

ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ІМ. М.І. ПИРОГОВА

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова

праця на правах рукопису

ЗАІЧКО КАТЕРИНА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 577.15+57.053:616-055.2:616.72-002.77-08

ДИСЕРТАЦІЯ

**ЦИРКАДНІ РИТМИ ПРОДУКЦІЇ ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ СИНТАЗИ
ОКСИДУ АЗОТУ ТА ТОЛ-ПОДІБНИХ РЕЦЕПТОРІВ 2 У ЖІНОК,
ХВОРИХ НА РЕВМАТОЇДНИЙ АРТРИТ: ЗВ'ЯЗОК З ПЕРЕБІГОМ
ЗАХВОРЮВАННЯ ТА ЕФЕКТИВНІСТЮ ЛІКУВАННЯ**

222 – Медицина

(22 – Охорона здоров'я)

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень.

Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають

посилання на відповідне джерело _____ Заічко К.О.

Науковий керівник:

Станіславчук Микола Адамович,

доктор медичних наук, професор

Вінниця – 2020

АНОТАЦІЯ

Заїчко К.О. Циркадні ритми продукції ендотеліальної синтази оксиду азоту та тол-подібних рецепторів 2 у жінок, хворих на ревматоїдний артрит: зв'язок з перебігом захворювання та ефективністю лікування. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 – «Медицина». – Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова МОЗ України, Вінниця, 2020.

Дисертація присвячена вирішенню актуального завдання сучасної медицини - удосконаленню діагностики та контролю ефективності лікування хворих на ревматоїдний артрит (РА) на основі встановлення циркадних ритмів продукції ендотеліальної синтази оксиду азоту (NOS3) та тол-подібних рецепторів 2 типу (sTLR2) і оцінки їх клініко-патогенетичної значимості.

На підставі комплексного багатоетапного дослідження (клініко-лабораторного, інструментального, спеціалізованих індексів та шкал РА, імуноферментного, молекулярно-генетичного, статистичного) з'ясовані циркадні особливості продукції NOS3 та sTLR2 - медіаторів ангіогенезу та запалення; охарактеризовані клінічні особливості хворих на РА з аберантними рівнями NOS3 та sTLR2; встановлені нові хронобіологічні предиктори перебігу захворювання та резистентності до лікування.

У дослідження увійшло 173 хворих на РА (100% жінки), середнім віком $45,9 \pm 8,79$ років, тривалістю захворювання $7,96 \pm 6,38$ років. Діагноз РА встановлювали на основі критеріїв ACR/EULAR (2010), наказу МОЗ України від 11.04.2014 р. № 263. Серед обстежених переважали особи з серопозитивним варіантом РА (РФ виявлявся у 78,6 % осіб, АЦЦП - у 83,2% осіб), помірною та високою активністю процесу (DAS28-ШОЕ > 5,1 виявлявся у 65,9 % осіб), II-III рентгенологічною стадією (80,9 % осіб), II-III ФК (96,5 % осіб). Позасуглобові прояви виявлені у 42 (24,3%) хворих на РА, у 89 (51,4 %)

пацієнтів виявлялись коморбідні стани, серед яких переважала артеріальна гіпертензія (АГ) I-II стадії 1-го та 2-го ступеня (34,1 % осіб). Група контролю складалась з 82 жінок (українок в третьому поколінні, мешканок Вінницької області, без об'єктивних ознак РА, середнім віком $43,7 \pm 10,2$ роки).

Вперше встановлено, що у жінок, хворих на РА, як і у практично здорових осіб, реєструються циркадні коливання рівня NOS3 в сироватці крові із мінімальним рівнем (батіфазою) о 08⁰⁰ та максимальним рівнем (акрофазою) о 20⁰⁰. У хворих на РА упродовж доби виявляється статистично значуще зниження рівнів NOS3 порівняно із групою контролю, із найбільшими відмінностями о 08⁰⁰ ($401,4 \pm 123,7$ проти $512,9 \pm 92,8$ нг/л, $p < 0,01$).

У хворих на РА зі збільшенням віку спостерігалось зниження добової продукції NOS3: сироваткові рівні NOS3 о 08⁰⁰, о 20⁰⁰ та середньодобовий у осіб віком ≤ 25 років були вищими на 15,7; 22,9 та 19,9 % ($p < 0,05$), ніж у осіб віком 45-60 років. Також у хворих на РА з підвищенням тривалості захворювання реєструвалось помірне зниження добової продукції NOS3: у осіб з тривалістю РА > 10 років рівні NOS3 о 08⁰⁰, 20⁰⁰ та середньодобовий були нижчими (на 18-24%, $p < 0,05$), ніж у хворих з тривалістю РА до 5 років. Показники продукції NOS3 не залежали від наявності АЦЦП та/ або РФ, але знижувались зі збільшенням рентгенологічної стадії та функціонального класу ураження суглобів. У пацієнтів з тривалістю РА до 5 років рівень NOS3 о 08⁰⁰ вище 420 нг/л виявився предиктором повільної рентгенологічної прогресії (OR=2,48; 95% CI 1,02-6,04, $p < 0,05$) з чутливістю 80,8 % та специфічністю 79,3 %. ROC-аналіз вечірнього та середньодобового рівня NOS3 засвідчив низьку чутливість та специфічність цих показників як предикторів перебігу РА. Зниження циркадного приросту рівня NOS3 у вечірній час ($\lg \Delta \text{NOS3} \leq 1,50$) асоціювалось з підвищенням шансів коморбідної АГ (OR=3,78; 95% CI 1,96-7,28, $p < 0,001$) з чутливістю 82,5 % та специфічністю 72,9 %.

Вперше встановлено, що у жінок, хворих на РА, та жінок групи контролю реєструються циркадні коливання рівня sTLR2 в сироватці крові із максимальним рівнем (акрофазою) о 08⁰⁰ та мінімальним рівнем (батіфазою) о

20⁰⁰. У хворих на РА упродовж доби виявляються більш високі рівні sTLR2, ніж у осіб групи контролю, особливо вранці о 08⁰⁰ (342,9±93,4 проти 181,9±67,1 нг/л, $p < 0,001$). У хворих на РА не виявлено залежності показників циркадної продукції sTLR2 від віку. В той же час, підвищення тривалості захворювання, рентгенологічної стадії ураження суглобів та погіршення функціонального стану суглобів асоціювалось з підвищенням продукції sTLR2 як у ранковий, так і у вечірній час. Серо (+) за РФ та/ або АЦЦП асоціювалась з більш значимим зростанням показників добової продукції sTLR2 (на 15-18%, $p < 0,05$) у хворих на РА. У хворих на РА високий рівень sTLR2 о 08⁰⁰ (> 375 нг/л) є предиктором швидкого досягнення II-III стадії за Steinbroker з чутливістю 87,5% та специфічністю 78,7% ($p = 0,002$).

У хворих на РА зниження продукції NOS3 та підвищення продукції sTLR2 асоціювалось з підвищенням активності захворювання. У хворих з ранковим рівнем NOS3 ≤ 420 нг/л частіше виявлялась висока активність захворювання за індексами DAS28-ШОЕ $> 5,1$ (OR=2,21, 95% CI 1,29 - 4,34) та DAS28-СРБ $> 5,1$ (OR=2,47, 95% CI 1,33 - 4,58), втрата фізичних функцій за HAQ $> 2,0$ (OR=1,72, 95% CI 0,77 - 3,82), посилення впливу захворювання на загальний стан пацієнта за індексом RAID (OR=2,37, 95% CI 1,29-4,34). Однак, більш тісна асоціація показників активності РА виявилась з продукцією sTLR2: у хворих з ранковим рівнем sTLR2 ≥ 375 нг/л багаторазово підвищувались шанси високої активності РА за індексами DAS28-ШОЕ (OR= 8,22, 95% CI 3,51 - 19,25) та CDAI (OR= 8,73, 95% CI 3,37 - 22,63), RAID (OR=4,96, 95% CI 2,55 - 9,65) та HAQ (OR=2,40, 95% CI 1,09 - 5,28). Показники активності РА обернено корелювали з ранковим рівнем NOS3 ($r_{sp} = -(0,27-0,32)$, $p < 0,01$) і прямо – з ранковим рівнем sTLR2 ($r_{sp} = 0,46-0,64$, $p < 0,001$). Зниження продукції NOS3 та підвищення продукції sTLR2 супроводжувалось погіршенням фізичної складової здоров'я за SF-36 (на 16,5 та 20,2%, $p < 0,05$).

Вперше у хворих на РА доведена асоціація поліморфізму *rs2070744* (T-786C) гена NOS3 з циркадними ритмами продукції NOS3 та sTLR2. У носіїв генотипу CC рівні NOS3 вранці (о 08⁰⁰), ввечері (о 20⁰⁰) та середньодобовий

були нижчими, ніж у носіїв генотипу *TT* (на 16-25 %, $p < 0,001$) та *TC* (на 12-18%, $p < 0,01$). Також, показники продукції sTLR2 у носіїв генотипу *CC* були вищими (на 15-27%, $p < 0,05$), ніж у носіїв генотипів *TT* та *TC*. У носіїв генотипу *CC* шанси розладів продукції NOS3 та sTLR2 є вищими порівняно з носіями алелі *T* (*TT+TC*): OR = 2,58; 95% CI 1,09 - 6,12 ($p < 0,05$) та OR = 4,13; 95% CI 1,77 - 9,64 ($p = 0,001$), відповідно.

Вперше встановлено, що дисбаланс циркадної продукції NOS3 та sTLR2 асоціюється зі збільшенням резистентності до лікування. Через 12-тижнів стандартної фармакотерапії серед хворих на РА виявилось 52,6 % респондерів ACR20 та 47,4% нереспондерів. На підставі множинного регресійного аналізу встановлені додаткові предиктори стану «нереспондер»: відношення ранкових рівнів NOS3 / sTLR2 ($\beta = 0,366$, $p = 0,000$) та генотип *CC* ($\beta = -0,177$, $p = 0,016$). У хворих на РА з показником NOS3 / sTLR2 $\leq 1,20$ шанси резистентності до лікування зростають втричі (OR = 3,68; 95% CI 1,60-8,46, $p = 0,002$).

Практичне значення одержаних результатів підтверджують наступні положення: поглиблено теоретичні уявлення щодо хронобіологічних аспектів РА, встановлено клініко-патогенетичне значення розладів циркадної продукції NOS3 та sTLR2 у хворих на РА; виявлено нові предиктори рентгенологічної прогресії захворювання та резистентності до лікування; встановлено, що генетично-детемінованим чинником дисбалансу циркадної продукції NOS3 та sTLR2 є носійство генотипу *CC* за поліморфізмом *rs2070744* (*T-786C*) гена *NOS3*; засвідчено, що розлади вечірньої продукції NOS3 ($\lg \Delta \text{NOS3} \leq 1,50$) асоціюються з високим ризиком АГ у хворих на РА.

Ключові слова: ревматоїдний артрит, ендотеліальна синтаза оксиду азоту, тол-подібні рецептори 2, циркадні ритми, лікування.

ANNOTATION

Zaichko K.O. Circadian fluctuations of endothelial nitric oxide synthase and toll-like receptors 2 production in females with rheumatoid arthritis: association with the course of the disease and the efficacy of the therapy. - Qualified scientific work on the rights of the manuscript.

Thesis for a Doctor of Philosophy degree by specialty 222 – «Medicine». National Pirogov Memorial Medical University, Ministry of Health of Ukraine, Vinnytsya, 2020.

The dissertation is devoted to the solution of the actual problem of modern medicine - optimization of diagnostics and control of treatment efficacy in patients with rheumatoid arthritis (RA) on the basis of circadian fluctuations of endothelial nitric oxide synthase (NOS3) and toll-like receptors 2 (sTLR2) production and evaluation of its clinical and pathogenetic significance.

On the basis of a comprehensive multi-stage study (clinical, laboratory, instrumental, specialized indices and RA scales, immuno-enzyme, molecular genetic studies, statistical methods of investigation) were established circadian features of NOS3 and sTLR2 production - mediators of angiogenesis, inflammation, osteodestruction and proliferative processes; clinical features of RA patients with aberrant NOS3 and sTLR2 levels has been evaluated; new chronobiological criteria that predict the course of the disease and markers of resistance to the therapy were established.

In the study were enrolled 173 patients with RA (100% female), aged 45.9 ± 8.79 years, with the disease duration 7.96 ± 6.38 years. RA was diagnosed by ACR/EULAR (2010) criteria, order of the Ministry of Health of Ukraine from 26.04.2014, No. 263. Among RA patients prevailed subjects with high activity by DAS28-ESR > 5.1 (65.9%), II-III X-ray stage (78.6%), seropositive by ACCP - anticyclic citrullinated peptide (83.2%) and RF - rheumatoid factor (78.4%). Extra-

articular manifestations were observed in 42 (24.3%) RA patients, 89 (51.4%) patients were with comorbid pathologies, among which arterial hypertension of the I-II stage, 1 and 2 grade predominated (34,1%). 82 healthy women aged $43,7 \pm 10,2$ years (Ukrainians in the third generation, residents of Vinnytsia region, without RA) made up the control group.

For the first time, the diurnal variation of serum NOS3 level was established in RA patients and in the control group with a minimum in the morning 08:00 (batiphase) and a maximum in the evening 20:00 (acrophase). In RA patients the diurnal variation of serum NOS3 level was significantly lower than in the control group, with the more significant differences at 08:00 (401.4 ± 123.7 ng/l vs. 512.9 ± 92.8 ng/l, $p < 0.01$).

In patients with RA with increasing of the age, a decrease in NOS3 daily production was observed, thus the serum NOS3 levels at 08:00, 20:00 and the daily average level in individuals aged ≤ 25 years were higher by 15.7; 22.9 and 19.9% ($p < 0.05$) than in the 45-60 age group. Also, in RA patients with an increasing of the disease duration, a moderate decrease in NOS3 daily production was observed: in persons with RA > 10 years, NOS3 levels at 08:00, 20:00 and the average daily level were lower (by 18-24%, $p < 0.05$) than in patients with a disease duration up to 5 years.

Markers of NOS3 production did not depend on the presence of ACCP and/or RF, but decreased with progression of renthenological stage and functional class of joint lesions. In RA patients with the disease duration up to 5 years, NOS3 level at 08:00 above 420 ng/l was a predictor of a slow radiographic progression by Steinbroker (OR = 2.48; 95% CI 1.02-6.04, $p < 0.05$) with a sensitivity of 80.8% and specificity 79.3%. ROC analysis of the evening NOS3 level and the daily average level revealed low sensitivity and specificity of these markes as predictors of RA. At the same time, the decrease in circadian fluctuation in NOS3 level in the evening (by $\lg \Delta \text{NOS3} \leq 1.50$) was an indicator of high risk of comorbid hypertension (OR = 3.78; 95% CI 1.96-7.28, $p < 0.001$) with a sensitivity of 82.5% and a specificity of 72.9%.

For the first time, circadian fluctuations of serum sTLR2 level with a maximum level (acrophase) at 08:00 and a minimum level (bathyphase) at 20:00 was established both, in females with RA and in the control group. Markers of the diurnal sTLR2 production in patients with RA were higher, than in the control group, especially in the morning at 08:00 (342.9 ± 93.4 vs. 181.9 ± 67.1 ng/l, $p < 0.001$). In patients with RA, no correlation between sTLR2 circadian production and age was found. At the same time, an increase in the disease duration, radiological stage and the functional class of joint lesions were associated with an increase in sTLR2 production both in the morning and in the evening. Sero (+) by RF and/or ACCP was associated with more significant increase in sTLR2 daily production (by 15-18%, $p < 0.05$) in RA patients. In RA patients, a high level of sTLR2 at 08:00 (> 375 ng/l) is a predictor of rapid achievement II-III stage by Steinbrocker with 87.5% sensitivity and 78.7% specificity ($p = 0.002$).

In RA patients, decreased production of NOS3 and increased sTLR2 production associated with a higher disease activity. Patients with morning NOS3 level ≤ 420 ng/l were more likely to have high disease by DAS28-ESR > 5.1 (OR = 2.21, 95% CI 1.29 - 4.34) and DAS28-CRP > 5.1 (OR = 2.47, 95% CI 1.33 - 4.58), loss of physical functions by HAQ > 2.0 (OR = 1.72, 95% CI 0.77 - 3.82), gain of influence the disease on the general condition of the patient by the RAID index (OR = 2.37, 95% CI 1.29-4.34). Significant correlation with markers of RA activity were found with with serum level of sTLR2. Thus, in patients with morning level of sTLR2 ≥ 375 ng/l the chances of high activity of the disease by DAS28-ESR were increased (OR = 8.22, 95% CI 3.51 - 19.25) and CDAI (OR = 8.73, 95% CI 3.37 - 22.63), RAID (OR = 4.96, 95% CI 2.55 - 9.65) and HAQ (OR = 2,40, 95% CI 1.09 - 5.28). Markers of RA activity inversely correlated with the morning NOS3 level ($r_{sp} = - (0.27-0.32)$, $p < 0.01$) and directly correlated with morning sTLR2 level ($r_{sp} = 0.46-0.64$, $p < 0.001$). Decreased NOS3 production and increased sTLR2 production were accompanied by deterioration of the physical health component by the SF-36 scale (by 16.5 and 20.2%, $p < 0.05$).

For the first time in RA patients the association between the polymorphism *rs2070744* (*T-786C*) of NOS3 gene and the circadian rhythms of NOS3 and sTLR2 production has been established. Among CC genotype carriers, NOS3 levels in the morning (at 08:00), in the evening (at 20:00) and the daily average level were lower than in the *TT* genotype carriers (by 16-25%, $p < 0.001$) and *TC* (by 12-18%, $p < 0,01$). Also, sTLR2 production was higher in *CC* genotype carriers (15-27%, $p < 0.05$) than in *TT* and *TC* genotype carriers. In *CC* genotype carriers the odds of NOS3 and sTLR2 production disorders were higher than in the *T*-allele carriers (*TT+TC*) with OR = 2.58; 95% CI 1.09 - 6.12 ($p < 0,05$) and OR = 4.13; 95% CI 1.77 - 9.64 ($p = 0.001$).

For the first time, was established that, the imbalance of circadian production of NOS3 and sTLR2 associated with resistance to the therapy. After 12 weeks of therapy with methotrexate among RA patients was 52.6% of ACR20 respondents and 47.4% of non-responder. On the basis of multiple regression analysis, additional predictors of the “non-responder” status were established: the ratio of morning levels NOS3/ sTLR2 ($\beta = 0.366$, $p = 0.000$) and the genotype *CC* ($\beta = -0.177$, $p = 0.016$). In patients with RA with NOS3 / sTLR2 ≤ 1.20 , the chances of treatment resistance increase in 3 times (OR = 3.68; 95% CI 1.60-8.46, $p = 0,002$).

The practical significance of the obtained results is confirmed by the following statements: deepened theoretical understanding of the chronobiological aspects of RA, established the clinical and pathogenic significance of disorders of circadian production of NOS3 and sTLR2 levels in RA patients; revealed new informative predictors of radiographic progression of the disease and resistance to standard treatment; found that the genetically determined factor in the imbalance of circadian production of NOS3 and sTLR2 is genotype *CC* of polymorphism *rs2070744* NOS3 gene; disorders of the evening NOS3 production ($\lg \Delta \text{NOS3} \leq 1.50$) were associated with a high risk of hypertension in RA patients.

Key words: rheumatoid arthritis, endothelial nitric oxide synthase, toll-like receptors 2, circadian rhythms, treatment.

Список публікацій здобувача

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Станіславчук, М.А. Патогенетичне значення ендотеліальної NO-синтази та поліморфізму промотора гена NOS3 при ревматоїдному артриті / М.А. Станіславчук, К.О. Заїчко // Укр. ревматол. журн. - 2018. - № 1 (17). - С. 35-40.
2. Станіславчук, М.А. Крос-культуральна адаптація та валідизація україномовної версії RAID у хворих на ревматоїдний артрит / М.А. Станіславчук, К.О. Заїчко // Укр. ревматол. журн. - 2019.- № 3 (77). - С. 51-55.
3. Заїчко, К. О. Добова варіабельність рівня розчинних тол-подібних рецепторів 2 в сироватці крові жінок, хворих на ревматоїдний артрит: зв'язок з перебігом захворювання / К. О. Заїчко, М. А. Станіславчук, Н. В. Заїчко // Медична та клінічна хімія. - 2019. - № 21 (4). - С. 5-12. DOI 10.11603/mcch.2410-681X.2019.v.i4.10820
4. Zaichko, K. Circadian fluctuations of endothelial nitric oxide synthase activity in females with rheumatoid arthritis: a pilot study / K. Zaichko, M. Stanislavchuk, N. Zaichko // Rheumatology International. - 2020. - Vol. 40. – P. 549-554. DOI 10.1007/s00296-020-04525-4.
5. Заїчко, К. О. Добова варіабельність рівня ендотеліальної NO-синтази (NOS3) в сироватці крові у жінок, хворих на ревматоїдний артрит: зв'язок з перебігом захворювання / К. О. Заїчко, М. А. Станіславчук // Укр. ревматол. журн. - 2020. - № 1 (79). - С. 48-53. DOI 10.32471/rheumatology.2707-6970.79.13183
6. Zaichko K. Associations between efficacy of the therapy and circadian fluctuations of endothelial nitric oxide synthase with toll-like receptors 2 expression, and NOS3 polymorphism in females with rheumatoid arthritis / Zaichko K., Stanislavchuk M., Zaichko N., Khomenko V. // Georgian Medical News. – 2020. - Vol. 2 , No 299.- P. 93-100.
7. Zaichko K. Circadian rhythms of endothelial nitric oxide synthase and toll-like receptors 2 production in females with rheumatoid arthritis depending on NOS3 gene polymorphism / K. Zaichko, N. Zaichko, O. Maievskiyi, O. Korotkyi, T.

Falalyeyeva, Sh.Fagoonee, R. Pellicano, L. Abenavoli, M. Stanislavchuk // *Reviews on Recent Clinical Trials*. – 2020. – Vol. 15, No 2, P. 145-151. DOI : 10.2174/1574887115666200416143512.

8. Пат. №107770 Україна UA МПК (2016) А61В 5/145 (2006.01) G01N33/53 (2006.01) Спосіб прогнозування ефективності лікування ревматоїдного артриту / Станіславчук М.А., Заїчко К. О., Заїчко Н.В.; заявник та патентовласник НДІ реабілітації інвалідів ВНМУ ім. М.І. Пирогова.- № у 2015 11681; заявл. 26.11.2015; опубл. 24.06.2016; Бюл. №12.

9. Пат. №116869 Україна UA МПК (2016) G01N 33/50 (2006.01). Спосіб прогнозування перебігу ревматоїдного артриту за коморбідності з артеріальною гіпертензією / Станіславчук М.А., Заїчко К. О., Заїчко Н.В.; заявник та патентовласник НДІ реабілітації інвалідів ВНМУ ім. М.І. Пирогова. - № у 2016 12366; заявл. 05.12.2016; опубл. 12.06.2017; Бюл. № 11.

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

10.Станіславчук, М. А. Поліморфізм промотору гена eNOS T-786C та вміст галектину-3 в сироватці крові у жінок з ревматоїдним артритом та артеріальною гіпертензією / М.А. Станіславчук, К.О. Заїчко // Матеріали науково-практичної конференції «Стандарти діагностики та лікування в клініці внутрішніх хвороб» 15-16 квітня 2015 р., Вінниця, 2015. - С. 99.

11.Станіславчук, М.А. Поліморфізм промотору гену eNOS T-786C та ефективність базисної терапії метотрексатом у хворих на ревматоїдний артрит / М.А. Станіславчук, К.О. Заїчко // Матеріали VIII Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Досягнення клінічної фармакології та фармакотерапії на шляхах доказової медицини» 9-10 листопада 2015 р., Вінниця, 2015. – С. 128-129.

12.Станіславчук, М.А. Вміст ендотеліальної синтази оксиду азоту у хворих на рематоїдний артрит / М.А. Станіславчук, К.О. Заїчко // Збірник тез наукових робіт учасників всеукраїнської науково-практичної конференції «Актуальні питання лабораторної діагностики та медицини сьогодення» 24 лютого 2016 р., Вінниця, 2016. – С. 58 -59.

13. Заїчко, К.О. Поліморфізм гену ендотеліальної синтази оксиду азоту як фактор ризику артеріальної гіпертензії у хворих на ревматоїдний артрит / К.О. Заїчко // Мат. XIII міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених «Перший крок у науку», 7-8 квітня 2016 р., Вінниця, 2016. - С. 242.

14. Заїчко, К.О. Алельний поліморфізм гену ендотеліальної синтази оксиду азоту NOS3 T-786C як предиктор перебігу ревматоїдного артрити / К.О. Заїчко // Матеріали XX міжнародного медичного конгресу студентів і молодих вчених, 25-27 квітня 2016 р., Тернопіль, 2016. – С. 27.

15. Заїчко, К.О. Артеріальна гіпертензія у жінок з ревматоїдним артритом: зв'язок з перебігом захворювання / К.О. Заїчко, М.А. Станіславчук // Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції «Стандарти діагностики та лікування в клініці внутрішніх хвороб», 27-28 квітня 2016 р., Вінниця, 2016. - С.27-28.

16. Zaichko, K. 203. T-786C Gene promoter polymorphism of endothelial nitric oxide synthase: its association to the disease activity and arterial hypertension in patients with rheumatoid arthritis in the Ukraine population / K. Zaichko, M. Stanislavchuk // British Society of Rheumatology (BSPR) Annual conference, 25-27 April, 2017, Birmingham, United Kingdom. Rheumatology. – 2017. - Vol. 56 (Suppl. 2), ii 129. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kex062.204>

17. Заїчко, К.О. Клініко-патогенетичне значення ендотеліальної синтази оксиду азоту у хворих на ревматоїдний артрит / К.О. Заїчко // Матеріали VII національного конгресу ревматологів України, Київ, 18-20 жовтня 2017 р. Укр. ревматол. журн. – 2017. – № 3 (69). – С. 58.

18. Заїчко, К.О. Діагностичне значення галектину-3 у хворих на ревматоїдний артрит / К.О. Заїчко, М.А. Станіславчук, Н.В. Школіна, Л.Б. Веденко // Мат. науково-практичної конференції «Стандарти діагностики та лікування в клініці внутрішніх хвороб», 25-26 квітня 2017 р., Вінниця, 2017. – С. 94-95.

19. Zaichko, K. Endothelial nitric oxide synthase T-786C gene promoter polymorphism as a possible predictor of high disease activity in patients with rheumatoid arthritis and arterial hypertension in Ukraine population / K. Zaichko,

M. Stanislavchuk // Medical International Conference for Students MEDICS 2017, 30 March - 2 April, Bucharest, Romania, 2017. – P. 31.

20. Zaichko, K. Endothelial nitric oxide synthase T-786C gene promoter polymorphism is a potential predictor of low response to the therapy in patients with rheumatoid arthritis, Ukraine population / K. Zaichko, M. Stanislavchuk, I. Shapoval // Annual European Congress of Rheumatology (EULAR-2017), 14–17 June, 2017, Madrid, Spain. *Annals of the Rheumatic Diseases*. – 2017. - 76 (Suppl 2). – P. 1038-1039. DOI: 10.1136/annrheumdis-2017-eular.3962

21. Stanislavchuk, M. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism as a risk factor of hypertension in patients with rheumatoid arthritis / Stanislavchuk M., Zaichko K., Sulaiman A. // 2017 ACR/ARHP Annual Meeting, November 3-8, 2017, San Diego, CA, USA. *Arthritis Rheumatol*. – 2017. - Vol. 69 (Suppl 10).- [abstract number: 2370].

22. Zaichko, K. Urinary 6-sulfatoxymelatonin excretion and galectin-3 plasma level in patients with osteoarthritis / K. Zaichko, O. Gumeniuk, M. Stanislavchuk // Annual European Congress of Rheumatology (EULAR-2018), 13–16 June, 2018, Amsterdam, The Netherlands. *Annals of the Rheumatic Diseases*. – 2018. - Vol. 77 (Suppl 2). – P. 797. DOI: 10.1136/annrheumdis-2018-eular.3778

23. Zaichko, K. Association between eNOS gene polymorphism and the level of Toll-like receptors 2 in women with rheumatoid arthritis/ K. Zaichko, M. Stanislavchuk // *Мат. науково-практичної конференції Асоціації ревматологів України «Ревматоїдний артрит та споріднені з ним хвороби: локальні та системні ураження. Стратегія персоніфікованого лікування»*, Київ, 28-29 листопада 2018 р. *Ukr. Rheum. J.* – 2018. – Vol. 3 (73). – P. 94.

24. Заїчко, К.О. Досвід застосування опитника RAID у хворих на ревматоїдний артрит / К.О. Заїчко, Н.В. Школіна, Т. І. Плазовський // *Матеріали науково-практичної конференції «Стандарти діагностики та лікування в клініці внутрішніх хвороб»*, 25 квітня 2019 р., Вінниця, 2019. – С.19-20.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ	16
ВСТУП	17
РОЗДІЛ 1 СУЧАСНІ АСПЕКТИ ПАТОГЕНЕЗУ, ХРОНОБІОЛОГІЇ ТА ЛІКУВАННЯ РЕВМАТОЇДНОГО АРТРИТУ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	24
1.1 Сучасні аспекти епідеміології та патогенезу ревматоїдного артриту	25
1.2 Роль системи NOS3 / NO в патогенезі ревматоїдного артриту: зв'язок з поліморфізмом гена <i>NOS3</i>	31
1.3 Хронобіологічні аспекти ревматоїдного артриту	36
1.4 Сучасні принципи лікування ревматоїдного артриту: зв'язок з циркадними ритмами	42
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	49
2.1 Клінічна характеристика обстежених хворих	49
2.2 Методи дослідження	55
2.3 Методи лікування	61
2.4 Методи статистичної обробки отриманих результатів	62
РОЗДІЛ 3 ЦИРКАДНІ РИТМИ ПРОДУКЦІЇ ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ СИНТАЗИ ОКСИДУ АЗОТУ У ЖІНОК, ХВОРИХ НА РЕВМАТОЇДНИЙ АРТРИТ: ЗВ'ЯЗОК З ПЕРЕБІГОМ ТА ПОЛІМОРФІЗМОМ <i>rs2070744</i> ГЕНА <i>NOS3</i>	64
3.1 Циркадні особливості продукції NOS3 у хворих на РА	65
3.2 Клінічні особливості хворих на РА: зв'язок з варіабельністю рівня NOS3 в сироватці крові	77
3.3 Зв'язок циркадних ритмів продукції NOS3 з поліморфізмом <i>rs2070744</i> гена <i>NOS3</i> у хворих на РА	86
РОЗДІЛ 4 ЦИРКАДНІ РИТМИ ПРОДУКЦІЇ ТОЛ-ПОДІБНИХ	98

РЕЦЕПТОРІВ 2 У ЖІНОК, ХВОРИХ НА РЕВМАТОЇДНИЙ АРТРИТ

4.1	Циркадні особливості продукції sTLR2 у хворих на РА	99
4.2	Клінічні особливості хворих на РА: зв'язок з варіабельністю рівня sTLR2 в сироватці крові	108
4.3	Зв'язок циркадних ритмів продукції sTLR2 з поліморфізмом <i>rs2070744</i> гена <i>NOS3</i> та рівнем <i>NOS3</i> у хворих на РА	119
РОЗДІЛ 5	ЕФЕКТИВНІСТЬ ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ НА РЕВМАТОЇДНИЙ АРТРИТ: ЗВ'ЯЗОК З ЦИРКАДНИМИ РИТМАМИ ПРОДУКЦІЇ <i>NOS3</i> ТА sTLR2, ПОЛІМОРФІЗМОМ <i>rs2070744</i> ГЕНА <i>NOS3</i>	124
РОЗДІЛ 6	АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	139
	ВИСНОВКИ	156
	ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ	158
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ	159
	ДОДАТОК А	198
	ДОДАТОК Б	204
	ДОДАТОК В	206

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

АГ	- артеріальна гіпертензія
АЦЦП	- антитіла до циклічного цитрулінованого пептиду
ВАШ	- візуально-аналогова шкала
ГК	- глюкокортикоїди
ЗОАЗЛ	- загальна оцінка активності захворювання лікарем
ЗОАЗП	- загальна оцінка активності захворювання пацієнтом
КБС	- кількість болючих суглобів
КНС	- кількість набряклих суглобів
МТХ	- метотрексат
НПЗЗ	- нестероїдні протизапальні засоби
РА	- ревматоїдний артрит
РФ	- ревматоїдний фактор
СРП	- С-реактивний протеїн
ФК	- функціональний клас
ХМПРП	- хворобомодифікуючі протиревматичні препарати
ХМПРТ	- хворобомодифікуюча протиревматична терапія
ШОЕ	- швидкість осідання еритроцитів
ACR	- Американський коледж ревматологів
EULAR	- Європейська протиревматична Ліга
CDAI	- клінічний індекс активності захворювання
95% CI	- 95% довірчий інтервал
DAS28	- індекс активності захворювання за 28 суглобами
HAQ	- опитник Health Assessment Questionnaire
NO	- оксид азоту
NOS3	- ендотеліальна синтаза оксиду азоту
OR	- відношення шансів (Odds Ratio)
RAID	- опитник Rheumatoid Arthritis Impact of Disease
T-786C	- заміна тиміну (T) в положенні 786 на цитозин (C)
(s) TLR-2	- (розчинні) тол-подібні рецептори 2 типу

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Ревматоїдний артрит (РА) - аутоімунне полігенне захворювання, що характеризується прогресивним перебігом, швидкою інвалідизацією понад 50% хворих упродовж 5 років та резистентністю до лікування. РА має високу поширеність (близько 1%) і в Україні виявляється із частотою близькою до 288 випадків на 100 тис дорослого населення [26; 30; 44]. У 2017 р. захворюваність на РА серед осіб працездатного віку склала 14,7 випадків на 100 тис населення України [26].

В сучасній клінічній ревматології спостерігається значний прогрес у зв'язку із встановленням молекулярних механізмів розвитку РА та розробкою на цій основі нових методів діагностики та фармакотерапії [251; 252]. Водночас, проблема резистентності до лікування хворих на РА залишається не вирішеною: близько 40% осіб не відповідають на базисні хворобомодифікуючі протиревматичні препарати (ХМПП), з них 20% осіб не відповідають на комбіновану терапію із включенням біологічних препаратів [82; 138; 201; 230].

В патогенезі РА важливу роль відіграють порушення циркадної регуляції імунозапальних та проліферативних процесів в суглобових тканинах, що зумовлені розладами експресії генів біологічного годинника (clock-генів) [165; 212], десинхронизацією секреції гормонів-регуляторів біологічних ритмів (мелатоніну, кортизолу) та медіаторів запалення (ІЛ-6, ФНП α) [98; 271]. Перспективною стратегією підвищення ефективності та безпеки лікування хворих на РА вважають хронотерапію, яка ґрунтується на синхронізації прийому окремих препаратів (глюкокортикоїдів, НПЗЗ, метотрексату) з циркадними ритмами продукції гормонів та цитокінів [98; 271]. Тому хронобіологічні предиктори резистентності до лікування у осіб різного віку та статі потребують більш детального вивчення.

Провідну роль у розвитку РА відіграє ангиогенез, перебіг якого контролюється clock-генами [152]. До регуляції різних ланок ангиогенезу

залучені ендотеліальна синтаза оксиду азота (NOS3) [73; 204; 205] та тол-подібні рецептори 2 (TLR2) [234]. NOS3 експресується не лише в ендотелії судин, а й в остеоцитах, впливає на ремоделювання кісткової тканини [91], виявляє імуномодулюючу дію і підтримує баланс Th1 / Th2 [283]. Продукція NOS3 контролюється геном *NOS3*, поліморфізм якого може впливати на перебіг РА [6; 79].

TLR2 в ревматоїдній синовії активують процеси міграції та інвазії клітин [197], експресію прозапальних цитокінів [145] та медіаторів ангиогенезу [92; 234]. В крові ці рецептори представлені розчинною формою (sTLR2), різноспрямовані зміни якої відмічено при аутоімунних запальних процесах [143; 144]. Циркадні ритми продукції NOS3 та sTLR2 у хворих на РА не досліджувались, не відомий зв'язок цих медіаторів з перебігом захворювання та ефективністю лікування. Більш детальне вивчення цього питання дозволить встановити нові чинники резистентності до лікування і персоніфікувати підходи до вибору фармакотерапевтичної тактики у хворих на РА.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в рамках планової НДР кафедри внутрішньої медицини №1 Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова «Генетичні та середовищні чинники в виникненні та прогресуванні основних ревматологічних захворювань», № держреєстрації – 0115U001282. Автор є співвиконавцем вказаної теми.

Мета дослідження: удосконалити діагностику та контроль ефективності лікування хворих на ревматоїдний артрит на основі встановлення циркадних ритмів продукції ендотеліальної синтази оксиду азоту (NOS3) та тол-подібних рецепторів 2 (sTLR2) і оцінки їх клініко-патогенетичної значимості.

Завдання дослідження

1. Дослідити добову варіабельність рівня ендотеліальної синтази оксиду азоту (NOS3) в сироватці крові у жінок, хворих на РА, оцінити зв'язок з віком, тривалістю та рентгенологічною стадією захворювання.

2. Встановити клінічні особливості хворих на РА за показниками активності захворювання (DAS28, CDAI, ШОЕ, СРП), функціонального стану та якості життя (HAQ, SF-36, RAID) залежно від циркадних ритмів продукції NOS3.
3. Дослідити добову варіабельність рівня розчинних тол-подібних рецепторів 2 (sTLR2) в сироватці крові у жінок, хворих на РА, оцінити зв'язок з віком, тривалістю, рентгенологічною стадією, активністю захворювання, показниками функціонального стану та якості життя.
4. Дослідити частоту алелей та генотипів за поліморфізмом *rs2070744(T-786C)* гена *NOS3* та оцінити їх асоціацію з варіабельністю продукції NOS3 та sTLR2 у жінок, хворих на РА (жителів Подільського регіону).
5. Оцінити ефективність стандартної хворобомодифікуючої протиревматичної терапії у хворих на РА залежно від циркадних особливостей продукції NOS3, sTLR2, носійства варіантних алелей та генотипів за поліморфізмом *rs2070744* гена *NOS3*, і на цій основі визначити нові предиктори резистентності до лікування.

Об'єкт дослідження: патогенетичні особливості РА.

Предмет дослідження: циркадні ритми продукції медіаторів ангиогенезу NOS3, sTLR2; зв'язок вказаних чинників з перебігом РА, якістю життя, носійством алельних варіантів поліморфізму *rs2070744(T-786C)* гена *NOS3*.

Методи дослідження: клінічні (DAS28, CDAI, HAQ, SF-36, RAID), лабораторні (ШОЕ, РФ, АЦЦП), інструментальні (рентгенографія суглобів), молекулярно-генетичні (поліморфізм *rs2070744* гена *NOS3*), імуноферментні (вміст NOS3, sTLR2 в сироватці крові), статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів

Вперше досліджені циркадні особливості продукції NOS3 та sTLR2 у хворих на РА, оцінено зв'язок з показниками перебігу та активності захворювання, встановлено нові хронобіологічні предиктори швидкого прогресування РА та резистентності до лікування. Встановлено, що у хворих на РА (як і у практично здорових осіб) показники хронограм сироваткових рівнів sTLR2 та NOS3 знаходяться у протифазі: вранці (о 08⁰⁰) зареєстровано

найнижчі рівні NOS3 та найвищі рівні sTLR2, ввечері (о 20⁰⁰) – найвищі рівні NOS3 та найнижчі рівні sTLR2. У хворих на РА всі показники хронограми сироваткового рівня NOS3 є нижчими (в 1,2-1,3 рази, $p < 0,001$), а показники хронограми рівня sTLR2, навпаки, вищими (в 1,9-2,2 рази, $p < 0,001$), ніж у осіб групи контролю. Зниження ранкового рівня NOS3 асоціюється з підвищенням рівня sTLR2 упродовж доби ($r_{sp} = -0,41$, $p < 0,01$).

Вперше засвідчено, що у хворих на РА аберантні показники ранкової продукції NOS3 та sTLR2 є предикторами швидкої рентгенологічної прогресії захворювання і асоціюються з високою активністю запального та больового синдромів (за DAS28-ШОЕ, DAS28-СРБ, CDAI) порушенням фізичних функцій (за HAQ), посиленням впливу захворювання (за RAID) та погіршенням показників якості життя (за SF-36). Натомість, пригнічення вечірньої продукції NOS3 статистично значуще асоціюється з коморбідною артеріальною гіпертензією.

Вперше виявлено, що у хворих на РА носійство алельних варіантів поліморфізму *rs2070744* гена *NOS3* асоціюється зі змінами циркадних ритмів продукції NOS3 та sTLR2: у носіїв генотипу *CC* втричі частіше виявляються аберантні ранкові рівні NOS3 та sTLR2, статистично значуще знижується відношення NOS3 / sTLR2 порівняно із носіями генотипів *TT* та *TC*. Доведено, що дисбаланс ранкової продукції медіаторів ангіогенезу ($NOS3 / sTLR2 \leq 1,20$) та носійство генотипу *CC* є незалежними предикторами високої резистентності до лікування у хворих на РА.

Практичне значення одержаних результатів

За результатами дослідження поглиблені теоретичні уявлення щодо хронобіологічних аспектів РА та встановлено клініко-патогенетичне значення показників циркадної продукції медіаторів ангіогенезу, запалення та остеодеструкції - NOS3 та sTLR2 у хворих на РА. Виявлені нові предиктори швидкої рентгенологічної прогресії захворювання та недостатньої ефективності лікування (аберантні ранкові рівні NOS3 та sTLR2) у хворих на РА. Встановлено, що у хворих на РА генетично-детемінованим чинником

дисбалансу продукції NOS3 та sTLR2 є гомозиготне носійство С-алелі за поліморфізмом *rs2070744* гена *NOS3*. Показано, що зниження вечірньої продукції NOS3 ($\lg \Delta NOS3 \leq 1,50$) асоціюється з коморбідною АГ у хворих на РА. За результатами дослідження розроблено 2 патенти України на корисні моделі (№107770; №116869).

Результати дослідження впроваджені в клінічну роботу ревматологічного відділення Науково-дослідного інституту реабілітації осіб з інвалідністю Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, Високоспеціалізованого клінічного центру ревматології, остеопорозу та біологічної терапії Комунального некомерційного підприємства «Вінницька обласна клінічна лікарня імені М.І. Пирогова Вінницької обласної Ради», ревматологічного відділення Багатопрофільного медичного центру Одеського національного медичного університету, ревматологічного відділення Комунального некомерційного підприємства «Хмельницька обласна лікарня Хмельницької обласної Ради», ревматологічного відділення Комунального некомерційного підприємства «Обласна клінічна лікарня Івано-Франківської обласної ради». Результати дослідження використовуються в науковій роботі та навчальному процесі кафедр внутрішньої медицини №1, внутрішньої медицини №2 Вінницького національного медичного університету ім. М.І.Пирогова.

Особистий внесок здобувача

Дисертаційна робота є самостійною науковою працею автора. Автором самостійно проведений патентно-інформаційний пошук, аналіз наукової літератури за темою дисертації, визначено напрямки наукового дослідження, проведені клінічні дослідження, статистично опрацьовані отримані результати, оформлені всі розділи дисертаційної роботи. Тема, мета, завдання, основні положення дисертації висновки, практичні рекомендації обговорені з науковим керівником, д.мед.н., професором Станіславчуком М.А., і сформульовані автором самостійно. Біохімічні дослідження виконані на базі науково-дослідної клініко-діагностичної лабораторії ВНМУ ім. М.І. Пирогова

(свідоцтво МОЗ України №049/15 від 02.03.2015 р.) Молекулярно-генетичні дослідження виконані на базі навчально-наукової клініко-діагностичної лабораторії ПЛР ВНМУ ім. М.І. Пирогова (свідоцтво МОЗ України №051/15 від 02.03.2015 р.). Автор висловлює глибоку вдячність колегам за допомогу у проведенні досліджень, співучасть яких у виконанні роботи відмічена у спільних публікаціях. Автор не запозичував ідеї та розробки співавторів публікацій.

Апробація результатів дослідження. Основні положення роботи доповідались на науково-практичній конференції «Стандарти діагностики та лікування в клініці внутрішніх хвороб» (Вінниця, 2015); VIII Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Досягнення клінічної фармакології та фармакотерапії на шляхах доказової медицини» (Вінниця, 2015); науково-практичній конференції «Актуальні питання лабораторної діагностики та медицини сьогодні» (Вінниця, 2016); XIII Міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку - 2016» (Вінниця, 2016); XX міжнародному медичному конгресі студентів і молодих вчених (Тернопіль, 2016); всеукраїнській науково-практичній конференції «Стандарти діагностики та лікування в клініці внутрішніх хвороб» (Вінниця, 2016); науково-практичної конференції «Стандарти діагностики та лікування в клініці внутрішніх хвороб» (Вінниця, 2017); British Society of Rheumatology (BSR) Annual conference (Birmingham, United Kingdom, 2017), Medical International Conference for Students MEDICS 2017 (Bucharest, Romania, 2017); VII Національному конгресі ревматологів України (Київ, 2017); Annual European Congress of Rheumatology, EULAR-2017 (Madrid, Spain, 2017); 2017 ACR/ARHP Annual Meeting (San Diego, CA, USA, 2017); науково-практичній конференції асоціації ревматологів України «Ревматоїдний артрит та споріднені з ним хвороби: локальні та системні ураження. Стратегія персоніфікованого лікування» (Київ, 2018); Annual European Congress of Rheumatology EULAR-2018 (Amsterdam, The Netherlands, 2018); науково-практичній мультидисциплінарній конференції «Досягнення

сучасної медицини та фармакології на засадах медичної біохімії», до 70-річчя від дня народження професора О.О. Пентюка (Вінниця-2019); науково-практичній конференції, присвяченій пам'яті академіка М.Д. Стражеска «Особливості надання медичної допомоги хворим на серцево-судинні захворювання в сучасних умовах» (Київ, 2020), засіданнях кафедри внутрішньої медицини №1 Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова (2016-2020 р.р.).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 24 наукових праці: 4 статті у наукових фахових виданнях МОН України, 3 статті – у фахових періодичних іноземних виданнях (Німеччина, Італія, Грузія), що цитуються в Scopus і Web of Science, 15 тез - в матеріалах конгресів та конференцій, 2 патенти України.

Структура і обсяг дисертації. Дисертація викладена українською мовою на 212 сторінках друкованого тексту (основна текстова частина – 140 сторінок) і складається з анотації, вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, 3 розділів власних досліджень, аналізу і узагальнення отриманих результатів, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних літературних джерел, що включає 301 найменування (з них 253 латиницею), додатків. Робота ілюстрована 47 таблицями та 24 рисунками.

РОЗДІЛ 1

СУЧАСНІ АСПЕКТИ ПАТОГЕНЕЗУ, ХРОНОБІОЛОГІЇ ТА ЛІКУВАННЯ РЕВМАТОЇДНОГО АРТРИТУ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

Ревматоїдний артрит (РА) - аутоімунне полігенне захворювання з прогресивним перебігом, що асоціюється із значним погіршенням якості життя, швидкою інвалідизацією хворих та резистентністю до лікування. Вивчення етіології та патогенезу РА на молекулярному рівні стало підґрунтям для розробки та впровадження в клінічну практику нових діагностичних моделей та засобів хворобомодифікуючої протиревматичної терапії (ХМПРТ) [251; 252], що зумовило значний прогрес в клінічній ревматології, але проблему резистентності та безпеки лікування остаточно не вирішило. Біля 40% хворих на РА не відповідають на базисні хворобомодифікуючі протиревматичні препарати (ХМПРП), 20% хворих не відповідають навіть на комбіновану ХМПРТ із застосуванням антицитокінових препаратів [82; 138; 201; 230]. Крім того, висока вартість біологічної терапії обмежує можливість її широкого впровадження в клінічну практику [69; 76], в тому числі в Україні.

Перспективною стратегією підвищення лікувального ефекту та профілю безпеки ХМПРП у хворих на РА є хронотерапія, що ґрунтується на засадах хронобіології [98; 271]. Встановлення циркадних ритмів продукції ключових біорегуляторів та медіаторів імунозапального процесу, ангіогенезу, ремоделювання суглобових тканин доводить доцільність добової синхронізації фармакотерапії РА, що зокрема потрібно враховувати при призначенні глюкокортикоїдів [98]. Доведено, що до регуляції ангіогенезу залучені clock-гени [152], між тим добова варіабельність продукції проангіогенних медіаторів у хворих на РА практично не досліджувалась. Наприклад, у хворих на РА не встановлені добові ритми продукції та клініко-патогенетичне значення таких медіаторів ангіогенезу як NOS3 та TLR2, експресія яких пов'язана із роботою clock-генів [60; 249].

Завданням даного розділу було проаналізувати та узагальнити наукову інформацію щодо сучасних аспектів патогенезу та лікування РА із акцентом на особливості циркадних ритмів продукції ключових медіаторів імунозапального процесу та ангиогенезу, висвітлити перспективні напрямки підвищення ефективності контролю за перебігом захворювання та принципи хронотерапії хворих на РА.

1.1 Сучасні аспекти епідеміології та патогенезу ревматоїдного артриту

В сучасному світі захворювання суглобів належать до найбільш вагомих причин погіршення здоров'я та стійкої втрати працездатності населення різних країн. Наприклад, в США (CDC, 2013–2015 р.р., National Health Interview Survey) 54,4 млн (22,7%) дорослих осіб мають суглобові захворювання, діагностовані лікарем, і до 2040 року прогнозується збільшення таких хворих до 78,4 млн із збільшенням прямих витрат на лікування до 81 млн доларів [67].

Чільне місце серед суглобових захворювань посідає РА, що має високу поширеність і в середньому вражає біля 1% населення країн Європи та Північної Америки [136; 247]. В окремих етнічних групах розповсюдженість РА може бути значно вищою – біля 5-6% серед індіанців Піма та Чіппева, або нижчою - біля 0,1% серед населення Африки, Японії та Китаю [247]. В Туреччині поширеність РА становить 0,56% і є значно вищою серед жінок, ніж серед чоловіків - 0,89% проти 0,1%, відповідно [275]. Поширеність РА неухильно зростає, зокрема в канадській популяції (Онтаріо) захворюваність за 10 років зростає з 0,49% (473 на 100 000 населення у 1996 р.) до 0,9% (784 на 100 000 населення в 2010 р.) [286].

В Україні масштабних популяційних досліджень по епідеміології РА не проводилось. За різними даними, частота цього захворювання серед українського населення варіює від 0,4 до 1,4% і в середньому становить 288 випадків на 100 тис осіб [26; 30; 44]. За даними офіційної статистики МОЗ України в 2013 році реєструвалось 115 515 хворих на РА (з них біля 49 тисяч

осіб працездатного віку), а захворюваність становила 4069 осіб [29]. Частота РА серед жінок є в 3-4 рази вищою, ніж серед чоловіків, хоча серед серопозитивних пацієнтів та осіб похилого віку статеві відмінності за цим показником є менш суттєвими [26; 44]. Схожі епідеміологічні показники щодо поширеності РА зафіксовані у Польщі – загальна поширеність 0,9%, в тому числі серед жінок – 1,06% та 0,74% серед чоловіків [69]. У 56% польських пацієнтів з вперше діагностованим РА виявлена висока активність захворювання із DAS-28 > 5,1 [69].

У 58,7-72% хворих на РА виявляються коморбідні стани, які можуть суттєво модифікувати перебіг захворювання, погіршувати ефективність лікування та зменшувати тривалість життя [31; 48; 112; 186]. Коморбідні стани частіше виявляються у пацієнтів похилого віку (> 65 років) [155]. Найбільш високою є коморбідність РА з серцево-судинною патологією, що асоціюється з високою активністю імунозапального процесу і розглядається як чинник низької ефективності базисної терапії [25; 48; 93]. Серед інших коморбідних станів, які обтяжують перебіг та знижують ефективність лікування РА, слід відзначити остеоартрит, остеопороз, тривожність та депресивні розлади [186; 254], фіброміалгію [33; 34]. Ризик серопозитивного РА суттєво підвищується при тютюнопалінні (OR 1,9, 95% CI 1,7-2,1) [134].

Контроль перебігу РА залишається складною проблемою сучасної ревматології, адже біля 20-40% хворих залишаються нереспондерами різних варіантів ХМПРТ [82; 150]. Підвищення ефективності фармакотерапії РА є її серйозною економічною проблемою. Наприклад, в Болгарії витрати на лікування хворих на РА різними біологічними препаратами коливались від 66 до 30 тисяч євро для досягнення покращення якості життя на 1 бал за шкалою EQ5D за рік і економічно вигідним виявився лише ритуксимаб [76]. В одному з досліджень показано, що переключення одного варіанту ХМПРТ на інший суттєво підвищує щомісячну вартість лікування хворих на РА (в середньому з 2297 до 3364 \$) [242].

Недостатня ефективність лікування хворих на РА може пояснюватись нез'ясованістю окремих ланок патогенезу цього захворювання. Це підтверджує і той факт, що фармакогенетичні моделі прогнозу ефективності базисної терапії РА, які здебільшого включають оцінку поліморфізму генів фолатного циклу, виявляють неоднозначну чутливість та специфічність у різних популяціях [113; 178; 187]. Таким чином, дослідження нових аспектів патогенезу РА та оцінка клінічної значущості потенційних предикторів перебігу захворювання та ефективності лікування залишається актуальною проблемою сучасної ревматології.

