 р. – травень 2020 р.
6. Загальна кількість спостережень – 36
7. Ефективність впровадження у відповідності з критеріями викладеними у джерелі інформації (п.3):
- позитивні – 33 (кількість спостережень)
- невизначені – 3 (кількість спостережень)
- негативні – 0 (кількість спостережень)
8. Зауваження, пропозиції – відсутні

«05» 06 2020 р.

Відповідальний за впровадження
_Синенький О.В.

Керівник установи в якій впроваджена пропозиція

«05» 06 2020 р.

Затверджую»
Гичка М.М.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Оцінка фагоцитарної активності нейтрофілів та моноцитів у пацієнтів з реактивним артритом, спричиненим Chlamydia trachomatis та вірусом Епштейна-Барр (найменування пропозиції для впровадження)
2. Установа, що розробила (поштова адреса) прізвище, ім'я, по батькові авторів: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького МОЗ України, м. Львів, вул. Пекарська, 69.
Ломіковська М.П., Чопяк В.В., Кріль І.Й., Горбаль Н.М., Синенький О.В., Гичка М.М.
3. Джерело інформації: Стаття "Фагоцитарна активність нейтрофілів та моноцитів у пацієнтів з реактивним артритом, спричиненим хламідійною та Епштейна-Барр вірусною інфекціями" / Ломіковська М., Кріль І., Чопяк В. // Львівський медичний часопис. - 2019. - 25 (4). (назва, рік видання метод. реком., інформаційного листа, вихідні дані статті, №.і.т.п.)
(назва, рік видання метод. реком., інформаційного листа, вихідні дані статті, №.і.т.п.)
4. Впроваджено в: Львівська обласна клінічна лікарня
(найменування лікувально-профілактичного закладу)
5. Термін впровадження з грудня 2019 р. – травень 2020 р.
6. Загальна кількість спостережень – 36
7. Ефективність впровадження у відповідності з критеріями викладеними у джерелі інформації (п.3):
- позитивні – 34 (кількість спостережень)
- невизначені – 2 (кількість спостережень)
- негативні – 0 (кількість спостережень)
8. Зауваження, пропозиції – відсутні

«05» 06 2020 р.

Відповідальний за впровадження

Синенький О.В.

Затверджую»
Керівник установи в якій впроваджена пропозиція

«01»



Гичка М.М.
2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Оцінка рівня прозапальних та антизапальних цитокінів у пацієнтів з реактивним артритом, спричиненим Chlamydia trachomatis та вірусом Епштейна-Барр (найменування пропозиції для впровадження)
2. Установа, що розробила (поштова адреса) прізвище, ім'я, по батькові авторів: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького МОЗ України, м. Львів, вул. Пекарська, 69. Ломіковська М.П., Чопяк В.В., Потьомкіна Г.О., Кріль І.Й., Синенький О.В., Гичка М.М.
3. Джерело інформації: Стаття "Цитокіновий профіль у пацієнтів з реактивним артритом, спричиненим Chlamydia trachomatis та вірусом Епштейна-Барра" / Ломіковська М., Кріль І., Потьомкіна Г., Чопяк В. // Праці Наукового товариства імені Шевченка. Медичні науки. - 2019. - 57 (2). (назва, рік видання метод. реком., інформаційного листа, вихідні дані статті, №.і.т.п.)
(назва, рік видання метод. реком., інформаційного листа, вихідні дані статті, №.і.т.п.)
4. Впроваджено в: Львівська обласна клінічна лікарня
(найменування лікувально-профілактичного закладу)
5. Термін впровадження з грудня 2019 р. – травень 2020 р.
6. Загальна кількість спостережень – 44
7. Ефективність впровадження у відповідності з критеріями викладеними у джерелі інформації (п.3):
- позитивні – 41 (кількість спостережень)
- невизначені – 3 (кількість спостережень)
- негативні – 0 (кількість спостережень)
8. Зауваження, пропозиції – відсутні

«05» 06 2020 р.

Відповідальний за впровадження
_Синенький О.В.