Патогенез РА. РА відноситься до мультифакторних полігенних захворювань із складним патогенезом та остаточно нез'ясованою етіологією. Тригерним механізмом РА вважають ініціацію імунозапального процесу в синовіальній оболонці суглобів [30; 44]. Синовіт при РА характеризується неоангіогенезом, формуванням панусу та наступною деструкцією суглобового хряща та субхондрального відділу кісток [240]. За сучасними уявленнями, ключовим тригером РА є утворення аутоантитіл і аутореактивних Т-клітин у синовіальній оболонці до артритогенного антигену, які часто передують появі перших симптомів захворювання [119]. На даний час виділяють три основні механізми розвитку синовіїту: неімунний, апоптозний та імунозапальний.

Імунозапальний механізм розвитку РА полягає у імунній відповіді Т-хелперів 1 типу (Th_1) на артритогенні антигени, порушенням балансу у системі про- (ІЛ-1 α , ІЛ- β , ІЛ-7, ІЛ-17, ІЛ-18, ФНП- α) і протизапальних цитокінів, активацією В-лімфоцитів з продукцією аутоантитіл, що розпочинається в синовіальній оболонці та поширюється на інші тканини [11; 194; 229;]. Пусковим чинником у розвитку синовіїту є секреція макрофагами прозапальних цитокінів (ФНП- α , ІЛ-1, ІЛ-6) та пригнічення диференціації регуляторних Т-лімфоцитів [75]. Синовіальні фібробласти при РА (RASf) продукують ІЛ-6, який стимулює секрецію прозапальних цитокінів (ФНП α , ІЛ-17) Т-лімфоцитами (Th_{17}) та промотує розвиток синовіїту [68; 158; 174]. RASf також експресують активатор рецепторів ліганду нуклеарного фактору κB

(RANKL), що полегшує диференціацію моноцитів/ макрофагів в остеокласти і стимулює таким чином патологічну резорбцію субхондральної кістки з формуванням ерозій [103]. В ураженому суглобі значно зростає рівень прозапальних цитокінів та хемокінів (ФНП- α , ІЛ-1, ІЛ-8, МСР-1 та інших), які активують фібробласти, остеокласти, нейтрофіли, макрофаги, стимулюють проліферацію синовіальних клітин [78; 203]. Прогресуюче аутоімунне запалення синовії призводить до формування пануса, інвазивний ріст якого спричиняє деградацію суглобового хряща та субхондральної кістки, як безпосередньо (через резорбцію остеокластами кісткової тканини), так і опосередковано (через активацію секреції протеолітичних ензимів – матриксних металопротеїназ, катепсинів, плазмінів) [147; 158; 206].

Найбільш вірогідними імуногенами при РА є цитруліновані протеїни синовіальної оболонки – цитрулінований віментин, пептиди у складі колагену І та ІІ типу, α - та β -ланцюги фібрину [163; 95; 193]. Антитіла до цитрулінованих циклічних пептидів (АЦЦП), і особливо, до віментину, є чутливим індикатором формування ревматоїдного ураження суглобів ще на доклінічному етапі [71; 195]. Наявність у крові пацієнтів з РА антитіл до АЦЦП асоціюється з вищою активністю хвороби, системними проявами, прогресією рентгенологічних симптомів [47; 195].

Важлива роль у активації синовії належить Toll-подібним рецепторам (TLR), які запускають сигнальні механізми експресії прозапальних цитокінів RASF [80; 106; 145; 219; 239]. В експериментальних дослідженнях показано, що найбільш важливу роль в ініціації та розвитку запального процесу при РА відіграють TLR2 та TLR4 [106; 182], які стимулюють продукцію ФНПа, ІЛ-6, ІЛ-12, ІЛ-18 в суглобових тканинах [145; 223]. Активація TLR2 викликає дисрегуляцію експресії мітохондріальних генів RASF, розвиток оксидативного стресу та гіпоенергетичного стану [196], активацію остеокластогенезу та кісткової резорбції [211; 222]. Натомість, TLR9 можуть підвищувати толерантність та стримувати розвиток запальної реакції в ревматоїдній синовії [137].

Апоптозний механізм. У спробі пояснити причини збільшення кількості клітин у суглобових тканинах при РА виникла теорія дисрегуляції апоптозу або теорія «неспецифічного апоптозу» (bystander apoptosis) [30]. Як відомо, в суглобових тканинах при РА відбувається активація багатьох сигнальних шляхів - NF-κB, фосфатидилінозитол-3-каїназа/Akt-1 та інших, які активують експресію не лише прозапальних генів, а й генів, що контролюють синтез антиапоптозних протеїнів (Bcl-2, Mcl-1, FLICE інгібіторного протеїну, Bcl-xL) [147; 181]. Останні пригнічують рецептор-залежний та рецептор-незалежний шляхи апоптозу в лімфоїдних та синовіальних клітинах. Як відомо, RASF є резистентними до дії індукторів апоптозу та запуску механізмів запрограмованої смерті, особливо у проліферативну фазу їх клітинного циклу [177; 221]. Встановлено, що ступінь інфільтрації ураженого суглобу лімфоцитами, макрофагами і синовіальними фібробластами відповідає збільшенню експресії антиапоптозного протеїну Bcl-2 в синовії при РА [215; 216]. Посилення експресії Bcl-2 сприяє виживанню Т-лімфоцитів та посиленню клітинної інфільтрації [147; 181]. Існує думка, що RASF можуть відігравати певну роль в пригніченні апоптозу Т-клітин, що експресуються з фенотипом «чутливим до апоптозу» - з низьким рівнем Bcl-2 та високим рівнем Вах Fas-ліганду. Частота загибелі Т-лімфоцитів у синовії є низькою, хоча ці клітини погано виживають *in vitro* за відсутності синовії [11].

Неімунний механізм. RASF відрізняються високою інвазивною активністю, здатністю до міграції та проліферації, що пов'язують з активацією онкогенної мережі із включенням протоонкогенів та трансформацією нормального клітинного циклу [11; 266]. Існують дані, що протеїни з родини протоонкогенів (c-myc, Jun, Fos) експресуються в ревматоїдній синовії [146].

Одним із важливих механізмів патогенезу РА є **ангіогенез** - активація проліферації ендотеліальних клітин та формування нових кровоносних судин в умовах гіпоксії під впливом ангіогенних медіаторів [192; 240]. Найбільш важливим проангіогенним медіатором є васкулоендотеліальний фактор росту

(VEGF), продукція якого активується у відповідь на чинники, наявні в ревматоїдній синовії: прозапальні цитокіни (ФНП α , ІЛ-1 β , ІЛ-17, ІЛ-6), медіатори запалення (простагландини), фактори, що індукуються гіпоксією (HIF), фактори клітинної проліферації та інгібітори апоптозу, галектин-3 та інші [121; 155; 190; 214]. VEGF підвищує проникність судинної стінки, активує проліферацію та міграцію ендотеліальних клітин, посилює синовіальну вакуляризацію, що призводить до збільшення лімфоцитарної інфільтрації, гіперплазії синовії та прогресуванню суглобової деструкції. В свою чергу формування нових кровоносних судин збільшує надходження кисню та поживних речовин до запальної клітинної маси, що сприяє підтриманню синовіту - формується хибне коло [268]. Посилення ангиогенезу при РА підтверджується результатами мікроскопії синовіальних біоптатів та при артроскопії синовії, при цьому ступінь синовіальної васкуляризації та вміст в синовіальній рідині VEGF тісно корелюють з активністю та рентгенологічною стадією РА [65; 114; 153]. У хворих на РА у сироватці крові та синовіальній рідині виявляється підвищення концентрація VEGF [28; 65].

Багато інших факторів росту, що продукуються паннусом (тромбоцитарний фактор росту, фактор росту фібробластів, інсуліноподібний фактор росту) причетні до ремоделювання судин в суглобах [96; 232]. Експериментально доведено, що TLR2 залучені до регуляції ангиогенезу через різні сигнальні системи - стимуляцію експресії VEGF [91] та активацію рецепторів ангиопоетину Tie2 [234]. В культурі ревматоїдної синовії активація TLR2 спричиняла формування ангиогенних трубок, інвазію та міграцію ендотеліальних клітин, підвищення експресії ангиопоетину-2 (Ang2), адгезивних молекул ICAM-1, матриксних металопротеїназ MMP-2 та MMP-9 [234]. Експресія TLR2 виявлена в періваскулярних ділянках синовії [223], а активація TLR2 індукувала експресію VEGF/ІЛ-8 в культурі синовіальних фібробластів [91] та хондроцитів [278]. Слід відзначити, що вплив VEGF на процес ангиогенезу переважно реалізується через посилення ендотеліальної продукції NO внаслідок стимуляції експресії ендотеліальної синтази оксиду

азоту (NOS3) [73; 204; 205]. Не виключено, що система NOS3/NO інтегрована в патогенез РА, однак чітка інформація з цього питання відсутня.

Формування нових кровоносних судин збільшує надходження кисню та поживних речовин до запальної клітинної маси, що сприяє підтриманню синовіиту - формується хибне замкнене коло [268]. Посилення ангиогенезу при РА підтверджується за результатами мікроскопії синовіальних біоптатів та при артроскопії синовії, а ступінь синовіальної васкуляризації корелює із активністю захворювання [258]. Вивчення клініко-патогенетичного значення NOS3 та TLR2 у хворих на РА може підвищити ефективність контролю за перебігом захворювання, але це питання вимагає окремих досліджень.

1.2 Роль системи NOS3 / NO в патогенезі ревматоїдного артриту: зв'язок з поліморфізмом гена *NOS3*

В організмі синтез NO відбувається з амінокислоти L-аргініну (L-аргінін → L-цитрулін + NO) за участі синтази оксиду азоту (NOS; КФ 1.14.13.39), яка представлена трьома ізоформами - нейрональною (nNOS або NOS1), індукцибельною (iNOS або NOS2) та ендотеліальною (eNOS або NOS3) [191]. Роль iNOS в патогенезі РА є добре відомою і реалізується через гіперпродукцію NO та нітрозативний стрес, активацію катаболічних процесів, запалення та апоптозу за участі макрофагальних та лімфоцитарних клітин, синовіоцитів, фібробластів, остеобластів, хондроцитів [109; 274].

Ishiuchi N. та ін. (1999) при дослідженні біоптатів синовіальної оболонки хворих на РА в синовіоцитах та інтерстиціальних клітинах одночасно з експресією індукцибельної iNOS вперше виявили експресію NOS3, яка конститутивно експресується в ендотелії і не виявляється в синовії хворих на ОА [149]. Існує думка, що підвищення ендотеліальної продукції NO може посилювати ангиогенез в ревматоїдній синовії, адже у хворих на РА в плазмі крові та синовіальній рідині були виявлені високі концентрації кальретікуліну

– мультифункціонального протеїну ендоплазматичного ретикулума, який підвищує функціональну активність NOS3 [111].

З іншого боку, у хворих на РА зниження активності NOS3 може бути потенційним чинником змін ремоделювання кісткової тканини, оскільки цей ензим експресується в остеocyтах і регулює остеогенез [86; 91]. Встановлено, що в кістковій тканині NO через систему транскрипційного ядерного фактору NF-κB та остеопротегерину пригнічує остеокластогенез та знижує резорбцію кістки [91]. Нокаут гена NOS3 викликає значні порушення ендохондральної осифікації, проліферації та диференціації остеобластів, мінералізації кісткової тканини [50], пригнічення проліферації хондроцитів та інгібування ендохондрального росту кістки [289]. Зниження активності NOS3 вважають чинником ідіопатичного аваскулярного некрозу голівки стегнової кістки [123]. Дисфункція NOS3 та зниження синтезу ендотеліального NO асоціюється з підвищенням експресії прозапальних медіаторів - NF-κB, циклооксигенази-2 [74; 129]. NOS3 виявляє імуномодулючу дію і підтримує баланс Th1 / Th2 [118; 283]. Зниження NO-синтазної активності NOS3 (ефект роз'єднання із переключенням ензиму на синтез активної форми кисню - супероксид-аніону) індукує парадоксальне підвищення експресії VEGF, який через NO-незалежні сигнальні шляхи стимулює патологічний ангиогенез із порушенням цілісності судинної стінки, гіперактивацією та проліферацією ендотеліальних клітин, гіпертрофією гладеньких м'язів, посиленням макрофагальної міграції та аномальним ангиогенезом [205; 204]. Не виключено, що цей механізм може включатись і в ревматоїдній синовії, але це питання потребує вивчення.

РА та поліморфізм гена NOS3. Контроль експресії NOS3 забезпечує ген *NOS3*, що знаходиться на довгому плечі хромосоми 7 в позиції 35-36 (7q35-7q36) і складається з 26 екзонів [191]. Промотор гена *NOS3* містить різні домени для взаємодії з факторами транскрипції та стероїдними гормонами [157; 191; 300]. Відомо біля 11 поліморфних варіантів гена *NOS3*, серед яких в популяції найбільш поширеними є однонуклеотидні поліморфізми *rs61722009*

(4a/b) інтрону 4, *rs1799983* (G-894T або *Glu298Asp*) екзону 7, *rs2070744* (T-786C) промотору гена [13; 14; 88 ; 224; 290]

Поліморфізм *G-894T* викликає заміну глутаміну на аспарагін в 298 положенні в ділянці *NOS3*, що функціонально непов'язана з активним центром та сайтом димеризації і не впливає на активність ензиму [125; 270]. Не засвідчено і суттєвого впливу поліморфізму *4a/b* інтрона 4 на активність *NOS3*, хоча виявлений вплив на регуляторні ділянки гена *NOS3* [88; 224]. У декількох масштабних мета-аналізах було засвідчено, що в європейській популяції не виявлено значимих асоціацій алельних варіантів вказаних поліморфізмів гена *NOS3* з розвитком серцево-судинної патології, на відміну від етнічних груп Близького Сходу [88; 180; 209].

Поліморфізм *rs2070744* гена *NOS3* локалізується у некодуєчій промоторній ділянці гена *NOS3* на 7 хромосомі: chr7:150992991 (GRCh38.p12) [233]. Вказаний одонуклеотидний поліморфізм (SNP) є простою нуклеотидною заміною T (тиміну) на C (цитозин). За поліморфізму *rs2070744* (T-786C) промотору гена *NOS3* наявність алелі C детермінує пригнічення експресії *NOS3* та зниження функціональної активності шляху L-аргінін/NO в ендотелії судин. В умовах *in vitro* заміна тиміну на цитозин в положенні 786 спричиняла зниження активності промотору гена *NOS3* більш, ніж на 50% [207]. Наявність 786C-алелі призводить до порушення взаємодії факторів транскрипції з промотором і експресія гена *NOS3* пригнічується [200; 205]. Відповідно, у гомозигот -786CC виявляються нижчі рівні мРНК *NOS3* та метаболітів NO (нітритів та нітратів) в крові [200], а також реєструється зниження ендотелійзалежної вазодилатації [231]. Нещодавно було показано, що у пацієнтів з бронхіальною астмою та коморбідною артеріальною гіпертензією гомозиготне та гетерозиготне носійство C-алелі за поліморфізму T-786C гена *NOS3* асоціювалось зі зниженням рівня метаболітів NO в крові (CC < CT < TT) [243].

Зауважимо, що експресію *NOS3* стимулюють збільшення напруги зсуву, гіпоксія та естрогени та фактори росту (трансформуючий фактор росту β ,

VEGF), останні також підвищують стабільність мРНК NOS3 [184; 170; 238]. Глюкокортикостероїди, прозапальні цитокіни (ФНП- α), NF- κ B, бактеріальні ліпополісахариди інгібують експресію eNOS та зменшують стабільність її мРНК [175; 182; 238; 241]. Промоторна активність гена *NOS3* пригнічується за дії ФНП α [58; 208]. Цілком ймовірно, що дія вказаних чинників може по-різному модифікувати експресію NOS3 за носійства алельних варіантів поліморфізму *rs2070744* гена *NOS3*.

Роль поліморфізму *rs2070744* (T-786C) гена *NOS3* спочатку активно досліджувалась в когортах хворих з серцево-судинною патологією та/або метаболічними факторами кардіоваскулярного ризику. Зокрема, у ряді проспективних досліджень виявлений зв'язок генотипу *CC* з ішемічною хворобою серця [13; 32; 236], хронічною серцевою недостатністю [9, 10], стенокардією Принцметала [124], артеріальною гіпертензією [148; 244], інсулінорезистентністю у хворих з ішемічною та неішемічною кардіоміопатією [279]. Досенко В.Є. (2005) вперше було показано, що в українській популяції частота гомозиготного носійства алелі *C* у здорових осіб становила 6,0%, а у пацієнтів з гострим коронарним синдромом була значно вищою - 16% [13]. Генотип *-786CC* асоціювався з нижчим рівнем ІЛ-6 у хворих з гострим коронарним синдромом [218].

В подальшому з'явилися дослідження, у яких був виявлений зв'язок генотипу *-786CC* з розладами репаративного остеогенезу у хворих з незрощеними переломами довгих кісток [1], остеопорозом [130], високим ризиком онкологічних захворювань [168; 287], а генотипу *TC* – з більшою фізичною витривалістю та адаптивними можливостями кардіореспіраторної системи [27]. В окремих роботах засвідчені відмінності щодо ефективності фармакотерапії у носіїв алельних варіантів гена *NOS3* за поліморфізмом *rs2070744*: у гомозигот *CC* ефективність тромболізу [32] та статинів [46] була нижча, ніж у носіїв *T*-алелі.

Клініко-патогенетичне значення поліморфізму *rs2070744* гена *NOS3* за умов РА залишається дискусійним (табл. 1.1). Зокрема, вища частота

генотипу -786CC відмічена в німецькій популяції хворих на РА [198; 199] та в популяції хворих на РА в Північному Китаї [57]. Vrenol C.V. та ін. (2009) показали наявність асоціації позасуглобових маніфестацій з носійством мінорної C-алелі (OR=4,9; 95 CI% 1,3-18,9) у хворих на РА [79].

Таблиця 1.1

Частоти варіантних генотипів за поліморфізму *rs2070744* гена *NOS3* у хворих на РА та їх патогенетичне значення

Автори; країна, [бібліогр.]	Контингент обстежених (n)	Частоти генотипів <i>NOS3</i> TT/TC/CC (%)	Патогенетичне значення
Melchers I. et al. (2006); Німеччина [198]	Загальна популяція (n =1160)	39,6/48,4/12,1	Генотип <i>CC</i> асоціювався із підвищеним ризиком розвитку РА
	Хворі на РА (596)	34,7/46,1/19,1	
Gonzalez-Gay M.A. et al. (2009); Іспанія [126]	Хворі на РА (n =182)	39/46/15	При поєднанні генотипу - <i>CC786</i> з носійством HLA-DRB1*0404 алелі у хворих на РА ризик серцево-судинних ускладнень зростає в 10 разів.
An J.D. et al. (2012); Китай [57]	Здорові особи (n=201, чол - 53,73%)	74,63/22,39/2,99	Частота C-алелі та генотипу <i>CC-786 NOS3</i> була вірогідно вищою у хворих на РА, ніж в когорті практично здорових осіб
	Хворі на РА (n=196, чол - 54,08%)	65,31/30,10/4,59	
Sydorchuk L. et al. (2017); Україна [263]	Здорові (20)	25,0/65,0/10,0	Генотип <i>CC</i> у хворих на РА асоціювався з болем в серці, тривалість ранкової скутості не залежала від генотипу, серед носіїв T-алелі виявлено більше пацієнтів з кількістю болісних суглобів
	РА (n=60, ж -71,67%)	48,33/38,33/13,33	
Букач О.П. та ін. (2017); Україна [2]	Здорові (n =20)	25,0/65,0/10,0	Серед гомозиготних носіїв C-алелі частіше виявлялись особи з високим А-ССР та тяжким перебігом РА. Генотипи не є факторами ризику РФ (+) та високого титру АССР
	РА (n=60, ж -71,67%)	48,33/38,33/13,33	

Не виявлений зв'язок між поліморфізмом *NOS3 T-786C* та ризиком серцево-судинної патології у хворих на РА в Північній Іспанії [127]. Однак, в

цьому ж дослідженні було засвідчено багаторазове збільшення ризику серцево-судинних ускладнень у хворих на РА при поєднанні генотипу *-786CC* з носійством алелі *HLA-DRB1*0404* (OR = 9,06, 95% CI 1,29-63,3) [127]. За даними Вунїеваскі V. ін. (2016) в сербській популяції не встановлено асоціації алельних варіантів поліморфізму *T-786C* з ризиком розвитку РА, однак припускається, що мінорна алель може бути предиктором більш сприятливого перебігу захворювання [83].

Нещодавно були опубліковані дані щодо частот алелей та генотипів за поліморфізму *rs2070744 (T-786C)* гена *NOS3* в невеликій змішаній когорті з 60 хворих на РА та 20 практично здорових осіб – жителів Північної Буковини [2; 6; 264]. Автори не виявили чіткого зв'язку між клінічними симптомами РА, супутньою артеріальною гіпертензією, цукровим діабетом, ожирінням у носіїв алельних варіантів поліморфізму *rs2070744 (T-786C)* гена *NOS3* [264]. В інших роботах цих же авторів засвідчено, що у носіїв мінорної алелі *C* відмічалась більш висока активність РА, більш виразні порушення функціонального стану суглобів, вища рентгенологічна стадія захворювання, вищі рівні ІЛ-6 та ІЛ-12 в крові, вищі прояви дисліпідемії [2; 6].

Слід відзначити, що в жодному з вказаних досліджень у хворих на РА не проводилась оцінка рівня *NOS3* в крові чи синовії, не вивчався зв'язок з носійством поліморфних варіантів гена *NOS3*.

1.3 Хронобіологічні аспекти ревматоїдного артриту

Відомо, що ключові клінічні симптоми РА, такі як скутість та суглобовий біль, характеризуються значною добовою варіабельністю, із найбільшою виразністю вранці і найменшою – у денний період [98;122]. Посилення симптомів РА в ранкові години пояснюється порушенням нейроендокринної регуляції та аномальною гіперпродукцією прозапальних медіаторів вночі (рис. 1.1). Відмічається чітка залежність між тривалістю ранкової скутості та підвищенням рівня циркулюючих в крові прозапальних

цитокінів [63; 217]. Так, у хворих з активним РА виявлена добова варіабельність інтерлейкіну-6 (ІЛ-6): найнижчі рівні ІЛ-6 в сироватці крові реєструються вдень та ввечері (приблизно з 16³⁰ до 22³⁰), а найвищі рівні – вранці (приблизно з 7¹⁵ до 10³⁰) [63; 162; 217]. Максимальне підвищення рівня ІЛ-6 в сироватці крові хворих на РА реєструється у період з 02⁰⁰ до 7⁰⁰ [162]. Ранковий рівень ІЛ-6 виявляв прямий кореляційний зв'язок з індексом Річі та рівнем СРБ [63]. Зауважимо, що на відміну від хворих на РА у практично здорових осіб сироватковий рівень ІЛ-6 є значно нижчим протягом всієї доби і його підвищення в ранкові години є дуже незначним [217]. В роботі Perry M.G. та ін. (2009) не виявлено добової варіабельності сироваткового рівня ФНПа у хворих на РА та практично здорових осіб [217]. За даними Sierakowski S., Cutolo M. (2011), у пацієнтів з активним РА спостерігалось значне підвищення рівнів ІЛ-6 та ФНПа в дуже пізні нічні години, а найнижчий рівень цих цитокінів реєструвався після 12⁰⁰ [246].

Одним із пояснень посилення продукції прозапальних медіаторів при РА в нічний період є порушення нормальних ритмів продукції мелатоніну, кортизолу та інших гормонів (пролактину, статевих стероїдних гормонів) [98]. Наприклад, вдень рівень мелатоніну в крові у хворих на РА може бути нижчим, ніж у здорових осіб [115; 284]. Однак, вночі секреція мелатоніну у хворих на РА підвищується більш інтенсивно, ніж у здорових осіб [49]. За результатами досліджень Sulli A. та ін. (2002) старт секреції мелатоніну у здорових осіб та хворих на РА реєструється в один і той же час - біля 8-ої години вечора [261]. На відміну від здорових осіб, у хворих на РА рівень мелатоніну в крові досягає пікових значень на дві години раніше і утримується біля 2-3 годин, формуючи так зване плато [261]. У хворих на РА, як і у здорових осіб, зниження секреції мелатоніну розпочинається після 2-ої години ночі і після 7-ої години ранку секреція цього гормону практично припиняється [261]. У пацієнтів з активним РА у період з 22⁰⁰ до 02⁰⁰ в крові реєструються найнижчі рівні адренкортикотропного гормону, кортизолу, пролактину, найвище відношення пролактин/ кортизол, а у період з 02⁰⁰ - 6⁰⁰ - найбільш

високі рівні ІЛ-1 β , ФНПа [301]. За іншими даними, у пацієнтів з РА максимальне зниження рівня кортизолу в крові було відмічено у більш пізній період (з 00⁰⁰ до 3⁰⁰) з наступним поступовим підвищенням вранці (до 9⁰⁰ години) [162; 217].

Циркадні ритми продукції мелатоніну, кортизолу та цитокінів у хворих на РА можуть варіювати залежно від пори року, місця проживання, тривалості світлового дня чи інших чинників. Наприклад, в січні-лютому у хворих на РА, які проживають в Естонії, у період з 22-ої до 8-ої години реєструвались вищі рівні мелатоніну, нижчі рівні кортизолу та вищі рівні ФНПа, ніж у пацієнтів, які проживають у Італії [98].

Дисбаланс між надмірною секрецією мелатоніну та недостатньою секрецією кортизолу є одним із чинників, який промотує запальну реакцію в суглобах у хворих на РА [98]. Встановлено, що у хворих на РА вранці в синовіальній рідині виявляються високі рівні мелатоніну, а у синовіальних макрофагів хворих на РА експресуються рецептори до мелатоніну [188].

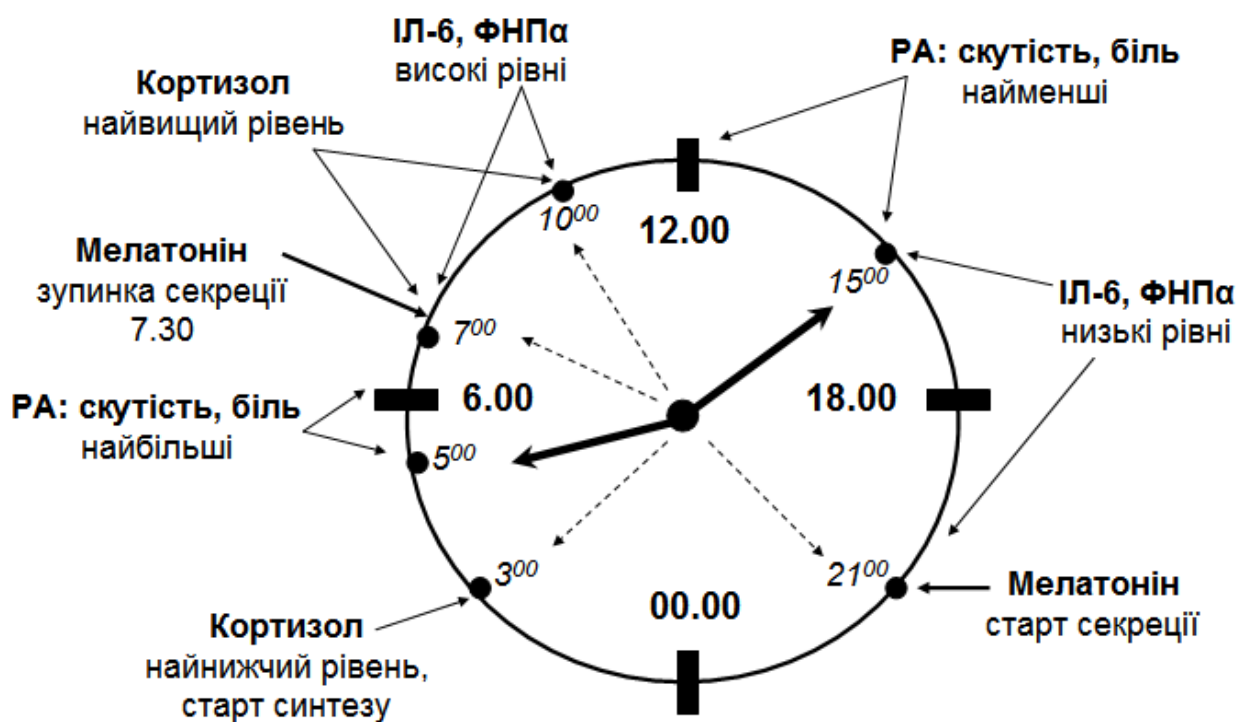


Рис. 1.1 Циркадний патерн нейроендокринної та імунозапальної регуляції у хворих на РА (адаптовано за Cutolo M., 2016 [98]).

Як відомо, мелатонін є не лише гормональним регулятором циркадних ритмів, а й впливає на функціональний стан імунної системи. Наприклад, мелатонін регулює активність Т-лімфоцитів (особливо Th1-клітин) і через систему ІЛ-2 / ІЛ-2R посилює продукцію низки прозапальних цитокінів (ІЛ-2, ІЛ-6, ІЛ-12, інтерферону-гама) [87;102;120; 179]. Навіть у практично здорових осіб було зареєстровано підвищення сироваткового рівня ІЛ-2 вночі, яке співпадало із піком секреції мелатоніну [179].

Порушення циркадних ритмів у хворих на РА може бути викликано порушенням роботи так званого центрального годинника в гіпоталамусі, який синхронізує фізіологічні функції організму (цикли сон/пробудження, частоту серцевих скорочень, артеріальний тиск, температуру тіла, гонадальний та адреналовий стероїдогенез, імунну відповідь) відповідно до 24-годинного циклу, із наступним порушенням роботи периферичного годинника суглобових та інших тканин [98]. З іншого боку, імунозапальний процес десинхронізує роботу периферичного годинника, безпосередньо втручаючись в контроль експресії низки clock-генів, що контролюють природні циркадні ритми [212].

Встановлено, що у хворих на РА в синовіальній оболонці відбуваються специфічні пертурбації експресії цілого ряду clock-генів. Зокрема, в рематоїдній синовії виявлено значне підвищення експресії генів *BHLHE40* та *NR1D1*, а також одночасне підвищення експресії генів *BMAL1* та *PER1*, в той же час остеоартрозній синовії ці зміни були істотно меншим і відбувались в протифазі [165]. Розлади експресії clock-генів в рематоїдній синовії асоціювались з порушенням циркадних ритмів продукції ІЛ-6, ІЛ-1 β , ФНП α [165]. Встановлений безпосередній вплив ФНП α на експресію clock-генів в культурі синовіальних фібробластів із посиленням експресії генів *ARNTL2* й *NPAS2* та пригніченням експресії генів *PER3* й *DBP* [165; 212].

Ангіогенез та циркадні ритми. Циркадні механізми є надзвичайно важливими в регуляції ангіогенезу, про що свідчить взаємозв'язок між експресією clock-генів та факторів росту судин. Так, через фактори

транскрипції *Bmal1*, *Bmal2* та *Clock* регулюється синтез VEGF, продукція якого в культурі ендотеліальних клітин істотно підвищується в нічний період [152]. Існують дані, що у осіб з нормальною толерантністю до глюкози та пацієнтів з цукровим діабетом типу не має значної варіабельності сироваткового рівня VEGF протягом доби, хоча після 17-ої години реєструється невелике зниження рівня однієї з його ізоформ (VEGF-C), а після ланча - постпрандіальне підвищення рівня VEGF-C [133]. В роботі Hetlanda M. L. (2008) показано, що у хворих на РА вранці (о 7-00) рівень VEGF в сироватці крові є нижчим (приблизно в 1,2 рази), ніж вночі (о 01-00 та 04-00) [139].

NOS3 / NO та циркадні ритми. Зміни в експресії протеїнів *clock* та *Bmal1* в ендотеліальних клітинах є одним із чинників контролю активності NOS3 та ендотеліальної продукції NO. У мишей з нокаутом генів *Clock* та *Bmal1* спостерігається зниження продукції NO внаслідок порушення функціональної активності NOS3 [60; 61]. За цих умов виникає ефект роз'єднання NOS3: NO-синтазна активність пригнічується та активується продукція супероксид-аніону [60; 61]. Мутації гену *Period2* викликають зниження ендотеліальної продукції NO, хоча і не викликають змін рівня NOS3 [281; 282]. Існує думка, що NO власне може впливати на циркадні ритми: у старих тварин реєструється значне зниження активності eNOS в денний час, що корелює із змінами експресії *clock*-генів, але при введенні донорів NO промоторна активність *clock*-гена *Period* значно підвищується [169]. Нокаут гену NOS3 викликав порушення циркадної регуляції температури тіла у мишей (із більш значним приростом температури тіла у денний період) [62]. В мозку тварин виявляються циркадні коливання продукції NO зі збільшенням його рівня в темнову фазу та зниження рівня – в світлову фазу [164]. В активний період доби у тварин зафіксовано підвищення судинної експресії NOS3 (мРНК та протеїну) та посилення NO-залежної вазодилатації [228]. Циркадний характер експресії мРНК NOS3 та NO-синтазної активності виявлений в міокарді щурів [291]. Існують дані щодо зв'язку поліморфізму гену *NOS3*

(*Glu298Asp*) з циркадними ритмами коливання артеріального тиску у практично здорових осіб та хворих на артеріальну гіпертензію [213].

Гіпотетично, у хворих на РА можуть змінюватись циркадні ритми продукції NO, що в свою чергу може відобразитись на активності ангиогенезу та імунозапальної реакції в ревматоїдній синовії. Адже експериментально доведено, що мелатонін значно підвищує рівень NO та активність NOS3 в культурі ендотеліальних клітин людини [245] та продукцію NO в культурі синовіальних макрофагів хворих на РА [102]. З іншого боку, у мелатоніну встановлений антиангіогенний ефект через здатність інгібувати експресію VEGF та ангіопоетинів, пригнічувати VEGF-залежну міграцію ендотеліальних клітин та утворення мікросудин [126]. Циркадність продукції NOS3 у хворих на РА не досліджувалась. Не відома і роль поліморфізму гену *NOS3* у регуляції продукції NOS3 у хворих на РА.

TLR та циркадні ритми. В ряді експериментальних досліджень засвідчений зв'язок експресії практично всіх видів TLR з циркадними ритмами в клітинах імунної системи [248; 249] та епітелії кишечника [202]. Наприклад, засвідчена добова ритмічність експресії мРНК TLR2 та TLR6 в макрофагах селезінки із піком експресії біля другої години дня (*Zeitgeber time* 19) [249]. У нейтрофілах та CD14⁺ моноцитах венозної крові практично здорових осіб не виявлялось добової варіабельності експресії TLR1, 2, 4 та 9, але після стимуляції специфічними лігандами реєструвалось більш значне підвищення експресії TLR1, 2, 4 ввечері, ніж вранці [172]. Нокаут гену TLR2 (*Tlr2*^{-/-} миші) викликав у тварин зміни циркадних ритмів поведінкових реакцій – вживання їжі, води, рухової активності [104].

У хворих на РА існують передумови для порушення природніх ритмів експресії TLR, але досліджень в цьому напрямку поки не проводилось. В одному дослідженні було показано, що *in vivo* (у щурів з раком яєчників) введення мелатоніну викликало зменшення експресії TLR4 і не впливало на експресію TLR2 [94]. Також виявлені секс-специфічні відмінності в експресії

TLR2 та TLR4 у тварин: в лімфоцитарних клітинах селезінки мишей коксакі-вірус індукував експресію TLR4 у самців і експресію TLR2 у самиць [226].

Дослідження особливості циркадних ритмів продукції нових біологічно-активних молекул – гормонів, медіаторів заплення, ангіогенезу, апоптозу є важливими з точки зору оптимізації підходів до контролю перебігу РА на різних етапах його розвитку. Лікування хворих на РА на засадах хронобіології спрямовано на досягнення оптимального фармакотерапевтичного балансу «користь/ ризик» і з цієї точки зору дослідження циркадних ритмів нових патогенетичних чинників РА є актуальним та перспективним напрямком сучасної ревматології.

1.4 Сучасні принципи лікування рематоїдного артриту: зв'язок з циркадними ритмами

Принципи лікування РА за останнє 10-річчя змінилися кардинально. Більш глибоке розуміння молекулярних механізмів розвитку РА сприяло розробці нових патогенетично обґрунтованих методів хворобо-модифікуючої протиревматичної терапії (ХМПРТ), які підвищили ефективність контролю захворювання на більш ранніх етапах. Сучасною концепцією у лікуванні рематоїдного артриту є T2T: (Treat to Target) - стратегія лікування, розроблена і сформульована Європейською антиревматичною лігою (EULAR) [252]. Основною метою T2T є досягнення ремісії РА шляхом призначення максимально активної базисної терапії у перші місяці формування суглобового синдрому. Згідно сучасних рекомендацій EULAR та Американської колегії ревматологів (ACR) фармакотерапевтичне лікування РА відбувається з основними групами препаратів: хворобо-модифікуючими препаратами (ХМПРП), глюкокортикоїдами (ГК) та біологічними препаратами [251; 252].

Лікування РА в Україні регламентоване наказом МОЗ України № 263 від 11.04.2014 «Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (спеціалізованої), третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги та

медичної реабілітації ревматоїдний артрит» [29]. Основними положеннями протоколу є призначення ХМПРТ у перші 3 місяці після появи чітких симптомів захворювання та досягнення ремісії або мінімальної активності запального процесу.

Препарати першої лінії включають синтетичні ХМПРП: метотрексат (MTX), лефлуномід, сульфасалазин, циклоспорин, азатиоприн. «Золотим стандартом» є призначення MTX, як препарату першої лінії, у дозуванні 10-15 мг/ тиждень із подальшим збільшенням дози до 20-25 мг/ тиждень, з можливим переходом на парентеральну форму введення. Лефлуномід, сульфасалазин або гідроксихлорін призначають при наявності протипоказів чи поганій переносимості MTX. За неможливості досягнути мети препаратом першої лінії та / чи наявності несприятливих прогностичних факторів відбувається перехід на комбіновану терапію або додавання біологічної терапії до лікування. На сьогодні доступно 9 видів біологічної терапії, які мають спільні фармакологічні властивості, але різний механізм дії: 5 блокаторів ФНПа, інгібітори ІЛ-1 та ІЛ-6, лімфоцитоспрямовані препарати із впливом на Т- та В- клітини [251; 252].

Застосування глюкокортикоїдів (ГК) у низьких дозах (< 10 мг/добу за преднізолоном) дозволяє покращити довгострокові результати та зменшити виразність симптомів у хворих РА, однак ефективність цих препаратів є вищою на ранніх етапах імунозапального процесу і поступово зменшується за його хронізації [159]. Для полегшення клінічних симптомів РА - суглобового болю та ранкової скутості використовують нестероїдні протизапальні засоби (НПЗЗ) та /або анальгетики (метамізол натрію, парацетамол та інші). У на хворих на РА про адекватну відповідь на лікування свідчить зниження DAS28 не менш ніж, на 1,2 бали.

В США превалючим засобом ХМПРТ залишається MTX, хоча частота його застосування поступово зменшується. Наприклад, частота застосування засобів біологічної терапії (блокаторів ФНПа) до прийому MTX у 2009 році становила 27% (у когорті з 48,9 тис пацієнтів) і 36% у 2012 році (у когорті

серед 107,6 тис пацієнтів), в той час як частота сумісного застосування МТХ та біологічної терапії становила 74,1% (в когорті 2009 року) та 45,4% (в когорті 2012 року) [210]. У Польщі серед пацієнтів з РА (когорта 1957 пацієнтів) 94% осіб отримували НПЗЗ, 80% - ГК, 80% - МТХ, а біологічну терапію – лише 2,94% [69]. В Україні така статистична інформація поки відсутня.

Незважаючи на досить широкий спектр засобів ХМПРТ, ефективність лікування хворих на РА сьогодні залишається недостатньою [82;150]. Клінічна ефективність та безпека лікування хворих на РА є дещо вищою при підшкірному введенні МТХ порівняно із пероральним застосуванням, хоча це не вирішує проблему резистентності до ХМПРТ [72;176]. За результатами перехресного мета-аналізу ефективності ХМПРТ адекватної відповіді на лікування за критеріями ACR 20/50/70 вдалось досягнути при монотерапії МТХ у 44,3/19,5/4,1% хворих на РА, анти-ФНПа – 58,3/30,5/15,5%, тофацитінібом – 49,7/24,7/4,6%, тоцилізумабом – 72,9/50,5/25,%, відповідно [82]. Серед хворих, що отримували комбінацію МТХ з різними біологічними препаратами частка респондерів ACR 20 коливалась від 63,7 до 77,1%, ACR 50 – від 50,1 до 55,9%, ACR 70 – від 17,0 до 28,0% [82]. Таким чином, частка нереспондерів ACR 20 за умов монотерапії різними ХМПРТ коливалась в межах 27-56%, а за умов комбінованої терапії - в межах 23-36%, що свідчить про відсутність належного терапевтичного ефекту практично у кожного третього пацієнта з РА. Подібні результати отримані і в іншому масштабному мета-аналізі ефективності застосування антагоністів ФНПа у вигляді монотерапії або у комбінації з одним чи двома засобами ХМПРТ за критеріями EULAR [138]. В дослідженнях останніх років показано, що застосування тоцилізумабу (інгібітору ІЛ-6) у поєднанні з синтетичними ХМПРТ дозволяє прискорити зниження активності імунозапального процесу у хворих на РА – нереспондерів МТХ та /або блокаторів ФНПа [201]. При цьому за умов монотерапії тоцилізумабом або комбінованої терапії тоцилізумабом та ХМПРТ частки респондерів ACR 20/50/70/90 суттєво не відрізнялись і становили 63,6/40,9/22,7/18,2% та 61,2/43,5/25,9/10,6%, відповідно [201].

Таким чином, біля 40% хворих на РА не дають належної відповіді і на комбіновану ХМПРТ. Відбуваються спроби розробити алгоритми раціонального та економічно-обгрунтованого вибору варіанту біологічної терапії на основі оцінки мультибіомаркерної шкали активності хвороби (Multi-Biomarker Disease Activity score - MBDA) у комбінації з оцінкою антитіл до цитрулінованих циклічних пептидів [132]. MBDA є новим тестом для встановлення активності захворювання, що включає комплексну оцінку 12 біомаркерів сироватки крові (VCAM-1, EGF, VEGF-A, ІЛ-6, TNF-RI, YKL-40, MMP-1, MMP-3, лептин, резистин, SAA, СРБ) і призначена для прогнозування рентгенологічної прогресії та ефективності лікування РА [140]. Зауважимо, що широкого впровадження в реumatологічну практику тест MBDA не набув.

Одним із перспективних напрямків підвищення ефективності лікування хворих на РА є хронотерапія, що ґрунтується на хронобіології експресії clock-асоційованих генів, продукції ендогенних гормонів та інших біорегуляторів [98; 271]. Синхронізація прийому ГК, МТХ, НПЗЗ, інших ХМПРТ з циркадними ритмами секреції мелатоніну, кортизолу, медіаторів запалення та ангиогенеза може сприяти досягненню оптимального контролю за перебігом РА і при цьому не буде суттєво впливати на вартість лікування. Хронотерапія може додатково покращити якість сну, зменшити симптоми депресії чи афективних розладів, що асоціюються з РА [98; 271].

Незважаючи на те, що симптоми РА чітко демонструють 24-годинну ритмічність, критерії хронотерапії цього захворювання остаточно не сформовані. В нещодавно опублікованій оглядовій статті професора Мауріціо Кутоло (Maurizio Cutolo, 2016), одного із головних фундаторів хронобіології та хронотерапії РА, були сформульовані основні циркадні принципи призначення ГК та інших засобів (рис. 1.2) [98].

Хворим на РА екзогенні ГК (у низьких дозах) зазвичай призначаються вранці, відповідно до природніх циркадних ритмів продукції ендогенних ГК, що можна розцінювати як замісну гормонотерапію в умовах зниженої біодоступності кортизолу та підвищеної продукції прозапальних цитокінів.

Слід брати до уваги суттєву різницю між ендогенними (фізіологічними) та екзогенними (синтетичними) ГК, які виявляють більшу селективну глюкокортикоїдну та протизапальну дію, меншу мінералокортикоїдну дію, відрізняються періодом напівжиття, іншими кінетичними параметрами та негеномним ефектами. Тривале призначення екзогенних ГК впливає на гіпоталамо-питуїтарно-адреналову вісь та циркадну продукцію кортизолу. З іншого боку, тривале низькодозове лікування ГК може стримувати рентгенологічну прогресію РА щонайменше на 50% [101]. ГК на геномному рівні регулюють клітинний імунітет, і згідно з природними циркадним ритмами, пригнічують нічну стимуляцію активності імунних клітин та секрецію прозапальних цитокінів. Очевидно, призначення ГК у період з 6⁰⁰ до 8⁰⁰ не може бути оптимальним для контролю нічної активації запального процесу у хворих на РА. В 1997 році було проведено дослідження, у якому 26 хворих на РА, нелікованих ГК, були розподілені на дві групи, що приймали низькі дози преднізолону о 02⁰⁰ або о 7³⁰. Виявилось, що у хворих на РА нічний прийом преднізолону забезпечував більший лікувальний ефект за такими критеріями, як зменшення ранкової скутості, суглобового болю, індекса Річі та сироваткового рівня ІЛ-6 вранці, порівняно із ранковим прийомом ГК [64]. В подальшому був розроблений преднізолон із відтермінованим вивільненням (modified-release), прийом якого ввечері (о 22⁰⁰) забезпечував його нічне вивільнення (о 02⁰⁰-03⁰⁰), що більш ефективно коригувало симптоми РА, ніж ранковий прийом преднізолону з негайним вивільненням (immediate-release) [84; 99; 167]. В мультицентрових рандомізованих контрольованих дослідженнях CAPRA-1, CAPRA-2 (Circadian Administration of Prednisone in Rheumatoid Arthritis) було засвідчено, що у хворих на РА вечірній прийом преднізолону з відтермінованим вивільненням (Prednison MR) упродовж 12 місяців виявив вищий профіль безпеки та вищу клінічну ефективність, ніж прийом звичайного преднізолону (Prednison IR) вранці [54; 55; 84; 85, 167].

MTX знижує продукцію цитокінів через пригнічення проліферації лімфоцитів та транскрипційної активності ФНПа, інгібує запалення суглобів та підвищує ефективність лікування хворих на РА за критеріями ACR. Перед призначенням MTX слід оцінювати ризик розвитку побічних ефектів, таких як мієлосупресія та інтерстиціальний пневмоніт. Доцільність синхронізації прийому MTX з циркадними ритмами імунозапального процесу та продукції ФНПа була засвідчена в окремих експериментальних [272] та пілотних клінічних дослідженнях [273]. Так, японським хворим на РА призначали MTX або у стандартному режимі, або у хронотерапевтичному режимі упродовж 3-х місяців. Стандартний режим включав прийом препарату 3 рази на тиждень (незалежно від тижневої дози): 1-й день – після сніданку та вечері, 2-й день – тільки після сніданку. Хронотерапевтичний режим включав прийом MTX 1 раз на добу ввечері перед сном 3 рази на тиждень, із дотриманням аналогічної тижневої дози препарату як і у стандартному режимі. Було засвідчено, що через 3 місяці хронотерапевтичний режим прийому MTX забезпечував більш ефективно зниження кількості набряклих суглобів (хоча менш суттєво впливала на кількість болісних суглобів), зниження рівня СРБ і, в цілому, забезпечував кращу відповідь на лікування за критеріями EULAR, викликав менше побічних ефектів, ніж стандартний режим [271; 273].

Існують дані, що ефективність НПЗЗ також залежить від циркадних ритмів. В одному із ранніх досліджень показано, що у хворих на РА прийом флурбіпрофену (по 200 мг) в ранці і вдень забезпечував менший знеболючий ефект, ніж прийом вранці і ввечері або вдень та ввечері (перед сном) [166]. В подальшому були розроблені спеціальні НПЗЗ для хронотерапії запального процесу у нічний період – індометацин [262], ацеклофенак [225; 237], лорноксикам [131] з відтермінованим вивільненням (лаг-період до 5-6 годин), які забезпечували кращий контроль ранкових симптомів РА. Цілком очевидно, більш широке впровадження принципів хронотерапії в клінічну ревматологію є обґрунтованим.

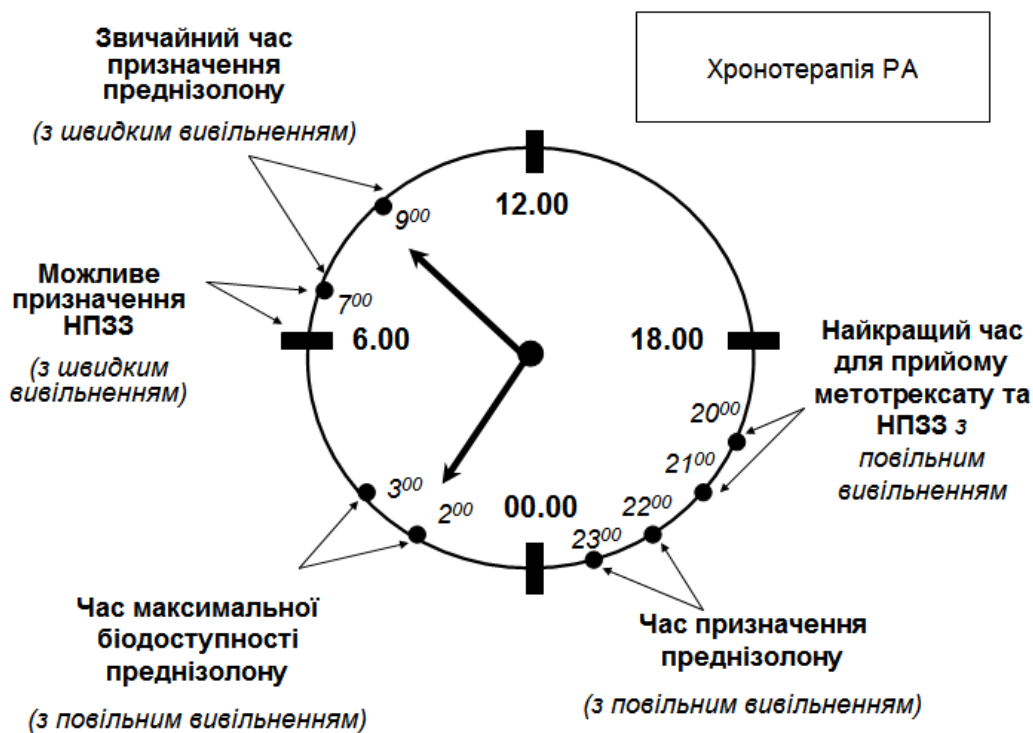


Рис. 1.2 Підходи до хронотерапії РА (адаптовано за Cutolo M., 2016 [98]).

Резюме. Таким чином, підвищення ефективності діагностики та лікування РА залишається актуальною проблемою сучасної ревматології. Про це свідчить неухильне зростання захворюваності на РА та достатньо висока частота резистентності до лікування (близько 20-40%). Розширення спектру лабораторних предикторів ефективності лікування РА дозволить підвищити чутливість та специфічність мультибіомаркерних шкал активності захворювання та обґрунтувати нові підходи до персоніфікованого вибору ХМПП. Перспективним напрямком є вивчення циркадних ритмів продукції медіаторів ангіогенезу (зокрема, NOS3 та TLR2), встановлення їх зв'язку з перебігом захворювання та ефективністю лікування у хворих на РА, що потребує окремого дослідження і дозволить удосконалити хронобіологічні підходи до контролю імунзапального процесу за цих умов.

Основні наукові результати розділу висвітлені в наступних публікаціях [18, 21, 294].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Клінічна характеристика обстежених хворих

Вибірка клінічної групи сформована з 173 хворих на РА (100% жінки, віком 20-60 років, українки в третьому поколінні, мешканки Вінницької області), які перебували в ревматологічному відділенні Вінницької обласної клінічної лікарні ім. М.І. Пирогова (з 2019 року - Високоспеціалізований клінічний центр ревматології, остеопорозу та біологічної терапії Комунального некомерційного підприємства «Вінницька обласна клінічна лікарня ім. М.І. Пирогова Вінницької обласної Ради») та ревматологічному відділенні НДІ реабілітації інвалідів Вінницького національного медичного університету (ВНМУ) ім. М.І. Пирогова у 2014-2018 р.р. Всі етапи дослідження проведені із дотриманням біоетичних норм відповідно до основних положень ВООЗ, Гельсінської декларації Генеральної асамблеї Всесвітньої медичної асоціації (1964 р.), Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину (1977 р.), Міжнародної ради медичних наукових товариств, Міжнародного кодексу медичної етики (1983 р.), діючих законів України, що засвідчено комітетом з біоетики ВНМУ ім. М.І. Пирогова (протокол № 12 від 17.11.2016; № 3 від 25.05.2020).