Керівник установи в якій впроваджена пропозиція

«0»

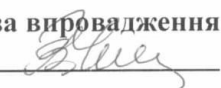


Пукальяк Р. М.
2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Оцінка фагоцитарної активності нейтрофілів та моноцитів у пацієнтів з реактивним артритом, спричиненим Chlamydia trachomatis та вірусом Епштейна-Барр
(найменування пропозиції для впровадження)
2. Установа, що розробила (поштова адреса) прізвище, ім'я, по батькові авторів: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького МОЗ України, м. Львів, вул. Пекарська, 69.
Ломіковська М.П., Чоп'як В.В., Потьомкіна Г.О., Кріль І.Й., Ліщук-Якимович Х.О., Білянська Л.М., Пукаляк Р.М.
3. Джерело інформації: Стаття "Фагоцитарна активність нейтрофілів та моноцитів у пацієнтів з реактивним артритом, спричиненим хламідійною та Епштейна-Барр вірусною інфекціями" / Ломіковська М., Кріль І., Чоп'як В. // Львівський медичний часопис. - 2019. - 25 (4). (назва, рік видання метод. реком., інформаційного листа, вихідні дані статті, № і т.п.)
4. Впроваджено в: Львівський обласний клінічний діагностичний центр
(найменування лікувально-профілактичного закладу)
5. Термін впровадження з грудня 2019 р. – травень 2020 р.
6. Загальна кількість спостережень – 13
7. Ефективність впровадження у відповідності з критеріями викладеними у джерелі інформації (п.3):
- позитивні – 12 (кількість спостережень)
- невизначені – 1 (кількість спостережень)
- негативні – 0 (кількість спостережень)
8. Зауваження, пропозиції – відсутні

«0» 06 2020 р.

Відповідальний за впровадження
проф. Чоп'як В.В. 

«Затверджую»

Керівник установи в якій впроваджена пропозиція

Р. М. Пукаляк
«05» _____ 2020 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Оцінка фенотипічних властивостей лімфоцитів у пацієнтів з реактивним артритом, спричиненим Chlamydia trachomatis та вірусом Епштейна-Барр

(найменування пропозиції для впровадження)

2. Установа, що розробила (поштова адреса) прізвище, ім'я, по батькові авторів: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького МОЗ України, м. Львів, вул. Пекарська, 69.

Ломіковська М.П., Чоп'як В.В., Потьомкіна Г.О., Кріль І.Й., Ліщук-Якимович Х.О., Білянська Л.М., Пукаляк Р.М.

3. Джерело інформації: Стаття "Особливості лімфоцитарного пулу у крові пацієнтів з реактивним артритом на тлі Епштейна-Барр вірусної та хламідійної інфекцій" / Ломіковська М., Кріль І., Чоп'як В. // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. - 2019. - 87 (3). (назва, рік видання метод. реком., інформаційного листа, вихідні дані статті, № і т.п.)

4. Впроваджено в: Львівський обласний клінічний діагностичний центр
(найменування лікувально-профілактичного закладу)

5. Термін впровадження з грудня 2019 р. – травень 2020 р.

6. Загальна кількість спостережень – 13

7. Ефективність впровадження у відповідності з критеріями викладеними у джерелі інформації (п.3):

- позитивні – 11 (кількість спостережень)
- невизначені – 2 (кількість спостережень)
- негативні – 0 (кількість спостережень)

8. Зауваження, пропозиції – відсутні

«05» _____ 06 _____ 2020 р.

Відповідальний за впровадження
проф. Чоп'як В.В. *В.В. Чоп'як*

«Затверджую»

Керівник установи в якій впроваджується пропозиція

« » _____
 « » _____
 Пукаляк Р. М.
 2020 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Оцінка рівня прозапальних та антизапальних цитокінів у пацієнтів з реактивним артритом, спричиненим Chlamydia trachomatis та вірусом Епштейна-Барр

(найменування пропозиції для впровадження)

2. Установа, що розробила (поштова адреса) прізвище, ім'я, по батькові авторів: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького МОЗ України, м. Львів, вул. Пекарська, 69.

Ломіковська М.П., Чоп'як В.В., Потьомкіна Г.О., Кріль І.Й., Пукаляк

3. Джерело інформації: Стаття "Цитокіновий профіль у пацієнтів з реактивним артритом, спричиненим Chlamydia trachomatis та вірусом Епштейна-Барра" / Ломіковська М., Кріль І., Потьомкіна Г., Чоп'як В. // Праці Наукового товариства імені Шевченка. Медичні науки. - 2019. - 57 (2). (назва, рік видання метод. реком., інформаційного листа, вихідні дані статті, № і т.п.)

4. Впроваджено в: Львівський обласний клінічний діагностичний центр
 (найменування лікувально-профілактичного закладу)

5. Термін впровадження з грудня 2019 р. – травень 2020 р.