Діагноз РА встановлювали за критеріями ACR/EULAR (2010) [53], керуючись наказом МОЗ України № 263 від 11.04.2014 р. «Про затвердження та впровадження медико-технологічних документів зі стандартизації медичної допомоги при ревматоїдному артриті», уніфікованим клінічним протоколом первинної, вторинної (спеціалізованої), третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги та медичної реабілітації «Ревматоїдний артрит», адаптованою клінічною настановою «Ревматоїдний артрит» [29]. Рентгенологічну стадію РА встановлювали за Steinbroker, функціональний клас (ФК) – за переглянутими критеріями ACR 1991 р. [141].

Всі пацієнти були проінформовані щодо мети та завдань дослідження і надали згоду щодо участі в ньому (засвідчено у вигляді форми інформованої згоди з підписом і зазначенням дати до проведення будь-яких процедур, передбачених дослідженням). Стан хворих на РА оцінювали за допомогою спеціально розробленого протоколу, що містив алгоритми клінічних, інструментальних та лабораторних етапів дослідження. Детальний опис критеріїв рандомізації хворих у дослідження наведено у табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Критерії включення / невключення пацієнтів у дослідження

Критерії включення :	Критерії невключення:
<ul style="list-style-type: none"> - жіноча стать; - вік 18-60 років; - діагноз РА за критеріями ACR/EULAR 2010; - тривалість РА \geq 6 місяців; - активність РА за DAS28 $>$ 3,2; - КБС \geq 3 і КНС \geq 3; - серо (+) чи серо (-) за РФ та/ чи АЦЦП; - при прийомі пероральних ГК – доза препарату є стабільною не менше 4 тижнів; - при прийомі НПЗЗ – доза препарату є стабільною не менше 4 тижнів; - рентгенограма ОГК без ознак будь-якого інфекційного захворювання легень, зокрема туберкульозу; - наявність письмової інформованої згоди хворого на участь в дослідженні (із підписом та планом проведення будь-яких процедур, передбачених дослідженням). 	<ul style="list-style-type: none"> - небажання хворого брати участь у дослідженні; - чоловіча стать; - вік менше 18 чи більше 60 років; - тривалість РА $<$ 6 місяців; - ХМПРТ біологічним препаратом; - внутрішньосуглобове введення будь-яких лікарських засобів (зокрема, ГК) за останні 4 тижні; - функціональний клас РА IV (відповідно до переглянутих критеріїв ACR 1991 р.); порушення функції суглобів III; - супутні захворювання внутрішніх органів у стадії декомпенсації; - неконтрольована АГ (САТ \geq 180 мм рт.ст., ДАТ \geq 100 мм рт.ст.); - алкогольна та наркотична залежність; - онкологічні захворювання; - вагітність та період лактації.

У зв'язку з гендерним диморфізмом РА [253; 277], його коморбідності [51], статевих та вікових особливостей регуляції циркадних ритмів [288] та

імунної відповіді [265] у дослідження залучались лише особи жіночої статі, молодого та середнього віку (18-60 років), українки в третьому поколінні, жительки Вінницької області), з тривалістю захворювання ≥ 6 місяців, кількістю болючих та набряклих суглобів ≥ 3 (КБС ≥ 3 , КНС ≥ 3), активністю захворювання за DAS28 $> 3,2$ балів.

Вік включених у дослідження жінок, хворих на РА, становив $45,9 \pm 8,79$ років (табл. 2.2). У сформованій виборці переважали жінки пременопаузного та раннього постменопаузного віку, частка жінок середнього віку (45-59 років за ВООЗ) була найбільшою і становила 60,7 %. Це узгоджується з результатами масштабних епідеміологічних досліджень щодо високої поширеності РА серед осіб віком 40-60 років [59; 69; 253].

У включених у дослідження пацієнтів тривалість РА коливалась від 6 місяців до 30 років і в середньому становила $95,5 \pm 76,5$ місяців (або $7,96 \pm 6,38$ років, відповідно). Раній РА (із тривалістю менше 2-х років) був відмічений у 17 (9,8 %) хворих, з тривалістю від 2 до 5 років – у 38 (22,0 %) осіб та понад 5 років – у 118 (68,2 %) осіб. Серед хворих на РА переважали особи з серопозитивним варіантом захворювання: у 78,6 % осіб був виявлений ревматоїдний фактор (РФ), а у 83,2 % хворих - антитіла до циклічного цитрулінованого пептиду (АЦЦП), співвідношення частоти серо (+) та серо (-) варіантом РА становило 5:1. Подібні частоти серо (+) за РФ та АЦЦП варіантів РА також засвідчені в інших роботах [48; 59; 135].

У дослідження включали пацієнтів з середньою та високою активністю захворювання. За індексом DAS28 (ШОЕ) висока активність РА ($> 5,1$) була зареєстрована у 114 (65,9%) хворих, помірна активність (3,2-5,1) – у 59 (34,1%) хворих. За DAS28 (СРБ) висока активність РА виявлена у 101 (58,4 %) хворих, а за CDAI (>22 балів) - у 122 (70,5%) пацієнтів, що узгоджувалось із DAS28 (ШОЕ). Серед хворих на РА переважали особи з II та III рентгенологічною стадією за Steinbroker (загальна частка 80,9%), а частка осіб з I стадією була втричі меншою. Функціональні порушення (згідно ACR

1991) у 62,4 % хворих на РА відповідали ФК II, у 34,1% - ФК III, в той час як частка пацієнтів з ФК I була незначною (3,5 %).

Таблиця 2.2

Клініко-демографічна характеристика хворих на РА (n=173)

Характеристика		Показник
Жінки	n (%)	173 (100%)
Вік, роки	M±σ	45,9±8,79
18 - 25 років	n (%)	7 (4,1 %)
26 - 44 років	n (%)	58 (33,5 %)
45 - 59 років	n (%)	105 (60,7 %)
60 років	n (%)	3 (1,7 %)
Тривалість захворювання, роки	M±σ	7,96±6,38
< 5 років	n (%)	55 (31,8 %)
5 - 10 років	n (%)	78 (45,1 %)
> 10 років	n (%)	40 (23,1 %)
Імунологічна характеристика		
Серо (+) за РФ	n (%)	136 (78,6 %)
Серо (+) за АЦЦП	n (%)	144 (83,2 %)
Серо (-) за АЦЦП та РФ	n (%)	28 (16,2 %)
Активність РА за DAS28 (ШОЕ):		
Помірна (DAS28 3,2-5,1)	n (%)	59 (34,1 %)
Висока (DAS28 > 5,1)	n (%)	114 (65,9 %)
Рентгенологічна стадія:		
I	n (%)	33 (19,1 %)
II	n (%)	72 (41,6 %)
III	n (%)	68 (39,3 %)
Функціональний клас (ФК):		
I	n (%)	6 (3,5 %)
II	n (%)	108 (62,4 %)
III	n (%)	59 (34,1 %)
Системні прояви	n (%)	42 (24,3%)
Прийом ГК (перорально)	n (%)	145 (83,8%)
ГК, мг/добу (за преднізолоном)	M±σ	10,2±7,37
Прийом МТХ (перорально)	n (%)	173 (100%)
МТХ, мг/тиждень	M±σ	11,3±2,23

Позасуглобові прояви РА були виявлені у 42 (24,3%) пацієнтів. Найбільш часто реєструвалась анемія хронічного захворювання та лімфаденопатія - у 37 (21,4 %) та 31 (17,9 %) хворих на РА, з меншою частотою виявлялись ревматоїдні вузлики та синдром Рейно - у 21 (12,1 %) та 4 (2,3 %) осіб, відповідно.

У 89 (51,4 %) хворих на РА виявлялись коморбідні стани, в тому числі у 13 (7,5 %) хворих виявлялось більше одного супутнього захворювання. В структурі коморбідності хворих на РА перше місце посідала артеріальна гіпертензія (АГ) (табл. 2.3) За анамнестичними даними та результатами офісного вимірювання артеріального тиску (АТ) в обстеженій когорті хворих на РА було виявлено 59 (34,1 %) осіб з АГ, в тому числі АГ I стадії 1-го ступеня була виявлена у 23 (13,3%) пацієнтів, АГ II стадії 1-го та 2-го ступеня – у 22 (12,7 %) хворих, у 14 (8,1 %) пацієнтів виявлено ізольовану систолічну АГ II стадії. Антигіпертензивну терапію отримували 49 (28,3 %) хворих на РА: 41 (23,7 %) осіб отримували інгібітори АПФ, 6 (3,5 %) – сартани, 8 (4,6 %) – бета-блокатори, 2 (1,2 %) – антагоністи кальцію, у тому числі 8 (4,6 %) хворих отримували комбіновану антигіпертензивну терапію. В загальній групі хворих на РА в середньому показники артеріального тиску за результатами офісного вимірювання становили: САТ $126 \pm 16,7$ мм рт.ст., ДАТ $78,6 \pm 10,7$ мм рт.ст. Серед інших коморбідних станів у обстежених хворих на РА реєструвався остеоартроз колінних суглобів – у 4,6 % осіб, остеохондроз поперекового відділу хребта – у 4,0 % осіб, виразкова хвороба дванадцятипалої кишки (ДПК) – у 2,9 % осіб, ожиріння I-II ступеню – у 7,7 % осіб, частота патології сечовидільної та дихальної системи, системного остеопорозу не перевищувала 3%. У 7 (4 %) хворих виявлялось поєднання поєднання АГ з остеоартрозом (3), ожирінням (5), остеохондрозом (2). Середній індекс маси тіла (ІМТ) в загальній групі хворих на РА становив $26,5 \pm 4,59$ кг/м². В цілому, частота загальної коморбідності та структура в зазначеній когорті хворих на РА узгоджується із результатами інших досліджень [48].

Таблиця 2.3

Структура коморбідності у хворих на РА, включених в дослідження (n=173)

Коморбідна патологія	n (%)	% у структурі коморбідності (n=92, 100%)
Артеріальна гіпертензія	59 (34,1 %)	64,1
Остеоартроз колінних суглобів	8 (4,6%)	9,0
Остеохондроз поперекового відділу хребта	7 (4,0 %)	7,9
Системний остеопороз	5 (2,9%)	5,6
Виразкова хвороба ДПК (ремісія)	5 (2,9 %)	5,6
ХОЗЛ	3 (1,7 %)	3,4
Патологія сечовидільної системи	3 (1,7 %)	3,4
Ожиріння I-II ступеню	16 (7,7 %)	17,4

Для оцінки окремих лабораторних показників була сформована група контролю, до якої методом суцільної вибірки були включені 82 жінки (українки в третьому поколінні, жительки Вінницької області), віком від 22 до 58 років ($43,7 \pm 10,2$ роки), з відсутністю скарг з боку внутрішніх органів, об'єктивних ознак РА, патологічних змін при фізикальному обстеженні. З метою виключення органічної патології особам групи контролю проводили інструментальне (ЕКГ, флюорографія органів грудної клітки) і лабораторне дослідження (загальний аналіз крові, загальний аналіз сечі, креатинін, загальний холестерин, глюкоза крові). Серед осіб групи контролю у 3 (3,7 %) жінок був виявлений остеоартроз колінних суглобів, у 4 (4,9 %) осіб – остеоохондроз поперекового відділу хребта, у 21 (25,6 %) осіб - АГ, ожиріння I-II ступеню - у 6 (7,3 %) осіб, інших патологічних станів не встановлено. В групі контролю середні показники артеріального тиску становили САТ $125 \pm 13,3$ мм рт.ст., ДАТ $78,4 \pm 9,01$ мм рт.ст., а ІМТ склав $26,0 \pm 3,65$ кг/м². За вказаними показниками група контролю була репрезентативною загальної групі хворих на РА. До пілотного етапу (поглиблене вивчення циркадних ритмів) з групи контролю була включена підгрупа з 34 практично здорових нормотензивних жінок (віком $42,4 \pm 10,5$ років) без супутньої патології.

2.2 Методи дослідження

Згідно уніфікованого наказу МОЗ України від 11.04.2014 р. № 263 клінічне обстеження хворого на РА включало: збір анамнестичних даних (тривалість симптомів), оцінку кількості болючих (КБС) та набряклих суглобів (КНС), сімейний анамнез захворювання; фізикальний огляд (виявлення КБС, КНС); лабораторне дослідження крові (з обов'язковою оцінкою ШОЕ, рівня РФ, АЦЦП, СРБ); лабораторне дослідження сечі; інструментальні дослідження (ЕКГ/ЕхоКГ); оцінка рентгенограм суглобів (за відсутності – рентгенографія кистей і стоп); рентгенографія органів грудної клітки (в прямій проекції).

Активність РА встановлювали за клінічними індексами. Визначали:

1. Індекс активності захворювання DAS28, який включає оцінку КБС та КНС із 28 суглобів (2 плечових, 2 ліктьових, 2 променевоzap'ясткових, по 2 п'ясно-фалангових 1-5 пальців кисті, 2 міжфалангових 1 пальця та по 2 проксимальних міжфалангових 2-5 пальців кисті, 2 колінних); загальну оцінку здоров'я пацієнтом (ЗОЗП) за ВАШ в мм (0-100) та рівень гострофазових реактантів – ШОЕ (СРП) [220] або СРБ [117].

DAS28 розраховували за формулами:

$$\text{DAS28 (ШОЕ)} = 0,56\sqrt{\text{КБС}} + 0,28\sqrt{\text{КНС}} + 0,70[\ln(\text{ШОЕ})] + 0,0143\text{ЗОЗП};$$

$$\text{DAS28 (СРБ)} = 0,56\sqrt{\text{КБС}} + 0,28\sqrt{\text{КНС}} + 0,36[\ln(\text{СРБ}+1)] + 0,0143\text{ЗОЗП} + 0,96.$$

Критерії активності РА за DAS28 (0,49-9,07): $\leq 2,6$ – ремісія; $\leq 3,2$ – низька активність; $\leq 5,1$ – помірна активність; $> 5,1$ – висока активність.

2. Клінічний індекс активності захворювання CDAI, який включає оцінку КБС та КНС із 28 суглобів; загальну оцінку активності захворювання пацієнтом (ЗОАЗП) за ВАШ в см (0-10); загальну оцінку активності захворювання лікарем (ЗОАЗЛ) за ВАШ в см (0-10) і розраховується за формулою: $\text{CDAI} = \text{КБС} + \text{КНС} + \text{ЗОАЗП} + \text{ЗОАЗЛ}$ [52].

Критерії активності РА за CDAI (0-76): $\leq 2,8$ – ремісія; ≤ 10 – низька активність; ≤ 22 – помірна активність; > 22 – висока активність.

Функціональну здатність хворих на РА оцінювали згідно рекомендацій ACR за індексом HAQ (Health Assessment Questionnaire) [81], україномовна версія (HAQ-DI - Ukraine / Ukrainian, ID 2387). HAQ складається з 8 категорій (в кожній по 20 питань), які визначають здатність хворого виконувати певні дії в балах: 0 - легко; 1 - з незначними труднощами; 2 - важко, або з допомогою; 3 - не можу. Пункти із використанням допоміжних засобів оцінюють в 2 бали. Індекс HAQ розраховується як середнє значення з найгірших оцінок по кожній з 8 категорій: 1) вдягання та зовнішній вигляд; 2) здатність вставати та сідати (або лягати); 3) прийом їжі; 4) ходьба; 5) гігієна; 6) здатність діставати предмети; 7) здатність до стискання; 8) активність.

Для оцінки впливу захворювання на загальний стан пацієнта застосовували опитник RAID (Rheumatoid Arthritis Impact of Disease), розроблений у 2011 р. з ініціативи EULAR [128]. В дисертаційному дослідженні використана україномовна версія RAID, валідизація якої була здійснена автором роботи [42] за письмовою згодою головного розробника та правовласника – Laure Gossec, MD, PhD, Professor of Paris Descartes University (контактна інформація: Gossec L., Paris Descartes University, Medicine Facility, APHP, Rheumatology B Department, Cochin Hospital, Paris, France. E-mail: laure.gossec@cch.aphp.fr) та письмового дозволу дослідницького інституту Mapi Research Trust (Lyon, France E-mail: PROinformation@mapi-trust.org). Переклад і крос-культурна адаптація RAID були виконані згідно з рекомендаціями [70], вся інформація була надана правовласникам. У 2019 році фінальна версія RAID Ukraine/Ukrainian - Version of 12 Jan 12 - Mapi Institute, ID6556 / RAID_AU1.0_ukr-UA.doc була предсталена на офіційному сайті EULAR (<http://pitie-salpetriere.aphp.fr/psaid/questionnaire.php>).

RAID включає самотійну оцінку хворим 7 шкал (1 - біль; 2 - функціональна оцінка зниження працездатності; 3 - втомлюваність; 4 - сон; 5 – фізичне самопочуття; 6 – емоційне самопочуття; 7 – адаптація до проявів захворювання або пристосованість) за шкалою від 0 до 10. Кожна складова

має свій коефіцієнт, який був встановлений під час розробки опитника, та супроводжується NSR (numering rating scale), де 0 відповідає найкращому значенню відповідної складової, а 10 – найгіршому. Кінцевий результат анкети обчислюється на основі оцінки усіх 7 питань за їх коефіцієнтами. Фінальна оцінка за RAID знаходиться у діапазоні від 0 (найкраща) до 10 (найгірша). Індекс RAID менше 4 балів відповідає низькій активності ПА, від 4 до 6 балів – помірній активності і вище 6 балів – високій активності ПА.

Висока валідність RAID у хворих на ПА нещодавно підтверджена у мультицентрових дослідженнях країн Європи [142; 235]. Нами вперше було показано, що україномовна версія RAID також має високу надійність та валідність [42]: 1) за процедурою тест-ретест (повторне опитування через 7 днів) між показниками окремих шкал та фінальним значенням RAID встановлені сильні прямі кореляційні зв'язки (кореляція Пірсона) із високим ступенем статистичної значущості ($r=0,68-0,83$, $p<0,0001$); 2) між показниками RAID тест/ ретест та індексами активності ПА (табл. 2.4) виявлялись сильні прямі зв'язки ($r=0,70-0,78$, $p<0,0001$).

Таблиця 2.4

Кореляція RAID Ukraine/Ukrainian з показниками активності ПА [42]

Показники	RAID-тест			RAID-ретест		
	r	95% ДІ	p	r	95% ДІ	p
КБС	0,781	0,68-0,86	0,000	0,707	0,54-0,82	0,000
КНС	0,496	0,26-0,69	0,001	0,489	0,27-0,70	0,001
ШОЕ	0,340	0,03-0,59	0,027	0,335	0,01-0,60	0,030
СРБ	0,428	0,12-0,63	0,005	0,409	0,05-0,63	0,007
DAS28-ШОЕ	0,710	0,53-0,84	0,000	0,706	0,54-0,83	0,000
DAS28-СРБ	0,777	0,66-0,87	0,000	0,781	0,66-0,87	0,000
HAQ	0,581	0,37-0,74	0,000	0,675	0,49-0,80	0,000

Загально-клінічні методи дослідження включали оцінку антропометричних параметрів (зріст, маса тіла, індекс маси тіла), загальний

аналіз крові та сечі, визначення вмісту РФ та АЦЩП; загального білка, холестерину, креатиніну, сечовини, трансаміназ, глюкози в сироватці крові.

Антропометричні показники (зріст, маса тіла, індекс маси тіла) були визначені при надходженні пацієнта у стаціонар відповідно до рекомендацій ВООЗ [285]. Індекс маси тіла (ІМТ) визначали за відомою формулою $ІМТ (кг/м^2) = \text{маса тіла (кг)} / (\text{зріст, м})^2$. Інтерпретацію ІМТ здійснювали відповідно до критеріїв ВООЗ (1995), де нормальний ІМТ становить 18,5 - 24,9 кг/м², надлишок маси тіла – 25,0-29,9 кг/м², ожиріння I ступеня – 30-34,9 кг/м²; II ступеня – 35-39,9 кг/м²; III ступеня - більше 40 кг/м².

Імуноферментні дослідження виконані в науково-дослідній клініко-діагностичній лабораторії ВНМУ ім. М.І. Пирогова (свідоцтво МОЗ України про переатестацію №049/15 від 02.03.2015 р.) за допомоги завідувачки лабораторії, к.мед.н., доцента кафедри біологічної та загальної хімії, Лауреата Державної премії України в галузі науки та техніки Штатько О.І. Автор висловлює глибоку вдячність за допомогу у проведенні досліджень.

Забір крові здійснювався в стандартних умовах, натще, з ліктьової вени за допомогою вакуумних систем «Vacuette» (Greiner Bio-One, Австрія). Обстежувані особи упродовж 1 доби до забору крові утримувались від важкого фізичного навантаження, вживання алкоголю, жирної їжі. Сироватку отримували шляхом центрифугування цільної крові при 1500 g упродовж 20 хвилин при 18-22°C. Проби сироватки до тестування зберігались при -20°C.

Для дослідження циркадних ритмів продукції NOS3 та TLR2 забір крові проводили 4 рази на добу, кожні 6 годин - о 08⁰⁰, 14⁰⁰, 20⁰⁰, 02⁰⁰, з урахуванням циркадних коливань секреції кортизолу, мелатоніну, окремих цитокінів у хворих на РА (табл. 2.5).

Вміст NOS3 в сироватці крові визначали імуноферментним методом за набором “Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Nitric Oxide Synthase 3, Endothelial (NOS3)” (Cloud-Clone Corp., США, SEA868Hu, L170922832) відповідно до інструкції виробника. Чутливість методу (мінімальна концентрація NOS3) $\leq 0,057$ нг/мл, коефіцієнт варіації < 10%. Концентрації

стандартних розчинів для побудови калібрувальної кривої – 0,0; 0,156; 0,312; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 нг/мл. Детекцію проводили на аналізаторі STAT-FAX 303+ (США) при довжині хвилі 450 нм (диференційний фільтр – 630 нм). Концентрацію NOS3 в сироватці крові розраховували у нг/л.

Вміст TLR2 в сироватці крові визначали за набором “Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Toll Like Receptor 2 (TLR2)” (Cloud-Clone Corp., США, SEA663Hu, L170922830) відповідно до інструкції виробника. Чутливість методу $\leq 0,112$ нг/мл, коефіцієнт варіації $< 10\%$. Концентрації стандартних розчинів sTLR2 для побудови калібрувальної кривої – 0,0; 0,156; 0,312; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 нг/мл. Детекцію проводили на аналізаторі STAT-FAX 303+ (США) при довжині хвилі 450 нм (диференційний фільтр – 630 нм). Концентрацію sTLR2 в сироватці крові розраховували у нг/л.

Таблиця 2.5

Обґрунтування режиму забору крові для дослідження циркадних ритмів продукції NOS3 та TLR2 у хворих на РА

Показник	Ранок	День	Вечір	Ніч	Бібліографія
Мелатонін	Зупинка секреції 7 ³⁰	Низький рівень 8 ⁰⁰ - 20 ⁰⁰	Старт секреції 20 ³⁰ - 21 ⁰⁰	Найвищий рівень 02 ⁰⁰ - 06 ⁰⁰	[100]
Кортизол	Найвищий рівень 07 ⁰⁰ - 10 ⁰⁰	Поступове зниження рівня 10 ⁰⁰ - 15 ⁰⁰	Низький рівень 15 ⁰⁰ - 22 ⁰⁰	Найнижчий рівень - 02 ⁰⁰ , старт секреції 03 ⁰⁰	[100]
ІЛ-6, ФНПа	Найвищі рівні 07 ⁰⁰ - 10 ⁰⁰	Поступове зниження рівня 10 ⁰⁰ - 16 ⁰⁰	Найнижчі рівні 16 ³⁰ -22 ³⁰	Поступове підвищення рівнів 02 ⁰⁰ - 07 ⁰⁰	[64; 100; 162; 217]
Забір крові (години)	08 ⁰⁰	14 ⁰⁰	20 ⁰⁰	02 ⁰⁰	-

Вміст С-реактивного білка (СРБ) в сироватці крові визначали імуноферментним методом за набором “СРБ-ИФА-БЕСТ (высокочувствительный)” (ЗАТ Вектор-Бест, РФ, А-9002) відповідно до інструкції виробника. Чутливість методу $\leq 0,05$ мг/л, коефіцієнт варіації $< 10\%$.

Концентрації стандартних розчинів СРБ для побудови калібрувальної кривої – 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 5; 10 мг/л. Детекцію проводили на аналізаторі STAT-FAX 303+ (США) при довжині хвилі 450 нм (диференційний фільтр – 630 нм).

Молекулярно-генетичні дослідження виконані в навчально-науковій клініко-діагностичній лабораторії ПЛР ВНМУ ім. М.І. Пирогова (свідоцтво МОЗ України про атестацію №051/15 від 02.03.2015 р.) за допомогою завідувачки лабораторії Людкевич Г.П. та завідувача кафедри медичної біології ВНМУ ім. М.І. Пирогова, к.б.н., с.н.с Шкарупи В.М. Автор висловлює глибоку вдячність за допомогу у виконанні досліджень.

Геномна ДНК екстрагувалась із мононуклеарів периферичної крові з використанням набору «Gene Jet Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit» (Thermo Scientific, США) згідно інструкції виробника. Забір крові здійснювався в стандартних умовах з ліктьової вени за допомогою систем «Vacuette» (Greiner Bio-One, Австрія) з K_2EDTA .

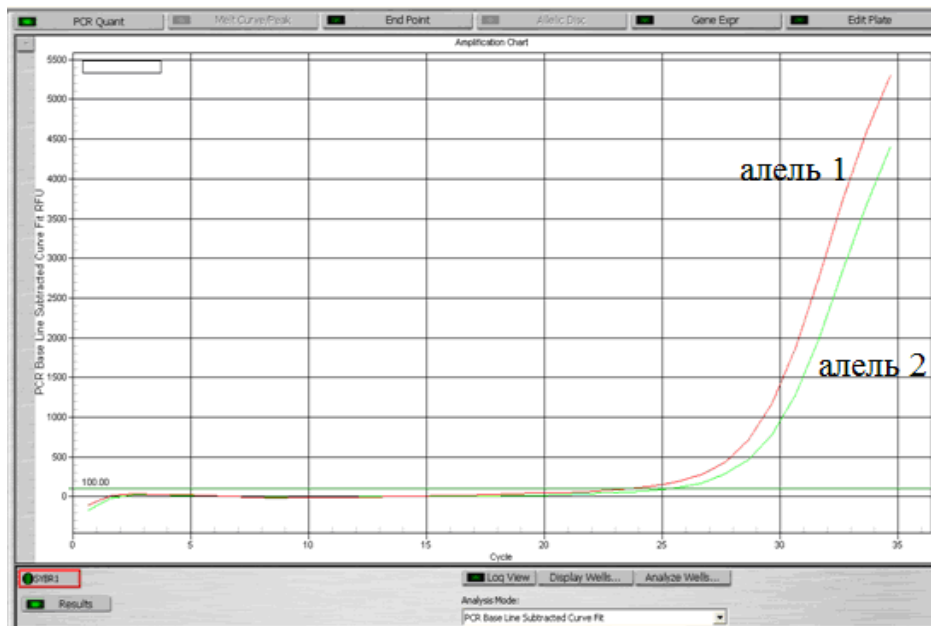
Поліморфізм *rs2070744 (T-786C)* промотору гену *NOS3* визначали за допомогою алель-специфічної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в режимі реального часу (Real-Time PCR) на ампліфікаторі iCycler IQ5 BioRad (США) з використанням стандартного набору «SNP-ЭКСПРЕСС-РВ» (НПФ «Литех», РФ) відповідно до інструкції виробника. Аналіз базувався на одночасному проведенні двох реакцій ампліфікації з двома парами алель-специфічних праймерів (комплементарних алелям -786T та -786C) з використанням інтеркалюючого барвника SYBR Green. Робоча суміш для ПЛР складалась з 17,5 мкл розчинника, 2,5 мкл реакційної суміші (алель 1 чи алель 2, відповідно), 0,2 мкл барвника SYBR Green, 0,2 мкл Таq-полімерази із розрахунку на 1 пробу. Для ампліфікації специфічних фрагментів гену *NOS3* до 20 мкл робочої суміші додавали по 5 мкл зразка ДНК та використовували наступний режим ампліфікації (табл. 2.6). Детекція продуктів ампліфікації здійснювалась у кожному циклі ампліфікації автоматично, з наступною побудовою кривих накопичення флуоресцентного сигналу, який при вбудовуванні барвника SYBR Green у дволанцюговий продукт ампліфікації,

зростає багаторазово. На рис. 2.1 представлені типові результати дослідження поліморфізму *rs2070744* гену *NOS3* в режимі реального часу. Загальна частота мінорної алелі *C* становить за даними MAF/MinorAlleleCount: TOPMED $f=0.28902$ (36292/125568), GnomAD - $f=0.29155$ (9139/31346) [233].

Таблиця 2.6

Режим ампліфікації при дослідженні поліморфізму *rs2070744* гена *NOS3* в режимі реального часу (iCycler IQ5 BioRad)

Температура	Час	Кількість циклів
+93°C	1 хв	35 циклів
+93°C	10 сек	
+64°C	10 сек	
+72°C	20 сек (зчитування)	

Рис. 2.1 Гетерозигота *TC* (Real-Time PCR, приклад типового дослідження).

2.3 Методи лікування

Хворі на РА, включені у дослідження, отримували лікування відповідно до уніфікованого клінічного протоколу первинної, вторинної (спеціалізованої), третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги та

медичної реабілітації «Ревматоїдний артрит», затвердженого наказом МОЗ України від 11.04.2014 р. № 263. Стандартна схема фармакотерапії хворих на РА включала 1) МТХ (Метотрексат Orion, Фінляндія) у стандартній дозі перорально (за умови, що ця доза ≥ 10 мг/тиждень); 2) ГК - метилпреднізолон (MEDROL®, Pfizer Inc., США) перорально у стандартній дозі (за умови що ця доза ≤ 10 мг/добу за преднізолоном і не змінювалась упродовж 4 тижнів до початку дослідження); 3) прийом будь-якого НПЗЗ у стандартній дозі, за умови що ця доза не змінювалась упродовж 4 тижнів до початку дослідження; 4) фолієву кислоту (Фолієва кислота, Технолог ЗАО, Україна) у дозі, що дорівнює половині тижневої дози МТХ (не раніше ніж через 1 добу після та не пізніше ніж за 1 добу до прийому МТХ).

Для оцінки клінічної значущості циркадних ритмів продукції медіаторів ангиогенезу в якості предикторів резистентності до лікування було проведено відкрите контрольоване дослідження із тривалістю 12 тижнів. Проведено 12-тижнева відкрите контрольоване дослідження, до якого із загальної групи обстежених хворих на РА увійшло 97 жінок, віком $46,3 \pm 8,89$ років та тривалістю захворювання $8,44 \pm 6,52$ років.

Контроль ефективності лікування здійснювали згідно критеріїв Американського коледжу ревматологів ACR20 / ACR 50/ ACR 70 [56]. Про відповідь на лікування на рівні ACR20 свідчить зниження двох обов'язкових показників (КНС і КБС) не менше ніж на 20% та покращення на 20% щонайменш 3-х з наступних показників – ЗОАЗП; ЗОАЗЛ; ВАШ; НАQ; ШОЕ чи СРБ. Відповідно для визначення респондерів на рівні ACR50 та ACR70 вищевказані показники повинні змінюватись на 50% та 70%, відповідно. Додатково в процесі лікування оцінювали динаміку індексу RAID [42; 128].

2.4 Методи статистичної обробки отриманих результатів

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою Microsoft Excel для Windows-2010 та універсальних статистичних програм IBM Statistics

SPSS 22 та STATISTICA 6.0 (ЦНІТ ВНМУ ім. М.І. Пирогова, ліцензійний №АХХR910A3374605FA). Обчислювали середню арифметичну, квадратичне відхилення, середні помилки середньої арифметичної. Для ранжирування показників визначали медіану (Me), процентилі ($P_5, P_{10}, P_{25}, P_{75}, P_{90}, P_{95}$), 95% довірчий інтервал (95% CI). Статистичну значущість відмінностей для парних та незалежних вибірок оцінювали за допомогою t-критерію Ст'юдента (при нормальному розподілі), U-критерію Мана-Уїтні (при розподілі, що відхилявся від нормального). Нормальність розподілу оцінювали за критеріями Колмогорова-Смірнова (D) та Шапіро-Уїлка (W). При порівнянні частоти змін застосовували точний метод Фішера (Fisher exact test, 2-tailed) та критерій χ^2 . Зв'язок між показниками оцінювали на підставі кореляційного аналізу за Пірсоном або Спірманом.

Розподіл частот поліморфних алелей перевіряли на відповідність закону Харді-Вайнберга (HWE: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$), оцінювали відношення шансів (OR). Для виявлення предикторів проводили однофакторний дисперсійний (ANOVA) та множинний лінійний регресійний аналіз, оцінювали стандартизований коефіцієнт β . Для встановлення діагностичної цінності показника проводили ROC-аналіз, оцінювали чутливість (Se) та специфічність (Sp). Результати наведено як середнє та стандартне відхилення ($M \pm \sigma$) або медіана та 25-й – 75-й процентиль (Me [P_{25} - P_{75}]). При перевірці гіпотез критичним рівнем статистичної значущості вважали $p < 0,05$.

Резюме. Обрані критерії рандомізації у дослідження, клініко-лабораторні, інструментальні та статистичні методи відповідають завданням дослідження і дозволяють об'єктивно та комплексно вивчити циркадність продукції медіаторів ангіогенезу у хворих на РА, встановити клінічну значимість виявлених змін та виявити потенційні предиктори ефективності лікування.

Основні результати розділу висвітлені в наступних публікаціях: [24; 42].

РОЗДІЛ 3

ЦИРКАДНІ РИТМИ ПРОДУКЦІЇ ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ СИНТАЗИ ОКСИДУ АЗОТУ У ЖІНОК, ХВОРИХ НА РЕВМАТОЇДНИЙ АРТРИТ: ЗВ'ЯЗОК З ПЕРЕБІГОМ ТА ПОЛІМОРФІЗМОМ *rs2070744* ГЕНА *NOS3*

РА відноситься до захворювань, які асоціюються з розладами хронобіологічних ритмів внаслідок дисбалансу продукції ключових гормональних регуляторів (з більш інтенсивним та тривалим підвищенням нічної секреції мелатоніну за умов зниженої секреції кортизолу) [49; 100; 162] та значних пертурбацій в експресії *clock*-генів [165; 212]. Зміни в роботі центрального біологічного годинника індукують порушення циркадних ритмів продукції медіаторів запалення (ІЛ-6, ІЛ-1 β , ФНП α), які, в свою чергу, поглиблюють розлади експресії *clock*-генів в суглобових тканинах [165; 212].

Провідною патогенетичною ланкою РА є ангиогенез, який стимулює формування панусу. Одним із медіаторів ангиогенезу, через який реалізується дія фактору росту судин (VEGF), є конститутивний ензим NOS3 [73]. Експериментально доведено зв'язок між експресією *clock*-генів та ендотеліальною продукцією NO [60; 61], виявлено циркадні коливання експресії NOS3 в міокарді тварин [291], встановлено здатність мелатоніну підвищувати активність NOS3 в культурі ендотеліоцитів [245]. Експресія NOS3 контролюється геном *NOS3*, поліморфізм якого, гіпотетично, може впливати на добові коливання продукції цього ензиму. Зокрема, при дослідженні ролі поліморфізму *rs2070744* гена *NOS3* було засвідчено, що за наявності *C*-алелі порушується взаємодія факторів транскрипції з промотором і пригнічується експресія NOS3 [200]. У гомозигот *CC* виявляються нижчі рівні метаболітів NO (нітритів та нітратів) в крові [200; 243]. Відмічений зв'язок носійства варіантної алелі *C* за поліморфізмом *rs2070744* гена *NOS3* з клінічними проявами та рівнем окремих прозапальних цитокінів (ІЛ-6, ІЛ-12) у хворих на РА [5; 6; 79]. Отже, дослідження

циркадних ритмів продукції NOS3 в клінічних умовах у хворих на РА є актуальним.

Завданням цього розділу роботи було встановити добову варіабельність рівня NOS3 в сироватці крові у хворих на РА, оцінити можливий зв'язок з перебігом захворювання та носійством варіантних алелей та генотипів за поліморфізму *rs2070744 (T-786C)* гена *NOS3*.

3.1 Циркадні особливості продукції NOS3 у хворих на РА

На першому (пілотному) етапі дослідження було обстежено 34 практично здорових жінки віком $42,4 \pm 10,5$ років, які склали групу контролю, та 36 жінок, хворих на РА (віком $43,7 \pm 7,35$ років) з середньою та високою активністю захворювання ($\text{DAS28-ШОЕ} > 3,2$) (табл. 3.1). На цьому етапі у дослідження залучали лише нормотензивних осіб без ознак серцево-судинної патології та/або інших коморбідних станів, що вірогідно асоціюються з розладами ендотеліальної продукції NO та змінами рівня NOS3 в сироватці крові [12; 108; 267]. У дослідження також не залучались особи з ІМТ вище 30 кг/м^2 , базальною гіперхолестеролемією (вище $5,2 \text{ ммоль/л}$), глікемією натще $> 5,5 \text{ ммоль/л}$ та палії тютюну. Група контролю та група хворих на РА були репрезентативними за віком, показниками артеріального тиску та лабораторними показниками. Серед хворих на РА превалювали особи з тривалістю захворювання від 2 до 15 років (95% СІ), з II-III рентгенологічною стадією ураження суглобів (69,4%), серопозитивні за АЦЦП та РФ (80,6 %). Забір крові здійснювали 4 рази на добу – о 08^{00} ; 14^{00} ; 20^{00} та 02^{00} з урахуванням добової варіабельності рівнів мелатоніну, кортизолу та прозапальних цитокінів в сироватці крові (див. розділ 2, табл. 2.4). Перед забором крові обстежувані особи уникали фізичних та психічних навантажень, вранці забір крові проводився натще, у подальшому – щонайменше через 2 години після їжі.

Таблиця 3.1

Характеристика групи хворих на РА та осіб групи контролю, які взяли участь у пілотному етапі дослідження

Розподільча ознака n (%)	Хворі на РА, n=36	Група контролю, n=34	p
Жіноча стать,	36 (100 %)	34 (100 %)	-
Вік, роки (M±σ)	43,7±7,35	42,4±10,5	0,715
САТ, мм рт. ст. (M±σ)	121,1±10,8	118,4±9,45	0,082
ДАТ, мм рт. ст. (M±σ)	76,8±5,79	74,3±7,87	0,104
ІМТ, кг/м ² (M±σ)	25,7±2,95	24,8±3,24	0,133
Холестерол, ммоль/л (M±σ)	4,85±0,26	4,81±0,35	0,856
Глюкоза, ммоль/л (M±σ)	4,53±0,43	4,40±0,53	0,379
Креатинін, мкмоль/л (M±σ)	58,9±10,8	63,5±12,8	0,139
Тривалість РА, роки (M±σ)	7,19±5,24	-	-
Рентгенологічна стадія II-III, n (%)	25 (69,4 %)	-	-
DAS28 - ШОЕ (M±σ)	5,71±1,16	-	-
Серо (+) за АЦЦП та РФ, n (%)	29 (80,6 %)	-	-

Встановлено, що у жінок групи контролю упродовж доби виявлялись статистично значущі коливання рівня NOS3 в сироватці крові із мінімумом в ранкові години (батіфаза) та максимумом у вечірній час (акрофаза) (табл. 3.2, рис. 3.1). Так, в групі контролю вранці о 08⁰⁰ рівень NOS3 в сироватці крові варіював від 378 до 677 нг/л (95% CI) із медіаною 512 нг/л. У вечірній час о 20⁰⁰ рівень NOS3 коливався від 563 до 865 нг/л (95% CI) із медіаною 704 нг/л, що перевищувало ранковий рівень показника в 1,38 рази (медіанний тест, p<0,001), відповідно. Слід відзначити, що у денний час продукція NOS3 зростала помірно - рівень цього ензиму в сироватці крові о 14⁰⁰ був вищим на 10,4%, ніж 08⁰⁰ (p<0,05) і на 19,8 % нижчим, ніж о 20⁰⁰ (p<0,05). Підвищена продукція NOS3 зберігалась у період з 20⁰⁰ до 02⁰⁰ (без

статистично значущих коливань сироваткового рівня показника), а у період з 02⁰⁰ до 08⁰⁰ продукція NOS3 поступово знижувалась (сироватковий рівень показника о 08⁰⁰ був статистично значуще нижчим на 29,0 % порівняно з таким о 02⁰⁰, $p < 0,001$). За цих умов, відносний приріст рівня NOS3 у вечірній час (різниця між рівнями NOS3 о 08⁰⁰ та о 20⁰⁰, де рівень о 08⁰⁰ прийнято за 100 %) в групі контролю в середньому становив $+39,2 \pm 15,2$ %.

Таблиця 3.2

Добова варіабельність рівня NOS3 в сироватці крові у практично здорових жінок групи контролю та хворих на РА

Години	Рівень NOS3 в сироватці крові, нг/л							
	M \pm σ	Me	P ₅	P ₁₀	P ₂₅	P ₇₅	P ₉₀	P ₉₅
Група контролю, n=34								
08 ⁰⁰	512,9 \pm 92,8	512	378	385	450	571	621	677
14 ⁰⁰	566,5 \pm 116,6*	545	407	421	485	638	727	732
20 ⁰⁰	706,5 \pm 103,2**	704	563	593	615	789	823	865
02 ⁰⁰	722,5 \pm 93,2**	731	587	604	655	792	823	870
середньо-добовий	627,1 \pm 92,6	629	494	592	549	696	743	770
Хворі на РА, n=36								
08 ⁰⁰	401,4 \pm 123,7 [#]	410	234	250	306	477	556	566
14 ⁰⁰	431,4 \pm 104,0 [#]	430	275	280	350	517	555	578
20 ⁰⁰	601,2 \pm 139,9 ^{**#}	626	357	382	543	696	768	784
02 ⁰⁰	583,1 \pm 135,5 ^{**#}	613	375	390	488	685	746	772
середньо-добовий	504,3 \pm 116,0 [#]	502	313	326	438	584	642	667

Примітки: 1. * - статистично значущі відмінності в групі відносно «08⁰⁰»

(* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,001$);

2. [#] - статистично значущі відмінності між групою контролю та групою хворих на РА ($p < 0,01$).

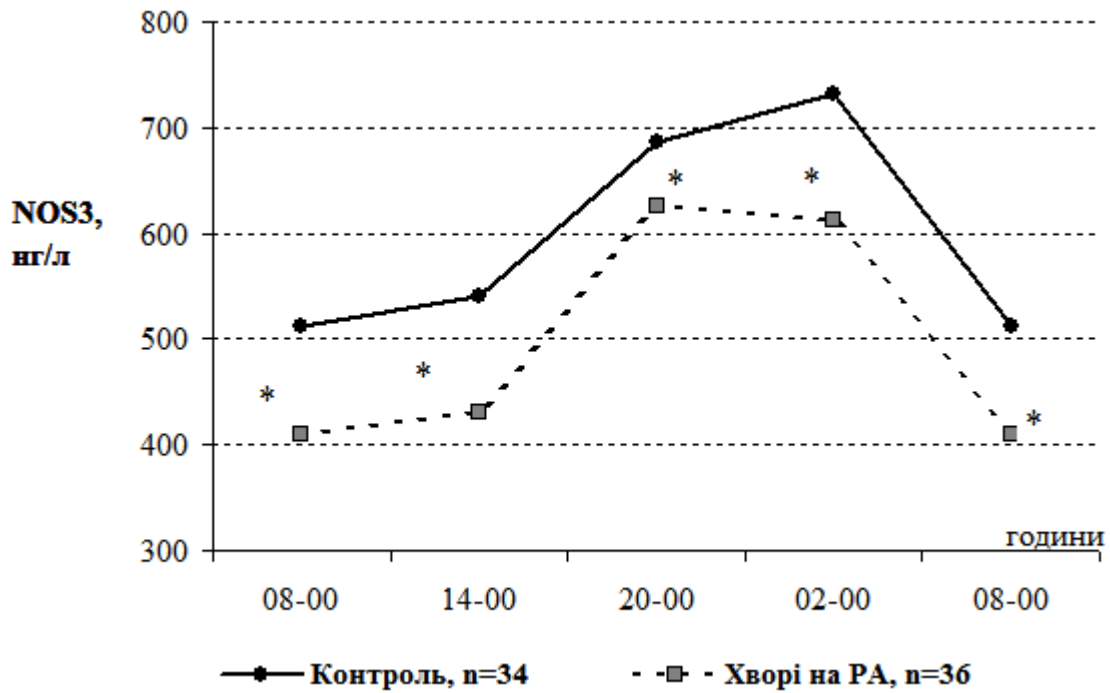


Рис. 3.1 Хронограма рівня NOS3 в сироватці крові у хворих на РА та в групі контролю (* - $p < 0,001$ відносно групи контролю, медіанний тест).

У жінок, хворих на РА, також виявлялись добові коливання продукції NOS3 із батифазою о 08⁰⁰ та акрофазою о 20⁰⁰, при цьому всі показники були статистично значуще нижчими, ніж в групі контролю. Так, у хворих на РА медіана та [P₂₅; P₇₅] рівня NOS3 в сироватці крові о 08⁰⁰ становили 410 [306; 477] нг/л, а о 20⁰⁰ – 626 [543; 696] нг/л ($p < 0,001$), а відносний вечірній приріст рівня NOS3 склав $+52,0 \pm 27,6$ %. У хворих на РА у першу половину дня продукція NOS3 підвищувалась незначуще – сироватковий рівень показника о 14⁰⁰ був вищим порівняно з таким о 08⁰⁰ (на 7,4 %, $p > 0,05$). В другу половину дня приріст продукції NOS3 у хворих на РА виявився більш значущим: рівень показника о 14⁰⁰ був нижчим на 28,2 %, ніж о 20⁰⁰ ($p < 0,001$). У період з 20⁰⁰ до 02⁰⁰ продукція NOS3 у хворих на РА суттєво не змінювалась і її пригнічення відбувалось переважно у період з 02⁰⁰ до 08⁰⁰ (сироватковий рівень показника о 08⁰⁰ був нижчим на 25,4 % порівняно з таким о 02⁰⁰, $p < 0,001$).

Слід відзначити, що у хворих на РА рівні NOS3 в сироватці крові о 08⁰⁰ та 20⁰⁰ були нижчими в 1,28 та 1,18 рази порівняно з групою контролю ($p < 0,01$), при цьому різниця між ранковим і вечірнім рівнем показника виявилась більшою в 1,33 рази ($p < 0,05$). Середньодобовий рівень NOS3 у хворих на РА становив 502 [438; 584] нг/л, що було в 1,25 рази нижчим ($p < 0,01$), ніж в групі контролю. Отже, у хворих на РА порівняно із групою контролю упродовж всієї доби продукція NOS3 була нижчою (із більш значущими міжгруповими відмінностями о 08⁰⁰), в той же час добова варіабельність показника посилювалась.

Оцінка середньоденного (середнє арифметичне показників о 08⁰⁰ та 14⁰⁰) та середньонічного (середнє арифметичне показників о 20⁰⁰ та 02⁰⁰) рівнів NOS3 у хворих на РА підтвердила виявлені закономірності (рис. 3.2). Так, в групі контролю середньоденний рівень NOS3 склав $539,7 \pm 102,6$ нг/л, а середньонічний – $714,5 \pm 92,3$ нг/л. У хворих на РА середньоденний та середньонічний рівні NOS3 становили $416,4 \pm 110,8$ нг/л та $592,2 \pm 134,7$ нг/л і були нижчими в 1,30 та 1,21 рази, ніж в групі контролю ($p < 0,001$).

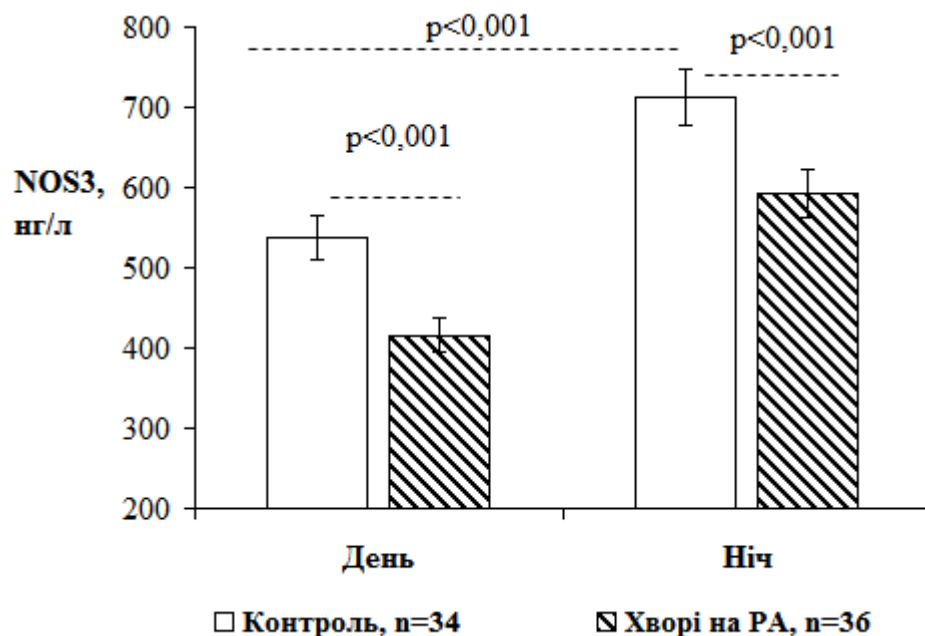


Рис. 3.2 Середньоденний (08⁰⁰-14⁰⁰) та середньонічний (20⁰⁰-02⁰⁰) рівні NOS3 в сироватці крові хворих на РА та практично здорових осіб (M±σ).

На наступному етапі проведено дослідження циркадної варіабельності продукції NOS3 у хворих на РА залежно від віку та клінічних показників перебігу захворювання. На цьому етапі у дослідження увійшло ще 137 пацієнтів і, таким чином, загальна когорта обстежених хворих на РА склала 173 особи (100% жінки), з середнім віком $45,9 \pm 8,79$ років, тривалістю захворювання $7,96 \pm 6,38$ років, з II-III рентгенологічною стадією за Steinbroker (80,9 %), серопозитивні за АЦЦП та/або РФ (83,2%), з середньою активністю захворювання за DAS28-ШОЕ $5,65 \pm 1,07$ балів. Рівень NOS3 в сироватці крові визначали о 08⁰⁰ та о 20⁰⁰, відповідно до батіфази та акрофази показника, встановлених на пілотному етапі дослідження.

У загальній групі хворих на РА параметри добової варіабельності рівня NOS3 в сироватці крові в цілому відповідали описаним на попередньому етапі, із збереженням всіх статистично значущих відмінностей відносно групи контролю (табл. 3.3). Так, в загальній групі хворих на РА ранковий, вечірній та середньодобовий рівні NOS3 в сироватці крові були статистично значуще нижчими на 19,0; 16,0 та 19,6 %, ніж в групі контролю.

Аналіз добової варіабельності продукції NOS3 у хворих на РА залежно від віку висвітлив наступні закономірності. У хворих на РА віком ≤ 25 років рівні NOS3 вранці (о 08⁰⁰), ввечері (о 20⁰⁰) та середньодобовий були вищими на 15,7; 22,9 та 19,9 %, ніж у хворих віком 45-60 років. У хворих віком 26-44 роки показники ранкової продукції NOS3 виявляли тенденцію до зниження ($p=0,1$), а показники вечірньої та середньодобової продукції NOS3 були статистично значуще нижчими на 13,7 та 12,3 %, ніж у хворих віком до 25 років. При цьому, між віковими групами 26-44 роки та 45-60 років статистично значущих відмінностей за ранковим та вечірнім рівнями NOS3 не виявлялось. Приріст рівня NOS3 у вечірній час у хворих на РА віком ≤ 25 років становив $+51,0 \pm 25,1$ % і був несуттєво вищим ($p > 0,05$), ніж у хворих віком 26-44 роки та 45-60 років ($+48,4 \pm 32,4$ % та $+43,5 \pm 30,1$ %, відповідно). В цілому, циркадні коливання рівня NOS3 у всіх вікових групах хворих на РА були вищими, ніж в групі контролю.

Таблиця 3.3

Добова варіабельність рівня NOS3 в сироватці крові хворих на РА залежно від віку

Характеристика групи		Рівень NOS3 в сироватці крові, нг/л ($M \pm \sigma$)		
		08 ⁰⁰	20 ⁰⁰	середньо-добовий
1	Контроль, n=34	512,9±92,8	706,5±103,2	627,1±92,6
2	Хворі на РА, n=173	415,7±87,7	593,2±124,7	504,4±95,3
	p _{2,1}	<0,001	<0,05	<0,01
Вік хворих на РА				
3	≤ 25 років, n=7	471,9±62,6	707,9±119,4	589,9±78,5
4	26 - 44 років, n=58	423,2±105,0	611,2±134,2	517,2±108,2
	p _{3,4}	>0,05	<0,05	<0,05
5	45-60 років, n=108	408,0±77,3	576,1±115,2	492,0±85,4
	p _{3,5}	<0,05	<0,05	<0,05
	p _{5,4}	>0,05	>0,05	>0,05

Аналіз показників добової варіабельності рівня NOS3 в сироватці крові залежно від клінічних параметрів захворювання висвітлив наступні закономірності (табл. 3.4). Зі збільшенням тривалості захворювання у хворих на РА виявлялось поступове зниження добової продукції NOS3 із збереженням циркадних особливостей. Так, у хворих з тривалістю РА понад 10 років рівні NOS3 о 08⁰⁰, 20⁰⁰ та середньодобовий були статистично значуще нижчими на 18,4; 24,2 та 21,0 %, ніж у хворих з тривалістю РА до 5 років. В той же час, відмінності показників добової варіабельності рівня NOS3 між хворими з тривалістю захворювання 5-10 років та понад 10 років не були статистично значущими. У хворих на РА не виявлялось суттєвих відмінностей щодо відносного приросту рівня NOS3 у вечірній час залежно від тривалості захворювання, який в групах з тривалістю РА до 5 років, 5-10 років та понад 10 років становив 46,1±29,2 %, 47,1±32,3 % та 41,0±29,1 %, відповідно (p>0,05). Аналіз циркадних ритмів продукції NOS3 залежно від імунологічної характеристики РА не виявив відмінностей між хворими з

серопозитивним та серонегативним (за АЦЦП та РФ) варіантами захворювання.

Таблиця 3.4

Добова варіабельність рівня NOS3 в сироватці крові залежно від клінічних характеристик хворих на РА

Характеристика групи		Рівень NOS3 в сироватці крові, нг/л (M±σ)		
		08 ⁰⁰	20 ⁰⁰	середньо-добовий
Тривалість РА				
1	< 5 років, n=55	431,4±98,3	618,9±135,8	525,1±106,4
2	5 - 10 років, n=78	416,3±86,9	597,4±115,4	506,8±89,4
	p _{2,1}	>0,05	>0,05	>0,05
3	> 10 років, n=40	397,7±63,0	555,3±113,5	479,5±77,0
	p _{3,1}	<0,05	<0,05	<0,05
	p _{3,2}	>0,05	>0,05	>0,05
Імунологічна характеристика РА				
4	Серо (+) за РФ, n=136	416,0±84,8	593,3±124,6	504,7±91,3
5	Серо (+) за АЦЦП, n=144	416,2±84,4	597,0±123,9	506,6±90,4
	p _{4,5}	>0,05	>0,05	>0,05
6	Серо (-) за АЦЦП та РФ, n=28	411,9±113,5	596,8±144,4	504,4±120,3
	p _{4,6}	>0,05	>0,05	>0,05
	p _{5,6}	>0,05	>0,05	>0,05
Рентгенологічна стадія РА за Steinbroker				
7	I стадія, n=35	450,6±109,1	694,1±128,9	572,3±103,3
8	II стадія, n=70	423,9±86,8	588,2±113,6	506,0±89,8
	p _{7,8}	>0,05	<0,05	<0,05
9	III стадія, n=68	390,0±68,8	549,5±106,5	469,8±78,8
	p _{7,9}	<0,05	<0,01	<0,01
	p _{8,9}	<0,05	<0,05	<0,05
Функціональний клас				
10	ФК I, n=6	480,6±75,6	686,3±112,5	583,5±87,4
11	ФК II, n=108	421,6±93,2	608,8±126,4	515,2±97,8
	p _{10,11}	>0,05	>0,05	>0,05
12	ФК III, n=59	398,1±74,1	559,1±110,8	478,6±81,6
	p _{10,12}	<0,05	<0,05	<0,05
	p _{11,12}	>0,05	<0,05	<0,05

В той же час, підвищення рентгенологічної стадії ураження суглобів статистично значуще асоціювалось зі зниженням добової продукції NOS3. Так, у хворих на РА з III стадією за Steinbroker рівні NOS3 о 08⁰⁰, 20⁰⁰ та середньодобовий були нижчими на 13,4; 20,8 та 17,9 % ($p < 0,05$), ніж у хворих з I стадією захворювання, а також на 8,0; 6,6 та 7,1 % нижчими ($p < 0,05$), ніж у хворих з II стадією за Steinbroker.

Погіршення функціонального стану суглобів у хворих на РА поєднувалось з поступовим зниженням показників добової продукції NOS3. Так, у хворих на РА з ФК III сироваткові рівні NOS3 о 08⁰⁰, 20⁰⁰ та середньодобовий були нижчими на 17,2; 18,5 та 17,9 % ($p < 0,05$), ніж у хворих з ФК I. Також у хворих з ФК III показники вечірньої та середньодобової продукції NOS3 були нижчими на 8,2 та 7,1 % ($p < 0,05$), ніж у хворих з ФК II. Зауважимо, що статистично значущих відмінностей щодо відносного приросту рівня NOS3 у вечірній час залежно від рентгенологічної стадії захворювання та функціонального класу у хворих на РА не виявлялось.

Таким чином, підвищення тривалості захворювання та поглиблення рентгенологічних змін в суглобах асоціювались з помірним пригніченням продукції NOS3 упродовж всієї доби, при цьому її циркадний характер зберігався. Постає питання, на якому етапі розвитку РА порушення продукції NOS3 може модифікувати перебіг захворювання, адже відомо, що зниження активності NOS3 за механізмом негативного зворотного зв'язку викликає підвищення експресії VEGF та індукує патологічний ангиогенез [204; 205]. Зі зниженням ендотеліальної продукції NO пов'язують порушення ремоделювання кісткової тканини [91]. Тому додатково були проаналізовані зміни продукції NOS3 у хворих на РА залежно від темпів досягнення певної рентгенологічної стадії.

Встановлено, що найбільш суттєві відмінності показників циркадної продукції NOS3 залежно від рентгенологічної стадії виявлялись в підгрупі хворих з тривалістю РА менше 5 років (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Добова варіабельність рівня NOS3 в сироватці крові хворих на РА за співставлення тривалості та рентгенологічної стадії захворювання

Характеристика групи		Рівень NOS3 в сироватці крові, нг/л (M±σ)		
		08 ⁰⁰	20 ⁰⁰	середньо-добовий
Тривалість РА < 5 років, n=55				
1	I стадія за Steinbroker, n=24	478,6±95,9	684,6±117,0	581,6±93,2
2	II стадія за Steinbroker, n=23 p _{2,1}	404,2±75,0 <0,05	583,0±123,2 <0,05	492,5±87,3 <0,05
3	III стадія за Steinbroker, n=8 p _{1,3} p _{2,3}	360,3±89,4 <0,05 >0,05	522,8±128,2 <0,01 >0,05	441,5±97,4 <0,01 >0,05
Тривалість РА 5-10 років, n=78				
4	I стадія за Steinbroker, n=9	439,3±127,1	748,4±120,5	593,9±104,3
5	II стадія за Steinbroker, n=39 p _{4,5}	426,8±89,9 >0,05	592,8±107,1 <0,05	509,8±89,1 <0,05
6	III стадія за Steinbroker, n=30 p _{4,6} p _{5,6}	395,7±65,1 >0,05 >0,05	558,1±87,2 <0,05 >0,05	476,9±67,3 <0,05 >0,05
Тривалість РА > 10 років, n=40				
7	II стадія за Steinbroker, n=10	394,9±78,1	554,3±117,5	474,6±80,0
8	III стадія за Steinbroker, n=30 p _{7,8}	392,3±67,1 >0,05	548,0±119,7 >0,05	470,1±85,1 >0,05

Так, у хворих, які до 5 років захворювання досягли III стадії за Steinbroker, рівні NOS3 о 08⁰⁰, 20⁰⁰ та середньодобовий виявились нижчими на 24,7; 23,6 та 24,0 % (p<0,05), а у хворих з II стадією – на нижчими на 15,5; 14,8 та 15,3 % (p<0,05), ніж у хворих з I стадією, відповідно. За цих умов, статистично значущих відмінностей за показниками продукції NOS3 між хворими з II та III стадією за Steinbroker не виявлялось. Зі збільшенням

тривалості захворювання виявлені закономірності поступово втрачались. Так, у пацієнтів з тривалістю захворювання від 5 до 10 років статистично значущі відмінності відносно пацієнтів з I стадією за Steinbroker та пацієнтами, що досягли II та III стадії, реєструвались лише за вечірнім та середньодобовим рівнем NOS3, а в підгрупах хворих з тривалістю захворювання понад 10 років суттєвих відмінностей в продукції NOS3 залежно від рентгенологічної стадії не виявлялось. Таким чином, зниження продукції NOS3 може бути одним із патогенетичних чинників прискореної деструкції суглобів на ранніх етапах розвитку РА.

Для з'ясування діагностичної цінності даного показника як потенційного предиктора швидкості рентгенологічної прогресії РА упродовж перших 5 років був проведений ROC-аналіз. Встановлено, що ранковий рівень NOS3 > 420 нг/л є оптимальною точкою відсікання (cut-off value) для досягнення найкращого балансу між чутливістю та специфічністю діагностичної моделі (табл. 3.6, рис. 3.3). Цей показник може слугувати предиктором повільної рентгенологічної прогресії РА у перші 5 років від початку захворювання із чутливістю 80,8 %, специфічністю 79,3 %. Площа під ROC-кривою становить 0,881 (95% CI 0,794 - 0,969), що вказує на дуже добру якість моделі. Оцінка шансових відношень засвідчила, що у хворих на РА з ранковим рівнем NOS3 > 420 нг/л (08^{00}) шанси упродовж п'яти років залишатись на I стадії за Steinbroker є вдвічі вищими, ніж у пацієнтів з нижчим рівнем цього показника (OR = 2,48, 95% CI 1,02-6,04, $p < 0,05$).

ROC-аналіз вечірнього та середньодобового рівнів NOS3 засвідчив, що ці показники мають меншу діагностичну цінність як предиктори швидкості рентгенологічної прогресії РА: площі під ROC-кривими становили 0,639 (95% CI 0,492-0,786, $p = 0,077$) та 0,743 (95% CI 0,612-0,874, $p = 0,002$), відповідно. Тому для подальшого аналізу клінічних особливостей хворих на РА був обраний ранковий рівень NOS3, який найбільш чітко відображає порушення продукції цього медіатора.

Таблиця 3.6

ROC-аналіз рівня NOS3 в сироватці крові (08^{00}) хворих на РА як предиктора повільної рентгенологічної прогресії захворювання

Показники	Рівень NOS3 в сироватці крові	Шанси рентгенологічної прогресії РА OR: 2,48 [95% CI 1,02-6,04]
Точка відсікання (cut-off value)	> 420 нг/л	
Чутливість (Se)	0,808	
Специфічність (Sp)	0,793	
Площа під кривою (AUC)	0,881	
Стандартна похибка	0,045	
95% CI	0,794; 0,969	
p	< 0,001	

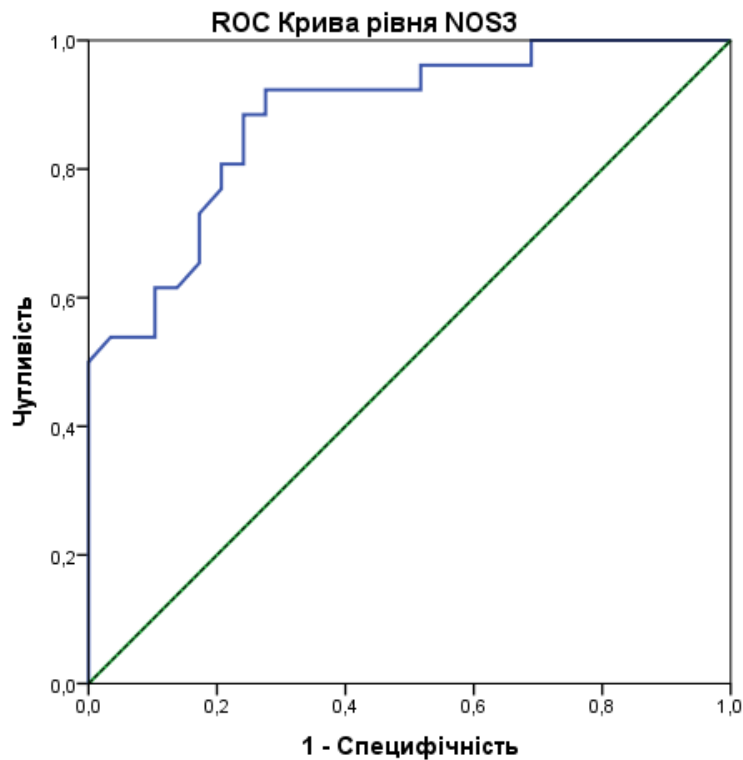


Рис. 3.3 ROC-крива рівня NOS3 в сироватці крові (08^{00}) як предиктора повільної рентгенологічної прогресії РА.

3.2 Клінічні особливості хворих на РА: зв'язок з варіабельністю рівня NOS3 в сироватці крові

Для вивчення клінічних особливостей всі пацієнти з РА були ранжовані на 4 групи згідно квантилям ранкового рівня NOS3 в сироватці крові. До першого квантилю (Q_1) було включено 45 хворих з рівнем NOS3 менше 357 нг/л, до другого квантилю (Q_2) – 43 хворих з рівнем NOS3 357-415 нг/л, до третього квантилю (Q_3) – 42 хворих з рівнем NOS3 415-469 нг/л, до четвертого (Q_4) – 43 хворих з рівнем NOS3 вище 469 нг/л (табл. 3.7). Розподіл хворих за квантилями рівня NOS3 висвітлив наступні закономірності: всі групи були репрезентативними за віком, але за клінічними параметрами виявлялись статистично значущі відмінності між хворими з рівнем NOS3 > 469 нг/л (Q_4) та хворими з нижчими рівнями показника (Q_1 ; Q_2 ; Q_3).

Таблиця 3.7

Клініко-демографічні показники у хворих на РА залежно від квантильного розподілу рівня NOS3 в сироватці крові (08⁰⁰)

Квантилі NOS3	Вік, роки	Тривалість, роки	Серо (-) за АЦЦП та РФ	III стадія Steinbroker	ФК III
	M±σ	M±σ	n (%)	n (%)	n (%)
Q_1 (< 357 нг/л), n=45	46,6±7,52	8,76±7,05	9 (20,9 %)	21 (46,7 %)	17 (37,8 %)
Q_2 (357-415 нг/л), n=43	47,3±7,99	8,58±6,94	7 (14,0 %)	22 (51,2 %)	18 (41,9 %)
Q_3 (415-469 нг/л), n=42	46,7±8,06	8,60±5,72	4 (11,6 %)	17 (40,5 %)	16 (38,1 %)
Q_4 (> 469 нг/л), n=43	43,3±10,4	5,85±5,43	9 (21,4 %)	8 (18,6 %)	8 (18,6 %)
p _{2,1}	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
p _{3,1}	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
p _{3,2}	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
p _{4,1}	>0,05	<0,05	>0,05	<0,05	<0,05
p _{4,2}	>0,05	<0,05	>0,05	<0,05	<0,05
p _{4,3}	>0,05	<0,05	>0,05	<0,05	<0,05

Зокрема, порівняно з квартилем Q_4 у квартилях Q_1 , Q_2 та Q_3 відмічалась вища середня тривалість захворювання (на 49,7; 46,7 та 47,0 %), більші частки пацієнтів з III рентгенологічною стадією за Steinbroker (на 151; 175 та 117 %) та більші частки хворих з функціональними розладами ФК III (на 103; 125 та 105 %), відповідно. При квартильному розподілі не виявлено статистично значущих міжгрупових відмінностей за частками хворих на РА, серонегативних за АЦЦП та РФ, в кожній групі превалювали пацієнти з серопозитивним варіантом захворювання. Слід відзначити, що суттєвих відмінностей за клініко-демографічними показниками між квартилями Q_1 , Q_2 та Q_3 не виявлялось. Таким чином, квартильний аналіз підтвердив, що зниження продукції NOS3 асоціюється з більшою тривалістю захворювання та рентгенологічною прогресією суглобової деструкції.

Аналіз клініко-лабораторних показників активності імунозапального процесу у хворих на РА засвідчив, що зниження ранкової продукції NOS3 асоціюється з помірним підвищенням суглобового больового синдрому і меншою мірою пов'язано зі змінами показників активності запального процесу (табл. 3.8). Так, від квартилю Q_1 до квартилю Q_4 спостерігалось зниження КБС і в групі хворих на РА з рівнем NOS3 > 469 нг/л цей показник виявився нижчим на 26,7 % ($p < 0,05$), ніж в групі хворих з рівнем NOS3 < 357 нг/л. Ще одним показником, який здебільшого відображає виразність больового синдрому у хворих на РА, є ЗОЗП - загальна оцінка захворювання пацієнтом з візуально-аналоговою шкалою. Виявилось, що зниження продукції NOS3 у хворих на РА асоціювалось з погіршенням ЗОЗП: цей показник в групі Q_1 був вищим на 16,4 % та 32,7 % ($p < 0,05$), ніж в групах Q_3 та Q_4 . Також від квартилю Q_1 до квартилю Q_4 спостерігалось поступове зменшення показників активності запального процесу - КНС, ШОЕ та СРБ, але відмінності не набували статистичної значущості, залишаючись в межах тенденції ($p = 0,1$).

Показники активності захворювання у хворих на РА залежно від кuartильного розподілу рівня NOS3 в сироватці крові (08⁰⁰)

Квартилі NOS3	Показники активності РА (M±σ)				
	КБС	КНС	ШОЕ, мм/год	СРБ, мг/л	ЗОЗП ВАН, мм
Q ₁ (< 357 нг/л), n=45	15,0±6,81	7,60±3,74	26,1±13,7	16,8±12,6	68,1±15,6
Q ₂ (357-415 нг/л), n=43	13,2±7,14	7,67±4,95	28,8±14,8	16,2±14,8	59,1±17,3
Q ₃ (415-469 нг/л), n=42	12,8±6,45	6,98±4,32	27,0±13,9	14,5±12,3	58,5±17,3
Q ₄ (> 469 нг/л), n=43	11,0±6,24	5,95±3,91	23,2±15,9	13,0±12,4	51,3±20,2
p _{2,1}	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
p _{3,1}	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05
p _{3,2}	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
p _{4,1}	<0,05	<0,05	>0,05	>0,05	<0,01
p _{4,2}	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05
p _{4,3}	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Аналіз клініко-лабораторних індексів активності захворювання (DAS28-ШОЕ, DAS28-СРБ, CDAI) та функціонального індексу HAQ засвідчив, що зниження ранкової продукції NOS3 супроводжується підвищенням клінічної важкості РА (табл. 3.9). Від кuartилію Q₁ до кuartилію Q₄ спостерігалось поступове зниження всіх зазначених показників і найбільш значущі відмінності реєструвались між кuartилями Q₁ - Q₂ та кuartилем Q₄. Зокрема, у хворих з рівнем NOS3 < 357 нг/л показники DAS28-ШОЕ, DAS28-СРБ та CDAI були вищими на 15,0 %; 16,1 % та 33,3 % (p < 0,01), а у хворих з рівнем NOS3 357-415 нг/л – вищими на 11,1 %; 9,3 % та 20,4 % (p < 0,05) порівняно з хворими з рівнем NOS3 > 469 нг/л, відповідно.

Оцінка індексу HAQ показала, що зниження ранкової продукції NOS3 супроводжується із статистично значущим погіршенням фізичних функцій хворих на РА. У хворих з рівнем NOS3 < 357 нг/л індекс HAQ виявився

вищим 30,9 % ($p < 0,05$), ніж у хворих з рівнем NOS3 > 469 нг/л. Також індекс HAQ в групах Q₂ та Q₃ виявився нижчим на 14,1 та 12,7 % ($p < 0,05$), ніж в групі Q₁.

Таблиця 3.9

Індекси активності захворювання та функціонального стану хворих на РА залежно від кuartильного розподілу рівня NOS3 в сироватці крові (08⁰⁰)

Квартилі NOS3	Шкали активності РА (M±σ)			HAQ (M±σ)
	DAS28-ШОЕ	DAS28-СРБ	СДАІ	
Q ₁ (< 357 нг/л), n=45	5,97±0,90	5,71±0,76	35,2±10,6	1,78±0,41
Q ₂ (357-415 нг/л), n=43	5,77±1,11	5,38±1,01	31,8±12,9	1,56±0,50
Q ₃ (415-469 нг/л), n=42	5,68±1,01	5,32±0,85	30,5±11,5	1,58±0,48
Q ₄ (> 469 нг/л), n=43	5,19±1,12	4,92±1,01	26,4±11,6	1,36±0,58
p _{2,1}	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05
p _{3,1}	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05
p _{3,2}	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
p _{4,1}	<0,01	<0,01	<0,01	<0,05
p _{4,2}	<0,05	<0,05	<0,05	>0,05
p _{4,3}	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Встановлено, що у хворих на РА зниження продукції NOS3 поєднувалось з підвищенням впливу захворювання на загальний стан пацієнта згідно з індексом RAID (табл. 3.10). Найбільш значні відмінності практично за всіма субшкалами RAID реєструвались між групами Q₁ та Q₄. Зокрема, у хворих з рівнем NOS3 < 357 нг/л реєструвались вищі показники болювого синдрому (на 10,4 %), більш виразні порушення функціонального стану (на 12,7 %), вищі ознаки втоми (на 16,0 %), гірша якість сну (на 8,4 %), більш виразні порушення фізичного та емоційного комфорту (12,4 та 15,2 %), гірші показники подолання симптомів захворювання (на 16,2 %), ніж у хворих з рівнем NOS3 > 469 нг/л. В цілому, загальна оцінка індексу RAID в групі Q₁ перевищувала таку в групі Q₄ на 12,7 % ($p < 0,01$), відповідно.

Таблиця 3.10

Індекс RAID у хворих на РА залежно від квартильного розподілу рівня NOS3 в сироватці крові (08⁰⁰)

Квартилі NOS3	Субшкали індексу RAID (M±σ)							RAID, бали
	1	2	3	4	5	6	7	
Q ₁ , n=45	6,60± 0,81	6,13± 0,84	5,96± 0,95	5,80± 1,04	6,07± 0,86	5,82± 0,98	6,16± 0,90	6,12± 0,69
Q ₂ , n=43	6,49± 1,28	5,98± 1,30	5,77± 1,21	5,65± 0,97	5,86± 1,08	5,56± 1,18	5,84± 1,15	5,93± 1,04
Q ₃ , n=42	6,33± 1,10	5,79± 1,16	5,69± 1,07	5,64±1 ,06	5,76± 0,91	5,36± 1,16	5,88± 0,86	5,83± 0,88
Q ₄ , n=43	5,98± 1,22	5,44± 1,16	5,14± 1,32	5,35± 0,95	5,40± 1,05	5,05± 1,02	5,30± 1,17	5,43± 0,99
p _{2,1}	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
p _{3,1}	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05	<0,05
p _{3,2}	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
p _{4,1}	<0,05	<0,01	<0,05	<0,05	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
p _{4,2}	>0,05	<0,05	<0,05	>0,05	<0,05	<0,05	<0,01	<0,05
p _{4,3}	>0,05	>0,05	<0,01	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05	>0,05

Примітка. Субшкали індексу RAID: 1 - біль; 2 - функція; 3 - втома; 4 - сон; 5 - фізичний комфорт; 6 - емоційний комфорт; 7 – подолання.

Оцінка показників якості життя у хворих на РА за допомогою неспецифічного опитника SF-36 засвідчила погіршення окремих показників фізичного та психічного здоров'я у хворих з низьким рівнем ранкової продукції NOS3 (табл. 3.11). Так, у хворих з рівнем NOS3 > 469 нг/л такі показники фізичного здоров'я як PF, BP та GH були вищими на 45,5 %; 20,1 % та 18,1 % (p<0,05), ніж у хворих з рівнем NOS3 < 357 нг/л. В цілому, показник сумарної фізичної складової здоров'я SF-36 (PCS) у хворих в групі Q₄ був вищим на 16,5 %, ніж у хворих в групі Q₁. Також, у хворих з рівнем NOS3 > 469 нг/л показники психічного здоров'я такі як SF та MH виявились вищими на 16,4 % та 17,1 % (p<0,05), ніж у хворих з рівнем NOS3 < 357 нг/л. Однак в цілому, статистично значущих відмінностей за показником сумарної психічної складової здоров'я SF-36 (MCS) в квартильних групах хворих на

РА не виявлялось. Таким чином, зниження ранкової продукції NOS3 можна розглядати як один із додаткових чинників погіршення фізичної складової здоров'я за SF-36 у хворих на РА.

Таблиця 3.11

Показники якості життя за шкалою SF-36 у хворих на РА залежно від квартильного розподілу рівня NOS3 в сироватці крові (08⁰⁰)

Квартилі NOS3	Фізична складова SF-36				PCS	Психічна складова SF-36				MCS
	PF	RP	BP	GH		VT	SF	RE	MH	
Q ₁ , n=45	38,9± 17,6	20,0± 38,3	43,3± 14,8	34,3± 12,1	32,7± 6,18	40,3± 13,0	67,2± 23,1	41,1± 33,2	40,1± 15,8	39,4± 7,33
Q ₂ , n=43	47,1± 26,7	20,3± 32,3	49,6± 15,8	42,8± 15,1	35,9± 7,97	43,3± 15,2	72,4± 21,7	31,0± 31,2	45,9± 17,4	39,5± 7,30
Q ₃ , n=42	47,6± 20,6	16,1± 26,4	49,4± 15,8	41,8± 18,6	35,2± 6,83	44,5± 14,4	74,1± 17,8	29,5± 32,7	48,0± 17,6	40,5± 7,53
Q ₄ , n=43	56,6± 18,5	30,2± 30,1	52,0± 13,7	40,5± 10,1	38,1± 6,20	42,1± 9,95	78,2± 16,4	34,9± 34,5	48,0± 14,5	39,8± 7,67
p _{2,1}	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
p _{3,1}	<0,05	>0,05	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05	>0,05
p _{3,2}	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
p _{4,1}	<0,01	>0,05	<0,05	<0,05	<0,01	>0,05	<0,05	>0,05	<0,05	>0,05
p _{4,2}	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
p _{4,3}	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Пригичення продукції NOS3 може погіршувати показники фізичного здоров'я у хворих на РА внаслідок модифікації перебігу захворювання. Аналіз поширеності показників високої клінічної активності РА засвідчив статистично значущі відмінності між квартильними групами NOS3 (табл. 3.12). Від квартилю Q₁ до квартилю Q₄ спостерігалось поступове зменшення частки хворих з високою активністю захворювання за індексами DAS28-ШОЕ, DAS28-СРБ, CDAI. Так, в групі хворих на РА з рівнем NOS3 > 469 нг/л частки осіб з DAS28-ШОЕ > 5,1 та CDAI > 22 були в 1,51 та 2,02 рази меншими, ніж серед хворих з рівнем NOS3 < 357 нг/л (p<0,01, Fisher exact test, 2-tailed). Також серед хворих на РА з рівнем NOS3 < 357 нг/л частіше в

2,87 рази виявлялись особи із значним погіршення фізичних функцій за індексом HAQ (HAQ > 2), ніж серед хворих з рівнем NOS3 > 469 нг/л ($p < 0,01$). Серед хворих з рівнем NOS3 < 357 нг/л накопичувались особи з індексом RAID вище 6 балів – їх частка була статистично значуще вищою в 2,04 рази, ніж серед хворих з рівнем NOS3 > 469 нг/л ($p < 0,01$). Отже, у більшості хворих на РА із збереженою ранковою продукцією NOS3 клінічний перебіг захворювання виявився більш сприятливим.

Таблиця 3.12

Частота виявлення високої активності захворювання у хворих на РА згідно квартильного розподілу рівня NOS3 в сироватці крові (08⁰⁰)

Квартилі NOS3	Кількість хворих з високою активністю РА, n (%)				
	DAS28-ШОЕ > 5,1	DAS28-СРБ > 5,1	СДАІ > 22	HAQ > 2	RAID > 6
Q ₁ (< 357 нг/л), n=45	35 (77,8 %)	36 (80,0 %)	40 (88,9 %)	12 (26,7 %)	30 (66,7 %)
Q ₂ (357-415 нг/л), n=43	30 (69,8 %)	24 (55,8 %)	30 (69,8 %)	8 (18,6 %)	23 (53,5 %)
Q ₃ (415-469 нг/л), n=42	27 (64,3 %)	23 (54,8 %)	30 (71,4 %)	6 (14,3 %)	19 (45,2 %)
Q ₄ (> 469 нг/л), n=43	22 (51,2 %)	17 (39,5 %)	22 (51,2 %)	4 (9,3 %)	14 (32,6 %)
p _{2,1}	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
p _{3,1}	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
p _{3,2}	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
p _{4,1}	<0,05	<0,01	<0,01	<0,05	<0,01
p _{4,2}	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05
p _{4,3}	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Примітка. Статистична значущість відмінностей визначена точним методом Фішера (Fisher exact test, 2-tailed)

Раніше було засвідчено, що у хворих на РА з рівнем NOS3 > 420 нг/л виявляються вищі шанси повільної рентгенологічної прогресії захворювання у перші 5 років. Аналіз шансових відношень клінічних показників в загальній когорті хворих на РА засвідчив, що зі зниженням ранкового рівня NOS3 ≤ 420 нг/л істотно зростають шанси розвитку високої активності захворювання (рис. 3.4). Зокрема, у хворих з рівнем NOS3 ≤ 420 нг/л шанси виявлення

високої активності за індексами DAS28-ШОЕ та CDAI були в 2,5 рази вищими, ніж у хворих з рівнем NOS3 > 420 нг/л (OR 2,47 та 2,60, $p < 0,05$). Таким чином, ранковий рівень NOS3 > 420 нг/л можна розглядати як додатковий предиктор більш сприятливого клінічного перебігу захворювання у жінок, хворих на РА.

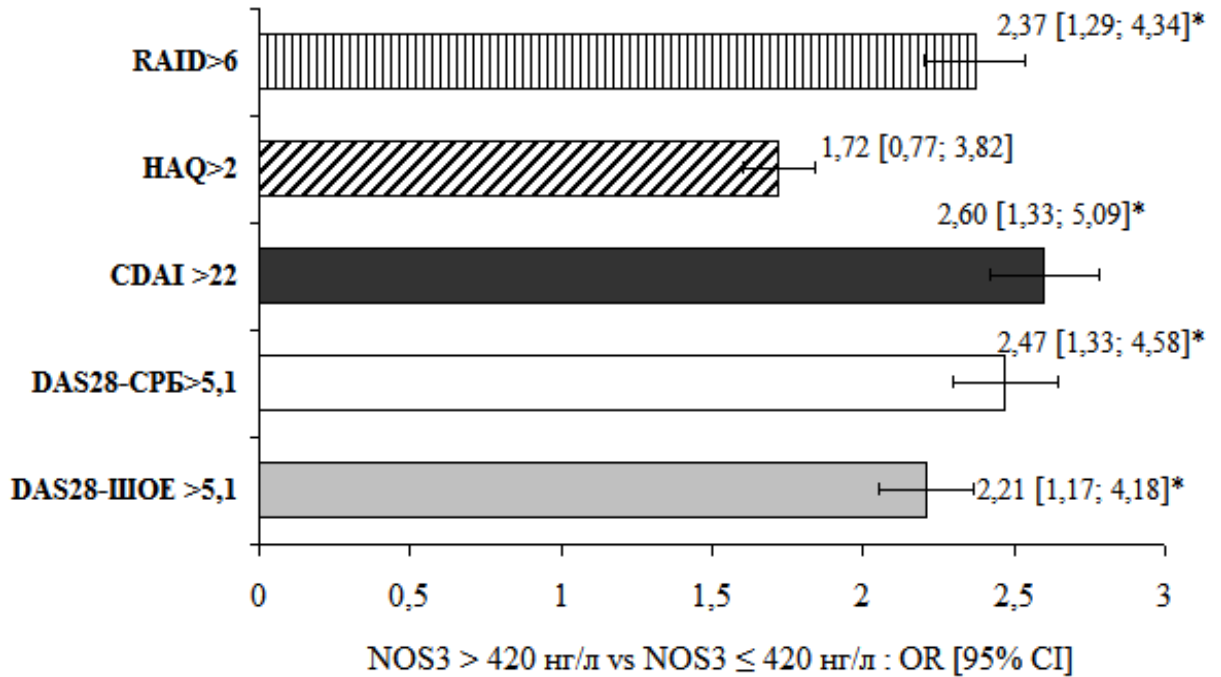


Рис. 3.4 Шанси виявлення високої активності захворювання за клінічними індексами у хворих на РА з рівнем NOS3 ≤ 420 нг/л порівняно із хворими з рівнем NOS3 > 420 нг/л (дані представлені як OR [95% CI], * - $p < 0,05$).

На підставі кореляційного аналізу були отримані додаткові докази статистично значущих, хоча переважно слабких, асоціацій між показниками циркадної продукції NOS3 та показниками перебігу та активності захворювання у хворих на РА (табл. 3.13). Виявилось, що вік та тривалість захворювання обернено корелювали з вечірнім та середньодобовим рівнем NOS3 ($r_{sp} = -0,21-0,25$, $p < 0,05$), але з ранковим рівнем був дуже слабкий зв'язок був ($r_{sp} = -0,15-0,16$, $p = 0,053-0,039$). Натомість, зв'язок показників клінічної активності захворювання (КБС, DAS28-CPB, CDAI та іншими) був

більш тісним з ранковим рівнем NOS3 ($r_{Sp} = -0,27-0,32$, $p < 0,01$), ніж з вечірнім показником ($r_{Sp} = -0,19-0,27$).

Таблиця 3.13

Кореляційні зв'язки сироваткового рівня NOS3 з клініко-демографічними та клініко-лабораторними показниками хворих на РА (n=173)

Показники	Кореляційні зв'язки сироваткового рівня NOS3 (r -Spearman's)		
	08 ⁰⁰	20 ⁰⁰	середньодобовий
Вік	-0,147	-0,219**	-0,214**
Тривалість РА	-0,157*	-0,245**	-0,237**
КБС	-0,314**	-0,210**	-0,295**
КНС	-0,222**	-0,190*	-0,224**
ШОЕ	-0,103	-0,061	-0,084
СРБ	-0,108	-0,048	-0,082
DAS28-ШОЕ	-0,271**	-0,240**	-0,257**
DAS28-СРБ	-0,270**	-0,270**	-0,292**
СДАІ	-0,316**	-0,274**	-0,305**
RAID	-0,246**	-0,248**	-0,274**
HAQ	-0,240**	-0,211**	-0,247**

Примітка. Статистична значущість r_{Sp} * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$.

Зауважимо, що у хворих на РА не виявлено статистично значущих асоціацій між показниками продукції NOS3 та лабораторними маркерами активності запального процесу – ШОЕ та СРБ, а зв'язок ранкової продукції NOS3 з віком та тривалістю захворювання виявився досить слабким. Постає питання, які чинники можуть детермінувати порушення продукції NOS3 у хворих на РА. Тому на наступному етапі були вивчені особливості циркадних ритмів продукції NOS3 у хворих на РА залежно від носійства варіантних алелей та генотипів за поліморфізму *rs2070744* гена *NOS3*.

3.3 Зв'язок циркадних ритмів продукції NOS3 з поліморфізмом *rs2070744* гена *NOS3* у хворих на РА

Спочатку була проведена оцінка частот варіантних алелей та генотипів за поліморфізму *rs2070744* гена *NOS3* у 173 жінок, хворих на РА (жителів Вінницької області, українок у третьому поколінні, субпопуляція Подільського регіону). Зауважимо, що у 51,4% пацієнтів виявлялись коморбідні стани, серед яких найчастіше зустрічалась АГ (34,1%), в той час як частота інших супутніх захворювань була незначною і коливалась від 1,7 до 4,6%. Тому для аналізу генетичних маркерів була сформована група контролю, яка включала 82 жінки середнім віком $43,7 \pm 10,2$ роки, репрезентативна групі хворих на РА за частотою супутньої патології, середнім АТ та ІМТ (див. розділ 2). В основну групу та групу контролю не включались особи з неконтрольованою АГ, супутніми захворюваннями внутрішніх органів у стадії декомпенсації, цукровим діабетом, морбідним ожирінням.

Встановлено (табл. 3.14), що в групі контролю виявлялось 47,6 % носіїв генотипу *TT* (нормальних гомозигот), 43,9 % носіїв генотипу *TC* (гетерозигот) та 8,5 % носіїв генотипу *CC* (мінорних гомозигот). Розподіл частот генотипів в групі контролю відповідав закону Харді-Вайнберга ($\chi^2 = 2,36, p=0,75$). В групі хворих на РА було виявлено 42,8 % носіїв генотипу *TT*, 41,0 % носіїв генотипу *TC* та 16,2 % носіїв генотипу *CC*. Розподіл частот генотипів за поліморфізмом *rs2070744* гена *NOS3* в групі хворих на РА також відповідав закону Харді-Вайнберга ($\chi^2=0,11, p=0,12$).

Отримані нами результати щодо частот алельних варіантів гена *NOS3* за поліморфізмом *rs2070744* в основній та контрольній групах жителів Вінницької області (100 % особи жіночої статі) в цілому узгоджуються з результатами досліджень вказаних параметрів в інших регіонах України, отриманих в змішаних когортах здорових осіб [13], хворих на РА [4; 263] та за різних патологічних станів (див. розділ 1).

Таблиця 3.14

Тест Харді-Вайнберга щодо розподілу варіантних генотипів за поліморфізму *rs2070744* гена *NOS3* в групі жінок, хворих на РА, та жінок групи контролю (на прикладі жителів Подільського регіону)

Гено-тип	Хворі на РА, n=173		HWE	χ^2 (df=1)	Контроль, n=82		HWE	χ^2 (df=1)
	n	частота			n	частота		
<i>TT</i>	74	0,428	0,401	2,36 p=0,12	39	0,476	0,483	0,11 p=0,75
<i>TC</i>	71	0,410	0,465		36	0,439	0,424	
<i>CC</i>	28	0,162	0,135		7	0,085	0,093	

На наступному етапі було проведено аналіз можливого зв'язку поліморфних варіантів гена *NOS3* зі схильністю до розвитку РА у жінок (табл. 3.15). Аналіз мультиплікативної моделі засвідчив, що в групі контролю частота алелі *T* становила 69,5 %, а алелі *C* - 30,5 %, відповідно, що в цілому узгоджується із даними MAF/MinorAlleleCount щодо частоти мінорної алелі *C* у європейській популяції [233]. В групі хворих на РА частота алелі *T* становила 63,3 %, а алелі *C* - 36,7%, що свідчить про слабку тенденцію ($p=0,17$) до підвищення частоти мінорної алелі. Згідно загальної моделі успадкування, частота генотипу *CC* у хворих на РА становила 16,2 % проти 8,5 % в контролі, але ці відмінності не виявились статистично значущими ($p=0,25$). У доміантній моделі також не виявили значущих відмінностей між групою хворих на РА та групою контролю за частотами носійства варіантних алелей та генотипів. Натомість, аналіз рецесивної моделі висвітлив стійку тенденцію ($\chi^2=7,86$, $p=0,1$) до збільшення частоти гомозиготного носійства мінорної алелі *C* серед жінок, хворих на РА (OR = 2,07; 95% CI 0,86-4,96) та зниження носійства алелі *T* (OR = 0,48; 95% CI 0,20-1,16) відносно жінок групи контролю.

Отримані результати свідчать, що власне поліморфізм *rs2070744* гена *NOS3* не слід вважати чинником, який підвищує схильність до розвитку РА у жінок.

Таблиця 3.15

Частоти алелей та генотипів за поліморфізму *rs2070744* гена *NOS3* у жінок, хворих на РА, та в групі контролю (на прикладі жителів Подільського регіону)

Алель / генотип	Хворі на РА (n=173)	Контроль (n=82)	χ^2 (df)	p	OR [95% CI]
	частота (n)	частота (n)			
Мультиплікативна модель успадкування; частота (n)					
T-алель	0,633 (219)	0,695 (114)	1,90	0,17	0,76 [0,51-1,13]
C-алель	0,367 (127)	0,305 (50)	(df=1)		1,32 [0,89-1,97]
Загальна модель успадкування; частота (n)					
TT	0,428 (74)	0,476 (39)	2,77 (df=2)	0,25	0,82 [0,49-1,40]
TC	0,410 (71)	0,439 (36)			0,89 [0,52-1,51]
CC	0,162 (28)	0,085 (7)			2,07 [0,86-4,96]
Домінантна модель успадкування; частота (n)					
TT	0,428 (74)	0,476 (39)	0,52 (df=1)	0,47	0,82 [0,49-1,40]
TC+CC	0,572 (99)	0,524 (43)			1,21 [0,72-2,06]
Рецесивна модель успадкування; частота (n)					
TT+TC	0,838 (145)	0,915 (75)	7,86 (df=1)	0,1	0,48 [0,20-1,16]
CC	0,162 (28)	0,085 (7)			2,07 [0,86-4,96]

В різних етнічних групах, в тому числі і в українській популяції, була виявлена асоціація поліморфізму *rs2070744* гена *NOS3* з серцево-судинною патологією [9;10;13]. Тому наступному етапі частоти алелей та генотипів за поліморфізму *rs2070744* гена *NOS3* було проаналізовано у хворих на РА залежно від наявності коморбідної АГ. Зауважимо, що за даними анамнезу та результатами офісного вимірювання АТ серед хворих на РА було виявлено 114 осіб без АГ та 59 осіб з АГ (в тому числі 13,3% осіб з АГ I стадії 1-го ступеня, 12,7% осіб з АГ II стадії 1-го та 2-го ступеня, 8,1% осіб з ізольованою систолічною АГ II стадії).

Як свідчать результати, наведені в табл. 3.16, розподіл частот алельних варіантів гена *NOS3* за поліморфізмом *rs2070744* в групах хворих на РА без АГ та з АГ відповідав закону Харді-Вайнберга ($p=0,57$ та $0,17$).

Таблиця 3.16

Тест Харді-Вайнберга щодо розподілу варіантних генотипів за поліморфізму *rs2070744* гена *NOS3* в групі жінок, хворих на РА, залежно від коморбідності з АГ (на прикладі жителів Подільського регіону)

Гено-тип	Хворі на РА без АГ, n=114		HWE	χ^2 (df=1)	Хворі на РА, з АГ, n=59		HWE	χ^2 (df=1)
	n	частота			n	частота		
ТТ	54	0,474	0,462	0,32 $p=0,57$	20	0,339	0,294	1,92 $p=0,17$
ТС	47	0,412	0,435		24	0,407	0,496	
СС	13	0,114	0,103		15	0,254	0,209	

Аналіз розподілу частот алелей і генотипів за поліморфізму *rs2070744* гена *NOS3* залежно від наявності АГ у хворих на РА виявив наявність статистично значущих відмінностей (табл. 3.17). В групі хворих на РА з АГ частота алелі *C* була вищою, ніж в групі хворих на РА без АГ і становила 45,8 % проти 32,0 % ($p=0,01$). За мультиплікативною моделлю успадкування у хворих на РА за носійства алелі *C* шанси коморбідної АГ зростали майже вдвічі ($OR=1,79$; 95% CI 1,13-2,83, $p=0,01$). Виявилось, що серед хворих на РА з АГ частота носійства генотипу *CC* була в 2,5 рази вищою, ніж серед хворих без АГ (25,4 % проти 11,4 %, $p<0,05$). Згідно рецесивної моделі успадкування генотип *CC* статистично значуще ($p=0,02$) асоціювався зі схильністю до коморбідної АГ ($OR=2,65$, 95% CI 1,16-6,03), в той час як наявність алелі *T* незалежно від алельного статусу може справляти протективний вплив щодо ризику розвитку АГ ($OR=0,38$, 95% CI 0,17-0,86). Таким чином, у жінок, хворих на РА, генотип *CC* за поліморфізму *rs2070744* гена *NOS3* можна вважати однією з детермінант підвищеної схильності до коморбідної АГ.

Таблиця 3.17

Частоти алелей та генотипів за поліморфізму *rs2070744* гена *NOS3* у жінок, хворих на РА, залежно від коморбідності з АГ (на прикладі жителів Подільського регіону)

Алель чи генотип	Хворі на РА з АГ, n=59	Хворі на РА без АГ, n=114	χ^2	p	OR [95% CI]
	частота (n)	частота (n)			
Мультиплікативна модель успадкування; частота (n)					
<i>T</i> -алель	0,542 (64)	0,680 (155)	6,32 (df=1)	0,01	0,56 [0,35-0,88]
<i>C</i> -алель	0,458 (54)	0,320 (73)			1,79 [1,13-2,83]
Загальна модель успадкування; частота (n)					
<i>TT</i>	0,339 (20)	0,474 (54)	6,37 (df=2)	0,04	0,57 [0,30-1,09]
<i>TC</i>	0,407 (24)	0,412 (47)			0,98 [0,52-1,85]
<i>CC</i>	0,254 (15)	0,114 (13)			2,65 [1,16-6,03]
Домінантна модель успадкування; частота (n)					
<i>TT</i>	0,339 (20)	0,474 (54)	2,88 (df=1)	0,09	0,57 [0,30-1,09]
<i>TC + CC</i>	0,661 (39)	0,526 (60)			1,76 [0,91-3,37]
Рецесивна модель успадкування; частота (n)					
<i>TT + TC</i>	0,746 (44)	0,886 (101)	5,63 (df=1)	0,02	0,38 [0,17-0,86]
<i>CC</i>	0,254 (15)	0,114 (13)			2,65 [1,16-6,03]

Постає питання, у якій мірі поліморфізм *rs2070744* гена *NOS3* та коморбідна АГ асоціюються зі змінами добової продукції *NOS3* у хворих на РА. Тому на наступному етапі був проведений аналіз циркадного профілю рівня *NOS3* у хворих на РА - носіїв різних генотипів поліморфізму *rs2070744* гена *NOS3* залежно від коморбідності з АГ. Встановлено, що у хворих на РА - носіїв різних генотипів виявляються статистично значущі відмінності за рівнем продукції *NOS3* як у загальній групі, так і у підгрупах, розподілених залежно від коморбідної АГ (табл. 3.18). Найбільш суттєві відмінності виявлялись між гомозиготними носіями алелей *T* та *C*. Так, в загальній групі у хворих на РА – носіїв генотипу *CC* рівні *NOS3* вранці (о

08⁰⁰), ввечері (о 20⁰⁰) та середньодобовий були нижчими на 16,5 %; 25,4 % та 21,8 % ($p < 0,001$), ніж у носіїв генотипу *TT*, та на 12,7 %; 18,7 % та 16,3 % ($p < 0,01$) нижчими, ніж у носіїв генотипу *TC*. Також, в загальній групі у носіїв генотипу *TC* вечірній та середньодобовий рівні NOS3 були нижчими на 8,2 % та 6,7 %, ніж у носіїв генотипу *TT* ($p < 0,05$). Приріст рівня NOS3 у вечірній час у хворих на РА – носіїв генотипу *CC* становив $+33,4 \pm 16,4$ % і був нижчим в 1,53 та 1,32 рази, ніж у носіїв генотипу *TT* (проти $+51,4 \pm 33,1$ %, $p < 0,01$) та носіїв генотипу *TC* (проти $+44,1 \pm 31,0$ %, $p < 0,05$), відповідно.

Аналіз добової варіабельності рівня NOS3 у носіїв різних генотипів залежно від коморбідності з АГ висвітлив наступні закономірності. В групі хворих на РА без АГ показники продукції NOS3 у гомозигот *TT* та гетерозигот *TC* суттєво не відрізнялись ($p > 0,05$), в той же час у гомозигот *CC* рівні NOS3 о 08⁰⁰, о 20⁰⁰ та середньодобовий були нижчими на 23,7 %; 33,6 % та 29,7 %, ніж у гомозигот *TT* ($p < 0,001$) та на 21,7 %; 30,0 % та 29,6 % нижчими, ніж у гомозигот *TC* ($p < 0,01$).

В групі хворих на РА з АГ найменші показники продукції NOS3 виявлялись у носіїв генотипу *CC*, а найвищі – у носіїв генотипу *TT*, однак міжгрупові відмінності були менш виразними. Наприклад, у гомозигот *CC* рівні NOS3 о 08⁰⁰, о 20⁰⁰ та середньодобовий були нижчими на 14,8 %; 15,4 % та 15,2 %, ніж у гомозигот *TT* ($p < 0,05$), в той час як відмінності щодо гетерозигот *TC* не були статистично значущими. При співставленні показників продукції NOS3 у хворих на РА залежно від коморбідності з АГ в межах одного генотипу також були виявлені статистично значущі відмінності. Встановлено, що наявність АГ асоціюється з нижчими показниками вечірньої та середньодобової продукції NOS3 у носіїв генотипу *TT* (на 19,3 % та 13,8%, $p < 0,01$) та носіїв генотипу *TC* (на 22,1 % та 16,3 %, $p < 0,01$), при цьому статистично значущих відмінностей за показником ранкової продукції NOS3 не виявлялось. У носіїв генотипу *CC* реєструвались найнижчі показники продукції NOS3 як у ранковий, так і у вечірній час, але без статистично значущих відмінностей залежно від наявності коморбідної АГ.

Таблиця 3.18

Добова варіабельність рівня NOS3 в сироватці крові у хворих на РА залежно від генотипів за поліморфізму *rs2070744* гена *NOS3* та коморбідності з АГ

Генотип <i>NOS3 T-786C</i>		Рівень NOS3 в сироватці крові, нг/л ($M \pm \sigma$)		
		08 ⁰⁰	20 ⁰⁰	середньо-добовий
Загальна група хворих на РА (n=173)				
1	<i>TT</i> , n=74	434,9±90,7	641,2±111,8	538,1±88,4
2	<i>TC</i> , n=71	416,4±79,9	588,5±118,9	502,4±86,8
	$p_{2,1}$	>0,05	<0,05	<0,05
3	<i>CC</i> , n=28	363,0±79,4	477,9±92,3	420,5±82,3
	$p_{3,1}$	<0,001	<0,001	<0,001
	$p_{2,3}$	<0,01	<0,001	<0,001
Хворі на РА без АГ (n=114)				
4	<i>TT</i> , n=54	441,5±100,5	676,2±99,0	558,8±47,8
5	<i>TC</i> , n=47	430,3±81,6	641,8±96,0	536,0±73,1
	$p_{5,4}$	>0,05	>0,05	>0,05
6	<i>CC</i> , n=13	337,0±90,2	449,3±94,0	393,2±88,3
	$p_{6,4}$	<0,001	<0,001	<0,001
	$p_{6,5}$	<0,01	<0,001	<0,001
Хворі на РА з АГ (n=59)				
7	<i>TT</i> , n=20	417,0±68,5	545,5±91,9	481,2±75,7
	$p_{7,4}$	>0,05	<0,01	<0,01
8	<i>TC</i> , n=24	398,2±59,3	499,5±89,7	448,9±68,5
	$p_{8,5}$	>0,05	<0,01	<0,01
	$p_{8,7}$	>0,05	>0,05	>0,05
9	<i>CC</i> , n=15	349,5±67,2	450,0±65,0	399,7±63,2
	$p_{9,6}$	>0,05	>0,05	>0,05
	$p_{9,7}$	<0,05	<0,05	<0,05
	$p_{9,8}$	<0,05	>0,05	<0,05

В групі хворих на РА без АГ приріст рівня NOS3 у вечірній час у гомозигот *CC* становив +36,2±20,1 % і був нижчим в 1,53 та 1,32 рази, ніж у носіїв генотипів *TT* (vs +58,9±34,6 %, $p < 0,05$) та *TC* (vs +53,3±32,4 %, $p < 0,05$), відповідно. В групі хворих на РА з АГ приріст рівня NOS3 у вечірній час у носіїв генотипів *TT* та *TC* становив +31,5±16,2 % та +26,3±18,5 %, що було

статистично значуще нижчим (в 1,86 та 2,02 рази, $p < 0,05$), ніж у носіїв аналогічних генотипів серед хворих РА без АГ. У носіїв генотипу *CC* з коморбідною АГ вечірній приріст рівня NOS3 був найменшим і становив $+25,9 \pm 10,0 \%$, хоча відмінності щодо носіїв генотипу *CC* без АГ не виявились статистично значущими ($p > 0,05$).

Раніше було зазначено, що рівень $\text{NOS3} \leq 420$ нг/л асоціюється із підвищенням клінічної активності захворювання. Аналіз частоти виявлення аберантних ранкових рівнів NOS3 у хворих на РА залежно від алельних варіантів гена *NOS3* виявив статистично значущі відмінності (рис. 3.5). Так, серед гомозигот *CC* превалювали хворі з рівнем $\text{NOS3} \leq 420$ нг/л – їх частка склала 71,4%, в той час як серед носіїв генотипу *TT* - 44,6 % ($p=0,025$, Fisher exact test, 2-tailed) та *TC* - 52,1% ($p=0,11$) і, в цілому, серед носіїв варіантного алелі *T* (*TT+TC*) - 48,3% ($p=0,037$), відповідно.