6. Загальна кількість спостережень – 15

7. Ефективність впровадження у відповідності з критеріями викладеними у джерелі інформації (п.3):

- позитивні – 13 (кількість спостережень)
- невизначені – 2 (кількість спостережень)
- негативні – 0 (кількість спостережень)

8. Зауваження, пропозиції – відсутні

«03» _____06_____ 2020 р.

Відповідальний за впровадження
 проф. Чоп'як В.В. _____

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

Наукові праці, опубліковані у фахових виданнях України

1. Чопяк В. В., Гайдучок І. Г., Ломіковська М. П. Експериментальний хламідіоз. Пробл. екол. та мед. генетики і клін. імунології. 2012. №6. С. 105–116. (Дисертантом зібрано та проаналізовано літературні джерела, підготовлено матеріал до друку).

2. Зубченко С. О., Потьомкіна Г. О., Ломіковська М. П. Дослідження асоціативних зв'язків хронічної Епштейна-Барр вірусної інфекції в стадії реплікативної активності у пацієнтів з алергопатологією. Імунологія та алергологія: наука і практика. 2016. № 1–2. С. 49. (Автором проведено огляд сучасних літературних джерел з даної проблеми, узагальнення та тлумачення отриманих результатів).

3. Ломіковська М. П., Кріль І. Й., Чопяк В. В. Особливості лімфоцитарного пулу крові пацієнтів з реактивним артритом на тлі Епштейна-Барр вірусної та хламідійної інфекцій. Експерим. та клін. фізіологія і біохімія. 2019. Вип. 3, Т. 87. С. 44–50. (Здобувачем проведено аналіз даних літератури, проведено клінічне обстеження хворих та узагальнення результатів).

4. Ломіковська М. П., Кріль І. Й., Чопяк В. В. Фагоцитарна активність нейтрофілів та моноцитів у пацієнтів з реактивним артритом, спричиненим хламідійною та Епштейна-Барр вірусною інфекціями. Львів. мед. часопис. 2019. № 4, Т. 25. С. 30–35. (Автором проаналізовано дані літератури, проведено підбір, аналіз та узагальнення даних, підготовлено матеріал до друку).

5. Ломіковська М., Кріль І., Потьомкіна Г., Чопяк В. Цитокіновий профіль у пацієнтів з реактивним артритом, спричиненим *Chlamydia trachomatis* та вірусом Епштейна-Барра. Праці Наук. товариства імені Шевченка. Медичні науки. 2019. Т. 57, № 2. С. 122–127. (Дисертантом сформовані групи

обстеження, аналіз та узагальнення отриманих результатів, підготовлено матеріал до друку).

6. Зубченко С. О., Маруняк С. Р., Ломіковська М. П. Дослідження впливу хронічної Епштейна-Барр вірусної інфекції на рівень експресії miR-146a та miR-155 у пацієнтів з алергопатологією. Укр. журн. медицини, біології та спорту. 2019. Т. 4, № 4. С. 77–83. (Здобувачем проведено огляд сучасних літературних джерел з даної проблеми, підготовлено матеріал до друку).

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації у журналах, що входять до міжнародних наукометричних баз Scopus або Web of Science

1. Zubchenko S. O., Chopyak V. V., Havrylyuk A. M., Potemkina G. O., Lomikovska M. P. Investigation of miR-BART 13 and 15 in patients with allergopathy in combination with chronic Epstein-Barr viral infection. World of Medicine and Biology. 2019. № 2(68). P.054–060. WEB OF SCIENCE (Автором проведено узагальнення отриманих результатів, підготовлено текст статті до друку).

2. Zubchenko S., Potemkina G., Havrylyuk A., Lomikovska M., Sharikadze O. Analysis of the level of cytokines with antiviral activity in patients with allergopathology in active and latent phases of chronic persistent Epstein-Barr infection. Georgian Med. News. 2019. Is. 289. P. 158–162. SCOPUS (Дисертантом проведено огляд сучасних літературних джерел з даної проблеми, узагальнення і тлумачення отриманих результатів).

3. Lomikovska M. P., Hayduchok I. G., Potomkina H. O., Zubchenko S. O., Kril I. Y., Ishcheykin K. Y., Chopyak V. V. Peculiarities of TLR9 expression on immune competent cells in reactive arthritis patients with chronic Epstein-Barr virus infection. World of Medicine and Biology. 2020. № 1(71). P. 083–088. WEB OF SCIENCE (Автором сформовані групи обстеження, зібрано матеріал, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовлено матеріал до друку).