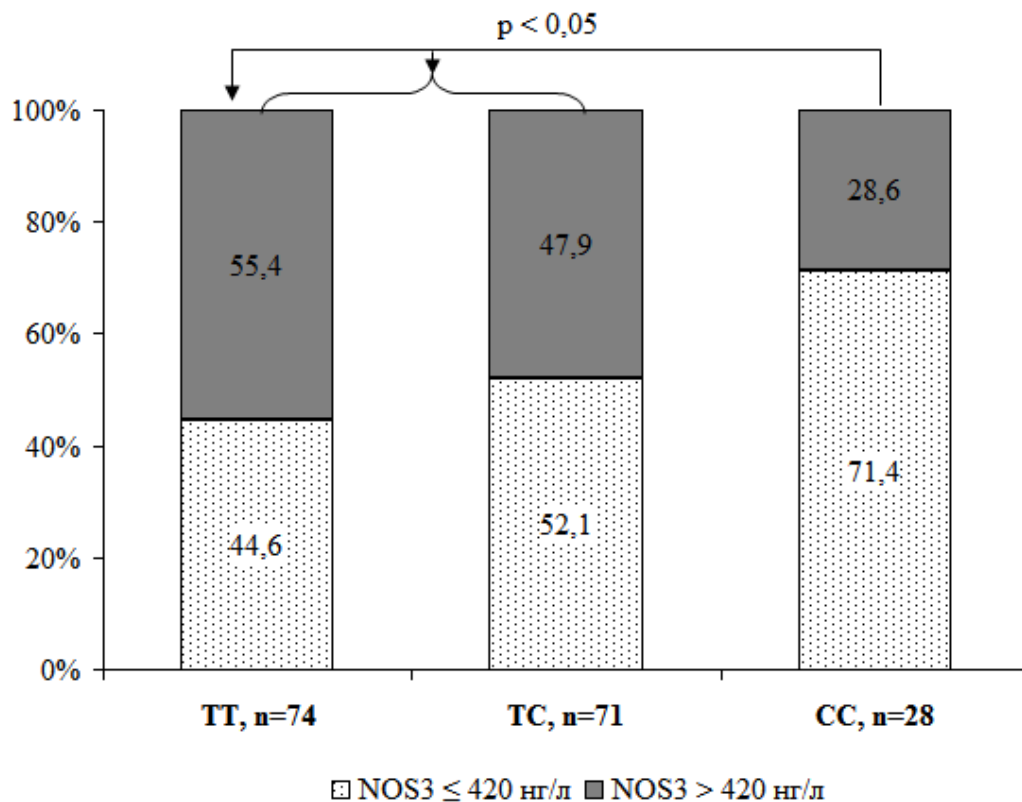


Рис. 3.5 Частота аберантного ранкового рівня NOS3 у хворих на РА - носіїв поліморфних генотипів *rs2070744* гена *NOS3*. Статистична значущість відмінностей між носіями генотипу *CC* та носіями алелі *T* визначена за Fisher exact test, 2-tailed.

Отже, за наявності генотипу *CC* у хворих на РА шанси зниження ранкової продукції NOS3 зростають статистично значуще порівняно з носіями генотипів *TT* (OR = 2,99; 95% CI 1,19 - 7,50, $p < 0,05$), *TC* (OR=2,62; 95% CI 1,04 - 6,60, $p < 0,05$) та *TT+TC* (OR = 2,58; 95% CI 1,09 - 6,12, $p < 0,05$).

На наступному етапі була проведена оцінка діагностичної значимості показників варіабельності рівня NOS3 як потенційного чинника АГ у хворих на РА. Оскільки відносний приріст рівня NOS3 у вечірній час характеризувався значною індивідуальною варіабельністю, був розрахований логарифм цього показника ($\lg \Delta \text{NOS3}$), що забезпечило логнормальний розподіл. ROC-аналіз (рис. 3.6, табл. 3.19) засвідчив, що відносний приріст рівня NOS3 у % виявляв меншу чутливість та специфічність, ніж $\lg \Delta \text{NOS3}$. Показник $\lg \Delta \text{NOS3} \leq 1,50$ виявився оптимальною точкою відсікання (cut-off value), що забезпечувала найкращий баланс між чутливістю та специфічністю діагностичної моделі.

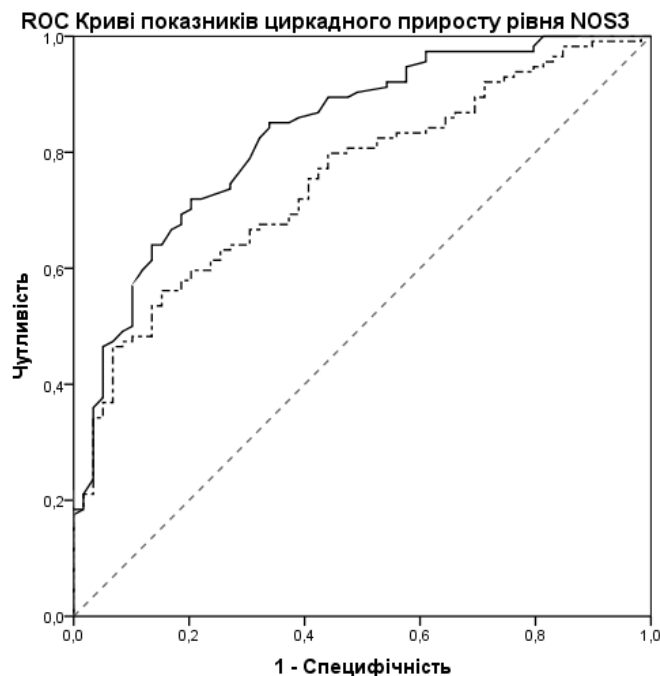


Рис. 3.6 ROC-криві показників циркадного приросту рівня NOS3 (суцільна лінія - ROC-крива $\lg \Delta \text{NOS3}$; пунктирна лінія - ROC-крива відносного приросту рівня NOS3 у % о 20⁰⁰).

Цей показник свідчить про ризик розвитку коморбідної АГ у жінок, хворих на РА, із чутливістю 80,8 %, специфічністю 79,3 %. Площа під ROC-кривою становить 0,881 (95% CI 0,794; 0,969), що вказує на дуже добру якість моделі. ROC-аналіз відносного приросту рівня NOS3 (у %) показав меншу діагностичну цінність - площа під ROC-кривою становила 0,752 (95% CI 0,680; 0,824). Оцінка шансових відношень засвідчила, що у хворих на РА з показником $\lg \Delta \text{NOS3} \leq 1,50$ підвищуються шанси коморбідної АГ (OR = 3,78, $p < 0,001$).

Таблиця 3.19

ROC-аналіз показника $\lg (\Delta \text{NOS3})$ у хворих на РА як предиктора АГ

Показники	$\lg \Delta \text{NOS3}$	Шанси коморбідної АГ у жінок, хворих на РА OR: 3,78 [95% CI 1,96-7,28]
Точка відсікання (cut-off value)	$\leq 1,50$	
Чутливість (Se)	0,825	
Специфічність (Sp)	0,729	
Площа під кривою (AUC)	0,833	
Стандартна похибка	0,032	
95% CI	0,771; 0896	
p	$< 0,001$	

За середніми величинами показник $\lg \Delta \text{NOS3}$ у хворих на РА без АГ був статистично значуще вищим (на 19,4 %, $p < 0,01$), ніж за коморбідності з АГ (рис. 3.7). На підставі генотипування за поліморфізмом *rs2070744* гена *NOS3* була засвідчена тенденція до зниження $\lg \Delta \text{NOS3}$ у носіїв мінорної алелі *C*, оскільки відмінності виявились статистично значущими лише між гомозиготами *CC* та *TT*. За середніми величинами, показник $\lg \Delta \text{NOS3}$ у носіїв генотипу *TT* був вищим на 11,6 % ($p < 0,05$), ніж у носіїв генотипу *CC*.

Таким чином, у хворих на РА генотип *CC* за поліморфізмом *rs2070744* гена *NOS3* асоціюється зі стійким зниженням продукції NOS3 упродовж всієї доби, в той час як за коморбідної АГ найбільш значимі відмінності виявляються за показниками циркадного приросту рівня NOS3 у вечірній час.

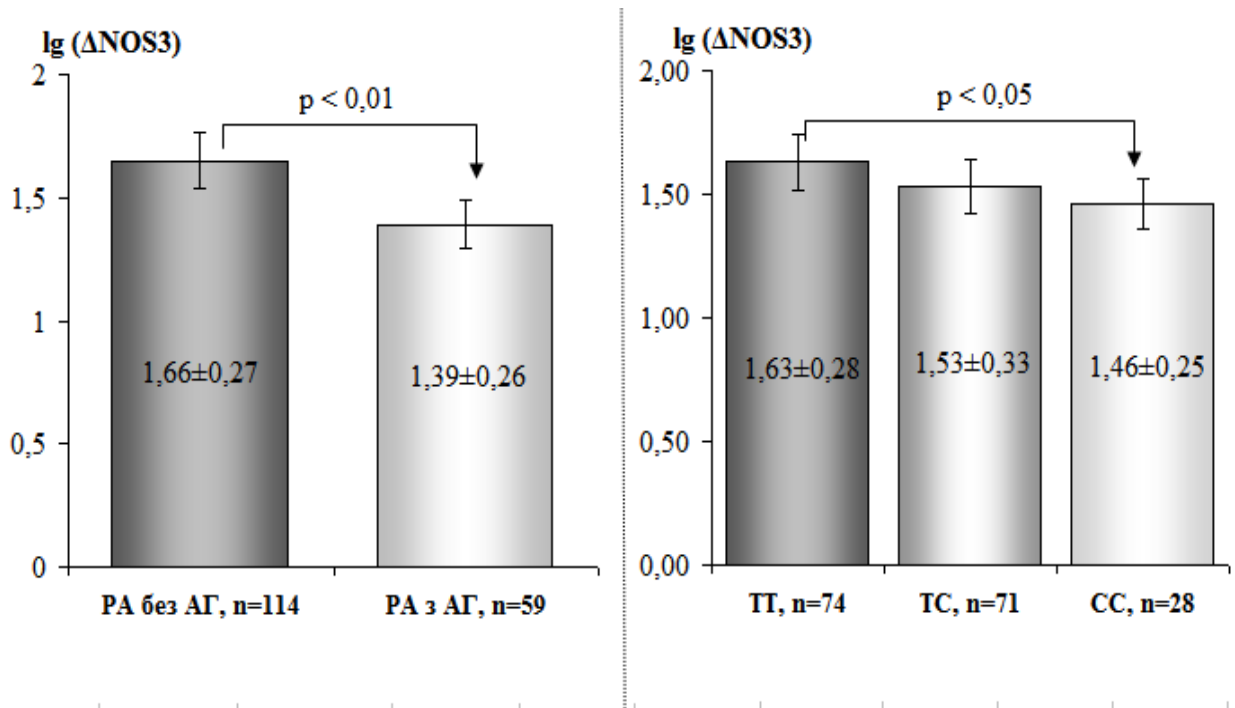


Рис. 3.7 Показник Ig Δ NOS3 у хворих на РА залежно від коморбідності з АГ та генотипу за поліморфізмом *rs2070744* гена *NOS3* ($M \pm \sigma$).

Резюме. Узагальнюючи результати досліджень даного розділу, можна виділити наступні циркадні особливості продукції NOS3 у хворих на РА: 1) відмічається помірне зниження рівня NOS3 в сироватці крові упродовж всієї доби (на 18-28% порівняно з групою контролю); 2) мінімальні рівні показника реєструються у ранковий період (08⁰⁰), максимальні рівні – ввечері (з 20⁰⁰ до 02⁰⁰); з 02⁰⁰ до 08⁰⁰ рівень NOS3 в сироватці крові знижується; добова варіабельність продукції NOS3 є більшою, ніж в групі контролю; 3) у хворих на РА виявлено статистично значуще зниження ранкової та вечірньої продукції NOS3 зі збільшенням віку (в межах 15-20%) із найбільшими відмінностями між молодими хворими (< 25 років) та хворими віком 45-60 років; 4) зниження ранкової та вечірньої продукції NOS3 асоціюється з підвищенням рентгенологічної стадії та ФК захворювання; 5) у хворих з тривалістю захворювання до 5 років високий рівень NOS3 вранці (> 420 нг/л) є предиктором повільної рентгенологічної прогресії РА з чутливістю 80,8 %, специфічністю 79,3 %; 6) не виявлено відмінностей продукції NOS3 у хворих з серо (-) за РФ та АЦЦП та серо (+) варіантом РА; 7) зниження продукції

NOS3 асоціюється з високою активністю захворювання: у хворих з ранковим рівнем NOS3 ≤ 420 нг/л частіше виявляється висока активність за індексами DAS28-ШОЕ та DAS28-СРБ (OR=2,21 та 2,47, $p < 0,05$), втрата фізичних функцій та посилення впливу захворювання на загальний стан пацієнта за індексом RAID (OR=2,37, $p < 0,05$); 8) зниження продукції NOS3 поєднується зі зниженням фізичної складової здоров'я за шкалою SF-36 (на 16,5%); 9) у жінок групи контролю та жінок хворих на РА (українок у 3-му поколінні, мешканок Подільського регіону) частоти варіантних генотипів за поліморфізмом *rs2070744* гена *NOS3* були наступними: *TT* - 47,6 % та 42,8 %; *TC* - 43,9 % та 41,0%; *CC* - 8,5 % та 16,2 %, відповідно. Статистично значущої асоціації між поліморфізмом *rs2070744* гена *NOS3* та схильністю до РА не виявлено, але підтверджена асоціація генотипу *CC* з коморбідною АГ (OR= 2,65; $p=0,02$) та зниженням продукції NOS3 (OR=2,58; $p=0,037$); 10) предиктором розитку коморбідної АГ у жінок з РА є зниження вечірнього приросту рівня NOS3 ($\lg \Delta \text{NOS3} \leq 1,50$) з чутливістю 82,5%, специфічністю 72,9 %.

У хворих на РА, крім порушення синтезу NOS3, можуть виникати розлади продукції інших ангіогенних медіаторів, тому наступний розділ роботи присвячено аналізу добової варіабельності продукції sTLR2 та можливої асоціації з показниками перебігу захворювання.

Основні наукові результати розділу висвітлені в наступних публікаціях: [18; 20; 22; 23; 24; 35; 39; 38; 41; 42; 257; 292; 295; 298; 299].

РОЗДІЛ 4

ЦИРКАДНІ РИТМИ ПРОДУКЦІЇ ТОЛ-ПОДІБНИХ РЕЦЕПТОРІВ 2 (TLR2)
У ЖІНОК, ХВОРИХ НА РЕВМАТОЇДНИЙ АРТРИТ: ЗВ'ЯЗОК З
ПЕРЕБІГОМ ЗАХВОРЮВАННЯ

TLR2 (CD282) належать до класу трансмембранних рецепторів родини PRRs (pattern recognition receptors), відповідальних за ініціацію каскадного механізму продукції медіаторів запалення у відповідь на дію флогогенних чинників - молекулярних комплексів, асоційованих з патогенами (PAMPs) та пошкодженням (DAMPs) [173]. В ревматоїдній синовії TLR2 індукують процеси міграції та інвазії клітин [197], активують експресію матриксних металопротеїназ [197; 234], прозапальних цитокінів [145], адгезивних молекул ICAM-1 [234], регуляторів ангиогенезу - VEGF та рецепторів ангиопоетину Tie2 [92; 234]. Експресія TLR2 в моноцитах крові та синовіальної рідини суттєво підвищується у хворих на РА [171]. Слід відзначити, що TLR2 представлені не лише трансмембранною, а й розчинною формою (sTLR2), що міститься у плазмі крові, слині та інших біологічних рідинах [173]. Нещодавно засвідчено, що рівень sTLR2 в сироватці крові змінюється при аутоімунних захворюваннях – зростає при розсіяному склерозі [143] та знижується при системному червоному вовчаку [144]. Тому доцільним є вивчення клініко-діагностичного значення та хронобіологічних аспектів продукції вказаних рецепторів у хворих на РА. Завданням даного розділу роботи було встановити добову варіабельність рівня sTLR2 в сироватці крові жінок, хворих на РА, та практично здорових жінок групи контролю, оцінити можливий зв'язок з активністю та перебігом захворювання. Дослідження циркадних ритмів продукції sTLR2 у хворих на РА проводилось аналогічно дослідженню циркадних ритмів продукції NOS3 (див. розділ 3). На першому етапі рівень sTLR2 визначали 4 рази на добу – о 20⁰⁰; 02⁰⁰; 08⁰⁰ та 14⁰⁰, на другому етапі - о 20⁰⁰ та 08⁰⁰, відповідно до акрофази та батіфази показників, встановлених на першому етапі.

4.1 Циркадні особливості продукції sTLR2 у хворих на РА

Встановлено, що у практично здорових жінок групи контролю упродовж доби виявлялись низькоамплітудні коливання продукції sTLR2 із максимумом в ранкові години (акрофаза) та мінімумом у вечірній час (батіфаза) (табл. 4.1, рис. 4.1). Зокрема, у осіб груп контролю о 08⁰⁰ рівень sTLR2 в сироватці крові коливався в діапазоні 103-297 нг/л (95% CI) із медіаною 178 нг/л, в той же час о 20⁰⁰ ці показники були суттєво нижчими і становили 54-213 нг/л (95% CI) із медіаною 96,5 нг/л (медіанний тест, $p < 0,001$), відповідно. Таким чином, різниця між ранковим та вечірнім рівнем sTLR2 в середньому становила $-40,1 \pm 11,5$ % ($p < 0,001$). У денний час рівень sTLR2 в сироватці крові поступово знижувався: о 14⁰⁰ цей показник був нижчим на 21,9 % ($p < 0,05$), ніж о 08⁰⁰, а о 20⁰⁰ – нижчим на 23,5%, ніж о 14⁰⁰ ($p < 0,05$). У нічний час рівень sTLR2 поступово зростав і о 02⁰⁰ був вищим на 59,7 %, ніж о 20⁰⁰ ($p < 0,001$), і до 08⁰⁰ зберігався підвищеним. Медіана та [P₂₅; P₇₅] середньодобового рівня (мезор) sTLR2 у жінок групи контролю відповідали 145 [106; 182] нг/л.

У жінок, хворих на РА, також виявлялись добові коливання продукції sTLR2 із акрофазою о 08⁰⁰ та батіфазою о 20⁰⁰, при цьому всі показники значуще перевищували такі у групі контролю. Так, у хворих на РА медіана та [P₂₅; P₇₅] рівня sTLR2 в сироватці крові о 08⁰⁰ становили 329,5 [266; 395] нг/л, а о 20⁰⁰ – 240,7 [190; 292] нг/л ($p < 0,001$), а різниця між ранковим та вечірнім рівнем склала $-29,7 \pm 11,2$ % ($p < 0,001$). У хворих на РА рівень sTLR2 о 14⁰⁰ був нижчим на 14,7 % ($p < 0,05$), ніж о 08⁰⁰, о 20⁰⁰ – нижчим на 17,7 % ($p < 0,05$), ніж о 14⁰⁰. Приріст рівня sTLR2 з 20⁰⁰ до 02⁰⁰ становив 24,0 % ($p < 0,01$). Слід зауважити, що у хворих на РА рівні sTLR2 о 08⁰⁰ та 20⁰⁰ були вищими в 1,89 та 2,21 рази порівняно з групою контролю ($p < 0,001$), однак різниця між ранковим і вечірнім рівнем показника виявилась меншою в 1,35 рази ($p < 0,05$). Медіана та [P₂₅; P₇₅] середньодобового рівня sTLR2 у хворих на РА становила 296,9 [235; 348] нг/л, що було вдвічі вищим ($p < 0,001$), ніж у

осіб групи контролю. Отже, у хворих на РА порівняно із групою контролю упродовж всієї доби продукція sTLR2 виявилась більш інтенсивною і менш виразно пригнічувалась вдень.

Оцінка середньоденного та середньонічного рівнів sTLR2 у хворих на РА підтвердила виявлені закономірності (рис. 4.2). Так, в групі контролю середньоденний показник склав $164 \pm 10,4$ нг/л, а середньонічний – $141,1 \pm 54,9$ нг/л. У хворих на РА середньоденний та середньонічний рівні sTLR2 становили $317,7 \pm 84,1$ нг/л та $269,5 \pm 76,3$ нг/л і були вищими в 1,93 та 1,90 рази, ніж в групі контролю ($p < 0,001$).

Таблиця 4.1

Добова варіабельність рівня sTLR2 в сироватці крові практично здорових жінок та хворих на РА

Години	Рівень sTLR2 в сироватці крові, нг/л							
	M \pm σ	Me	P ₅	P ₁₀	P ₂₅	P ₇₅	P ₉₀	P ₉₅
Група контролю, n=34								
08 ⁰⁰	181,9 \pm 67,1	178,0	103	115	128	223	282	297
14 ⁰⁰	142,0 \pm 58,5*	127,3	73	84	105	172	243	257
20 ⁰⁰	108,7 \pm 48,5**	96,5	54	63	77	125	160	213
02 ⁰⁰	173,6 \pm 65,8	172,0	98	108	122	214	271	287
середньо- добовий	152,6 \pm 57,4	145,2	79	97	106	182	235	259
Хворі на РА, n=36								
08 ⁰⁰	342,9 \pm 93,4 [#]	329,5	223	237	266	395	460	488
14 ⁰⁰	292,5 \pm 78,4* [#]	300,0	159	196	232	347	375	391
20 ⁰⁰	240,7 \pm 73,2** [#]	237,0	130	139	190	292	328	357
02 ⁰⁰	298,4 \pm 85,3* [#]	291,0	168	194	236	347	421	450
середньо- добовий	293,6 \pm 78,8 [#]	296,9	169	196	235	348	378	416

Примітки: 1. * - статистично значущі відмінності відносно показника «08⁰⁰» в групі (* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,001$);

2. [#] - статистично значущі відмінності між групою контролю та групою хворих на РА ($p < 0,001$).

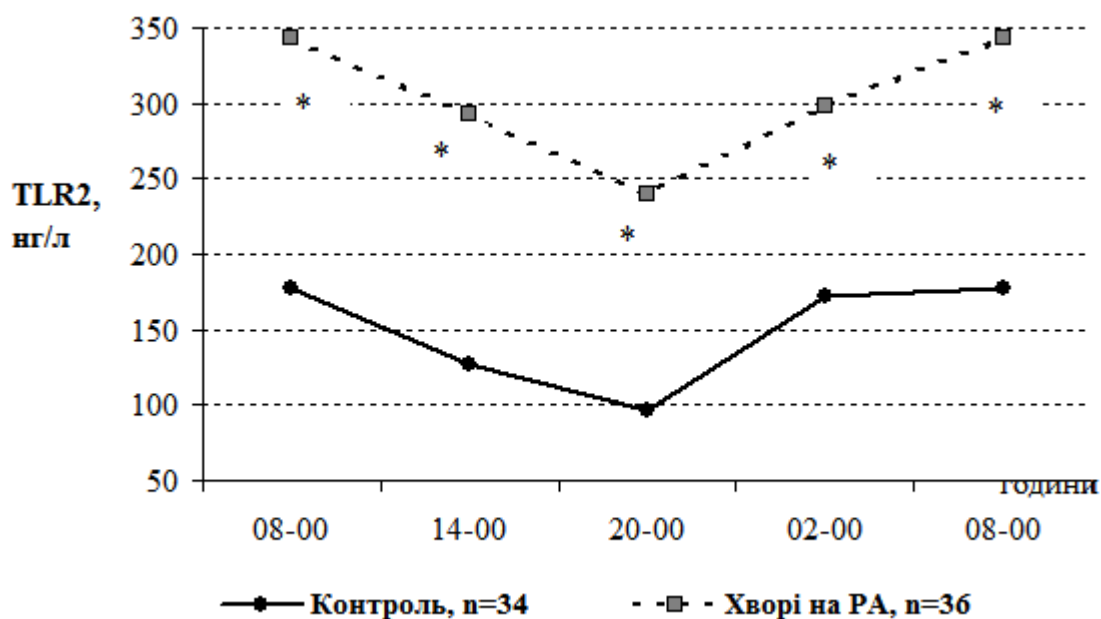


Рис. 4.1 Хронограма рівня sTLR2 в сироватці крові у хворих на РА та осіб групи контролю (* - $p < 0,001$ відносно групи контролю, медіанний тест).

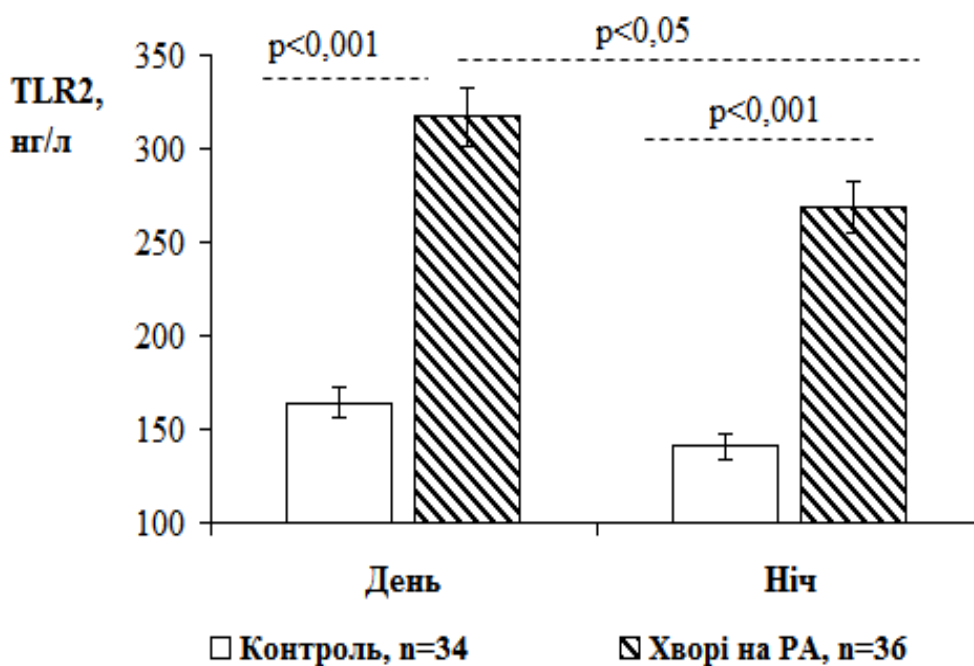


Рис. 4.2 Середньоденний та середньонічний рівні sTLR2 в сироватці крові хворих на РА та в групі контролю ($M \pm \sigma$).

Пілотний етап дослідження добової варіабельності рівня sTLR2 засвідчив, що у практично здорових осіб та хворих на РА акрофаза та батіфаза показника реєструються о 08⁰⁰ та 20⁰⁰. Тому у загальній когорті хворих на РА була проведена оцінка рівня sTLR2 саме в ці години. Зауважимо, що за такої схеми дослідження відмінності циркадної продукції sTLR2 в загальній групі хворих на РА відносно групи контролю відповідали описаним вище (табл. 4.2).

Спочатку ми проаналізували добову варіабельність продукції sTLR2 у хворих на РА залежно від віку (див. табл. 4.2). Встановлено, що у хворих на РА виявляється слабка тенденція до підвищення продукції sTLR2 з віком: у осіб віком 45-60 років рівні показника о 08⁰⁰, 20⁰⁰ та середньодобовий були вищими на 10,5; 17,4 та 13,6 % ($p > 0,05$), відповідно, ніж у осіб віком 18-25 років. Між віковими групами 26-44 роки та 45-60 років статистично значущих відмінностей за ранковим та вечірнім рівнями sTLR2 не виявлялось. Очевидно, вік не є вагомою детермінантою підвищення продукції sTLR2 у хворих на РА.

Таблиця 4.2

Добова варіабельність рівня sTLR2 в сироватці крові хворих на РА залежно від віку

Характеристика групи		Рівень sTLR2 в сироватці крові, нг/л (M±σ)		
		08 ⁰⁰	20 ⁰⁰	середньодобовий
1	Контроль, n=34	181,9±67,1	108,7±48,5	152,6±57,4
2	Хворі на РА, n=173	343,1±93,7	272,3±99,2	307,7±93,6
	p _{2,1}	<0,001	<0,001	<0,001
Вікові групи хворих на РА				
3	18 - 25 років, n=7	319,1±95,5	239,3±94,8	279,2±93,7
4	26 - 44 років, n=58	328,4±102,3	258,7±98,0	293,5±97,1
	p _{3,4}	>0,05	>0,05	>0,05
5	45 - 60 років, n=108	352,5±88,7	281,8±99,7	317,1±91,2
	p _{3,5}	>0,05	>0,05	>0,05
	p _{3,4}	>0,05	>0,05	>0,05

Аналіз показників добової варіабельності рівня sTLR2 в сироватці крові залежно від клінічних параметрів захворювання дозволив виявити наступні закономірності (табл. 4.3). По-перше, збільшення тривалості захворювання асоціювалось з підвищенням рівня sTLR2 у ранковий та вечірній періоди із збереженням циркадних особливостей. Так, у хворих з тривалістю РА понад 10 років рівні sTLR2 о 08⁰⁰, 20⁰⁰ та середньодобовий був вищими на 18,4; 24,2 та 21,0 % ($p < 0,05$), ніж у хворих з тривалістю РА до 5 років, та на 11,6; 21,3 та 15,8 % вищими, ніж у хворих з тривалістю захворювання 5-10 років, відповідно. По-друге, різниця між ранковим та вечірнім рівнями sTLR2 у хворих з тривалістю захворювання понад 10 років була меншою ($p < 0,05$), ніж у хворих з тривалістю захворювання до 5 років та 5-10 років і становила $-16,5 \pm 14,0$ % проти $-22,5 \pm 12,0$ % та $-23,7 \pm 12,3$ %, відповідно. Очевидно, у хворих на РА зі збільшенням тривалості захворювання поглиблюються розлади циркадних механізмів контролю за продукцією sTLR2.

Серопозитивний варіант захворювання (за РФ та/ або АЦЦП) асоціювався з помірним, але статистично значущим зростанням продукції sTLR2 упродовж доби. Зокрема, у серо (+) хворих на РА рівні sTLR2 о 08⁰⁰, 20⁰⁰ та середньодобовий були вищими на 15,3; 16,8 та 17,6 % ($p < 0,05$), ніж у серонегативних (за АЦЦП та РФ) хворих. При цьому, у серо (-) та серо (+) хворих на РА статистично значущих відмінностей за різницею між ранковими та вечірніми рівнями sTLR2 не виявлялось ($-24,1 \pm 10,7$ % проти $-20,8 \pm 19,6$ %, $p > 0,05$).

Підвищення рентгенологічної стадії ураження суглобів за Steinbroker поєднувалось з підвищеною продукцією sTLR2, при цьому статистично значущі відмінності реєструвались між хворими з III стадією та хворими з I або II стадією захворювання. Наприклад, у хворих на РА з III стадією за Steinbroker рівні sTLR2 о 08⁰⁰, 20⁰⁰ та середньодобовий були вищими на 22,1; 35,1 та 27,6%, ніж у хворих з I стадією захворювання. Слід відзначити, що різниця між ранковим та вечірнім рівнем sTLR2 у хворих з III стадією за

Steinbroker була меншою, ніж у хворих з I стадією ($-19,2 \pm 13,0$ % проти $-26,7 \pm 13,5$ %, $p < 0,05$).

Таблиця 4.3

Добова варіабельність рівня sTLR2 в сироватці крові залежно від клінічних параметрів захворювання у хворих на РА

Характеристика групи		Рівень sTLR2 в сироватці крові, нг/л ($M \pm \sigma$)		
		08 ⁰⁰	20 ⁰⁰	середньо-добовий
Тривалість РА				
1	< 5 років, n=55	321,5±89,1	256,1±96,2	288,8±90,0
2	5 - 10 років, n=78 p _{2,1}	341,0±95,2 >0,05	262,3±93,3 >0,05	301,7±91,1 >0,05
3	> 10 років, n=40 p _{2,1} p _{2,3}	380,6±88,3 <0,01 <0,05	318,1±103,4 <0,05 <0,05	349,4±92,6 <0,01 <0,05
Імунологічна характеристика РА				
4	Серо (+) за РФ, n=136	346,7±93,2	278,2±102,4	312,5±94,7
5	Серо (+) за АЦЦП, n=144 p _{4,5}	350,1±94,7 >0,05	280,6±103,3 >0,05	315,3±95,9 >0,05
6	Серо (-) за АЦЦП та РФ, n=28 p _{4,6} p _{5,6}	303,6±76,1 <0,05 <0,05	238,1±76,8 <0,05 <0,05	267,9±82,0 <0,05 <0,05
Рентгенологічна стадія РА за Steinbroker				
7	I стадія, n=33	303,4±93,1	222,8±198,0	263,1±84,1
8	II стадія, n=72 p _{7,8}	335,5±93,3 >0,05	267,8±102,2 <0,05	301,6±95,4 <0,05
9	III стадія, n=68 p _{7,9} p _{8,9}	370,4±87,8 <0,01 <0,05	301,1±94,0 <0,01 <0,05	335,8±87,4 <0,01 <0,05
Функціональний клас				
10	ФК I, n=6	269,5±54,0	188,5±33,6	229,0±37,1
11	ФК II, n=108 p _{10,11}	332,2±91,2 <0,05	253,8±86,3 <0,01	293,0±85,5 <0,05
12	ФК III, n=59 p _{10,12} p _{11,12}	370,5±95,0 <0,001 <0,05	314,7±110,3 <0,001 <0,01	342,6±100,6 <0,001 <0,01

Погіршення функціонального стану суглобів у хворих на РА поєднувалось з поступовим підвищенням продукції sTLR2 як у ранковий, так і у вечірній час. Зокрема, у хворих на РА з ФК III рівні sTLR2 о 08⁰⁰, 20⁰⁰ та середньодобовий були вищими на 37,4; 66,9 та 49,6 % ($p < 0,001$), ніж у хворих з ФК I, а також на 11,5; 24,0 та 16,9 % вищими, ніж у хворих з ФК II. У хворих з ФК III виявлялась найменша різниця між ранковим та вечірнім рівнем sTLR2 (-16,5±12,9 %), в той час як у хворих з ФК I та ФК II ця різниця була вищою ($p < 0,05$) і становила -28,7±12,5 % та -23,9±12,5 %, відповідно.

Таким чином, підвищення тривалості захворювання та поглиблення рентгенологічних змін в суглобах асоціювались з підвищенням продукції sTLR2 упродовж доби водночас зі зменшенням її варіабельності. Виникає питання на якому етапі розвитку РА посилення продукції sTLR2 може чинити найбільший вплив на стан суглобових тканин. Адже відомо, що активація експресії TLR2 в ревматоїдній синовії посилює процеси міграції клітин, запалення та ангиогенезу. Тому ми проаналізували рівень sTLR2 у хворих на РА залежно від термінів досягнення певної рентгенологічної стадії.

Найбільш суттєві відмінності показників циркадної продукції sTLR2 залежно від рентгенологічної стадії виявлялись в підгрупі хворих з тривалістю РА менше 5 років. Так, у хворих, які до 5 років захворювання досягли III стадії за Steinbroker, рівні sTLR2 о 08⁰⁰, 20⁰⁰ та середньодобовий виявились вищими на 54,6; 88,3 та 69,0 % ($p < 0,01$), ніж у хворих з I стадією, а також на 30,3; 51,4 та 39,6 % ($p < 0,05$) вищими, ніж у хворих з II стадією за Steinbroker. У хворих, які досягли II стадії до 5 років, рівні sTLR2 о 08⁰⁰, 20⁰⁰ та середньодобовий були на 18,6; 24,3 та 21,1 % вищими, ніж у хворих з I стадією. Виявилось, що у хворих з III стадією за Steinbroker різниця між ранковим та вечірнім рівнем sTLR2 була значуще меншою порівняно з хворими з I або II стадією і становила -9,80±7,63 % ($p < 0,01$) проти -25,6±11,0 % та -22,1±14,3 %, відповідно.

Однак, при більш тривалому перебігу захворювання ця закономірність втрачалась: у підгрупі пацієнтів з тривалістю захворювання від 5 до 10 років

статистично значущі відмінності між пацієнтами з I або II стадією, та пацієнтами, що досягли III стадії за Steinbroker, реєструвались лише за ранковим та середньодобовим рівнем sTLR2, а в підгрупах хворих з тривалістю захворювання понад 10 років статистично значущих відмінностей за цим показником не виявлялось. Цілком очевидно, що зростання продукції sTLR2 доцільно розглядати як потенційний чинник швидкої деструкції суглобів на ранніх етапах РА.

Таблиця 4.4

Добова варіабельність рівня sTLR2 в сироватці крові хворих на РА за співставлення тривалості та рентгенологічної стадії захворювання

Характеристика групи		Рівень sTLR2 в сироватці крові, нг/л ($M \pm \sigma$)		
		08 ⁰⁰	20 ⁰⁰	середньодобовий
Тривалість РА < 5 років, n=55				
1	I стадія за Steinbroker, n=24	273,9±66,0	204,9±62,5	239,4±61,8
2	II стадія за Steinbroker, n=23 p _{2,1}	325,0±85,7 <0,05	254,8±87,5 <0,05	289,9±82,3 <0,05
3	III стадія за Steinbroker, n=8 p _{1,3} p _{2,3}	423,4±79,3 <0,01 <0,05	385,9±93,6 <0,01 <0,05	404,6±85,8 <0,01 <0,05
Тривалість РА 5-10 років, n=78				
4	I стадія за Steinbroker, n=9	279,4±75,8	220,8±97,5	266,8±108,4
5	II стадія за Steinbroker, n=39 p _{4,5}	331,9±96,4 >0,05	259,4±102,9 >0,05	295,7±96,8 >0,05
6	III стадія за Steinbroker, n=30 p _{4,6} p _{5,6}	361,3±83,4 >0,05 <0,05	278,6±76,0 >0,05 >0,05	319,9±75,9 <0,05 <0,05
Тривалість РА > 10 років, n=40				
7	II стадія за Steinbroker, n=10	384,7±95,3	323,9±120,2	354,3±105,8
8	III стадія за Steinbroker, n=30 p _{7,8}	374,1±90,5 >0,05	310,8±101,9 >0,05	342,4±92,7 >0,05

Додаткові докази значущості посиленої продукції sTLR2 як предиктора швидкої рентгенологічної прогресії захворювання у хворих на РА з тривалістю захворювання до 5 років були отримані на підставі ROC-аналізу (рис. 4.3, табл. 4.5).

Виявилось, що ранковий рівень sTLR2 вище 375 нг/л є оптимальною точкою відсікання, що забезпечує досягнення найкращого балансу між чутливістю та специфічністю. Цей показник виявляє високу діагностичну цінність, оскільки із чутливістю 87,5 %, специфічністю 78,7% дозволяє прогнозувати досягнення II-III рентгенологічної стадії РА у термін до 5 років від початку захворювання. Площа під ROC-кривою становить 0,852 (95% CI 0,702; 0,990), що засвідчує дуже добру якість моделі. Оцінка шансових відношень засвідчила, що у хворих на РА із рівнем sTLR2 вранці (08^{00}) вище 375 нг/л шанси досягнути II-III стадії за Steinbroker упродовж п'яти років є втричі вищими (OR = 3,32, $p < 0,05$), ніж у пацієнтів із нижчим рівнем цього показника.

Таблиця 4.5

ROC-аналіз рівня sTLR2 в сироватці крові (08^{00}) хворих на РА як предиктора швидкого прогресування рентгенологічної стадії захворювання

Показники	Рівень sTLR2 в сироватці крові	Шанси досягнення II-III рентгенологічної стадії РА до 5 років OR: 3,32 [95% CI 0,96-11,47]
Точка відсікання (cut-off value)	> 375 нг/л	
Чутливість (Se)	0,875	
Специфічність (Sp)	0,787	
Площа під кривою (AUC)	0,852	
Стандартна похибка	0,077	
95% CI	0,702; 0,990	
p	0,002	

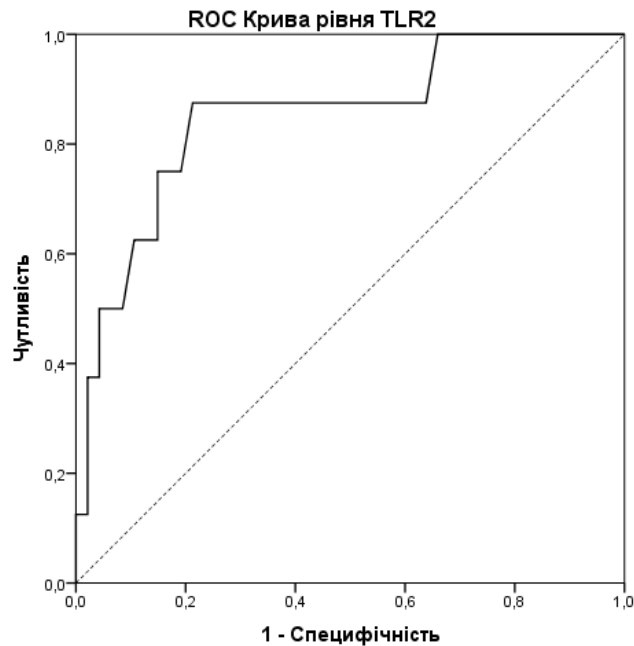


Рис. 4.3 ROC-крива рівня sTLR2 в сироватці крові (08^{00}) як предиктора швидкого прогресування РА (за рентгенологічною стадією).

ROC-аналіз вечірнього та середньодобового рівнів sTLR2 засвідчив аналогічні результати за точками відсікання $> 328,5$ нг/л (Se 0,875; Sp 0,872; AUC 0,899, $p < 0,001$) та $> 350,3$ нг/л (Se 0,875; Sp 0,830; AUC 0,879, $p < 0,001$), відповідно. Для подальшого аналізу клінічних особливостей хворих на РА був обраний ранковий рівень sTLR2, який відображає максимальну продукцію цього медіатора, а крім того, для практичної медицини забір крові для лабораторних досліджень вранці є більш традиційним та зручним.

4.2 Клінічні особливості хворих на РА: зв'язок з варіабельністю рівня sTLR2 в сироватці крові

Для вивчення клінічних особливостей захворювання всі хворі на РА були розподілені на 4 групи згідно квантилям ранкового рівня sTLR2 в сироватці крові. До першого квантилю (Q_1) включено 42 хворих з рівнем sTLR2 менше 265 нг/л, до другого квантилю (Q_2) – 45 хворих з рівнем sTLR2 265-335 нг/л, до третього квантилю (Q_3) – 45 хворих з рівнем sTLR2 336-405

нг/л, до четвертого (Q_4) – 41 хворий з рівнем sTLR2 вище 405 нг/л, всі групи були репрезентативними за віком (табл. 4.6). Квартильний розподіл хворих за рівнем sTLR2 висвітлив наступні закономірності: від квартилю Q_1 до квартилю Q_4 спостерігалось поступове зростання середньої тривалості захворювання, зменшення кількості осіб з серо (-) варіантом РА, збільшення часток пацієнтів з III рентгенологічною стадією за Steinbroker та порушеннями функціонального стану на рівні ФК III. Статистично значущі відмінності були виявлені між групами Q_1 та Q_4 : у хворих з рівнем sTLR2 < 265 нг/л реєструвалась менша середня тривалість захворювання (в 1,75 рази), нижчими були частки осіб з III рентгенологічною стадією захворювання та ФК III (в 2,36 та 2,16 рази) порівняно з хворими з рівнем sTLR2 > 406 нг/л. Частка серо (-) пацієнтів в групі Q_1 була вищою (в 2,2 рази), ніж в групі Q_4 , але відмінності не були статистично значущими ($p=0,23$).

Таблиця 4.6

Клініко-демографічні показники у хворих на РА залежно від квартильного розподілу рівня sTLR2 в сироватці крові (08^{00})

Квартилі sTLR2	Вік, роки	Тривалість, роки	Серо (-) за АЦПП та РФ	III стадія Steinbroker	ФК III
	$M \pm \sigma$	$M \pm \sigma$	n (%)	n (%)	n (%)
Q_1 (< 265 нг/л), n=42	44,0±7,78	5,85±5,03	9 (21,4 %)	10 (23,8 %)	9 (21,4 %)
Q_2 (265-335 нг/л), n=45	46,2±9,66	7,61±5,36	8 (17,8 %)	15 (33,3 %)	14 (31,1 %)
Q_3 (336-405 нг/л), n=45	47,2±7,15	7,94±6,28	7 (15,6 %)	20 (44,4 %)	17 (37,8 %)
Q_4 (> 406 нг/л), n=41	46,8±8,46	10,5±7,90	4 (9,8 %)	23 (56,1 %)	19 (46,3 %)
$p_{2,1}$	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
$p_{3,1}$	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05	>0,05
$p_{3,2}$	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
$p_{4,1}$	>0,05	<0,05	>0,05	<0,01	<0,05
$p_{4,2}$	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05	>0,05
$p_{4,3}$	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Таким чином, кuartильний аналіз підтвердив раніше описану асоціацію між збільшенням ранкової продукції sTLR2 та прогресуванням деструктивних змін в суглобах у хворих на РА.

Аналіз клініко-лабораторних показників активності імунозапального процесу у хворих на РА висвітлив чіткі асоціації з ранковим рівнем sTLR2 (табл. 4.7). Від кuartилію Q_1 до кuartилію Q_4 спостерігалось статистично значуще зростання КБС, КНС та ШОЕ, а також помірне підвищення рівня СРБ та погіршення загальної оцінки здоров'я пацієнтом (ЗОЗП). Так, у хворих з рівнем sTLR2 > 406 нг/л показники КБС та КНС були вищими - в 2,47 та 2,10 рази ($p < 0,001$) порівняно з хворими з рівнем sTLR2 < 265 нг/л, в 1,96 та 1,80 рази вищими порівняно хворими з рівнем sTLR2 265-335 нг/л, а також в 1,58 та 1,67 рази вищими порівняно з хворими з рівнем показника 336-405 нг/л, відповідно.

Таблиця 4.7

Показники активності захворювання у хворих на РА залежно від кuartильного розподілу рівня sTLR2 в сироватці крові (08^{00})

Кuartилі sTLR2	Показники активності РА ($M \pm \sigma$)				
	КБС	КНС	ШОЕ, мм/год	СРБ, мг/л	ЗОЗП ВАШ, мм
$Q_1 (< 265$ нг/л), n=42	8,33±4,84	5,17±2,97	19,1±12,7	11,5±11,4	54,3±16,5
$Q_2 (265-335$ нг/л), n=45	10,5±4,79	6,04±3,00	26,4±12,9	16,6±13,2	53,1±18,4
$Q_3 (336-405$ нг/л), n=45	13,0±4,44	6,51±2,78	25,0±14,1	15,1±12,7	62,0±17,6
$Q_4 (> 406$ нг/л), n=41	20,6±6,03	10,9±5,59	31,8±16,3	17,6±14,3	68,7±17,7
$p_{2,1}$	<0,05	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05
$p_{3,1}$	<0,001	<0,05	<0,01	>0,05	<0,05
$p_{3,2}$	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05
$p_{4,1}$	<0,001	<0,001	<0,001	<0,05	<0,05
$p_{4,2}$	<0,001	<0,001	>0,05	>0,05	<0,05
$p_{4,3}$	<0,001	<0,001	>0,05	>0,05	>0,05

Лабораторні маркери активності запального процесу ШОЕ та СРБ у хворих з рівнем sTLR2 > 406 нг/л були вищими в 1,66 та 1,53 рази ($p < 0,05$), ніж у хворих з рівнем sTLR2 < 265 нг/л, але відносно інших квартильних груп ці відмінності були менш суттєвими. Також, ЗОЗП в групі Q₄ статистично значуще перевищувала таку в групах Q₁ та Q₂ в 1,26 та 1,29 рази ($p < 0,05$), відповідно. Таким чином, наростання ранкової продукції sTLR2 у хворих на РА супроводжувалось посиленням больового синдрому, підвищенням активності локального (суглобового) та системного запального процесу, погіршенням загального стану хворих.

Квартильний аналіз індексів DAS28-ШОЕ, DAS28-СРБ, CDAI та HAQ підтвердив, що посилення ранкової продукції sTLR2 супроводжується статистично значущим підвищенням клінічної важкості захворювання за (табл. 4.8). Так, у хворих з рівнем sTLR2 > 406 нг/л показники DAS28-ШОЕ та DAS28-СРБ були вищими – на 38,3 % та 34,0 % ($p < 0,001$) порівняно з хворими з рівнем sTLR2 < 265 нг/л, вищими на 24,0 % та 23,5 % порівняно з хворими з рівнем sTLR2 265-335 нг/л, а також вищими на 15,4 % та 15,7 % порівняно з хворими з рівнем sTLR2 336-405 нг/л, відповідно. Показники DAS28-ШОЕ та DAS28-СРБ у хворих в групі Q₂ були вищими на 11,6 % та 8,5 % ($p < 0,05$), а у хворих в групі Q₃ – вищими на 19,9 % та 15,8 % ($p < 0,001$), ніж в групі Q₁.

Аналіз індексу CDAI підтвердив, що найбільш виразні відмінності виявлялись між хворими в групах Q₁ та Q₄. Так, у пацієнтів з рівнем sTLR2 > 406 нг/л індекс CDAI був вищим на 91,4 % відносно хворих з рівнем sTLR2 < 265 нг/л, на 68,8 % вищим відносно хворих з рівнем sTLR2 265 - 335 нг/л та на 43,7 % вищим відносно хворих з рівнем sTLR2 336 - 405 нг/л, відповідно.

Оцінка індексу HAQ показала, що підвищення ранкової продукції sTLR2 асоціюється із статистично значущим погіршенням фізичних функцій пацієнтів. У хворих з рівнем sTLR2 > 406 нг/л індекс HAQ виявився вищим на 46,9; 27,3 та 20,1 %, ніж у хворих з рівнями sTLR2 < 265 нг/л, 265-335 нг/л та 336-405 нг/л, відповідно.

Індекси активності захворювання та функціонального стану хворих на РА залежно від кuartильного розподілу рівня sTLR2 в сироватці крові (08⁰⁰)

Квартилі sTLR2	Шкали активності РА (M±σ)			HAQ (M±σ)
	DAS28-ШОЕ	DAS28-СРБ	СDAI	
Q ₁ (< 265 нг/л), n=42	4,82±0,90	4,67±0,75	23,2±8,38	1,30±0,49
Q ₂ (265 - 335 нг/л), n=45	5,38±0,86	5,07±0,75	26,3±8,83	1,50±0,47
Q ₃ (336 - 405 нг/л), n=45	5,78±0,76	5,41±0,70	30,9±8,29	1,59±0,52
Q ₄ (> 406 нг/л), n=41	6,67±0,86	6,26±0,82	44,4±10,7	1,91±0,39
p _{2,1}	<0,05	<0,05	>0,05	>0,05
p _{3,1}	<0,001	<0,001	<0,001	<0,05
p _{3,2}	<0,05	<0,05	<0,05	>0,05
p _{4,1}	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
p _{4,2}	<0,001	<0,001	<0,01	<0,001
p _{4,3}	<0,001	<0,001	<0,01	<0,01

Встановлено, що у хворих на РА підвищення продукції sTLR2 супроводжувалось суттєвим посиленням впливу захворювання на загальний стан пацієнта за індексом RAID (табл. 4.9). Найбільш виразні відмінності між групами хворих, розподілених за кuartилями ранкового рівня sTLR2 в сироватці крові, реєструвались за шкалами, які характеризують функціональний стан, втому, больовий синдром та подолання симптомів захворювання. Так, у хворих з рівнем sTLR2 > 406 нг/л реєструвались більш високі показники больового синдрому (на 27,5%), більш значні порушення функціонального стану (на 34,0 %), більш виразні ознаки втоми (на 32,4 %), погіршення сну (на 20,7 %), порушення фізичного та емоційного комфорту (23,1 та 31,2 %), здатності контролювати симптоми захворювання (на 29,1%), ніж у хворих з рівнем sTLR2 < 265 нг/л. Статистично значущі, але менш виразні відмінності реєструвались і по відношенню до хворих з рівнями sTLR2 265-335 нг/л та 336-405 нг/л. В цілому, загальна оцінка індексу RAID в групі Q₄ статистично значуще перевищувала таку в групах Q₁, Q₂, Q₃, на 28,4;

16,8 та 10,2 %, відповідно. Також у хворих в групах Q₂ та Q₃ загальна оцінка RAID була вищою на 10,0 та 16,7 %, ніж у хворих в групі Q₁ (p < 0,05).

Таблиця 4.9

Індекс RAID у хворих на РА залежно від квартильного розподілу рівня sTLR2 в сироватці крові (08⁰⁰)

Квартилі sTLR2	Субшкали індексу RAID (M±σ)							RAID, бали
	1	2	3	4	5	6	7	
Q ₁ , n=42	5,62± 1,17	5,02± 0,95	4,88± 1,02	5,07± 0,89	5,19± 0,80	4,74± 0,91	5,12± 0,97	5,13± 0,80
Q ₂ , n=45	6,27± 0,89	5,62± 1,09	5,40± 1,05	5,31± 0,92	5,58± 0,89	5,27± 1,10	5,60± 0,94	5,64± 0,78
Q ₃ , n=45	6,38± 0,94	6,00± 0,98	5,84± 1,04	5,96± 1,00	5,96± 1,07	5,60± 1,05	5,89± 0,98	5,98± 0,83
Q ₄ , n=41	7,17± 1,00	6,73± 0,87	6,46± 1,03	6,12± 0,84	6,39± 0,83	6,22± 0,88	6,61± 0,83	6,59± 0,69
p _{2,1}	<0,05	<0,05	<0,05	>0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
p _{3,1}	<0,01	<0,001	<0,01	<0,01	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001
p _{3,2}	>0,05	>0,05	>0,05	<0,01	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05
p _{4,1}	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
p _{4,2}	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
p _{4,3}	<0,01	<0,01	<0,01	>0,05	<0,05	<0,05	<0,01	<0,01

Примітка. Субшкали індексу RAID: 1 - біль; 2 - функція; 3 - втома; 4 - сон; 5 - фізичний комфорт; 6 - емоційний комфорт; 7 – подолання.

Оцінка показників якості життя у хворих на РА за допомогою неспецифічного опитника SF-36 також засвідчила статистично значущі міжгрупові відмінності згідно ранкового рівня sTLR2 в сироватці крові (табл. 4.10). Від квартилю Q₁ до квартилю Q₄ спостерігалось поступове погіршення фізичних та психічних складових SF-36. Наприклад, у хворих з рівнем sTLR2 > 406 нг/л такі показники фізичного здоров'я як PF, RP, VP та GH були нижчими на 43,5 %; 60,6 %; 29,8 % та 20,9 %, ніж у хворих з рівнем sTLR2 < 265 нг/л. В цілому, показник сумарної фізичної складової здоров'я SF-36 (PCS) у хворих в групі Q₄ був нижчим на 20,2 %; 14,2 % та 15,1 % (p<0,01), ніж у хворих в групах Q₁, Q₂ та Q₃.

Також, у хворих з рівнем sTLR2 > 406 нг/л показники психічного здоров'я такі як VT, SF та МН виявились нижчими на 20,0 %; 37,1 % та 21,4 %, ніж у хворих з рівнем sTLR2 < 265 нг/л. Показник сумарної психічної складової здоров'я SF-36 (MCS) у хворих в групі Q₄ був нижчим на 12,6 %; 14,3 % та 9,3 % (p<0,05), ніж у хворих в групах Q₁, Q₂ та Q₃.

Таким чином, підвищення продукції sTLR2 можна розглядати як один із чинників погіршення загального стану здоров'я хворих на РА, при цьому за шкалою SF-36 погіршення фізичної складової здоров'я було більш виразним, ніж погіршення психічної складової здоров'я.

Таблиця 4.10

Показники якості життя за шкалою SF-36 у хворих на РА залежно від кватильного розподілу рівня sTLR2 в сироватці крові (08⁰⁰)

Квартилі TLR2	Фізична складова SF-36				PCS	Психічна складова SF-36				MCS
	PF	RP	BP	GH		VT	SF	RE	MH	
Q ₁ , n=42	57,7± 18,3	31,0± 33,9	54,0± 12,9	43,1± 14,9	38,6± 6,65	45,6± 11,7	80,4± 13,8	40,5± 31,7	49,1± 16,3	41,2± 7,36
Q ₂ , n=45	49,3± 21,0	22,8± 31,4	51,4± 13,7	42,2± 14,2	35,9± 6,69	45,0± 13,7	80,3± 12,9	35,6± 35,1	50,0± 18,3	42,0± 7,93
Q ₃ , n=45	49,6± 24,7	20,6± 28,8	50,3± 13,8	40,4± 16,7	36,3± 7,41	42,7± 12,9	78,9± 14,6	32,6± 35,8	44,0± 15,3	39,7± 6,89
Q ₄ , n=41	32,6± 14,3	12,2± 33,6	37,9± 15,9	34,1± 11,1	30,8± 4,88	36,5± 13,1	50,6± 21,8	27,6± 27,8	38,6± 14,1	36,0± 6,06
p _{2,1}	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
p _{3,1}	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
p _{3,2}	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
p _{4,1}	<0,01	<0,05	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	>0,05	<0,05	<0,01
p _{4,2}	<0,01	>0,05	<0,01	<0,05	<0,01	<0,05	<0,01	>0,05	<0,05	<0,01
p _{4,3}	<0,01	>0,05	<0,01	<0,05	<0,01	<0,05	<0,01	>0,05	>0,05	<0,05

Цілком очевидно, що негативний вплив підвищеної продукції sTLR2 на загальний стан здоров'я хворих на РА може реалізуватись через збільшення активності імунозапального процесу, прискорення темпів деструкції суглобів та обмеження фізичних функцій. Тому на наступному етапі була

проаналізована частота виявлення показників високої активності захворювання за різними клінічними індексами залежно від кuartильного розподілу рівня sTLR2 в сироватці крові хворих на РА (табл. 4.11).

Встановлено, що в групах хворих на РА з рівнем sTLR2 > 406 нг/л та рівнем sTLR2 336 - 405 нг/л переважають пацієнти з високою клінічною активністю захворювання, в той час як в групі хворих з рівнем sTLR2 < 265 нг/л – особи з помірною активністю захворювання. Наприклад, відсоток пацієнтів з DAS28-ШОЕ > 5,1 в групі Q₄ був вищим в 3,62 та 1,58 рази (p<0,001 та p<0,01, Fisher exact test, 2-tailed), ніж в групах Q₁ та Q₂, відповідно. В групі Q₃ виявлялось в 3,13 та 1,37 рази більше пацієнтів з DAS28-ШОЕ > 5,1, ніж в групі Q₁ та Q₂ (p<0,001; p<0,05), а в групі Q₂ – в 2,29 рази, ніж в групі Q₁ (p<0,05, Fisher exact test, 2-tailed), відповідно. Аналогічні закономірності були виявлені і при аналізі поширеності високої активності захворювання за індексами DAS28-СРБ та CDAI в групах хворих на РА згідно кuartилей ранкового рівня sTLR2.

За результатами оцінки індексу HAQ, серед хворих на РА з рівнем sTLR2 > 406 нг/л частіше виявлялись особи із значним погіршення фізичних функцій (HAQ > 2), ніж серед хворих з рівнем sTLR2 < 265 нг/л. Наприклад, в групі Q₄ частка пацієнтів з HAQ > 2 була вищою в 4,46 та 3,56 рази (p<0,05), ніж в групах Q₁ та Q₂. В той же час, за цим показником відмінності між частками хворих в групах Q₁ та Q₂, а також Q₂ та Q₃ не були статистично значущими.

Більш значні між групові відмінності були засвідчені при аналізі поширеності високої активності захворювання за індексом RAID. Встановлено, що серед хворих з рівнем sTLR2 > 406 нг/л накопичувались особи з індексом RAID вище 6 балів: в групі Q₄ частка таких пацієнтів була вищою в 4,50; 2,39 та 1,42 рази (p<0,001; p<0,05), ніж в групах Q₁, Q₂ та Q₃. Також в групі Q₃ частка хворих з RAID > 6 була вищою в 3,16 та 1,68 рази, ніж в групах Q₁ та Q₂, відповідно.

Таким чином, посилення продукції sTLR2 тісно асоціюється із підвищенням активності захворювання за клінічними індексами DAS28-ШОЕ, DAS28-СРБ, CDAI, індексом оцінки фізичних функцій HAQ та шкалою RAID, яка визначає вплив захворювання на стан здоров'я хворого.

Таблиця 4.11

Частота виявлення високої активності захворювання у хворих на РА згідно кватильного розподілу рівня sTLR2 в сироватці крові (08⁰⁰)

Квартилі sTLR2	Кількість хворих з високою активністю РА, n (%)				
	DAS28-ШОЕ > 5,1	DAS28-СРБ > 5,1	CDAI > 22	HAQ > 2	RAID > 6
Q ₁ (< 265 нг/л), n=42	11 (26,2%)	11 (26,2%)	15 (35,7%)	3 (7,1%)	8 (19,0%)
Q ₂ (265 - 335 нг/л), n=45	27 (60,0%)	21 (46,7%)	28 (62,2%)	4 (8,9%)	16 (35,6%)
Q ₃ (336 - 405 нг/л), n=45	37 (82,2%)	31 (68,9%)	39 (86,7%)	10 (22,2%)	27 (60,0%)
Q ₄ (> 406 нг/л), n=41	39 (95,1%)	38 (92,7%)	40 (97,6%)	13 (31,7%)	35 (85,4%)
p _{2,1}	<0,05	<0,05	<0,05	>0,05	>0,05
p _{3,1}	<0,001	<0,05	<0,001	<0,05	<0,001
p _{3,2}	<0,05	<0,05	<0,05	>0,05	<0,05
p _{4,1}	<0,001	<0,001	<0,001	<0,05	<0,001
p _{4,2}	<0,01	<0,01	<0,05	<0,05	<0,001
p _{4,3}	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05	<0,05

Примітка. Статистична значущість відмінностей визначена точним методом Фішера (Fisher exact test, 2-tailed)

Раніше було засвідчено, що у хворих на РА з рівнем sTLR2 вище 375 нг/л у перші 5 років втричі підвищуються шанси швидкої рентгенологічної прогресії захворювання. Пацієнти з рівнем sTLR2 вище 375 нг/л накопичувались у кватильних групах Q₄ та Q₃, які характеризувались більшою часткою осіб з високою активністю захворювання за клінічними індексами DAS28 (ШОЕ та СРБ), CDAI, HAQ та RAID. Аналіз шансових відношень підтвердив, що у хворих з рівнем sTLR2 вище 375 нг/л істотно зростають шанси підвищення активності захворювання за всіма клінічними

індексами, при цьому найвищими були відношення шансів за індексами DAS28-ШОЕ та CDAI (OR 8,22 та 8,73, $p < 0,05$), нижчі за DAS28-СРБ та RAID (OR 5,78 та 4,96, $p < 0,05$) і найменші – за HAQ (OR 2,40, $p < 0,05$). Таким чином, ранковий рівень sTLR2 вище 375 нг/л можна розглядати і як предиктор підвищення клінічної важкості захворювання у хворих на РА.

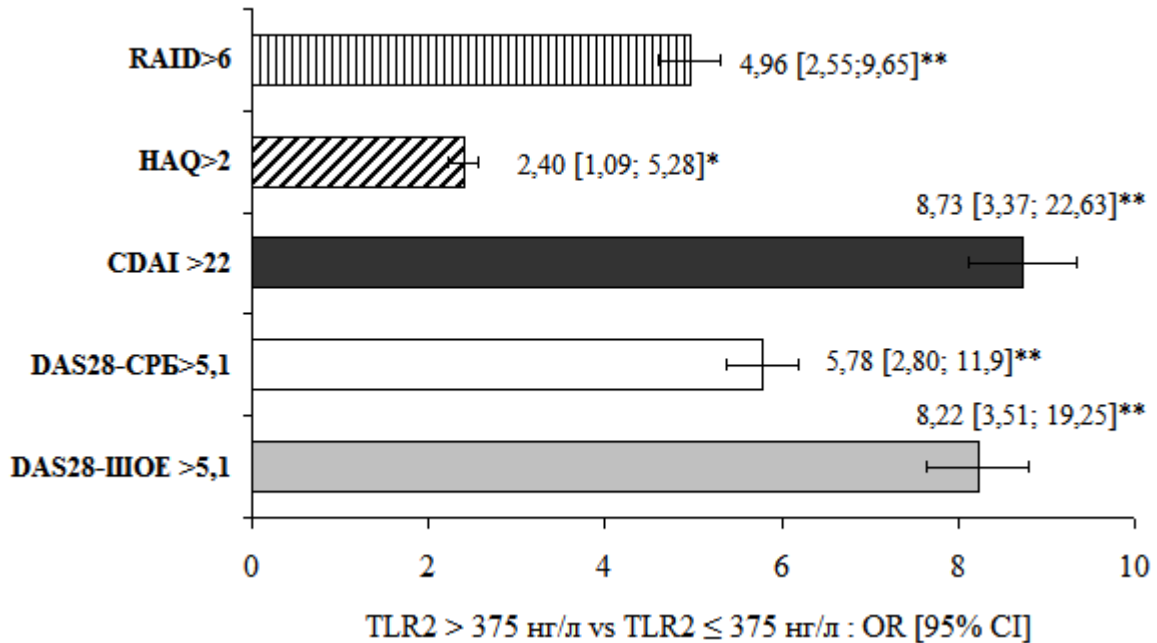


Рис. 4.4 Шанси виявлення високої активності захворювання за клінічними індексами у хворих на РА з рівнем sTLR2 > 375 нг/л (дані представлені як OR [95% CI], * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$).

Кореляційний аналіз підтвердив (табл. 4.12), що циркадні показники продукції sTLR2 статистично значуще асоціюються з показниками перебігу та активності захворювання у хворих на РА, при цьому найбільш тісні зв'язки частіше виявляються саме з ранковим рівнем sTLR2. Між ранковим, вечірнім, середньодобовим рівнем sTLR2 та віком хворих виявлялись статистично значущі, але слабкі кореляційні зв'язки ($r_{sp} = 0,16-0,17$, $p < 0,05$), також слабкий зв'язок виявлявся з тривалістю захворювання ($r_{sp} = 0,25-0,26$, $p < 0,01$). Виявлявся сильний прямий кореляційний зв'язок між ранковим, вечірнім та середньодобовим рівнем sTLR2 та клінічними показниками

активності захворювання - КБС ($r_{Sp} = 0,63-0,67, p < 0,001$) та КНС ($r_{Sp} = 0,41-0,46, p < 0,001$), в той же час зв'язок показників продукції sTLR2 з лабораторними маркерами запалення ШОЕ та СРБ був меншим ($r_{Sp} = 0,20-0,26, p < 0,01$ та $0,14-0,15, p > 0,05$). Серед клінічних індексів найбільш сильний зв'язок виявлявся між ранковим рівнем sTLR2 та DAS28-ШОЕ і CDAI ($r_{Sp} = 0,60-0,64, p < 0,001$), зв'язок середньої сили виявлявся з індексом RAID ($r_{Sp} = 0,54, p < 0,001$) і менш сильний зв'язок – з індексом HAQ ($r_{Sp} = 0,41, p < 0,01$). Кореляційний аналіз за Пірсоном також підтвердив наявність статистично значущих прямих зв'язків між ранковим рівнем sTLR2 та індексами DAS28 (ШОЕ та СРБ), RAID та HAQ (рис. 4.5)

Таблиця 4.12

Кореляційні зв'язки сироваткового рівня sTLR2 з клініко-демографічними та клініко-лабораторними показниками хворих на РА (n=173)

Показники	Кореляційні зв'язки сироваткового рівня sTLR2 (r -Spearman's)		
	08 ⁰⁰	20 ⁰⁰	середньодобовий
Вік	0,161*	0,163*	0,167*
Тривалість РА	0,247**	0,248**	0,255**
КБС	0,676***	0,632***	0,672***
КНС	0,458**	0,411**	0,446**
ШОЕ	0,260**	0,198**	0,231**
СРБ	0,139	0,147	0,144
DAS28-ШОЕ	0,600***	0,527***	0,577***
DAS28-СРБ	0,595***	0,540***	0,581***
CDAI	0,637***	0,578	0,624***
RAID	0,543***	0,485***	0,528***
HAQ	0,409**	0,389**	0,406**

Примітка. Статистична значущість коефіцієнта кореляції (r_{Sp}) - * - $p < 0,05$;

** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$.

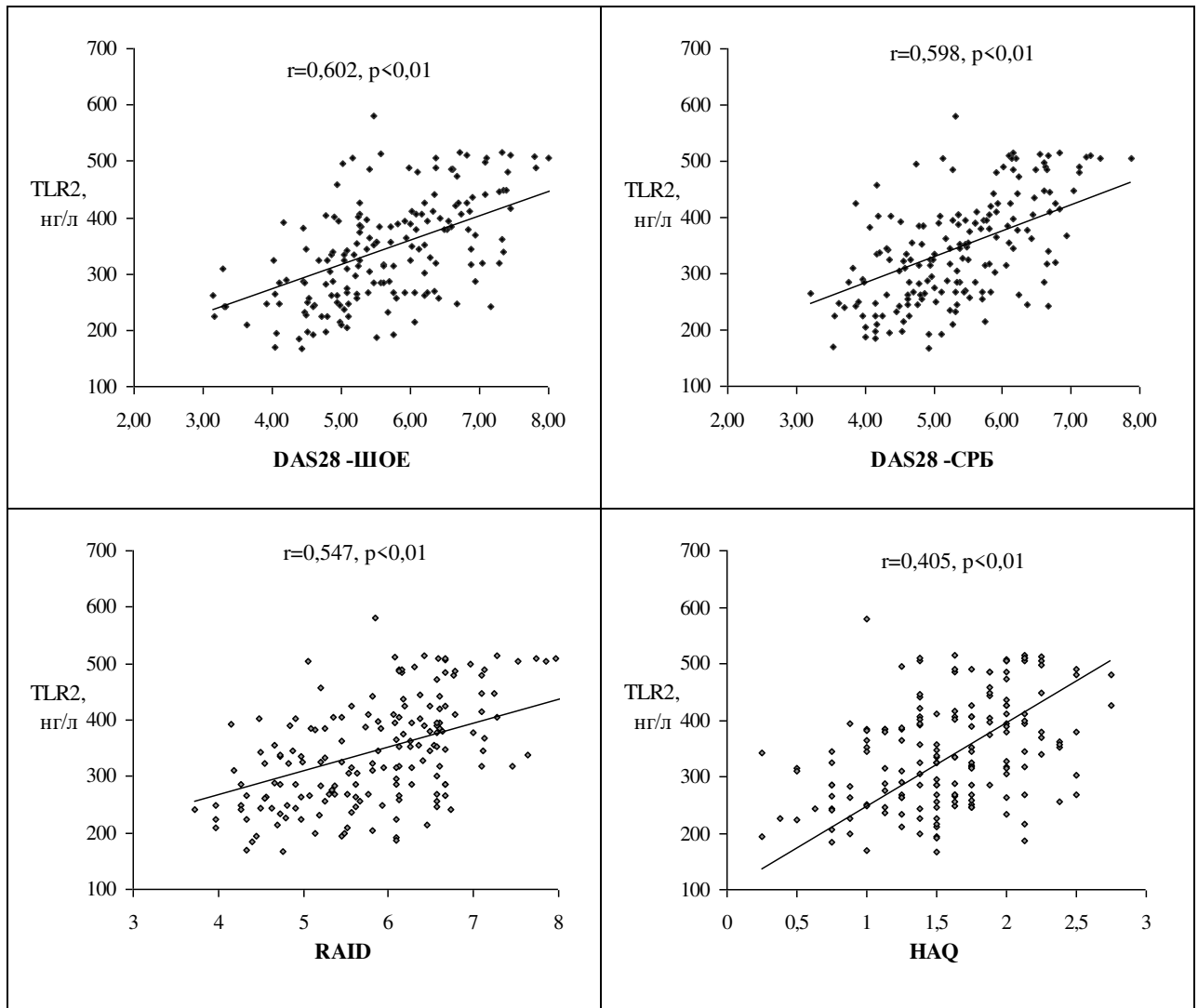


Рис. 4.5 Асоціація ранкового рівня sTLR2 з показниками активності захворювання та функціонального стану у хворих на РА (n=173, r-Pearson).

4.3 Зв'язок циркадних ритмів продукції sTLR2 з поліморфізмом *rs2070744* гена *NOS3* та рівнем NOS3 у хворих на РА

У попередньому розділі було зазначено, що поліморфізм *rs2070744* гена *NOS3* детермінує порушення продукції NOS3 у хворих на РА. Не виключено, що у хворих на РА – носіїв варіантних алелей також можуть виявлялись відмінності добової варіабельності рівня sTLR2.

Встановлено, що у хворих на РА - носіїв різних генотипів виявляються статистично значущі відмінності за рівнем продукції sTLR2 (табл. 4.13).

Найбільш суттєві відмінності виявлялись між гомозиготними носіями варіантних алелей *T* та *C*. Так, у хворих на РА – носіїв генотипу *CC* рівні sTLR2 вранці (о 08⁰⁰), ввечері (о 20⁰⁰) та середньодобовий були вищими на 27,3 %; 24,8 % та 26,1 %, ніж у носіїв генотипу *TT* та на 17,2 %; 12,8 % та 15,2 % вищими, ніж у носіїв генотипу *TC*. Статистично значущих відмінностей між гомозиготними та гетерозиготними носіями *T*-алелі за рівнем sTLR2 не виявлялось.

Таблиця 4.13

Добова варіабельність рівня sTLR2 в сироватці крові у хворих на РА залежно від генотипів за поліморфізму *rs2070744* гена *NOS3*

Генотип <i>NOS3 T-786C</i>		Рівень sTLR2 в сироватці крові, нг/л (M±σ)		
		08 ⁰⁰	20 ⁰⁰	середньодобовий
1	<i>TT</i> , n=74	318,6±95,8	251,9±95,6	285,3±93,2
2	<i>TC</i> , n=71	346,1±86,6	261,5±98,0	312,3±90,2
	p _{2,1}	>0,05	>0,05	>0,05
3	<i>CC</i> , n=28	405,7±75,4	314,3±99,9	360,0±81,3
	p _{2,1}	<0,001	<0,05	<0,01
	p _{2,3}	<0,01	>0,05	<0,05

Аналіз частоти виявлення аберантних ранкових рівнів sTLR2 у хворих на РА – носіїв варіантних алелей за поліморфізмом *rs2070744* гена *NOS3* виявив статистично значущі відмінності (рис. 4.5). Так, серед гомозигот *CC* превалювали хворі з рівнем sTLR2 > 375 нг/л – їх частка склала 67,9 %, в той час як серед носіїв генотипу *TT* – 29,7 % (p=0,0006, Fisher exact test, 2-tailed) та *TC* – 36,6 % (p=0,006) і, в цілому, серед носіїв варіантної алелі *T* (*TT+TC*) – 33,1% (p=0,001), відповідно. Отже, за наявності генотипу *CC* у хворих на РА шанси зростання ранкової продукції sTLR2 до критично високого рівня є більшими, ніж у носіїв генотипів *TT* (OR = 4,79; 95% CI 1,91 - 12,0, p<0,001), *TC* (OR = 3,52; 95% CI 1,42 - 8,77, p<0,01) і, відповідно, *TT+TC* (OR = 4,13; 95% CI 1,77 - 9,64, p=0,001).

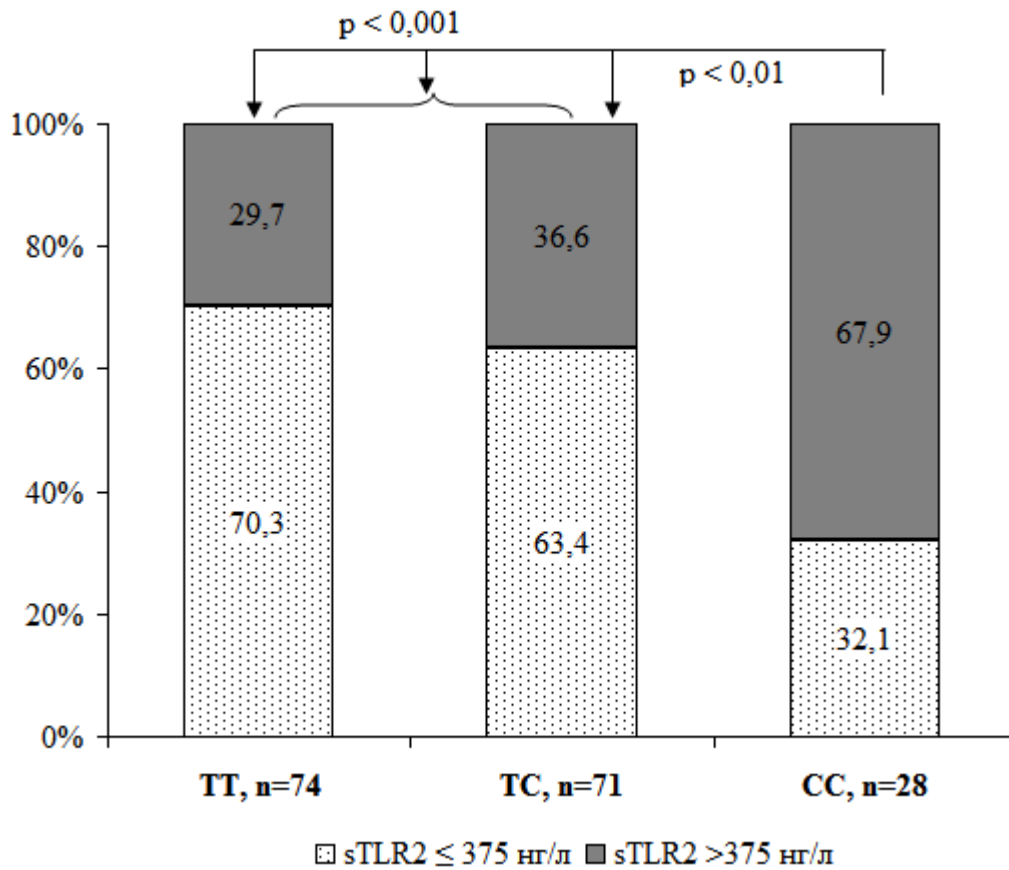


Рис. 4.6 Частота аберантного ранкового рівня sTLR2 у хворих на РА - носіїв поліморфних генотипів *rs2070744* гена *NOS3*. Статистична значущість відмінностей між носіями генотипу *CC* та носіями алелі *T* визначена за Fisher exact test, 2-tailed.

Додатково був проведений аналіз добової варіабельності рівня sTLR2 у хворих на РА залежно від ранкового рівня NOS3 (рис. 4.7). Раніше було зазначено, що у хворих з рівнем NOS3 > 420 нг/л клінічний перебіг захворювання є більш сприятливим, ніж у хворих з критично зниженим рівнем NOS3 (≤ 420 нг/л). Виявилось, що зниження рівня NOS3 асоціюється з підвищення ранкової та вечірньої продукції sTLR2. Зокрема, в групі хворих на РА з рівнем NOS3 ≤ 420 нг/л рівні sTLR2 о 08⁰⁰, о 20⁰⁰ та середньодобовий були вищими на 23,3 %; 28,7 % та 25,6 %, ніж у хворих на РА з рівнем NOS3 > 420 нг/л ($p < 0,05$). Кореляційний аналіз підтвердив наявність оберненого зв'язку між ранковим рівнем NOS3 та показниками циркадного профілю рівня sTLR2 в сироватці крові ($r_{sp} = - (0,41-0,42)$, $p < 0,01$). Таким

чином, у хворих на РА пригнічення продукції NOS3 асоціюється із зростанням продукції sTLR2 – альтернативного медіатора ангиогенезу.

Таблиця 4.14

Добова варіабельність рівня sTLR2 в сироватці крові залежно від рівня NOS3 у хворих на РА

Групи хворих на РА за рівнем NOS3 (08 ⁰⁰)		Рівень sTLR2 в сироватці крові, нг/л (M±σ)		
		08 ⁰⁰	20 ⁰⁰	середньо-добовий
1	NOS3 > 420 нг/л, n=83	306,0±84,8	236,9±90,7	271,5±85,5
2	NOS3 ≤ 420 нг/л, n=90	377,2±89,3	305,0±95,9	341,1±88,5
	p _{1,2}	<0,001	<0,001	<0,001

Резюме. Підсумовуючи результати даного розділу, можна виділити наступні хронобіологічні особливості продукції sTLR2 у хворих на РА: 1) відмічається значне підвищення рівня sTLR2 в сироватці крові упродовж всієї доби (вдвічі вище порівняно з групою контролю); 2) максимальні рівні показника реєструються у ранковий період (08⁰⁰), мінімальні рівні – ввечері (20⁰⁰); після 20⁰⁰ рівень sTLR2 в сироватці крові поступово зростає; зниження продукції sTLR2 у вечірній час є меншим (в 1,35 рази відносно групи контролю); 3) не виявлено відмінностей щодо циркадних ритмів продукції sTLR2 у хворих на РА залежно від віку; 4) підвищення ранкової продукції sTLR2 та зменшення різниці між рівнем показника вранці та ввечері асоціюється зі збільшенням рентгенологічної стадії та ФК захворювання; 5) у хворих з тривалістю захворювання до 5 років високий рівень sTLR2 вранці (>375 нг/л) є предиктором швидкої рентгенологічної прогресії РА з чутливістю 87,5 % та специфічністю 78,7 %; 6) у хворих з серо (-) за РФ та АЦЦП варіантом захворювання зміни циркадного профілю sTLR2 є меншими, ніж у хворих з серо (+) варіантом; 7) зростання продукції sTLR2 асоціюється з високою активністю захворювання у хворих на РА: у пацієнтів з ранковим рівнем sTLR2 вище 375 нг/л частіше виявляється висока

активність больового синдрому та запалення в суглобах за індексами DAS28-ШОЕ та DAS28-СРБ (OR = 8,22 та 5,78, $p < 0,05$), втрата фізичних функцій за HAQ (OR = 2,40, $p < 0,05$), посилення впливу захворювання на загальний стан пацієнта за індексом RAID (OR = 4,96, $p < 0,05$); 8) підвищення продукції sTLR2 поєднується з погіршенням загального стану здоров'я за шкалою SF-36, особливо з її фізичною складовою; 9) підвищення продукції sTLR2 є більш виразними у носіїв генотипу *CC* порівняно із носіями алелі *T* (OR = 4,13; $p = 0,001$) і асоціюються зі зниженням продукції NOS3 ($r_{sp} = - (0,41-0,42)$, $p < 0,01$).

Цілком очевидно, що порушення продукції медіаторів ангиогенезу можуть відображатись на ефективності лікування хворих на РА. Тому наступний розділ дисертаційного дослідження був присвячений вивченню ролі NOS3 та sTLR2 як потенційних предикторів резистентності до лікування у хворих на РА.

Основні наукові результати розділу висвітлені в наступних публікаціях:
[17 ; 293; 298].

РОЗДІЛ 5

ЕФЕКТИВНІСТЬ ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ НА РЕВМАТОЇДНИЙ АРТРИТ:
ЗВ'ЯЗОК З ЦИРКАДНИМИ РИТМАМИ ПРОДУКЦІЇ NOS3 ТА sTLR2,
ПОЛІМОРФІЗМОМ *rs2070744* гена *NOS3*

У попередніх розділах було засвідчено, що у хворих на РА реєструються протилежно спрямовані порушення продукції NOS3 та sTLR2 упродовж доби. Найбільш виразні зміни продукції вказаних медіаторів реєструються вранці і асоціюються з підвищенням клінічної важкості захворювання, зниженням функціональної активності та погіршенням показників якості життя. У хворих на РА виявлені статистично значущі відмінності циркадної продукції NOS3 та sTLR2 залежно від носійства варіантних алелей за поліморфізму *rs2070744* гена *NOS3* та коморбідності з АГ. Зокрема, у носіїв генотипу *CC* прогностично несприятливі ранкові рівні NOS3 (≤ 420 нг/л) та sTLR2 (≥ 375 нг/л) виявляються втричі частіше, ніж у носіїв генотипів *TT* та *TC*, в той час як у осіб з АГ реєструється зниження приросту рівня NOS3 ввечері ($\lg \Delta NOS3 \leq 1,50$). Не виключено, що циркадні порушення продукції медіаторів ангіогенезу можуть впливати на ефективність лікування хворих на РА. Завданням даного розділу було встановити предиктори резистентності до лікування у жінок, хворих на РА.

Проведено 12-тижневе відкрите контрольоване дослідження, до якого було включено 97 жінок, хворих на РА, віком 23-60 років та тривалістю захворювання від 1 до 20 років (табл. 5.1). Серед включених у дослідження хворих на РА переважали особи з серо (+) варіантом захворювання за РФ та/або АЦЦП (81,4 %), високою активністю за DAS28-ШОЕ (63,9 %), II-III рентгенологічною стадією ураження суглобів (86,8%), ФК II-III (100 %). У 23,7 % хворих виявлялись системні прояви (анемія хронічного захворювання, лімфаденопатія, синдром Рейно), у 40,2% - виявлялась супутня АГ. Всі включені у дослідження хворі на РА отримували лікування, регламентоване уніфікованим клінічним протоколом «Ревматоїдний артрит» відповідно до

наказу МОЗ України № 263 від 11.04.2014 р. Стандартна схема лікування включала МТХ у звичайній дозі (10-20 мг/тиждень перорально), яка в середньому становила $11,4 \pm 2,17$ мг/ тиждень; глюкокортикоїди у стабільній дозі, яка не перевищувала 10 мг/добу за преднізолоном (перорально) і в середньому становила $7,35 \pm 4,57$ мг/ добу; будь-який НПЗЗ у стабільній дозі; фолієву кислоту (1/2 тижневої дози МТХ 1 раз на тиждень). Ефективність лікування оцінювали за критеріями ACR 20/ ACR 50/ ACR 70.

Таблиця 5.1

Клініко-демографічні показники у хворих на РА - респондерів та нереспондерів за критеріями ACR 20

Характеристика		Хворі на РА		
		Загальна група, n=97	Респондери, n=51	Нереспондери, n=46
Вік, роки	M±σ	46,3±8,89	45,4±8,56	47,2±9,23
Тривалість РА, роки	M±σ	8,44±6,52	7,28±5,15	9,73±7,61
Серо (+) за РФ	n (%)	76 (78,4 %)	37 (72,5 %)	39 (84,8 %)
Серо (+) за АЦЦП	n (%)	79 (81,4 %)	39 (76,5 %)	40 (87,0 %)
Серо (-) за АЦЦП	n (%)	18 (18,6 %)	12 (23,5 %)	6 (13,0 %)
Ro стадія I	n (%)	13 (13,4 %)	7 (13,7 %)	6 (13,0 %)
Ro стадія II	n (%)	44 (45,4 %)	25 (49,0 %)	19 (41,3 %)
Ro стадія III	n (%)	40 (41,2 %)	19 (37,3 %)	21 (45,7 %)
ФК II	n (%)	57 (58,8 %)	33 (64,7 %)	24 (52,2 %)
ФК III	n (%)	40 (41,2 %)	18 (35,3 %)	22 (47,8 %)
Системні прояви	n (%)	23 (23,7 %)	10 (19,6 %)	13 (28,3 %)
Коморбідність з АГ	n (%)	39 (40,2 %)	18 (35,3 %)	21 (45,7 %)
Частка осіб без АГ	n (%)	58 (59,8 %)	33 (64,7 %)	25 (54,3%)
ІМТ, кг/м ²	M±σ	26,5±4,59	26,6±4,14	25,9±3,89
ГК, мг/добу	M±σ	7,35±4,57	6,89±4,06	7,85±5,07
МТХ, мг/тиждень	M±σ	11,4±2,17	11,5±2,35	11,2±1,95

Примітка. Відмінності між групами респондери / нереспондери – $p > 0,05$.

Респондерами ACR 20 / 50 / 70 вважали пацієнтів, у яких через 12 тижнів на 20 / 50 / 70 % знизилась КНС та КБС і покращились 3 або більше

клініко-лабораторних показника (ШОЕ; СРБ; ЗОАЗП; ЗОАЗЛ; НАQ). Для оцінки ефективності лікування також користувались індексом RAID.

Через 12-тижнів контрольованого лікування серед хворих на РА було виявлено 51 (52,6 %) респондерів ACR 20, у тому числі 16 (16,5 %) респондерів ACR 50 та 5 (5,2 %) респондерів ACR 70, а частка нереспондерів становила 46 (47,4%) осіб, відповідно. Групи респондерів ACR 20 та нереспондерів виявились репрезентативними за віком і незначуще відрізнялись за тривалістю захворювання, частками серо (+) та серо (-) пацієнтів, розподілом пацієнтів за рентгенологічною стадією та ФК, наявністю системних проявів чи коморбідності, середньою дозою МТХ та ГК (див. табл. 5.1), однак істотно відрізнялись за динамікою клініко-лабораторних показників (рис. 5.1). Наприклад, у респондерів позитивна динаміка ключових показників активності захворювання – КБС, КНС, ШОЕ та СРБ перевищувала таку у нереспондерів в середньому в 2,71; 2,63; 2,46 та 2,35 рази ($p < 0,05$).

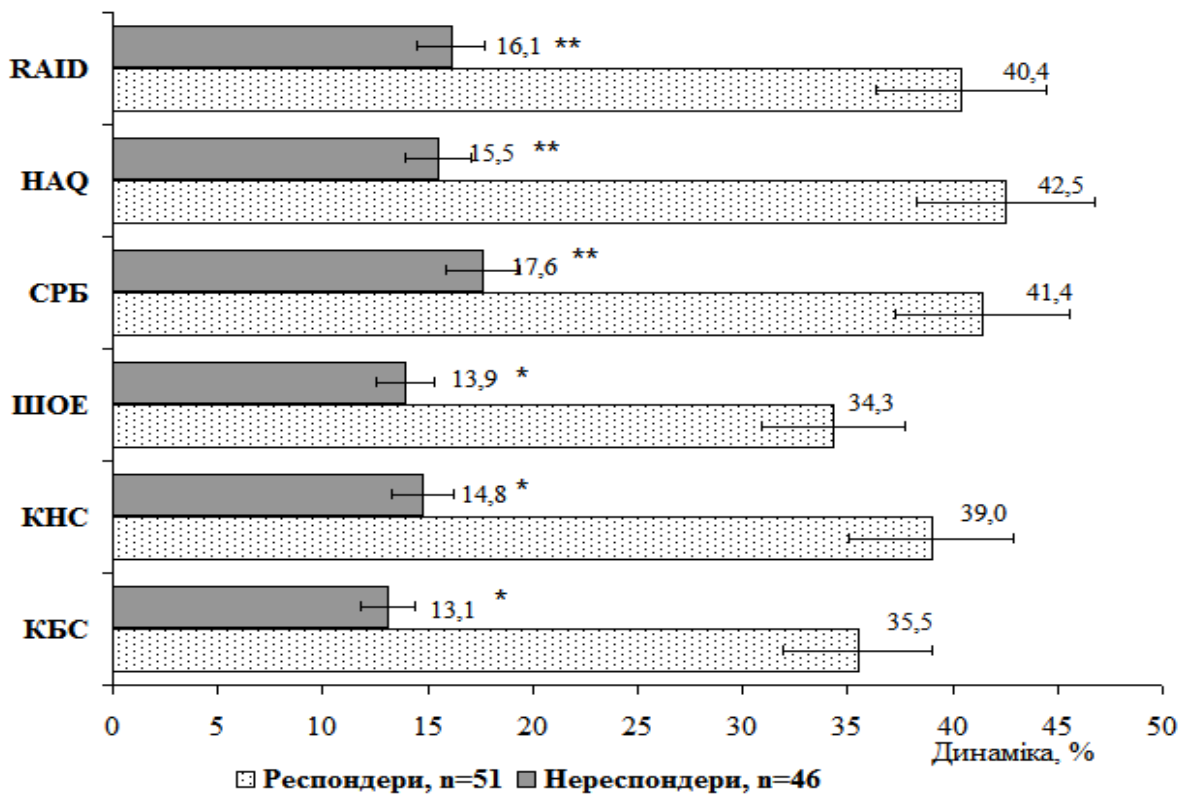


Рис. 5.1. Динаміка клінічних показників через 12 тижнів лікування у хворих на РА - респондерів та нереспондерів ($M \pm \sigma$). * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$.

У респондерів відмічалось статистично значуще покращення фізичних функцій та показників якості життя, а динаміка індексів HAQ та RAID була вищою в 2,74 та 2,50 рази порівняно з нереспондерами.

Загальновідомими предикторами недостатньої клінічної відповіді на ХМПРТ є клінічні показники активності захворювання (КБС, КНС), серо (+) за АЦЦП, порушення фізичних функцій за індексом HAQ [178]. За результатами наших досліджень (табл. 5.2), у нереспондерів порівняно з респондерами ACR 20 відмічались більш високі показники КБС та КНС (на 38,9 та 35,9 %), в той же час статистично значущих відмінностей за іншими показниками (ШОЕ, СРБ, ЗОАЗП та ЗОАЗЛ) не виявлялось. Також, у нереспондерів вихідні рівні сумарних показників активності РА - DAS28-ШОЕ, DAS28-СРБ, CDAI були вищими (на 12,4; 12,2 та 26,4 %), а вихідні індекси HAQ та RAID – вищими на 16,4 та 12,0 %, ніж у респондерів ACR 20.

Таблиця 5.2

Клініко-лабораторні показники активності захворювання у хворих на РА - респондерів ACR 20 та нереспондерів станом «до лікування»

Характеристика		Хворі на РА		
		Загальна група, n=97	Респондери, n=51	Нереспондери, n=46
КБС	M±σ	13,4±7,06	11,3±5,99	15,7±7,49*
КНС	M±σ	7,1±4,50	6,06±3,23	8,24±5,38*
ШОЕ, мм/год	M±σ	26,2±16,1	22,9±13,4	29,0±18,2
СРБ, мг/л	M±σ	14,7±12,9	12,6±10,9	17,1±14,3
ЗОАЗП, мм	M±σ	58,3±16,9	57,0±17,2	59,8±16,7
ЗОАЗЛ, мм	M±σ	49,0±1,57	46,6±14,8	51,6±1,63
DAS28-ШОЕ	M±σ	5,64±1,12	5,33±1,03	5,99±1,11**
DAS28-СРБ	M±σ	5,34±0,95	5,05±0,83	5,67±0,97**
СDAI	M±σ	31,2±12,2	27,7±10,2	35,0±13,2**
HAQ	M±σ	1,57±0,46	1,46±0,47	1,70±0,41*
RAID	M±σ	5,83±1,02	5,52±0,94	6,18±1,00**

Примітка. * - статистично значущі відмінності відносно групи респондерів (* - p < 0,05; ** - p < 0,01).

Зауважимо, що до загальної групи хворих на РА увійшло 35 (36,1 %) осіб з помірною активністю за DAS28-ШОЕ (3,2-5,1 бали) та 62 (63,9%) особи з високою активністю (> 5,1 бали). За індексом CDAI виявлялось 40 (41,2 %) хворих з помірною активністю (≤ 22 бали) та 57 (58,8 %) хворих з високою активністю РА, а за індексом RAID – 48 (49,5%) та 49 (50,5%) – з помірною (≤ 6 балів) та високою активністю РА (> 6 балів), відповідно. Серед хворих на РА з високою активністю захворювання за DAS28, CDAI та RAID відсоток нереспондерів був статистично значуще вищим (в 1,79; 3,33 та 1,67 рази), ніж серед хворих з помірною активністю РА (рис. 5.2).

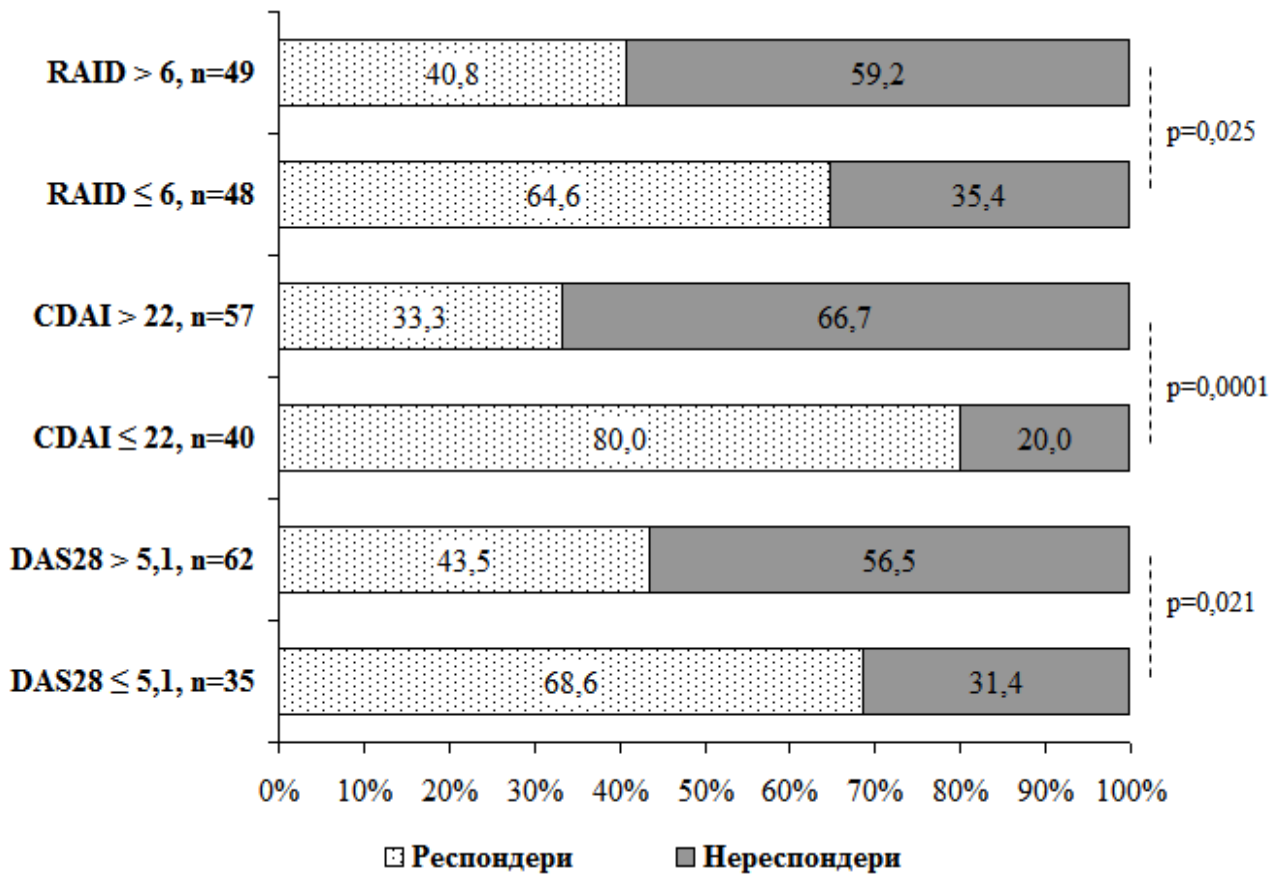


Рис. 5.2. Клінічна відповідь на лікування у хворих на РА, розподілених залежно від активності захворювання за DAS28-ШОЕ, CDAI та RAID (Fisher exact test, 2-tailed).

Отже, результати аналізу клінічних предикторів недостатньої відповіді на лікування в групі хворих на РА, які увійшли до останнього етапу

дослідження, узгоджувались із даними літератури [178]. Слід відзначити, що індекс RAID, який розраховується на підставі самостійних оцінок хворим 7 доменів (біль; функція; втома; сон; фізичний комфорт; емоційний комфорт; подолання), виявився чутливим інструментом, який дозволяє оцінити шанси належної клінічної відповіді на лікування на рівні ACR20 в українській когорті жінок, хворих на РА. Зокрема, у хворих з високим вихідним індексом RAID (> 6 балів) шанси недосягнення ACR20 за умов 12-тижневої ХМПРТ виявились значуще вищими, ніж у хворих з індексом RAID ≤ 6 балів (OR = 2,59; 95% CI 1,15 – 5,83, $p < 0,05$).

На наступному етапі був проведений аналіз циркадної варіабельності медіаторів ангиогенезу NOS3 та sTLR2 у хворих на РА – респондерів ACR20 та нереспондерів (табл. 5.3). Аналіз показників добової варіабельності рівня NOS3 висвітлив наступні закономірності: у нереспондерів рівень NOS3 о 08⁰⁰ був нижчим на 12,4 % ($p < 0,05$), ніж у респондерів. В той же час, між групами респондерів та нереспондерів не виявлялось статистично значущих відмінностей за вечірнім рівнем NOS3 та відносним приростом рівня NOS3 у вечірній час (Δ NOS3).

Дослідження показників добової варіабельності рівня sTLR2 засвідчило статистично значущі міжгрупові відмінності в продукції цього медіатора упродовж всієї доби. Так, у нереспондерів рівні sTLR2 о 08⁰⁰, о 20⁰⁰ та середньодобовий були вищими на 27,1; 31,1 та 28,9 % ($p < 0,01$), ніж у респондерів. При цьому, статистично значущих відмінностей за вечірнім зниженням рівня sTLR2 (Δ sTLR2) між групами респондерів та нереспондерів не виявлялось.

Серед пацієнтів з аберантними ранковими рівнями NOS3 (≤ 420 нг/л) та sTLR2 (≥ 375 нг/л) виявлялись вищі частки нереспондерів в 1,70 та 1,86 рази, ніж серед пацієнтів з прогностично сприятливими рівнями NOS3 (> 420 нг/л) та sTLR2 (< 375 нг/л) (рис. 5.3).

Таблиця 5.3

Показники циркадної варіабельності рівнів NOS3 та sTLR2 у хворих на РА – респондерів ACR 20 та нереспондерів

Показник		Хворі на РА		
		Загальна група, n=97	Респондери, n=51	Нереспондери, n=46
Показники циркадної варіабельності рівня NOS3				
NOS3 (08 ⁰⁰), нг/л	M±σ	428,4±84,6	457,0±91,2	400,4±71,2*
NOS3 (20 ⁰⁰), нг/л	M±σ	592,9±121,6	608,3±116,1	575,8±126,4
середньодобовий, нг/л	M±σ	510,6±93,6	528,2±96,2	491,1±87,5
ΔNOS3 (%)	M±σ	40,4±26,4	37,8±23,9	43,5±28,8
Показники циркадної варіабельності рівня sTLR2				
sTLR2 (08 ⁰⁰), нг/л	M±σ	346,9±98,1	307,9±12,3	391,4±86,7**
sTLR2 (20 ⁰⁰), нг/л	M±σ	283,3±106,7	247,6±91,3	324,5±108,1**
середньодобовий, нг/л	M±σ	315,1±100,6	277,7±12,4	357,9±96,6**
Δ sTLR2 (%)	M±σ	-19,8±26,4	-20,8±11,6	-18,6±12,6

Примітка. * - статистично значущі відмінності відносно групи респондерів (* - p < 0,05; ** - p < 0,01).

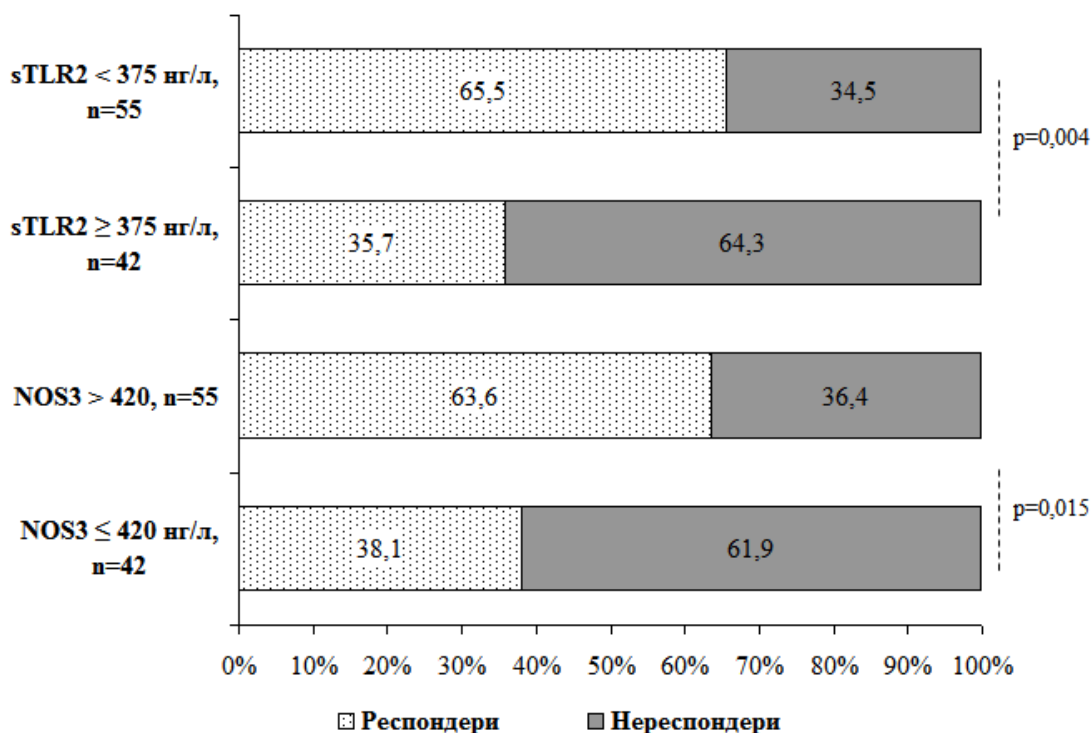


Рис. 5.3 Клінічна відповідь на лікування у хворих на РА, розподілена залежно від рівнів NOS3 та sTLR2 (08⁰⁰) (Fisher exact test, 2-tailed).

Як зазначалось у попередніх розділах, у хворих на РА пригнічення продукції NOS3 асоціювалось з підвищенням продукції sTLR2. Для комплексної оцінки дисбалансу продукції медіаторів ангіогенезу у хворих на РА було розраховано співвідношення ранкових та вечірніх рівнів NOS3 / sTLR2 (рис. 5.4). Зауважимо, що в групі контролю відношення показників NOS3 / sTLR2 о 08⁰⁰ та 20⁰⁰ були вищими порівняно з хворими на РА: $3,34 \pm 1,74$ проти $1,38 \pm 0,62$ ($p < 0,001$) та $6,92 \pm 2,71$ проти $2,41 \pm 1,17$ ($p < 0,001$), відповідно. У нереспондерів співвідношення рівнів ангіогенних медіаторів NOS3 / sTLR2 вранці (8⁰⁰) та ввечері (20⁰⁰) були статистично значуще нижчими, ніж у респондерів ACR20, і становили $1,10 \pm 0,36$ проти $1,62 \pm 0,70$ ($p < 0,001$) та $2,03 \pm 0,85$ проти $2,77 \pm 1,32$ ($p < 0,01$). Отже, поглиблення розладів циркадної продукції медіаторів ангіогенезу поєднується зі зниженням ефективності лікування у хворих на РА.