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

1. Чоп'як В. В., Потьомкіна Г. О., Ліщук-Якимович Х. О. Порівняльна характеристика вмісту кріоглобулінів у хворих на реактивний та ревматоїдний артрит. *Імунологія та алергологія: наука і практика (додаток)*. 2012. № 3. С. 36–37. (Автором зібрано матеріал, проаналізовано отримані результати).
2. Чоп'як В. В., Потьомкіна Г. О., Кріль І. Й. Скринінг студентської молоді на поширеність хламідійної інфекції. *Імунологія та алергологія: наука і практика (додаток)*. 2012. № 3. С. 57–59. (Здобувачем зібрано матеріал, проведено статистичну обробку та аналіз отриманих результатів).
3. Потьомкіна Г. О., Чоп'як В. В., Ломіковська М. П., Кріль І. Й. Поширеність реактивного артриту на тлі Епштейна-Барр вірусної інфекції серед студентської молоді. *Досвід, реалії і перспективи розвитку систем охорони здоров'я: тези доп. Укр.-Пол. симпозіуму*. Львів, 2013. С. 540–542. (Дисертантом зібрано матеріал, проведено статистичну обробку та аналіз отриманих результатів).
4. Ломіковська М. П. Реактивні артрити на тлі Епштейна-Барр вірусної інфекції. *Контроверсійні питання сучасної клінічної медицини: тези 2-ої загальноунів. наук.-практ. конф. молодих вчених і спеціалістів*. Львів, 2013. С. 47–48. (Автором проведено клінічне дослідження, аналіз та систематизація матеріалу).
5. Ломіковська М. П., Потьомкіна Г. О., Горбаль Н. М. Клініка, діагностика та стан імунної системи у хворих на реактивний артрит на тлі вірусної інфекції Епштейн-Барр. *Український ревматологічний журнал (матеріали конференції)*. 2015. № 3(61). С. 91. (Здобувачем проведено клінічне дослідження, статистичну обробку, сформульовано висновки).
6. Ломіковська М. П., Потьомкіна Г. О., Ліщук-Якимович Х. О., Горбаль Н. М. Оцінка ефективності препарату Імодину у хворих на Епштейн-Барр вірусний реактивний артрит. *Хронічні неінфекційні захворювання: заходи профілактики і боротьби з ускладненнями: матеріали конф.* 2015. С. 223.

(Дисертантом сформовано групи обстеження, проведено клінічне обстеження хворих та узагальнення отриманих результатів).

7. Ломіковська М. П., Потьомкіна Г. О. Вивчення ефективності застосування ліофілізованого діалізату лейкоцитів у хворих на реактивний артрит викликаний Епштейна-Барр вірусом. *Медикаментозна алергія: мультидисциплінарний підхід* : матеріали наук.-практ. конф. 2017. С. 12–14. (Автором проведено клінічне обстеження хворих, статистичну обробку та узагальнення результатів).

8. Lomikovska M. Clinical picture, diagnostics and condition of immune system in patients with reactive arthritis against the background of Epstein-Barr virus infection. *11th International Conference of Allergy, Asthma and Clinical Immunology* : conference materials. Edinburgh (Scotland), 2017. P. 67 (Здобувачем проведено набір хворих, узагальнення і тлумачення отриманих результатів).

9. Lomikovska M., Zubchenko S., Lishchuk-Yakymovych K. Clinical and immunological features of reactive arthritis on the background of the epstein-barr virus. *Allergy*. 2018. No. 73. P. 763. (Дисертантом проведено клінічне обстеження хворих, узагальнення отриманих результатів, сформульовано висновки).

10. Zubchenko S., Lomikovska M., Lishchuk-Yakymovych K. Peculiarities of the Epstein-Barr virus prevalence among patients with pollen allergy. *Allergy*. 2018. No. 73. P. 583. (Автором проведено огляд сучасних літературних джерел з даної проблеми та аналіз отриманих даних).

11. Lomikovska M., Chopyak V., Potomkina H., Kril I. Peculiarities of TLR9 expression on immunocompetent cells in patients with the reactive arthritis induced by the Epstein-Barr viral infection and the rheumatoid arthritis. *Allergy*. 2019. No. 74. P. 466. (Здобувачем зібрано матеріал, проаналізовано та узагальнено отримані результати).