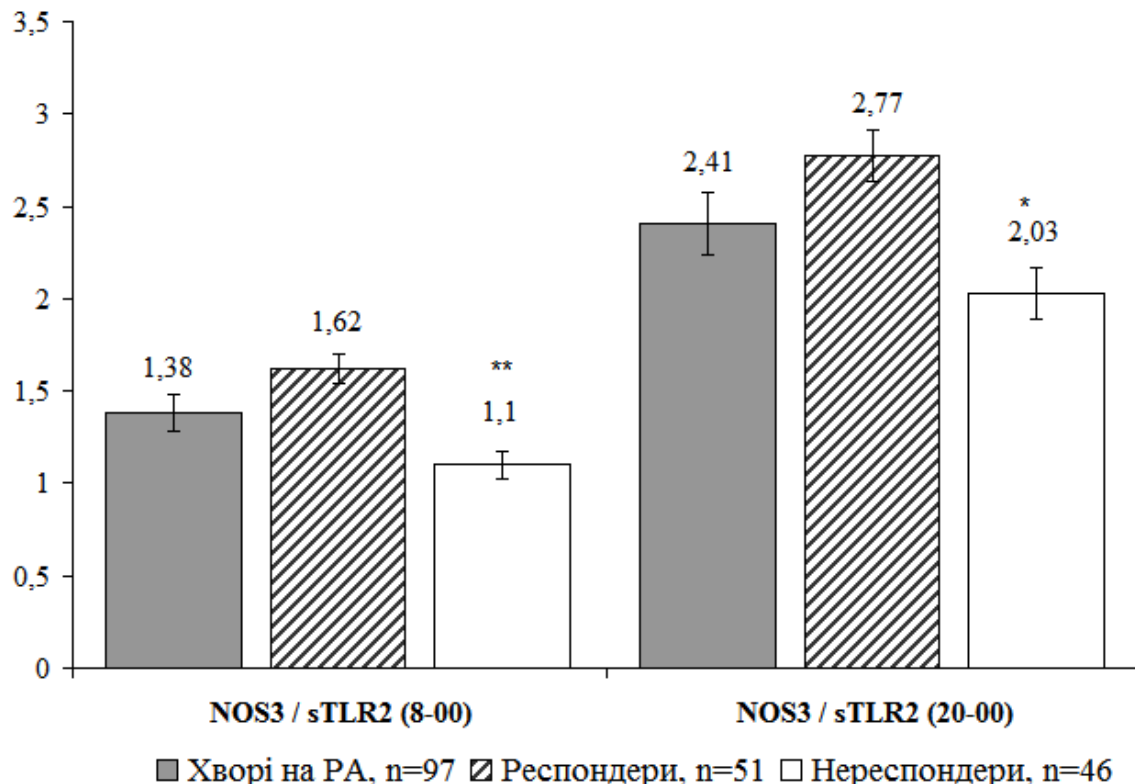


Рис. 5.4 Відношення NOS3 / sTLR2 у хворих на РА респондерів ACR 20 та нереспондерів ($M \pm \sigma$). * - статистично значущі відмінності між респондерами та нереспондерами (* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$)

За результатами ROC-аналізу (рис. 5.5, табл. 3.7) було встановлено, що більшу діагностичну цінність виявляє відношення ранкових рівнів NOS3 / sTLR2, ніж відношення вечірніх рівнів цих ангіогенних медіаторів. Показник NOS3 / sTLR2 (08^{00}) $\leq 1,20$ виявився оптимальною точкою відсікання (cut-off value), яка забезпечувала найкращий баланс між чутливістю та специфічністю діагностичної моделі. Цей показник свідчить про високу вірогідність недостатньої клінічної відповіді на лікування у жінок, хворих на РА, із чутливістю 86,3 %, специфічністю 80,0 %. Площа під ROC-кривою становить 0,881 (95% СІ 0,877; 0,974), що вказує на високу якість моделі. ROC-аналіз вечірнього відношення NOS3 / sTLR2 виявляв меншу діагностичну цінність - площа під ROC-кривою становила 0,686 (95% СІ 0,580; 0,792). Оцінка шансових відношень засвідчила, що у хворих на РА з відношенням NOS3 / sTLR2 $\leq 1,20$ суттєво зростають шанси недостатньої клінічної відповіді на лікування (OR = 3,68, $p < 0,05$). Серед хворих на РА з показником NOS3 / sTLR2 $\leq 1,20$ частка респондерів складала 36,7%, а з показником NOS3 / sTLR2 $> 1,20$ – 68,8%, відповідно (рис. 5.6).

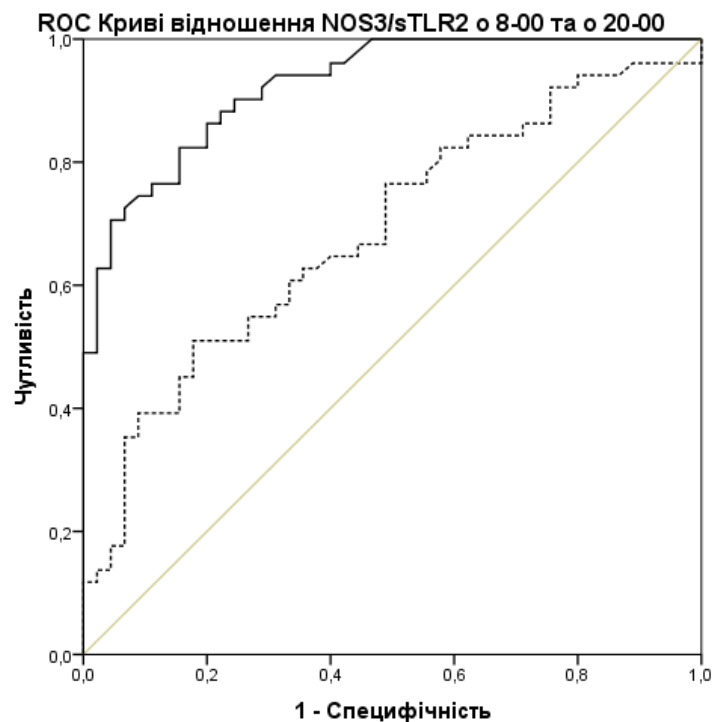


Рис. 5.5 ROC-криві відношення NOS3 / sTLR2 (суцільна лінія – відношення рівнів NOS3 та sTLR2 о 8⁰⁰; пунктирна лінія - о 20⁰⁰).

ROC-аналіз відношення NOS3 / sTLR2 (о 8-00) у хворих на РА як предиктора ефективності лікування

Показники	NOS3 / sTLR2	Шанси недосягнення ACR20 через 12 тижнів OR: 3,68 [95% CI 1,60-8,46]
Точка відсікання (cut-off value)	$\leq 1,20$	
Чутливість (Se)	0,863	
Специфічність (Sp)	0,800	
Площа під кривою (AUC)	0,925	
Стандартна похибка	0,025	
95% CI	0,877; 0,974	
p	< 0,001	

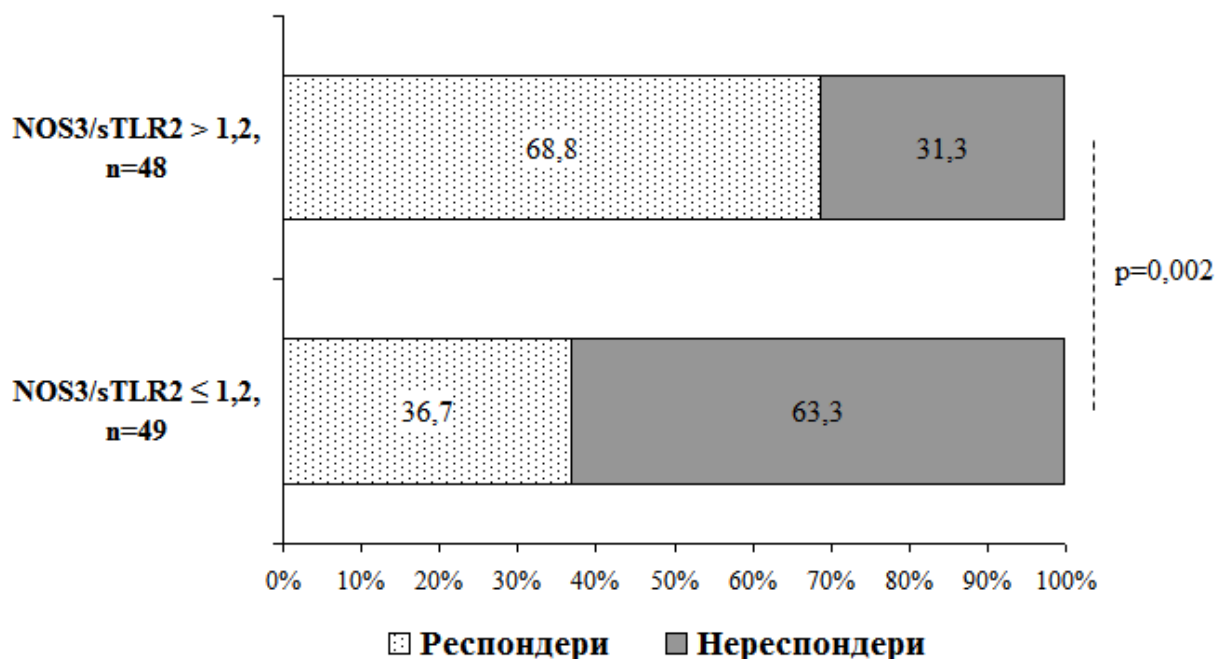


Рис. 5.6 Клінічна відповідь на лікування у хворих на РА, розподілена залежно від відношення NOS3 / sTLR2 (08⁰⁰) (Fisher exact test, 2-tailed).

Таким чином, у хворих на РА додатковим предиктором резистентності до лікування є зниження ранкового відношення NOS3 / sTLR2. Як було зазначено у попередніх розділах, порушення циркадної продукції ангіогенних медіаторів у хворих на РА асоціюються з поліморфізмом

rs2070744 гена *NOS3* і є більш виразними у носіїв генотипу *CC*. Тому на наступному етапі була проведена оцінка клінічної відповіді на лікування у носіїв поліморфних генотипів *NOS3*. Зауважимо, що в загальній групі хворих на РА було виявлено 15 (15,4 %) носіїв генотипу *CC*, 41 (42,3 %) носіїв генотипу *TC* та 41 (42,3 %) носіїв генотипу *TT*. Розподіл частот генотипів в загальній групі відповідав закону Харді-Вайнберга ($\chi^2 = 0,77$, $p=0,38$).

Аналіз частот алелей та генотипів за поліморфізмом *rs2070744* гена *NOS3* в групах респондерів та нереспондерів засвідчив статистично значущі асоціації з клінічною відповіддю на лікування (табл. 5.5).

Таблиця 5.5

Частоти алелей та генотипів гену за поліморфізмом *rs2070744* гена *NOS3* у хворих на РА групах респондерів та нереспондерів (жителів Подільського регіону)

Алель чи генотип	Нереспондери (n=46)	Респондери (n=51)	χ^2	p	OR [95% CI]
Мультиплікативна модель успадкування; частота (n)					
<i>T</i> -алель	0,587 (54)	0,676 (69)	1,67	0,2	0,68 [0,38-1,22]
<i>C</i> -алель	0,413 (34)	0,324 (33)	(df=1)		1,47 [0,82-2,65]
Загальна модель успадкування; частота (n)					
<i>TT</i>	0,413 (19)	0,431 (22)	5,22 (df=2)	0,07	0,93 [0,41-2,08]
<i>TC</i>	0,348 (16)	0,490 (25)			0,55 [0,24-1,26]
<i>CC</i>	0,239 (11)	0,078 (4)			3,69 [1,08-12,57]
Домінантна модель успадкування; частота (n)					
<i>TT</i>	0,413 (19)	0,431 (22)	0,03	0,86	0,93 [0,41-2,08]
<i>TC + CC</i>	0,587 (27)	0,569 (29)	(df=1)		1,08 [0,48-2,42]
Рецесивна модель успадкування; частота (n)					
<i>TT + TC</i>	0,761 (35)	0,922 (47)	4,78	0,03	0,27 [0,08-0,92]
<i>CC</i>	0,239 (11)	0,078 (4)	(df=1)		3,69 [1,08-12,57]

Згідно мультиплікативної моделі, в групі респондерів виявлялась тенденція ($p=0,2$) до зниження частоти зустрічаємості алелі *C* (32,4 % проти

41,3 %) та підвищення зустрічаємості алелі *T* (67,6 % проти 58,7 %) порівняно з групою нереспондерів. За загальною моделлю була підтверджена стійка тенденція ($p=0,07$) до зростання частоти гомозиготного носійства алелі *C* серед нереспондерів і превалювання носійства алелі *T* серед респондерів. Згідно рецесивної моделі у жінок, хворих на РА, генотип *CC* статистично значуще асоціювався з недостатньою клінічною відповіддю на лікування порівняно з генотипами *TT+TC* ($OR=3,69$, $p=0,03$). Таким чином, серед носіїв генотипу *CC* відсоток нереспондерів був вищим в 1,58 рази (32,6 проти 67,4%), ніж серед носіїв генотипів *TT+TC* ($p=0,034$, Fisher exact test, 2-tailed) (рис. 5.7).

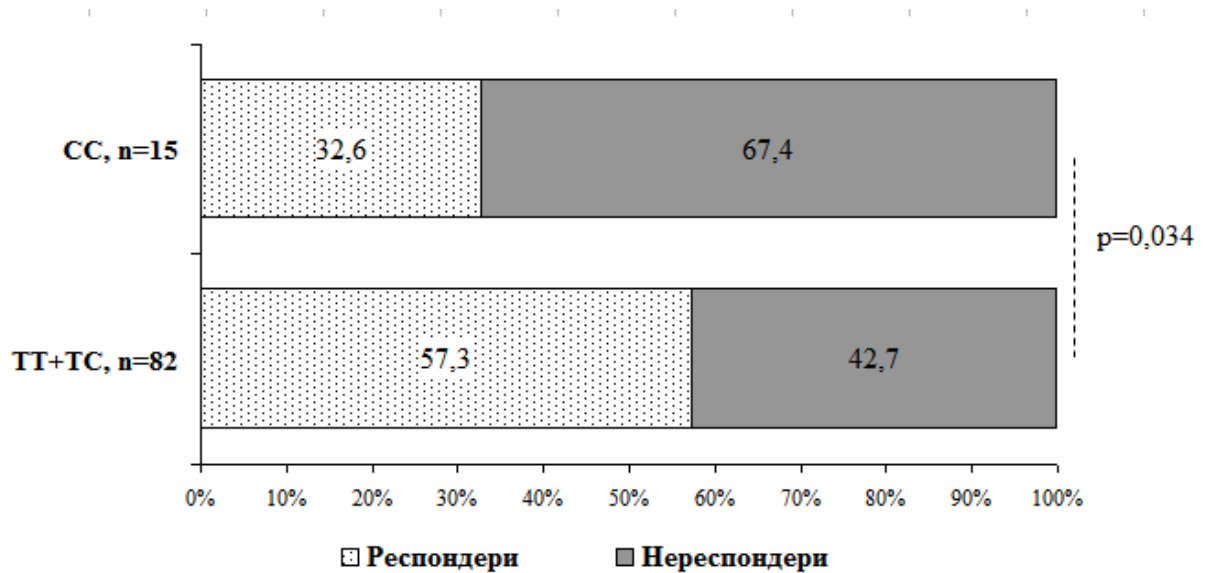


Рис. 5.7 Клінічна відповідь на лікування у хворих на РА – носіїв варіантних алелей за поліморфізмом *rs2070744* гена *NOS3* (Fisher exact test, 2-tailed).

Встановлено, що в загальній групі хворих на РА у носіїв генотипу *CC* реєструвались нижчі показники ранкового та вечірнього відношення *NOS3* / *sTLR2*, ніж у носіїв генотипів *TT+TC* (в 1,39 та 1,50 рази), *TT* (в 1,56 та 1,74 рази) та *TC* (в 1,21 та 1,27 рази), відповідно (табл. 5.6). В групах респондерів та і нереспондерів виявлялись аналогічні відмінності відношення *NOS3*/ *sTLR2* залежно від варіантного генотипу гена *NOS3*: найнижчі показники реєструвались у носіїв генотипу *CC*. Слід відзначити, що у респондерів -

носіїв генотипів *TT*, *TC*, *CC* та *TT+TC* показник NOS3/ sTLR2 о 08⁰⁰ був вищим в 1,67, 1,28, 1,37 та 1,46 рази ($p < 0,05$), ніж у нереспондерів з аналогічними генотипами. Відмінності за показником NOS3/ sTLR2 о 20⁰⁰ між респондерами та нереспондерами з однаковим поліморфними генотипами гена *NOS3 T-786C* були менш виразними. Отже, генотип *CC* детермінує порушення балансу в системі ангиогенних медіаторів у жінок, хворих на РА, що може підвищувати резистентність до лікування.

Таблиця 5.6

Відношення NOS3/ sTLR2 у респондерів ACR 20 та нереспондерів – носіїв варіантних генотипів за поліморфізмом *rs2070744* гена *NOS3* ($M \pm \sigma$)

Генотип гена <i>NOS3</i>	Хворі на РА, n=97		Респондери, n=51		Нереспондери, n=46	
	NOS3/ sTLR2 (08 ⁰⁰)	NOS3/ sTLR2 (20 ⁰⁰)	NOS3/ sTLR2 (08 ⁰⁰)	NOS3/ sTLR2 (20 ⁰⁰)	NOS3/ sTLR2 (08 ⁰⁰)	NOS3/ sTLR2 (20 ⁰⁰)
<i>TT</i>	1,63±0,75	3,05±1,61	2,04±0,76	3,89±1,68	1,22±0,42**	2,17±0,94**
<i>TC</i>	1,26±0,46	2,22±1,01	1,34±0,51	2,27±1,11	1,05±0,33*	2,13±0,82
<i>TT+TC</i>	1,45±0,65	2,64±1,40	1,66±0,72	2,99±1,60	1,14±0,38**	2,15±0,88**
<i>CC</i>	1,04±0,26	1,75±0,61	1,23±0,29	2,06±0,42	0,90±0,18*	1,64±0,64
$p_{TT/TC}$	< 0,05	< 0,05	< 0,01	< 0,01	> 0,05	> 0,05
$p_{TT/CC}$	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,05	> 0,05
$p_{TC/CC}$	< 0,05	< 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
$p_{TT+TC/CC}$	< 0,01	< 0,01	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05

Примітка. * - статистично значущі відмінності між групами респондерів та нереспондерів (* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$).

Результати наших досліджень підтвердили, що у хворих на РА резистентність до лікування визначається комплексним впливом низки клініко-патогенетичних чинників. Для встановлення незалежних предикторів клінічної відповіді на лікування, був проведений множинний лінійний регресійний аналіз (табл. 5.7). В якості потенційних предикторів були обрані пацієнт-асоційовані змінні – вік, коморбідність з АГ; РА-асоційовані змінні – тривалість, рентгенологічна стадія, КБС, КНС, НАQ; циркадні змінні –

ранкові та вечірні рівні NOS3 та sTLR2, ранкове та вечірнє відношення NOS3 / sTLR2, генотип NOS3 за поліморфізмом rs2070744 (T-786C) (умовні ранги – 1– генотип TT+TC, 2 – генотип CC). Критеріальною залежною змінною була обрана прогнозована клінічна ефективність лікування за ACR20. Для здійснення регресійного аналізу хворим на РА були присвоєні умовні раги: 1 - нереспондер, 2 – респондер ACR20 (залежна змінна). З огляду на високу інтерколінеарність регресорів був застосований метод Forward (покрокове включення незалежних змінних із високим паціальним коефіцієнтом кореляції у регресійне рівняння), що забезпечує підвищення коефіцієнта детермінації лінійного рівняння регресії. Встановлено, що у хворих на РА поряд із традиційними предикторами (КБС, КНС, тривалістю захворювання) додатковими незалежними предикторами резистентності до лікування є: 1) відношення NOS3 / sTLR2 (8^{00}) із коефіцієнтом регресії $\beta = 0,366$, $p < 0,0001$); 2) носійство генотипу CC за поліморфізмом rs2070744 (T-786C) гена NOS3 ($\beta = -0,177$, $p = 0,016$).

Таблиця 5.7

Множинний лінійний регресійний аналіз предикторів клінічної відповіді на лікування у жінок, хворих на РА

Незалежні змінні		β	B	Стандартна помилка B	t	p	
Константа			1,802	0,200	9,022	0,000	
КНС		-0,423	-0,049	0,010	-5,017	0,000	
КБС		-0,207	-0,015	0,006	-2,362	0,020	
Тривалість РА		0,183	0,014	0,006	2,461	0,016	
NOS3 / sTLR2 (8^{00})		0,366	0,302	0,065	4,644	0,000	
Генотип CC (rs2070744 NOS3)		-0,177	-0,222	0,084	-2,146	0,016	
Регресійна статистика		Дисперсійний аналіз (ANOVA)					
Множинний R	0,789	Показник	df	Сума квадратів	Середній квадрат	F	p
Множинний R ²	0,622	Регресія	5	15,053	3,011	30,000	0,000
Скоригований R ²	0,602	Залишок	91	9,132	0,100		
Стандартна похибка	0,316	Всього	96	24,186			

Враховуючи величину критерію Фішера та його статистичну значущість (30,000, $p=0,000$), коефіцієнт множинної детермінації ($df=5$), виявлені предиктори резистентності хворих на РА до лікування можна вважати інформативними.

Резюме. Підсумовуючи результати даного розділу, можна виділити наступні закономірності: 1) у хворих на РА, поряд з традиційними клінічним предикторами (КБС, КНС, НАQ), чутливим маркером недостатньої відповіді на лікування є високий індекс RAID (> 6 балів), за наявності якого вдвічі зростають шанси недосягнення ACR20 за 12 тижнів стандартного лікування ($OR = 2,59$; 95% CI 1,15-5,83, $p < 0,05$); 2) патогенетичними предикторами резистентності до лікування є низькі ранкові рівні NOS3 та високі ранкові рівні sTLR2: серед пацієнтів з прогностично несприятливими ранковими рівнями NOS3 (≤ 420 нг/л) та sTLR2 (≥ 375 нг/л) частки нереспондерів були вищими в 1,70 та 1,86 рази порівняно з такими серед пацієнтів з рівнями NOS3 > 420 нг/л та sTLR2 < 375 нг/л; 3) за результатами ROC-аналізу та множинного регресійного аналізу статистично значущим предиктором резистентності до лікування виступає співвідношення ранкових рівнів NOS3 / sTLR2 ($\beta=0,366$, $p=0,000$). У хворих на РА з показником NOS3 / sTLR2 $\leq 1,20$ шанси недостатньої клінічної відповіді на лікування зростають втричі ($OR = 3,68$; 95% CI 1,60-8,46, $p < 0,05$), чутливість та специфічність предикторної моделі - 86,3 % та 80,0%; 4) у хворих на РА значний дисбаланс циркадної продукції NOS3/ sTLR2 асоціюється з генотипом CC за поліморфізмом *rs2070744* гена NOS3. За результатами множинного регресійного аналізу генотип CC є незалежним предиктором ($\beta=-0,177$, $p=0,016$) резистентності до лікування у хворих на РА. У носіїв генотипу CC шанси недостатньої клінічної відповіді на лікування є вищими, ніж у носіїв алелі T (генотипи TT+TC) ($OR = 3,69$; 95% CI 1,08-12,57, $p = 0,03$).

Основні наукові результати розділу висвітлені в наступних публікаціях:
[19; 40; 296].

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

РА належить до захворювань, в механізми розвитку яких інтегровані порушення циркадної регуляції. У ревматоїдній синовії відбуваються значні пертурбації в експресії генів біологічного годинника, які детермінують порушення імунозапальних, деструктивних та проліферативних процесів в суглобових тканинах [165; 212]. У хворих на РА порушується центральна регуляція добових ритмів внаслідок дисбалансу секреції мелатоніну, кортизолу, пролактину та статевих гормонів, що в свою чергу поглиблює розлади експресії генів-clock та циркадних транскрипційних факторів в суглобових тканинах [98; 271]. Циркадні ритми продукції прозапальних цитокінів (ІЛ-6, ФНП α) асоціюються з добовою варіабельністю ранкової скутості та інших клінічних проявів у хворих на РА.

РА відзначається високою резистентністю до лікування, адже близько 40% осіб не відповідають на базисні ХМПРП, з них близько 20% осіб не відповідають на комбіновану терапію із включенням біологічних препаратів [82; 138; 201; 230]. З'ясування циркадних особливостей продукції мелатоніну та кортизолу у хворих на РА стало підґрунтям для модифікації хронотерапевтичних підходів до призначення ГК, НПЗЗ, метотрексату [98; 271]. Водночас, хронобіологічні предиктори резистентності до ХМПРП у хворих на РА різного віку та статі потребують більш детального вивчення.

Пошук нових чинників резистентності до ХМПРП доцільно проводити серед медіаторів ангиогенезу, оскільки цей процес контролюється clock-генами [152] і відноситься до провідних патогенетичних механізмів розвитку РА [268; 192]. Хронобіологічні аспекти продукції медіаторів ангиогенезу в клінічних умовах вивчені недостатньо. Наприклад, у хворих на РА, як і у здорових осіб, не досліджувались циркадні ритми продукції NOS3 та sTLR2, які опосередковують регуляцію ангиогенезу через VEGF-залежні та VEGF-незалежні сигнальні системи [73; 204; 205; 234]. Відомо, що NOS3

експресується не лише в ендотелії судин, а й в остеоцитах, і регулює процеси ремоделювання кісткової тканини [91]. Продукція NOS3 контролюється геном *NOS3*, поліморфізм якого впливає на продукцію окремих медіаторів запалення у хворих на РА [5]. TLR2 в ревматоїдній синовії активують процеси міграції та інвазії клітин [197], експресію прозапальних цитокінів [145], медіаторів ангиогенезу [92; 234]. Більш детальне вивчення хронобіологічних аспектів РА, в тому числі циркадних ритмів продукції NOS3 та sTLR2, дозволить виявити нові предиктори резистентності до лікування і персоніфікувати вибір фармакотерапії у хворих на РА.

Мета дисертаційного дослідження - удосконалити діагностику та контроль ефективності лікування хворих на ревматоїдний артрит на основі встановлення циркадних ритмів продукції NOS3 та sTLR2 і оцінки їх клініко-патогенетичної значимості.

У дослідження було включено 173 хворих на РА (100% жінки), середнім віком $45,9 \pm 8,79$ років, тривалістю захворювання $7,96 \pm 6,38$ років. У 55 (31,8 %) хворих тривалість РА була менше 5 років, в тому числі, у 30 (17,3 %) осіб - менше 2 років. Серед обстежених хворих переважали особи з серопозитивним варіантом РА (РФ виявлявся у 78,6 % осіб, АЦЦП - у 83,2% осіб), помірною та високою активністю процесу (DAS28-ШОЕ > 5,1 виявлявся у 65,9 % осіб), II-III рентгенологічною стадією (80,9 % осіб), II-III ФК (96,5 % осіб). Позасуглобові прояви РА виявлені у 42 (24,3%) хворих, найбільш часто реєструвались анемія хронічного захворювання (у 21,4 % осіб) та лімфаденопатія (у 17,9 % осіб). У 89 (51,4 %) хворих на РА виявлялись коморбідні стани, серед яких переважала артеріальна гіпертензія (АГ) I-II стадії 1-го та 2-го ступеня (34,1 % осіб). Частота та структура коморбідності в групі залучених у дослідження пацієнтів, узгоджувалась із загальновідомими даними щодо української субпопуляції хворих на РА [48]. Також у дослідження була залучена група контролю з 82 жінок (українок в третьому поколінні, жителів Вінницької області) середнім віком $43,7 \pm 10,2$

роки без об'єктивних ознак РА, яка була репрезентативна за частотою супутньої АГ, показниками артеріального тиску, ІМТ.

Дослідження проводилось за принципом «випадок / контроль» і складалось з 3-х етапів: 1) пілотного етапу, на якому детально вивчалась добова варіабельність продукції NOS3 та sTLR2, у 36 хворих на РА (без коморбідних станів, що асоціюються з розладами ендотеліальної продукції NO та змінами рівня NOS3 в сироватці крові). З групи контролю у пілотний етап дослідження було залучено 34 практично здорових особи (без АГ та іншої супутньої патології), віком $42,4 \pm 10,5$ років; 2) основного етапу, на якому у загальній групі хворих на РА (173 особи) був вивчений зв'язок батіфази та акрофази рівнів NOS3 та sTLR2 з перебігом захворювання; досліджені клінічні особливості хворих на РА залежно від показників продукції NOS3 та sTLR2; вивчена добова варіабельність NOS3 та sTLR2 у носіїв варіантних алелей та генотипів за поліморфізмом *rs2070744* (T-786C) гена *NOS3*; 3) заключного етапу, на якому у 97 хворих на РА була оцінена ефективність 12-тижневої стандартної фармакотерапії (із включенням метотрексату), вивчені асоціації резистентності до лікування з показниками циркадної продукції NOS3 та sTLR2, а також з носійством варіантних алелей та генотипів за поліморфізмом *rs2070744* гена *NOS3*

На пілотному етапі дослідження було встановлено, що у практично здорових осіб та хворих на РА виявляються статистично значущі коливання рівнів NOS3 та sTLR2 у сироватці крові із характерними особливостями. Наприклад, в групі контролю мінімальні рівні NOS3 (батіфаза) реєструвались вранці (о 08⁰⁰), максимальні рівні (акрофаза) – ввечері (з 20⁰⁰ до 02⁰⁰); з 08⁰⁰ до 20⁰⁰ рівень NOS3 в сироватці крові повільно зростає, а з 02⁰⁰ до 08⁰⁰ - знижувався. У жінок групи контролю батіфаза відповідала – $512,9 \pm 92,8$ нг/л, а акрофаза – $706,5 \pm 103,2$ нг/л ($p < 0,001$ відносно показника о 08⁰⁰), середньодобовий рівень NOS3 становив $627,1 \pm 92,6$ нг/л. У хворих на РА виявлялись добові коливання продукції NOS3 із батіфазою о 08⁰⁰ ($401,4 \pm 123,7$ нг/л) та акрофазою о 20⁰⁰ ($601,2 \pm 139,9$ нг/л, $p < 0,001$ відносно

показника о 08⁰⁰). У хворих на РА всі показники хронограми були нижчими (в 1,18 - 1,28 рази, $p < 0,05$), ніж в групі контролю, при цьому відмінності за вечірнім рівнем NOS3 були меншими, ніж за ранковим рівнем показника. Добова варіабельність рівня NOS3 у хворих на РА виявилась вищою, ніж у контролі: відносний приріст показника ввечері становив $+52,0 \pm 27,6$ % проти $+39,2 \pm 15,2$ % ($p < 0,05$), відповідно.

Отримані нами дані щодо діапазону коливань рівня NOS3 в сироватці крові в цілому узгоджуються із результатами інших досліджень щодо української популяції: за даними Denesyuk V., Muzyka N. (2017) у практично здорових осіб цей показник складав $731,79 \pm 84,63$ пг/мл [107]. В літературі відсутня інформація щодо добової варіабельності рівня NOS3, однак засвідчені добові коливання рівня L-аргініну (субстрату NOS3) та метаболітів NO (нітратів та нітритів) у крові та слині вагітних жінок із максимальним рівнем цих показників о 16⁰⁰ та 17⁰⁰, відповідно, та мінімальним рівнем близько 04⁰⁰ [8].

Пілотне дослідження добової варіабельності рівня sTLR2 у сироватці крові засвідчило статистично значущі відмінності показників хронограм у практично здорових осіб та хворих на РА. У практично здорових жінок виявлялись низькоамплітудні коливання рівня sTLR2 із максимумом вранці (акрофаза) та мінімумом у вечірній час (батіфаза): о 08⁰⁰ рівень sTLR2 в сироватці крові становив $181,9 \pm 67,1$ нг/л, а о 20⁰⁰ - $108,7 \pm 48,5$ нг/л ($p < 0,001$ відносно показника о 08⁰⁰). У хворих на РА також виявлялись добові коливання продукції sTLR2 із акрофазою о 08⁰⁰ ($342,9 \pm 93,4$ нг/л) та батіфазою о 20⁰⁰ ($240,7 \pm 73,2$ нг/л, $p < 0,001$ відносно показника о 08⁰⁰), при цьому всі показники хронограми були вищими (в 1,89 та 2,21 рази, $p < 0,001$), ніж в групі контролю. У хворих на РА відносно зниження продукції sTLR2 у вечірній час виявилось меншим (в 1,35 рази), ніж у практично здорових осіб групи контролю ($-29,7 \pm 11,2$ % проти $-40,1 \pm 11,5$ %, $p < 0,05$). В цілому, у хворих на РА продукція sTLR2 виявилась більш інтенсивною упродовж всієї доби і менш виразно пригнічувалась вдень, ніж у здорових осіб.

Слід відзначити, що показники хронограми сироваткових рівнів sTLR2 та NOS3 знаходились у протифазі як у практично здорових осіб, так і у хворих на РА. Зниження рівня NOS3 та підвищення рівня sTLR2 в сироватці крові о 08⁰⁰ відповідає часовому інтервалу, в якому фізіологічно припиняється секреція мелатоніну (близько 7³⁰) та активується секреція кортизолу (07⁰⁰ - 10⁰⁰). Натомість, вечірнє підвищення рівня NOS3 та зниження рівня sTLR2 відповідає часовому інтервалу, в якому розпочинається поступове наростання секреції мелатоніну на тлі низької секреції кортизолу [100]. Встановлено, що мелатонін може стимулювати продукцію NO в культурах ендотеліальних клітин [245] та синовіальних макрофагів [102], але пригнічувати експресію TLR2 в слизовій оболонці шлунка [184]. Вплив ГК на експресію NOS3 залишається дискутабельним. Зокрема, кортизол викликає дозозалежне пригнічення експресії NOS3 в культурі ендотеліальних клітин [182]. В досліджах *in vivo* (у щурів з ад'ювантним артритом) ГК у високих дозах (> 7,5 мг за преднізолоном) підвищували активність NOS3 (за одночасного зниження активності аргінази, ЦОГ-2, продукції активних форм кисню), але ГК у низьких дозах пригнічували судинну експресію NOS3 [280]. Вплив ГК на експресію TLR2 виявляє клітинну специфічність: кортизол та дексаметазон стимулюють експресію TLR2 в культурі кератиноцитів та епітеліальних клітин, але не впливають на експресію TLR2 в культурі фібробластів [259; 260]. Не виключено, що аналогічний ефект мелатонін та кортизол можуть справляти і на продукцію NOS3 та sTLR2 у хворих на РА. Зауважимо, що у хворих на РА циркадні ритми секреції мелатоніну та кортизолу відрізняються від таких у здорових осіб: секреція мелатоніну вночі є більш інтенсивною та тривалою [49; 261], а кортизолу, навпаки, нижчою [301]. Можливо, тому у хворих на РА відносний приріст рівня NOS3 о 20⁰⁰ виявився вищим, а вечірнє падіння рівня sTLR2 – нижчим, ніж в контролі.

Встановлена нами добова варіабельність рівнів NOS3 та sTLR2, а також протилежно спрямований характер їх продукції, у хворих на РА

узгоджується з результатами експериментальних досліджень: циркадний характер експресії мРНК eNOS та NO-синтазної активності виявлено в міокарді щурів [291]; засвідчена добова ритмічність експресії мРНК TLR2 в макрофагах селезінки [249]; активація TLR2 в ендотеліальних клітинах спричиняла зниження активності NOS3 та пригнічення продукції NO [255]; протилежно спрямовані зміни рівня протеїнів TLR2 та NOS3 виявлені в тканинах пацієнтів з червоним плоским лишаям [283].

Аналіз циркадних показників продукції NOS3 та sTLR2 в загальній групі хворих на РА (n=173) висвітлив статистично значущі закономірності залежно від клініко-демографічних параметрів та показників перебігу захворювання. У хворих на РА зі збільшенням віку спостерігалось зниження добової продукції NOS3: сироваткові рівні NOS3 о 08⁰⁰, о 20⁰⁰ та середньодобовий у осіб віком ≤ 25 років були вищими на 15,7; 22,9 та 19,9 % (p<0,05), ніж у осіб віком 45-60 років. Між віковими групами 26-44 роки та 45-60 років статистично значущих відмінностей за ранковим та вечірнім рівнями NOS3 не встановлено. Циркадні показники продукції sTLR2 у хворих на РА не виявляли залежності від віку.

Як відомо, з віком відбувається поступове пригнічення експресії NOS3, знижується NO-синтазна активність цього ензиму, натомість посилюється його здатність до продукції активних форм кисню, зменшується біодоступність L-аргініну та тетрагідробіоптерину (субстрату та кофактору NOS3, відповідно) [90; 105]. Також, стосовно регуляції активності NOS3 встановлений статевий диморфізм: рівень експресії цього ензиму в культурі ендотеліальних клітин жінок є вищими, ніж в ендотеліальних клітинах чоловіків [89]. Вікові та статеві особливості продукції sTLR2 остаточно не з'ясовані. В одному дослідженні засвідчено відсутність вікових та гендерних відмінностей експресії TLR2 в моноцитах здорових дітей [66]. Не виявлено асоціації експресії TLR2 з віком у пацієнтів з хворобою Паркінсона [227]. За іншими даними, в процесі старіння спостерігалось слабе підвищення експресії TLR2 в альвеолярних макрофагах мишей [77], а у пацієнтів з

хронічним обструктивним захворюванням легень відмічалось підвищення рівня sTLR2 з віком [250]. В досліджах *in vivo* виявлені секс-специфічні відмінності в експресії TLR2 в лімфоцитарних клітинах тварин [226]. Не виключено, що циркадні ритми продукції NOS3 та sTLR2 можуть мати гендерні особливості, тому виявлені нами закономірності в жіночій групі здорових осіб та хворих на РА доцільно перевірити і у чоловічих когортах.

У хворих на РА з підвищенням тривалості захворювання реєструвалось помірне зниження добової продукції NOS3: у осіб з тривалістю РА > 10 років рівні NOS3 о 08⁰⁰, 20⁰⁰ та середньодобовий були нижчими (на 18-24%), ніж у хворих з тривалістю РА до 5 років. Показники продукції NOS3 не залежали від наявності серологічних маркерів РА (АЦЦП та/або РФ), в той же час зниження ранкового та вечірнього рівня NOS3 асоціювалось зі збільшенням рентгенологічної стадії та ФК. Зауважимо, що найбільш виразні відмінності циркадної продукції NOS3 залежно від рентгенологічної стадії ураження суглобів виявлялись в підгрупі хворих з тривалістю РА менше 5 років. Наприклад, у хворих на РА, які до 5 років досягли III стадії за Steinbroker, рівні NOS3 о 08⁰⁰, 20⁰⁰ та середньодобовий були нижчими (на 23-25 %, $p < 0,01$), ніж у хворих з I стадією, відповідно. За результатами ROC-аналізу у хворих на РА з тривалістю захворювання до 5 років ранковий рівень NOS3 > 420 нг/л (вище P₁₀ групи контролю) є предиктором повільної рентгенологічної прогресії РА з чутливістю 80,8 % та специфічністю 79,3 %. ROC-аналіз вечірнього та середньодобового рівня NOS3 засвідчив меншу чутливість та специфічність цих показників.

У хворих на РА підвищення тривалості захворювання, рентгенологічної стадії ураження суглобів та погіршення їх функціонального стану суглобів асоціювалось з підвищенням продукції sTLR2 як у ранковий, так і у вечірній час. Серопозитивний варіант захворювання (за РФ та/ або АЦЦП) асоціювався з більш значущим зростанням показників добової продукції sTLR2 (на 15-18%) у хворих на РА. Встановлено, що у пацієнтів з тривалістю захворювання до 5 років високий рівень sTLR2 вранці (> 375

нг/л) є предиктором швидкої рентгенологічної прогресії РА з чутливістю 87,5 % та специфічністю 78,7 %. Оцінка шансових відношень засвідчила, що у хворих на РА із рівнем sTLR2 вранці (08^{00}) вище 375 нг/л шанси досягнути II-III стадії за Steinbroker упродовж п'яти років є втричі вищими (OR = 3,32; 95% CI 0,96-11,47, $p < 0,05$), ніж у пацієнтів з рівнем sTLR2 ≤ 375 нг/л.

Слід відзначити, що на початкових етапах розвитку РА саме ангиогенні механізми детермінують швидкість формування панусу та прогресування деструктивних процесів в суглобах. Через систему NOS3 / NO реалізується дія найбільш потужного проангіогенного медіатору - VEGF, який володіє прозапальним, антиапоптичним та остеодеструктивним ефектом за умов РА [160]. Вочевидь, зниження активності NOS3 повинно сприятливо впливати на перебіг РА, однак результати наших досліджень виявились протилежними. Найімовірнішим поясненням цього протиріччя може бути описаний в роботі Nakagawa T. (2013, 2007) феномен в регуляції системи VEGF / NOS3 [204; 205]. Зазвичай пригнічення експресії NOS3 та ендотеліальної продукції NO відбувається за умов зниженої експресії VEGF. Однак при значному падінні активності NOS3 (з ефектом роз'єднання та переключенням на продукцію супероксид-аніону) експресія VEGF парадоксально зростає і через NO-незалежні сигнальні системи стимулює патологічний ангиогенез [204;205]. Зниження синтезу ендотеліального NO супроводжується підвищенням експресії прозапальних медіаторів (NF- κ B, циклооксигенази-2) [74; 129], компенсаторним посилення експресії та підвищенням вмісту VEGF, надмірною проліферацією ендотелію, гіпертрофією гладеньких міоцитів, посиленням макрофагальної міграції [205]. Напротивагу VEGF, який активує остеокластогенез та резорбцію кістки [160], NOS3 експресується в остеоцитах і стимулює остеогенез [86; 91]. Нокаут гена NOS3 викликає значні зміни ендохондральної осифікації, проліферації та диференціації остеобластів, мінералізації кісткової тканини [50], пригнічення проліферації хондроцитів та ендохондрального росту кістки [289]. Нещодавно засвідчено, що TLR2 активують процес ангиогенезу через різні сигнальні системи – через

посилення експресії VEGF [92] та активацію рецепторів ангіопоетину Tie2 [234]. Активація TLR2 спричиняє підвищення активності остеокластогенезу за участі RAFS [161]. Ймовірно, що у хворих на РА підвищення продукції sTLR2 за умов зниженої продукції NOS3 може акселерувати розвиток патологічного ангиогенезу в ревматоїдній синовії та прогресування остеодеструктивних змін.

У хворих на РА зниження продукції NOS3 та підвищення продукції sTLR2 (особливо у ранковий період) асоціювалось з підвищенням активності захворювання. Аналіз клінічних особливостей хворих на РА, розподілених на групи згідно кватилей ранкового рівня NOS3, засвідчив статистично значущий зв'язок з показниками активності захворювання, втратою фізичних функцій та погіршенням якості життя. Зокрема, у хворих з ранковим рівнем NOS3 ≤ 420 нг/л частіше виявлялась висока активність захворювання за індексами DAS28-ШОЕ $> 5,1$ (OR=2,21, 95% CI 1,29 - 4,34) та DAS28-СРБ $> 5,1$ (OR=2,47, 95% CI 1,33 - 4,58), втрата фізичних функцій за HAQ $> 2,0$ (OR=1,72, 95% CI 0,77 - 3,82), посилення впливу захворювання на загальний стан пацієнта за індексом RAID (OR=2,37, 95% CI 1,29-4,34). Також у хворих на РА з низьким рівнем ранкової продукції NOS3 реєструвалось погіршення показників фізичного та психічного здоров'я за неспецифічним опитником SF-36. Показники активності РА обернено корелювали з ранковим рівнем NOS3 ($r_{Sp} = -(0,27-0,32)$, $p < 0,01$), в той час як вік та тривалість захворювання – з вечірнім рівнем NOS3 ($r_{Sp} = -(0,21-0,25)$, $p < 0,05$).

Ще більш тісний зв'язок показників активності РА реєструвався з сироватковим рівнем sTLR2. Так, у хворих з ранковим рівнем sTLR2 > 375 нг/л шанси розвитку високої активності захворювання зростали багаторазово, при цьому найвищими були шансові відношення за індексами DAS28-ШОЕ (OR= 8,22, 95% CI 3,51 - 19,25) та CDAI (OR= 8,73, 95% CI 3,37 - 22,63), дещо нижчими - за DAS28-СРБ (OR=5,78, 95% CI 2,80 - 11,9), RAID (OR=4,96, 95% CI 2,55 - 9,65) та HAQ (OR=2,40, 95% CI 1,09 - 5,28). Виявлявся сильний прямий кореляційний зв'язок між ранковим, вечірнім та середньодобовим

рівнем sTLR2 та клінічними показниками активності захворювання - КБС ($r_{sp}=0,63-0,67$, $p<0,001$) та КНС ($r_{sp}=0,41-0,46$, $p<0,001$), відповідно. Серед клінічних індексів найбільш тісний зв'язок виявлявся між ранковим рівнем sTLR2 та DAS28-ШОЕ і CDAI ($r_{sp} = 0,60-0,64$, $p<0,001$), індексами RAID ($r_{sp}=0,54$, $p<0,001$) та HAQ ($r_{sp}=0,41$, $p<0,01$). Підвищення продукції sTLR2 поєднувалось з погіршенням загального стану здоров'я за шкалою SF-36, особливо з її фізичною складовою.

Зміни продукції NOS3 та sTLR2 у хворих на РА можуть пояснюватись впливом генетично-детермінованих та набутих чинників. Відомо, що ГК, прозапальні цитокіни (ФНП- α), NF- κ B, бактеріальні ліпополісахариди інгібують експресію eNOS та зменшують стабільність її мРНК [175; 182; 238;241]. Натомість, фізичні тренування динамічного характеру сприяють підвищенню рівня NOS3 в сироватці крові [16]. sTLR2 продукуються шляхом відщеплення ектодомену від клітинних рецепторів за участі металопротеїназ в умовах прозапальної стимуляції [173]. Підвищення експресії TLR2 в моноцитах крові та синовіальної рідини хворих на РА асоціюється зі збільшенням продукції прозапальних цитокінів (ІЛ-1 β , ІЛ-6, MCP-1, ФНП α) [171]. Рівень sTLR2 в плазмі крові позитивно корелює з рівнем прозапальних цитокінів ІЛ-6 та ФНП α і негативно – з рівнем ІЛ-10 за експериментальної ендотоксемії [269]. Прийом ГК, статинів, хлорохіну підвищував рівень sTLR2 у хворих з системним червоним вовчаком [144]. Ймовірно, за вищевказаних умов продукція sTLR2 у хворих на РА може посилюватись.

Серед відомих генетичних чинників поліморфізм *rs2070744* у промоторній ділянці гена *NOS3* спричиняє найбільш значуще зниження експресії цього протеїну: у гомозигот *CC* виявляються нижчі рівні мРНК *NOS3* та метаболітів NO (нітритів та нітратів) в крові, ніж у носіїв *T*-алелі [200; 243]. Поліморфізм *rs2070744* гена *NOS3* може відображатись не лише на експресії *NOS3*, а й на експресії медіаторів запалення. В дослідженні Melchers et al. (2006) було показано, що *in vitro* ендотеліальні клітини з генотипом *CC* не відповідають підвищенням експресії *NOS3* на стимуляцію

протизапальним ІЛ-10 і, відповідно, не відбувається ІЛ-10-залежної супресії протизапального ІЛ-12 [199]. Тому на наступному етапі було вивчено можливий зв'язок циркадної продукції NOS3 та sTLR2 з носійством варіантних алелей та генотипів за поліморфізмом *rs2070744* гена *NOS3*.

Спочатку в загальній групі із 173 жінок з РА (жителів Вінницької області, українок у третьому поколінні) та 82 жінок групи контролю були досліджені частоти алельних варіантів гена *NOS3* за поліморфізму *rs2070744*. Розподіл частот генотипів *TT / TC / CC* гена *NOS3* в групі контролю становив 47,6 / 43,9 / 8,5 %, в групі хворих на РА - 42,8 / 41,0 / 16,2 %, відповідно, що відповідало закону рівноважного зчеплення в обох групах ($\chi^2=0,11$, $p=0,75$; $\chi^2=2,36$, $p=0,12$). Аналіз генетичних моделей не виявив статистично значущого зв'язку між носійством алельних варіантів гена *NOS3* за поліморфізму *rs2070744* та схильністю до РА ($\chi^2=0,52 - 7,86$, $p=0,1-0,47$), але засвідчив статистично значущу асоціацію генотипу *CC* з коморбідною АГ (OR = 2,65, 95% CI 1,16-6,03, $\chi^2=5,63$, $p = 0,02$).

Частоти алельних варіантів гена *NOS3* за поліморфізму *rs2070744* в групах мешканок Подільського регіону (як практично здорових жінок, так і жінок, хворих на РА) узгоджуються з раніше отриманими даними щодо окремих когорт населення України [13; 15; 27; 32; 43]. Наприклад, в роботі Дроздовської С.Б. (2012) показано, що серед здорових осіб ($n=321$) частота генотипів *TT*, *TC* та *CC* становила 43,3, 45,8 та 10,9%, а частота *C*-алелі – 34%, відповідно. В роботі Досенко В.Є. (2005) засвідчено, що серед пацієнтів з гострим коронарним синдромом ($n=221$, 18,3% жінок) генотип *CC* виявлявся у 16% осіб [13]. За даними Sydorчук L. (2017) та Букач О.П. (2019) у жителів Північної Буковини розподіл поліморфізму *rs2070744* гена *NOS3* серед 60 хворих на РА (71,7 % жінки) та 20 практично здорових осіб виявився наступним 48,33/38,33/13,33 % проти 25,0/65,0/10,0 %, відповідно [4; 263]. Отже, серед мешканок Подільського регіону, які не хворіють на РА, та серед практично здорових жителів Північної Буковини частота генотипу *CC* була близькою, частота генотипів *TT* та *TC* відрізнялась незначуще

($\chi^2=3,43$, $p=0,18$), у відповідних групах хворих на РА статистично значущих відмінностей за частотою варіантних генотипів за поліморфізму *rs2070744* гена *NOS3* не виявлено ($\chi^2=0,63$, $p=0,73$). Зауважимо, що в європейських субпопуляціях хворих на РА схожа частота генотипу *CC* відмічалась в німецькій (19,1 % проти 12,1% в загальній популяції) [198] та іспанській (15%) когортах [126]. На відміну від європейської популяції, частота генотипу *CC* в китайській популяції була значно нижчою і серед здорових осіб, і серед хворих на РА (2,99 та 4,59 %, відповідно) [57].

Отримані нами результати щодо вищої частоти генотипу *CC* у хворих на РА з АГ узгоджуються із результатами інших досліджень [148; 244]. Серед клінічно здорових осіб серед носіїв генотипу *CC* було виявлено 22,6% гіпертензивних осіб, в той час як серед носіїв генотипів *TC* та *TT* – 14,8 та 12,4%, відповідно [148]. Засвідчено, що при поєднанні генотипу *CC* з іншими чинниками ендотеліальної дисфункції ризик АГ може підвищуватись багаторазово. Так, в індійській популяції у носіїв генотипу *CC* ризик АГ був вищим в 1,3 рази (OR = 1,31, 95% CI 0,53–3,22), а у осіб з генотипом *CC*, що вживають табак, - в 9 разів (OR = 9,0; 95% CI 1,14–71,04) [244]. В когорті з 60 хворих на РА - жителів Північної Буковини серед пацієнтів з коморбідною АГ I та II ступеню носії *T*-алелі виявлялись частіше, ніж серед осіб з АГ III ступеню [4].

У жінок, хворих на РА, встановлений зв'язок алельних варіантів гена *NOS3* за поліморфізму *rs2070744* з добовою варіабельністю продукції *NOS3*: сироваткові рівні *NOS3* вранці (о 08⁰⁰), ввечері (о 20⁰⁰) та середньодобовий у носіїв генотипу *CC* були нижчими, ніж у носіїв генотипу *TT* (на 16,5; 25,4 та 21,8 %, $p<0,001$) та *TC* (на 12,7; 18,7 та 16,3 %, $p<0,01$), відповідно. У носіїв генотипу *CC* шанси зниження ранкової продукції *NOS3* до прогностично несприятливого рівня (≤ 420 нг/мл) є вищими порівняно з носіями генотипів *TT* (OR = 2,99; 95% CI 1,19 - 7,50, $p<0,05$), *TC* (OR = 2,62; 95% CI 1,04 - 6,60, $p<0,05$) і, відповідно, *TT+TC* (OR = 2,58; 95% CI 1,09 - 6,12, $p<0,05$). У носіїв

генотипу *CC* вечірній приріст рівня NOS3 є суттєво меншим порівняно із носіями генотипів *TT* та *TC* (в 1,53 та 1,32 рази, $p < 0,05$), відповідно.

У хворих на РА за коморбідності з АГ реєструвалось більш виразне зниження вечірньої продукції NOS3 (на 15-20%, $p < 0,05$) порівняно із пацієнтами без АГ, в той час як показники ранкової продукції практично не відрізнялись. При аналізі показників продукції NOS3 у носіїв поліморфних генотипів *NOS3* залежно від коморбідності з АГ виявлена закономірність зберігалась. Чутливим та специфічним показником високого ризику коморбідної АГ у жінок, хворих на РА, виявилось зниження вечірнього приросту рівня NOS3, який оцінювали за показником $\lg \Delta \text{NOS3}$. Показник $\lg \Delta \text{NOS3} \leq 1,50$ з чутливістю 80,8 % та специфічністю 79,3 % свідчить про високий ризик розвитку коморбідної АГ у хворих на РА (OR=3,78; 95% CI 1,96-7,28, $p < 0,001$). Отже, порушення циркадної продукції NOS3 у хворих на РА модифікують перебіг захворювання та підвищують ризик АГ.

Отримані нами результати узгоджуються з результатами інших досліджень, в яких відмічалось зниження сироваткового рівня NOS3 у пацієнтів з серцево-судинною патологією. Наприклад, у осіб з серцевою недостатністю цей показник складав $371,98 \pm 29,30$ пг/мл [12; 107; 108]. Інформації щодо циркадних особливостей продукції NOS3 за різних патологічних станів нами не знайдено, але в одному дослідженні виявлені циркадні коливання рівня L-аргініну та метаболітів NO в сироватці крові та слині у вагітних жінок. Зокрема, у вагітних жінок з захворюваннями серцево-судинної системи виявлялись нижчі рівні L-аргініну та метаболітів NO в слині, при цьому суттєво порушувався їх циркадний характер порівняно з вагітними без супутньої патології [8].

У хворих на РА встановлений зв'язок зв'язок алельних варіантів гена *NOS3* за поліморфізму *rs2070744* з циркадними ритмами продукції sTLR2: сироваткові рівні sTLR2 вранці (о 08⁰⁰), ввечері (о 20⁰⁰) та середньодобовий у носіїв генотипу *CC* були вищими, ніж у носіїв генотипу *TT* (на 27,3; 24,8 та 26,1 %, $p < 0,05$) та *TC* (на 17,2 %; 12,8 % та 15,2 %, $p < 0,05$), відповідно. За

наявності генотипу *CC* у хворих на РА шанси зростання ранкової продукції *sTLR2* до критично високого рівня (> 375 нг/л) були більшими, ніж у носіїв генотипів *TT* (OR = 4,79, 95% CI 1,91 - 12,0, $p < 0,001$) та *TC* (OR = 3,52, 95% CI 1,42 - 8,77, $p < 0,01$), і, відповідно, *TT+TC* (OR = 4,13; 95% CI 1,77 - 9,64, $p = 0,001$). Підвищення продукції *sTLR2* асоціювалось зі зниження рівня *NOS3*: у хворих на РА з рівнем *NOS3* ≤ 420 нг/л рівні *sTLR2* о 08⁰⁰, о 20⁰⁰ та середньодобовий були вищими на 23,3; 28,7 та 25,6 % ($p < 0,05$), ніж у хворих на РА з рівнем *NOS3* > 420 нг/л, при цьому між рівнями *NOS3* та *sTLR2* виявлявся обернений зв'язок ($r_{sp} = - (0,41-0,42)$, $p < 0,01$).

Таким чином, поліморфізм *rs2070744* гена *NOS3* асоціюється не лише з порушенням продукції *NOS3*, а й зі змінами циркадної продукції *sTLR2*. В дослідженні Букач О.П., Федів О.І. та ін. (2017) були засвідчені відмінності імунозапальної відповіді у хворих на РА залежно від носійства варіантних алелей поліморфізм *rs2070744* гена *NOS3*, зокрема носії алелей *T* та *C* відрізнялись за рівнями ІЛ-6, ІЛ-12, ІЛ-10 в сироватці крові із більш високим рівнем прозапальних цитокінів у носіїв генотипу *CC* [2; 7]. Однак, механізми, через які реалізується зв'язок між поліморфізмом *rs2070744* гена *NOS3* та продукцією *sTLR2*, як і інших медіаторів запалення, потребують більш детального вивчення.

На наступному етапі було досліджено ефективність 12-тижневої стандартної фармакотерапії у 97 жінок, хворих на РА, віком $46,3 \pm 8,89$ років та тривалістю захворювання $8,44 \pm 6,52$ років. Стандартна схема лікування включала МТХ у стабільній дозі (середня доза $11,4 \pm 2,17$ мг/ тиждень), ГК (середня доза $7,35 \pm 4,57$ мг/добу), НПЗЗ у стабільній дозі, фолієву кислоту. Респондерами ACR 20 / 50 / 70 вважали пацієнтів, у яких через 12 тижнів на 20 / 50 / 70 % знизилась КНС та КБС і покращились 3 або більше клініко-лабораторних показника. Для оцінки ефективності лікування також користувались індексом RAID. Через 12-тижнів контрольованого лікування серед хворих на РА було виявлено 52,6 % респондерів ACR 20, у тому числі 16,5 та 5,2 % респондерів ACR 50 та ACR 70, а частка нереспондерів

становила 47,4% осіб, відповідно. За результатами масштабного мета-аналізу ефективності ХМПРТ, адекватної відповіді на лікування за критеріями ACR 20/ 50/ 70 при монотерапії МТХ вдається досягнути у 44,3/ 19,5/ 4,1% хворих на РА [82], що засвідчують результати і наших досліджень. Серед хворих, що отримували комбінацію МТХ з різними біологічними препаратами частка респондерів ACR 20 коливалась від 63,7 до 77,1%, ACR 50 – від 50,1 до 55,9%, ACR 70 – від 17,0 до 28,0% [82], що свідчить про відсутність належного терапевтичного ефекту практично у кожного третього пацієнта з РА.

Виявилось, що у хворих на РА, поряд з відомими клінічним показниками недостатньої клінічної відповіді на лікування (КБС, КНС, НАQ) [178], чутливим предиктором є високий індекс RAID. У хворих на РА з індексом RAID > 6 балів шанси недосягнення ACR20 через 12 тижнів лікування зростають вдвічі (OR=2,59, 95% CI 1,15-5,83).

Оцінка показників добової варіабельності рівнів NOS3 та sTLR2 висвітлила статистично значущі відмінності між респондерами та нереспондерами. У нереспондерів рівень NOS3 о 08⁰⁰ був нижчим на 12,4 % (p<0,05), а рівні sTLR2 о 08⁰⁰ та о 20⁰⁰ - вищими на 27,1 та 31,1 % (p<0,01), ніж у респондерів. Серед осіб з прогностично несприятливими ранковими рівнями NOS3 (≤ 420 нг/л) та sTLR2 (≥ 375 нг/л) частки нереспондерів були більшими (в 1,70 та 1,86 рази), ніж серед осіб з «безпечними» рівнями NOS3 (>420 нг/л) та sTLR2 (< 375 нг/л). У хворих на РА виявлявся дисбаланс продукції ангіогенних медіаторів: відношення NOS3/ sTLR2 вранці та ввечері було нижчим в 2,42 та 2,87 рази, ніж в групі контролю. У нереспондерів співвідношення рівнів NOS3 / sTLR2 вранці (8⁰⁰) та ввечері (20⁰⁰) були нижчими, ніж у респондерів ACR20: $1,10 \pm 0,36$ проти $1,62 \pm 0,70$ (p < 0,001) та $2,03 \pm 0,85$ проти $2,77 \pm 1,32$ (p < 0,01), відповідно.

На підставі ROC-аналізу та множинного регресійного аналізу було встановлено, що статистично значущим предиктором резистентності до лікування виступає ранкове відношення NOS3 / sTLR2 ($\beta=0,366$, p=0,000). У

хворих на РА з показником $NOS3 / sTLR2 \leq 1,20$ шанси недостатньої клінічної відповіді на лікування зростають втричі (OR=3,68; 95% CI 1,60-8,46) із чутливістю та специфічністю предикторної моделі 86,3 % та 80,0 %, відповідно. У хворих на РА значний дисбаланс продукції NOS3/ sTLR2 асоціюється з генотипом CC за поліморфізмом *rs2070744* гена *NOS3*. За результатами множинного регресійного аналізу генотип CC є незалежним предиктором ($\beta=-0,177$, $p=0,016$) резистентності до лікування у хворих на РА. У носіїв генотипу CC шанси недостатньої клінічної відповіді на лікування є вищими, ніж у носіїв алелі T (*TT+TC*) (OR = 3,69; 95% CI 1,08-12,57, $p = 0,03$). Виявлені закономірності узгоджуються із результатами досліджень Букач О.П. (2018, 2019): у хворих на РА - жителів Північної Буковини засвідчено відмінності у динаміці маркерів запального процесу під впливом лікування у носіїв варіантних алелей за поліморфізму *T-786C* гена *NOS3*, засвідчено більш важкий перебіг захворювання у осіб з генотипом CC [2, 3].

Зв'язок MTX та інших засобів ХМПРТ з продукцією ангіогенних медіаторів NOS3 та sTLR2 доцільно вивчити більш детально. Адже, лікування MTX може порушувати активність NOS3 в ендотеліальних клітинах (з ефектом роз'єднання та підвищенням продукції активних форм кисню) внаслідок формування дефіциту тетрагідробіоптерину – кофактору NOS3 [97; 256]. На ефективність MTX впливає поліморфізм генів ензимів фолатного циклу [178], з яким також пов'язаний обмін біоптерину. З іншого боку, MTX через аденозин-залежні сигнальні механізми (за участі АМР-кінази) може підвищувати синтез NOS3 в ендотелії судин [189] та спричиняти ендотеліопротективний ефект у хворих на РА [110].

Підвищення продукції sTLR2 може впливати на ефективність ХМПРТ через різні механізми. Виявилось, що TLR2 здатні модифікувати токсичність MTX та інших хіміотерапевтичних засобів, оскільки є активаторами мультифункціонального транспортеру ксенобіотиків - Р-глікопротеїну ABCB1/MDR1 в ентероцитах [116]. TLR2 залучені до регуляції болю та розвитку нейропатичного больового синдрому [156]. У пацієнтів з РА

відмічається висока експресія TLR2 в моноцитах та істотно підвищується продукція прозапальних цитокінів у відповідь на TLR2-агоністи [171]. Існують дані, що ефективність MTX підвищується за умов синхронізації його прийому з циркадними ритмами продукції фактору некрозу пухлини α [272; 273]. Прийом MTX ввечері забезпечував більш ефективне зниження КНС, рівня СРБ і, в цілому, забезпечував кращу відповідь на лікування за критеріями EULAR, викликав менше побічних ефектів, ніж прийом еквівалентної дози препарату у звичайному режимі [271; 273].

Таким чином, порушення циркадних ритмів продукції NOS3 та sTLR2 у хворих на РА асоціюється з підвищенням резистентності до лікування. При впровадженні хронотерапевтичних підходів в лікування РА доцільно враховувати особливості продукції ангіогенних медіаторів. На рис. 6.1 зазначено місце NOS3 та sTLR2 в циркадному патерні нейроендокринної регуляції у хворих на РА.

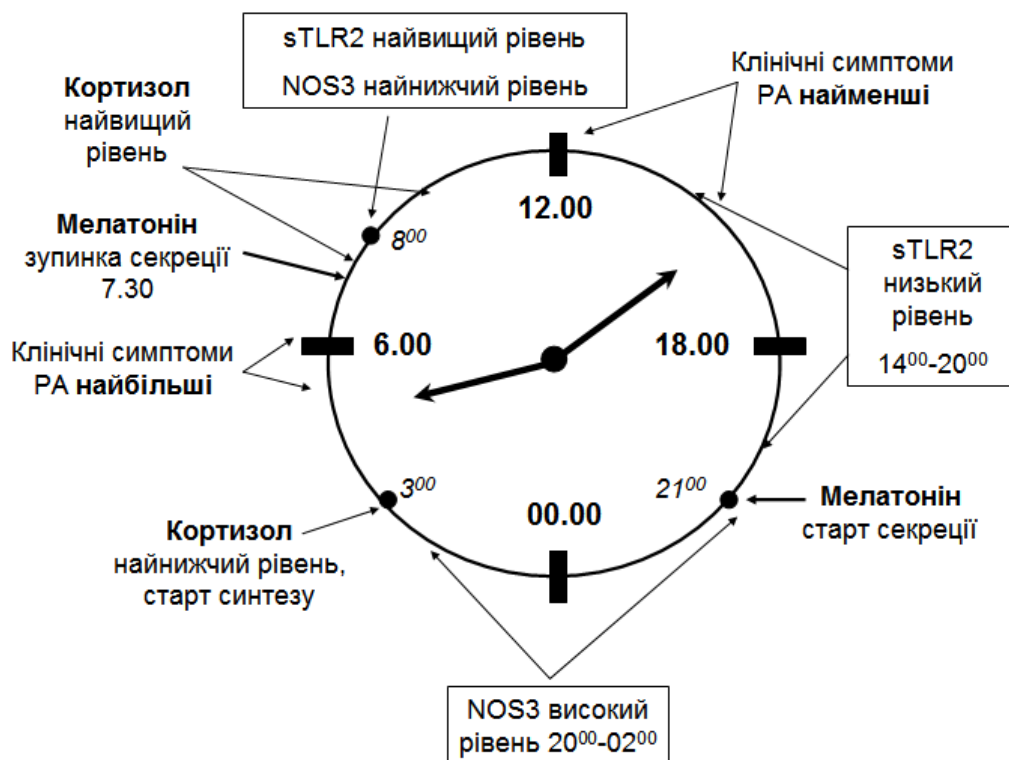


Рис. 6.1 Місце NOS3 та sTLR2 в циркадному патерні нейроендокринної регуляції у хворих на РА (адаптовано за Cutolo M., 2016 [98] та доповнено за результатами власних досліджень [17; 18; 295; 297]).

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено вирішення актуальної задачі сучасної ревматології – підвищення ефективності діагностики та лікування хворих на РА на основі встановлення циркадних ритмів продукції ендотеліальної синтази оксиду азоту (NOS3) та тол-подібних рецепторів 2 (sTLR2), оцінки їх клініко-патогенетичної значимості з наступним визначенням нових предикторів резистентності до лікування.

1. У жінок, хворих на РА, та жінок групи контролю реєструються циркадні коливання рівня NOS3 в сироватці крові із мінімальним рівнем (батіфазою) о 08⁰⁰ та максимальним рівнем (акрофазою) о 20⁰⁰. Показники продукції NOS3 у хворих на РА є значуще нижчими, ніж в групі контролю, із найбільшими відмінностями о 08⁰⁰ (401,4±123,7 проти 512,9±92,8 нг/л, p<0,01). За умов тривалості РА до 5 років ранковий рівень NOS3 > 420 нг/л є предиктором повільної рентгенологічної прогресії за Steinbroker з чутливістю 80,8 % та специфічністю 79,3 % (p < 0,001).

2. У хворих на РА зниження показників ранкової продукції NOS3 асоціюється з високою активністю захворювання, втратою фізичних функцій, погіршенням якості життя: у осіб з рівнем NOS3 ≤ 420 нг/л о 08⁰⁰ частіше в 1,7-2,5 рази виявляються високі показники DAS28-ШОЕ > 5,1; CDAI > 22; RAID > 6,0 (OR=2,21; 2,60; 2,37, p<0,05). У хворих на РА зниження вечірнього приросту рівня NOS3 (lg ΔNOS3 ≤ 1,50) асоціюється з коморбідною артеріальною гіпертензією (OR=3,78, p<0,05).

3. У жінок, хворих на РА, та жінок групи контролю реєструються циркадні коливання рівня sTLR2 в сироватці крові із максимальним рівнем (акрофазою) о 08⁰⁰ та мінімальним рівнем (батіфазою) о 20⁰⁰. Показники продукції sTLR2 у хворих на РА є вищими, ніж у осіб групи контролю, особливо о 08⁰⁰ (342,9±93,4 проти 181,9±67,1 нг/л, p<0,001). У хворих на РА високий рівень sTLR2 о 08⁰⁰ (> 375 нг/л) є предиктором швидкого досягнення II-III стадії за Steinbroker з чутливістю 87,5% та специфічністю 78,7%

($p=0,002$). Підвищення ранкової продукції sTLR2 асоціюється з серо(+) за АЦЦП, високою активністю захворювання за DAS28; CDAI ; RAID ($r_{sp} = 0,41 - 0,64, p<0,01$), зниженням продукції NOS3 ($r_{sp} = - (0,41-0,42), p<0,01$).

4. У хворих на РА носійство алельних варіантів поліморфізма *rs2070744* (*T-786C*) гена *NOS3* асоціюється з відмінностями циркадних ритмів продукції NOS3 та sTLR2. У носіїв генотипу *CC* порівняно з носіями алелі *T* (*TT+TC*) частіше виявляються аберантні ранкові рівні NOS3 (OR = 2,58; $p<0,05$) та sTLR2 (OR = 4,13; $p=0,001$). У носіїв генотипу *CC* приріст рівня NOS3 о 20⁰⁰ є меншим (в 1,53 та 1,32 рази, $p<0,05$), ніж у носіїв генотипів *TT* та *TC*.

5. Через 12-тижнів стандартної фармакотерапії серед хворих на РА ($n=97$) виявлено 52,6 % респондерів ACR 20 (з них 16,5% респондерів ACR 50) та 47,4% нереспондерів. За результатами множинного регресійного аналізу незалежними предикторами резистентності хворих на РА до лікування є зниження відношення ранкових рівнів NOS3 / sTLR2 ($\beta=0,366, p=0,000$) та генотип *CC* *rs2070744* гена *NOS3* ($\beta=-0,177, p=0,016$). Серед носіїв генотипу *CC* частка нереспондерів була вищою, ніж серед носіїв алелі *T* (67,4% проти 42,7%, $p=0,034$). У хворих на РА з показником NOS3 / sTLR2 $\leq 1,20$ шанси резистентності до лікування зростають втричі (OR = 3,68; 95% CI 1,60-8,46, $p=0,002$).

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. З метою оцінки впливу захворювання на стан пацієнта з РА доцільно використовувати україномовну версію опитника RAID. Індекс RAID > 6 балів свідчить про високу активність захворювання і вдвічі вищі шанси недостатньої клінічної відповіді на лікування (OR = 2,59; 95% CI 1,15-5,83).
2. З метою моніторингу перебігу захворювання у хворих на РА доцільно визначати ранковий рівень sTLR2 в сироватці крові. При встановленні рівня sTLR2 вище 375 нг/л слід очікувати швидку рентгенологічну прогресію захворювання із досягненням II-III стадії за Steinbroker до 5 років.
3. З метою прогнозування резистентності до стандартної схеми фармакотерапії із включенням метотрексату у хворих на РА з високими показниками DAS28 (> 5,1 бали) та RAID (> 6 балів) доцільно визначати відношення ранкових рівнів NOS3 / sTLR2 і при виявленні показника $\leq 1,20$ (предиктор стану «нереспондер») слід завчасно проводити корекцію лікування.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Безсмертний, Ю. О. (2013) Мутація промотора гена синтази оксиду азоту eNOS T786C у хворих з хибними суглобами довгих кісток: зв'язок з рівнем ліпідів та ендотеліальною функцією судин. *Медичні перспективи*, 18(2):73-78.
2. Букач, О. П. (2017) Асоціація T-786C поліморфізму гена ендотеліальної оксиду азоту синтази з ревматоїдним артритом у поєднанні з ожирінням, цукровим діабетом типу 2 та артеріальною гіпертензією. *Журнал клінічних та експериментальних медичних досліджень*, 5(1):720-727.
3. Букач, О. П. (2018) Динаміка гострофазових показників у хворих на ревматоїдний артрит у поєднанні з абдомінальним ожирінням, цукровим діабетом типу 2 та артеріальною гіпертензією залежно від поліморфізму гена T-786C eNOS під впливом лікування. *Міжнародний ендокринологічний журнал*, 14(1):20-25.
4. Букач, О. П. (2019) Особливості перебігу та оптимізація лікування ревматоїдного артриту в поєднанні з артеріальною гіпертензією, ожирінням та цукровим діабетом типу 2: Дис. на здобуття наук. ступ. канд. мед. наук : спец. 14.01.02 – внутрішні хвороби. Івано-Франківськ, 2019. - 258 с.
5. Букач, О. П., Сидорчук, Л. П., & Федів, О. І. (2017) Вплив T-786C поліморфізму гена ендотеліальної оксид азоту синтази на цитокіновий профіль у хворих на ревматоїдний артрит. *Клінічна та експериментальна патологія*, XVI, 1 (59):39-43.
6. Букач, О. П., Федів, О. І., & Сидорчук, Л. П. (2017) Зміни ліпідного обміну у хворих на ревматоїдний артрит із супутньою артеріальною гіпертензією, абдомінальним ожирінням та цукровим діабетом типу 2 залежно від поліморфізму гена T-786C ендотеліальної оксиду азоту синтази. *Міжнародний ендокринологічний журнал*, 13(1):104-109.
7. Букач, О. П., Федів, О. І., & Сидорчук, Л. П. (2017) Особливості перебігу

- ревматоїдного артриту залежно від поліморфізму T-786C гена ендотеліальної оксид азоту синтази. *Світ біології та медицини*, 1(59):23-27.
8. Владимиров, О. В., & Тофан, Н. І. (2003) Дослідження ролі системи L-аргінін-NO з метою профілактики та лікування серцево-судинних захворювань вагітних. *Фізіол. журн.*, 49(2):73-78.
9. Воронков, Л. Г., Горовенко, Н. Г., Мазур, І. Д., Горовенко, Н. Г., Шкурат, І. А., & Мхітарян, Л. С.(2012) Поліморфні варіанти T(-786)C і G894T гена ендотеліальної NO синтази та стан вазодилатаційної функції ендотелію у хворих із хронічною серцевою недостатністю. *Серце і судини*, 4:43-51.
10. Воронков, Л. Г., Мазур, І. Д., Горовенко, Н. Г., & Шкурат, І. А. (2013) Клініко-гемодинамічні показники та довготерміновий клінічний прогноз у пацієнтів із хронічною систолічною серцевою недостатністю залежно від поліморфізму T(-786)C промотора гена ендотеліальної NO-синтази. *Український кардіологічний журнал*, 1:50-57.
11. Гнилорыбов, А. М. (2000) Патогенез ревматоїдного синовита. І. Механізми активації кліток синовіальної оболочки и продукція цитокинов. *Укр. ревматол. журн.* 1:23–28.
12. Денесюк, В. І., Музика, Н. О. (2017) Уміст вазодилітаторних чинників у сироватці крові за різних ступенів систоло-діастолічної дисфункції лівого шлуночка у хворих на стабільну стенокардію, ускладнену серцевою недостатністю. *Львівський клінічний вісник*, 1(17):12-15.
13. Досенко, В. Е., Лутай, Я. М., Загорій, В. Ю., Пархоменко, А. Н., & Мойбенко, А. А. (2005) Частота аллельного поліморфізма гена ендотеліальної NO-синтази у больних с острым коронарным синдромом в украинской популяції. *Цитология и генетика*, 39(2):49-54.
14. Досенко, В. Є., Загорій, В. Ю., Мойбенко, О. О., & Пархоменко, О. М. (2002) Патолофізіологічні аспекти генетичного поліморфізму ендотеліальної NO-синтази. *Фізіол. журн.*, 48 (6):86–102.
15. Дроздовська, С. Б. (2012) T-786C поліморфізм промотора гена eNOS

- (ендотеліальної NO-синтази) у українських спортсменів. *Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології*, 6:46-53.
16. Дьякова, Е. Ю., Капилевич, Л. В., Захарова, А. Н., Кабачкова, А. В., Кироненко, Т. А., & Орлов, С. Н. (2017) Содержание эндотелиальной синтазы оксида азота в плазме после физических нагрузок различного характера. *Бюллетень сибирской медицины*, 16(1): 20-26.
17. Заїчко, К. О., Станіславчук, М. А., & Заїчко, Н. В. (2019) Добова варіабельність рівня розчинних тол-подібних рецепторів 2 в сироватці крові жінок, хворих на ревматоїдний артрит: зв'язок з перебігом захворювання. *Медична та клінічна хімія*. 21(4): 5-12. doi: 10.11603/mcch.2410-681X.2019.v.i4.10820
18. Заїчко, К. О., & Станіславчук, М. А. (2020) Добова варіабельність рівня ендотеліальної NO-синтази (NOS3) в сироватці крові у жінок, хворих на ревматоїдний артрит: зв'язок з перебігом захворювання. *Український ревматологічний журнал*, 1(79): 48-53. doi: 10.32471/rheumatology.2707-6970.79.13183
19. Заїчко, К.О. (2016) Алельний поліморфізм гену ендотеліальної синтази оксиду азоту NOS3 T-786C як предиктор перебігу ревматоїдного артриту. Матеріали XX міжнародного медичного конгресу студентів і молодих вчених , 25-27 квітня 2016 р., Тернопіль, 2016: 27.
20. Заїчко, К.О. (2016) Поліморфізм гену ендотеліальної синтази оксиду азоту як фактор ризику артеріальної гіпертензії у хворих на ревматоїдний артрит. Матеріали XIII міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених «Перший крок у науку», 7-8 квітня 2016 р., Вінниця, 2016: 242.
21. Заїчко, К.О., Станіславчук, М.А., Школіна, Н.В., & Веденко, Л.Б. (2017) Діагностичне значення галектину-3 у хворих на ревматоїдний артрит. Матеріали науково-практичної конференції «Стандарти діагностики та лікування в клініці внутрішніх хвороб», 25-26 квітня 2017 р., Вінниця, 2017: 94-95.

22. Заїчко, К.О., & Станіславчук, М. А. (2016) Артеріальна гіпертензія у жінок з ревматоїдним артритом: зв'язок з перебігом захворювання. Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції «Стандарти діагностики та лікування в клініці внутрішніх хвороб», 27-28 квітня 2016 р., Вінниця, 2016: 27-28.
23. Заїчко, К.О. Клініко-патогенетичне значення ендотеліальної синтази оксиду азоту у хворих на ревматоїдний артрит (2017) Матеріали VII національного конгресу ревматологів України, Київ, 18-20 жовтня 2017 р. *Укр. ревматол. журн.*, 3 (69): 58.
24. Заїчко, К.О., Школіна, Н.В., & Плазовський, Т. І. (2019) Досвід застосування опитника RAID у хворих на ревматоїдний артрит. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Стандарти діагностики та лікування в клініці внутрішніх хвороб», 25 квітня 2019 р., Вінниця, 2019: 19-20.
25. Коваленко, В. Н., Головач, И. Ю., & Борткевич, О. П. (2011) Индивидуализация лечения ревматоидного артрита: курс на достижение оптимальных результатов. *Укр. ревматол. журн.*, 3(45):5-15.
26. Коваленко, В.М., & Корнацький, В.М. (2019) Стан здоров'я народу України та медичної допомоги третинного рівня. Київ, ДУ «Національний науковий центр «Інститут кардіології імені акад. М. Д. Стражеска», 224 с.
27. Кузьміна, Л. (2009) Алельний поліморфізм гену ендотеліальної NO-синтази (eNOS) у спортсменів, які займаються підводним плаванням у ластах. *Молода спортивна наука України*, 3: 93-98.
28. Мангилёва, Т. А. (2012) Система сосудистого эндотеліального фактора роста и артериальная гипертензия. *Серце і судини*, 4:107-115.
29. Наказ МОЗ України від 11.04.2014 р. № 263. «Про затвердження та впровадження медико-технологічних документів зі стандартизації медичної допомоги при ревматоїдному артриті». Адаптована клінічна настанова, заснована на доказах. Ревматоїдний артрит. Електронний документ. Режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0263282-14>

30. Нейко, Є. М., Яцишин, Р. І., & Штефюк, О. В. (2009) Ревматоїдний артрит: сучасний погляд на проблему. *Укр. ревматол. журн.*, 2(36):35-39.
31. Панафидина, Т. А., Кондратьєва, Л. В., Герасимова, Е. В., Новикова, Д. С., & Попкова, Т. В. (2014) Коморбидність при ревматоїдному артриті. *Научно-практическа ревматология*, 52(3):283-289.
32. Пархоменко, А. Н., Кожухов, С. Н., Лутай, Я. М., Мойбенко, А. А., & Досенко, В. Е. (2008) Поліморфізм Т-786С промотора гена ендотеліальної NO-синтази: зв'язок з ефективністю тромболітичної терапії у пацієнтів з острым інфарктом міокарда. *Укр. мед. часопис*, VII/VIII, 4 (66):20-23.
33. Перебетюк, Л.С. (2015) Фіброміалгія як чинник модифікації клінічного перебігу ревматоїдного артриту. *Львівський клінічний вісник*, 2(10)-3(11):15-20.
34. Перебетюк, Л.С., & Станіславчук, М.А. (2015) Якість життя та психологічні розлади у хворих на ревматоїдний артрит: зв'язок з фіброміалгією. *ScienceRise*, 10/3(15):70-76. doi: 10.15587/2313-8416.2015.50676
35. Станіславчук М.А., Заїчко К. О., & Заїчко Н.В. (2016) Пат. №107770 Україна UA МПК (2016) А61В 5/145 (2006.01) G01N33/53 (2006.01) Спосіб прогнозування ефективності лікування ревматоїдного артриту. Заявник та патентовласник НДІ реабілітації інвалідів Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова.- № у 2015 11681; заявл. 26.11.2015; опубл. 24.06.2016; Бюл. №12.
36. Станіславчук М.А., Заїчко К. О., & Заїчко Н.В. (2016) Пат. №116869 Україна UA МПК (2016) G01N 33/50 (2006.01). Спосіб прогнозування перебігу ревматоїдного артриту за коморбідності з артеріальною гіпертензією. Заявник та патенто-власник НДІ реабілітації інвалідів ВНМУ ім. М.І. Пирогова. - № у 2016 12366; заявл. 05.12.2016; опубл. 12.06.2017; Бюл. № 11.
37. Станіславчук, М., & Заїчко, К. (2019) Крос-культуральна адаптація та

- валідизація україномовної версії RAID у хворих на ревматоїдний артрит. *Укр. ревматол. журн.*, 3 (77), 51-55.
38. Станіславчук, М.А., & Заїчко, К.О. (2015) Вміст ендотеліальної синтази оксиду азоту у хворих на ревматоїдний артрит. Збірник тез наукових робіт учасників всеукраїнської науково-практичної конференції «Актуальні питання лабораторної діагностики та медицини сьогодні» 24 лютого 2016 р., Вінниця, 2016: 58 -59.
39. Станіславчук, М.А., & Заїчко, К.О. (2015) Поліморфізм промотору гена eNOS T-786C та вміст галектину-3 в сироватці крові у жінок з ревматоїдним артритом та артеріальною гіпертензією. Матеріали науково-практичної конференції «Стандарти діагностики та лікування в клініці внутрішніх хвороб» 15-16 квітня 2015 р., Вінниця: 99.
40. Станіславчук, М.А., & Заїчко, К.О. (2015) Поліморфізм промотору гену eNOS T-786C та ефективність базисної терапії метотрексатом у хворих на ревматоїдний артрит. Матеріали VIII Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Досягнення клінічної фармакології та фармакотерапії на шляхах доказової медицини» 9-10 листопада 2015 р., Вінниця: 128-129.
41. Станіславчук, М.А., & Заїчко, К.О. (2018) Патогенетичне значення ендотеліальної NO-синтази та поліморфізму промотора гена NOS3 при ревматоїдному артриті. *Укр. ревматол. журн.*, 1 (17): 35-40.
42. Станіславчук, М.А., & Заїчко, К.О. (2019) Крос-культуральна адаптація та валідизація україномовної версії RAID у хворих на ревматоїдний артрит. *Укр. ревматол. журн.*, 3 (77): 51-55.
43. Станіславчук, М.А., & Заїчко, К.О. (2015) Поширеність поліморфізму промотора гена ендотеліальної синтази оксиду азоту eNOS T-786C у хворих на ревматоїдний артрит у Вінницькій області. Збірник матеріалів міжнародної науково-практичної конференції «Медичні науки: історія розвитку, сучасний стан та перспективи досліджень» 25-26 вересня 2015 р., Львів: 23-24.

44. Хімiон, Л. В., Ященко, О.Б., & Данилюк, С. В. (2016) Тактика ведення хворих на ревматоїдний артрит лікарем загальної практики–сімейним лікарем. *Семейная медицина*, 2 (64):6-15.
45. Шаханов, А. В., & Урясьев, О. М. (2018) Влияние полиморфизма NOS3 786С/Т на уровень оксида азота у коморбидных больных бронхиальной астмой и гипертонической болезнью. *Вестник РГМУ*, 3:56–60. doi: 10.24075/vrgmu.2018.029
46. Яковлева, Л. М., & Целуйко, В. Й. (2013) Вплив поліморфізму Т-786С гена ендотеліальної NO-синтази на прогноз та ефективність статинів у хворих з ішемічною хворобою серця при тривалому спостереженні. *Кардіоендокринологія*, 9-10:175–176.
47. Яременко, О. Б., & Микитенко, Г. М. (2008) Клінічна та лабораторна характеристика ревматоїдного артриту залежно від наявності антитіл до циклічного цитрулінованого пептиду. *Укр. ревматол. журн.*, 4 (34):51-55.
48. Яременко, О. Б., & Микитенко, Г. М. (2015) Влияние коморбидности и системных проявлений ревматоидного артрита на эффективность и переносимость лечения синтетическими базисными препаратами. *Укр. ревматол. журн.*, 1(59):28-35.
49. Afkhamizadeh, M., Sahebari, M., & Seyyed-Hoseini, S. R. (2014) Morning melatonin serum values do not correlate with disease activity in rheumatoid arthritis: a cross-sectional study. *Rheumatol Int*, 34(8):1145-1151.
50. Aguirre, J., Buttery, L., O’Shaughnessy, M., Afzal, F., Fernandez de Marticorena, I., Hukkanen... M. Polak J. (2001). Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene-Deficient Mice Demonstrate Marked Retardation in Postnatal Bone Formation, Reduced Bone Volume, and Defects in Osteoblast Maturation and Activity. *The American Journal Of Pathology*, 158(1), 247-257. doi: 10.1016/s0002-9440(10)63963-6
51. Albrecht, K. (2014) Gender-specific differences in comorbidities of rheumatoid arthritis. *Z Rheumatol*, 73(7):607-614.
52. Aletaha, D., Nell, V.P., Stamm, T., Uffmann, M., Pflugbeil, S., Machold, K.,

- & Smolen, J.S. (2005). Acute phase reactants add little to composite disease activity indices for rheumatoid arthritis: validation of a clinical activity score. *Arthritis Res Ther*, 7(4): 796-806.
53. Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A. J., Funovits, J., Felson, D. T., & Bingham, C. O. ... Hawker, G. (2010) Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis*, 69:1580–1588.
54. Alten, R., Döring, G., Cutolo, M., Gromnica-Ihle, E., Witte, S., Straub, R. & Buttgerit, F. (2010) Hypothalamus-pituitary-adrenal axis function in patients with rheumatoid arthritis treated with nighttimerelease prednisone. *J Rheumatol*, 37(10):2025–2031.
55. Alten, R., Grahn, A., Holt, R. J., Rice, P., & Buttgerit F. (2015) Delayed-release prednisone improves fatigue and health-related quality of life: findings from the CAPRA-2 double-blind randomised study in rheumatoid arthritis. *RMD Open*, 1(1): e000134 doi: 10.1136/rmdopen-2015-000134.
56. American College of Rheumatology Committee to Reevaluate Improvement Criteria. (2007) A proposed revision to the ACR20: the hybrid measure of American College of Rheumatology response. *Arthritis Rheum*, 57(2):193-202.
57. An, J. D., Li, X. Y., Yu, J. B., Zhao, Y., & Jin Z. S. (2012) Association between the eNOS gene polymorphisms and rheumatoid arthritis risk in a northern Chinese population. *Chin Med J (Engl)*, 125(8):1496-1499.
58. Anderson, H., Rahmutula, D., & Gardner, D. (2003). Tumor necrosis factor- α inhibits endothelial nitric-oxide synthase gene promoter activity in bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem*, 279(2), 963-969. doi: 10.1074/jbc.m309552200
59. Andrianakos, P., Trontzas, F., Christoyannis, E., Kaskani, Z., Nikolia, E., Tavaniotou A. ... Krachtis, P. for the ESORDIG study group. (2016) Prevalence and management of rheumatoid arthritis in the general population of Greece — the ESORDIG study. *Rheumatology*, (12):1549–1554.
60. Anea, C. B., Cheng, B., Sharma, S., Kumar, S., Caldwell, R.W., Yao L. ...

- Daniel, R. (2012) Increased superoxide and endothelial NO synthase uncoupling in blood vessels of Bmal1-knockout mice. *Circ Res*, 111: 1157–1165.
61. Anea, C. B., Zhang, M., Stepp, D. W., Simkins, G. B., Reed, G., Fulton, D. J. ... Daniel, R. (2009) Vascular disease in mice with a dysfunctional circadian clock. *Circulation*, 119: 1510–1517.
62. Arraj, M., & Lemmer, B. (2006) Circadian rhythms in heart rate, motility, and body temperature of wild-type C57 and eNOS knock-out mice under light-dark, free-run, and after time zone transition. *Chronobiol Int*, 23(4):795-812.
63. Arvidson, N. G., Gudbjörnsson, B., Elfman, L., Rydén, A.C., Tötterman, T. H., & Hällgren, R. (1994) Circadian rhythm of serum interleukin-6 in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 53(8):521-524.
64. Arvidson, N. G., Gudbjörnsson, B., Larsson, A., & Hallgren, R. (1997) The timing of glucocorticoid administration in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 56:27–31.
65. Ballara, S., Taylor, P. C., Reusch, P., Marmé, D., Feldmann, M., Ravinder, N. M., & Paleolog, E. M. (2001) Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and soluble VEGF receptor in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum*, 44:2055–2064.
66. Bannister, E., Smith, C., Visvanathan, K., Thompson, A., & Hardikar, W. (2013). TLR2 and TLR4 in healthy children: Age and gender differences. *Journal of Paediatrics and Child Health*, 49(12): 1082-1083. doi: 10.1111/jpc.12437
67. Barbour, K. E., Helmick, C. G., Boring, M., & Brady, T. J. (2017) Vital signs: prevalence of doctor-diagnosed arthritis and arthritis-attributable activity limitation - United States, 2013–2015. *MMWR*, 66: 246–253.
68. Bartok, B. & Firestein, G. S. (2010) Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev*, 233(1): 233-255.
69. Batko, B., Stajszczyk, M., Świerkot, J., Urbański, K., Raciborski, F., Jędrzejewski, M., & Wiland, P. (2019) Prevalence and clinical characteristics of

- rheumatoid arthritis in Poland: a nationwide study. *Arch Med Sci*, 15(1): 134-140.
70. Beaton, D.E., Bombardier, C., Guillemin, F., & Ferraz, M.B. (2000) Guidelines for the process of cross-cultural adaptation of self-report measures. *Spine*, 25: 3186–3191
71. Bertin, D., Dubucquoi, S., Lakomy, D., Deleplancque, A. S., & Desplat-Jégo, S. (2016) Diagnostic performance of a new vimentin-derived ACPA (CCP high sensitive) in patients with rheumatoid arthritis. *Immunol Res*, 64(2):455-460.
72. Bianchi, G., Caporali, R., Todoerti, M., & Mattana, P. (2016) Methotrexate and rheumatoid arthritis: current evidence regarding subcutaneous versus oral routes of administration. *Adv Ther*, 33(3):369-378.
73. Bir, S. C., Xiong, Y., Kevil, C. G., & Luo, L. (2012) Emerging role of PKA/eNOS pathway in therapeutic angiogenesis for ischaemic tissue diseases. *Cardiovasc Res*, 95(1):7-18.
74. Blais, V., & Rivest, S. (2001). Inhibitory action of nitric oxide on circulating tumor necrosis factor-induced NF- κ B activity and COX-2 transcription in the endothelium of the brain capillaries. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 60(9), 893-905. doi: 10.1093/jnen/60.9.893
75. Boissier, M. C., Semerano, L., Challal, S., Saidenberg-Kermanac'h, N., & Falgarone, G. (2012) Rheumatoid arthritis: from autoimmunity to synovitis and joint destruction. *J Autoimmun*, 39(3):222–228.
76. Boyadzieva, V. V., Stoilov, N., Stoilov, R. M., Tachkov, K., Kamusheva, M., Mitov, K., & Petrova, G.,I. (2018) Quality of life and cost study of rheumatoid arthritis therapy with biological medicines. *Front Pharmacol*, 9:794. doi: 10.3389/fphar.2018.00794
77. Boyd, A., Shivshankar, P., Jiang, S., Berton, M., & Orihuela, C. (2012). Age-related defects in TLR2 signaling diminish the cytokine response by alveolar macrophages during murine pneumococcal pneumonia. *Experimental Gerontology*, 47(7), 507-518. doi: 10.1016/j.exger.2012.04.004

78. Brennan, F., & Beech J. (2007) Update on cytokines in rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol*, 19:296-301.
79. Brenol, C., Chies, J., Brenol, J., Monticciolo, O., Franciscatto, P., Birriel, F., ... Xavier, R. M. (2008). Endothelial nitric oxide synthase T-786C polymorphism in rheumatoid arthritis: association with extraarticular manifestations. *Clinical Rheumatology*, 28(2), 201-205. doi: 10.1007/s10067-008-1018-6
80. Brentano, F., Kyburz, D., Schorr, O., Gay, R., & Gay, S. (2005) The role of Toll-like receptor signalling in the pathogenesis of arthritis. *Cell Immunol*, 233:90–96.
81. Bruce, B., & Fries, J. F. (2003) The Stanford Health Assessment Questionnaire: Dimensions and Practical Applications. Health and Quality of Life Outcomes. Published online: doi:10.1186/1477-7525-1-20
82. Buckley, F., Finckh, A., Huizinga, T.W., Dejonckheere, F., & Jansen, J.P. (2015) Comparative efficacy of novel DMARDs as monotherapy and in combination with methotrexate in rheumatoid arthritis patients with inadequate response to conventional DMARDs: a network meta-analysis. *J Manag Care Spec Pharm*, 21(5):409–423.
83. Bunjevacki, V., Maksimovic, N., Jekic, B., Milic, V., Lukovic, L., Novakovic, I. ... Damnjanovic, T. (2015). Polymorphisms of the eNOS gene are associated with disease activity in rheumatoid arthritis. *Rheumatology International*, 36(4), 597-602. doi: 10.1007/s00296-015-3401-3
84. Buttgereit, F., Doering, G., Schaeffler, A., Witte, S., Sierakowski, S., Gromnica-Ihle, E., ... Alten, R. (2008) Efficacy of modified-release versus standard prednisone to reduce duration of morning stiffness of the joints in rheumatoid arthritis (CAPRA-1): a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet*, 371:205–214.
85. Buttgereit, F., Doering, G., Schaeffler, A., Witte, S., Sierakowski, S., & Gromnica-Ihle E, ... Alten R. (2010) Targeting pathophysiological rhythms: prednisone chronotherapy shows sustained efficacy in rheumatoid arthritis. *Ann*

Rheum Dis, 69:1275–1280.

86. Caballero-Alías, A., Loveridge, N., Pitsillides, A., Parker, M., Kaptoge, S., Lyon, A., & Reeve, J. (2004). Osteocytic expression of constitutive NO synthase isoforms in the femoral neck cortex: a case-control study of intracapsular hip fracture. *Journal of Bone and Mineral Research*, 20(2), 268-273. doi: 10.1359/jbmr.041103
87. Carrillo-Vico, A., Lardone, P. J., Fernández-Santos, J. M., Martín-Lacave, I., Calvo, J. R., Karasek, M., ... Guerrero, J. M. (2005) Human lymphocyte-synthesized melatonin is involved in the regulation of the interleukin-2/interleukin-2 receptor system. *J Clin Endocrinol Metab*, 90(2):992-1000.
88. Casas, J., Cavalleri, G., Bautista, L., Smeeth, L., Humphries, S., & Hingorani, A. (2006). Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular disease: A HuGE Review. *American Journal of Epidemiology*, 164(10), 921-935. doi: 10.1093/aje/kwj302
89. Cattaneo, M., Vanetti, C., Decimo, I., Di Chio, M., Martano, G., Garrone, G., ... Vicentini, L.M. (2017). Sex-specific eNOS activity and function in human endothelial cells. *Scientific Reports*, 7(1). doi: 10.1038/s41598-017-10139-x
90. Cau, S., Carneiro, F., & Tostes, R. (2012). Differential modulation of nitric oxide synthases in aging: therapeutic opportunities. *Frontiers In Physiology*, 3: 218. doi: 10.3389/fphys.2012.00218
91. Cho, K., Demissie, S., Dupuis, J., Cupples, L., Kathiresan, S., Beck, T., ... Kiel, D.P. (2008). Polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene and bone density/ultrasound and geometry in humans. *Bone*, 42(1), 53-60. doi: 10.1016/j.bone.2007.09.051
92. Cho, M. L., Ju, J. H., Kim, H. R., Oh, H. J., Kang, C. M., Jhun J. Y., ... Kima, H.Y. (2007) Toll-like receptor 2 ligand mediates the upregulation of angiogenic factor, vascular endothelial growth factor and interleukin-8/CXCL8 in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Immunol Lett*, 108(2):121-128.
93. Choy, E., Ganeshalingam, K., Semb, A. G., Szekanecz, Z., & Nurmohamed,

- M. (2014) Cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: recent advances in the understanding of the pivotal role of inflammation, risk predictors and the impact of treatment. *Rheumatology*, 53(12):2143–2154, doi:10.1093/rheumatology/keu224
94. Chuffa, L. G., Fioruci-Fontanelli, B. A., Mendes, L. O., Ferreira Seiva, F. R., Martinez, M., Fávaro, W. J., ... Martinez, F.E. (2015) Melatonin attenuates the TLR4-mediated inflammatory response through MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways in an in vivo model of ovarian cancer. *BMC Cancer*, 15:34; doi:10.1186/s12885-015-1032
95. Conigliaro, P., Chimenti, M. S., Triggianese, P., Sunzini, F., Novelli, L., Perricone, C., & Perricone, R. (2016) Autoantibodies in inflammatory arthritis. *Autoimmun. Rev*, 15(7):673-683. doi: 10.1016/j.autrev.2016.03.003.
96. Costa, C., Incio, J., & Soares, R. (2007). Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? *Angiogenesis*, 10(3): 149-166. doi: 10.1007/s10456-007-9074-0
97. Crabtree, M. J., Hale, A. B., & Channon, K. M. (2011) Dihydrofolate reductase protects endothelial nitric oxide synthase from uncoupling in tetrahydrobiopterin deficiency. *Free Radic Biol Med*, 50(11): 1639–1646. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.03.010
98. Cutolo, M. (2016) Glucocorticoids and chronotherapy in rheumatoid arthritis. *RMD Open*, 2(1):e000203. doi: 10.1136/rmdopen-2015-000203.
99. Cutolo, M., Iaccarino, L., Doria, A., Govoni, M., Sulli, A., & Marcassa, C. (2013) Efficacy of the switch to modified-release prednisone in rheumatoid arthritis patients treated with standard glucocorticoids. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 31:498-505.
100. Cutolo, M., Maestroni, G., J., M., Otsa, K., Aakre, O., Villaggio, B., Capellino, S., ... Sulli, A. (2005) Circadian melatonin and cortisol levels in rheumatoid arthritis patients in winter time: a north and south Europe comparison. *Ann Rheum Dis*, 64:212-216. doi: 10.1136/ard.2004.023416
101. Cutolo, M., Spies, C.M., Buttgerit, F., Paolino, S., & Pizzorni, C. (2014)

- The supplementary therapeutic role of low-dose glucocorticoids in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 16(2). doi: 10.1186/ar4685
102. Cutolo, M., Villaggio, B., Candido, F., Valenti, S., Giusti, M., Felli, L., ... Accardo S. (1999) Melatonin influences interleukin-12 and nitric oxide production by primary cultures of rheumatoid synovial macrophages and THP-1 cells. *Ann N Y Acad Sci*, 876:246-254.
103. Davignon, J. L., Hayder, M., Baron, M., Boyer, J. F., Constantin, A., Apparailly F. ... Cantagrel, A. (2013) Targeting monocytes/macrophages in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*,52(4):590-598.
104. DeKorver, N. W., Chaudoin, T. R., & Bonasera, S. J. (2017) Toll-Like Receptor 2 Is a Regulator of Circadian Active and Inactive State Consolidation in C57BL/6 Mice. *Front Aging Neurosci*,9:219. doi:10.3389/fnagi.2017.00219
105. Delp, M., Behnke, B., Spier, S., Wu, G., & Muller-Delp, J. (2008). Ageing diminishes endothelium-dependent vasodilatation and tetrahydrobiopterin content in rat skeletal muscle arterioles. *The Journal of Physiology*, 586(4):1161-1168. doi: 10.1113/jphysiol.2007.147686
106. Dai, Q., Li, Y., Wang, M., Li, Y., & Li, J. (2020) TLR2 and TLR4 are involved in the treatment of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts with a medicated serum of asarinin through inhibition of Th1/Th17 cytokines. *Exp Ther Med*, 19(4):3009-3016. doi: 10.3892/etm.2020.8557.
107. Denesyuk, V., & Muzyka, N. (2017) The influence of the additional usage of L-arginine on the factors of vasodilation and the clinical data, complicated with cardiac decompensation with reduced and preserved fracture of the left ventricle that patients with stable coronary heart disease have. *Asian Journal of Science and Technology*, 8(4):4689-4692.
108. Denesyuk, V., Denesyuk, O., & Muzyka, N. (2016). The remodeling of left atrium and vasodilation factors changes in ischemic heart failure. *International Journal of Medicine and Medical Research*, 2(2):5-9. doi: 10.11603/ijmmr.2413-6077.2016.2.7038
109. Dey, P., Panga, V., & Raghunathan, S. (2016). A cytokine signalling

- network for the regulation of inducible nitric oxide synthase expression in rheumatoid arthritis. *PLOS ONE*, 11(9), e0161306. doi: 10.1371/journal.pone.0161306
110. Deyab, G., Hokstad, I., Whist, J., Smastuen, M., Agewall, S., Lyberg, T., ... Hollan, I. (2017). Methotrexate and anti-tumor necrosis factor treatment improves endothelial function in patients with inflammatory arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 19(232). doi: 10.1186/s13075-017-1439-1
111. Ding, H., Hong, C., Wang, Y., Liu, J., Zhang, N., Shen, C., ... Zheng F. (2014) Calreticulin promotes angiogenesis via activating nitric oxide signalling pathway in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*, 178:236-244.
112. Dougados, M., Soubrier, M., Antunez, A., Balint, P., Balsa, A., Buch, M. H., Kay, J. (2014) Prevalence of comorbidities in rheumatoid arthritis and evaluation of their monitoring: results of an international, cross-sectional study (COMORA). *Ann Rheum Dis.*, 73(1):62-68.
113. Eektimmerman, F., Allaart, C. F., Hazes, J. M., den Broeder, A. A., Fransen, J., Swen, J. J., ... Guchelaar, H.J. (2019) Validation of a clinical pharmacogenetic model to predict methotrexate nonresponse in rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics*, 20(2):85-93.
114. Elshabrawy, H., Chen, Z., Volin, M., Ravella, S., Virupannavar, S., & Shahrara, S. (2015). The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Angiogenesis*, 18(4): 433-448. doi: 10.1007/s10456-015-9477-2
115. Forrest, C. M., Mackay, G. M., Stoy, N., Stone, T. W., & Darlington, L. G. (2007). Inflammatory status and kynurenine metabolism in rheumatoid arthritis treated with melatonin. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 64(4): 517–526. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2007.02911.x>
116. Frank, M., Hennenberg, E., Eyking, A., Rünzi, M., Gerken, G., Scott, P., ... Cario, E. (2015). TLR Signaling Modulates Side Effects of Anticancer Therapy in the Small Intestine. *The Journal of Immunology*, 194(4): 1983-1995. doi: 10.4049/jimmunol.1402481
117. Fransen, J., Welsing, P. M., de Keijzer R. M., & van Riel, P. L. (2003)

- Disease activity scores using C-reactive protein: CRP may replace ESR in the assessment of RA disease activity. *Ann Rheum Dis*, 62:151.
118. Fritzsche, C., Schleicher, U., & Bogdan, C. (2010) Endothelial nitric oxide synthase limits the inflammatory response in mouse cutaneous leishmaniasis. *Immunobiology*, 215:826–832.
119. Galligan, C. L., Keystone, E. C., & Fish, E. N. (2016) Fibrocyte and T cell interactions promote disease pathogenesis in rheumatoid arthritis. *J Autoimmun*, 69:38-50. doi:10.1016/j.jaut.2016.02.008.
120. Garcia-Mauriño, S., Gonzalez-Haba, M. G., Calvo, J. R., Rafii-El-Idrissi, M., Sanchez-Margalet, V., Goberna, R., & Guerrero, J. M. (1997) Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J Immunol*, 159(2):574-581.
121. Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Maltezos, E., Athanassou, N., Papazoglou, D., Gatter, K. C., & Michael, I. K. (2003) Upregulated hypoxia inducible factor-1alpha and -2alpha pathway in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*, 5(4):193-201.
122. Gibbs, J. E., & Ray, D. W. (2013) The role of the circadian clock in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 15(1):205. doi:10.1186/ar4146
123. Glueck, C. (2007). Association between the T-786C eNOS polymorphism and idiopathic osteonecrosis of the head of the femur. *The Journal of Bone and Joint Surgery (American)*, 89(11): 2460. doi: 10.2106/jbjs.f.01421
124. Glueck, C., Valdes, A., Bowe, D., Munsif, S., & Wang, P. (2013). The endothelial nitric oxide synthase T-786c mutation, a treatable etiology of Prinzmetal's angina. *Translational Research*, 162(1): 64-66. doi: 10.1016/j.trsl.2013.03.003
125. Golser, R., Gorren, A., Mayer, B., & Schmidt, K. (2003). Functional characterization of Glu298Asp mutant human endothelial nitric oxide synthase purified from a yeast expression system. *Nitric Oxide*, 8(1): 7-14. doi: 10.1016/s1089-8603(02)00131-3

126. Gonzalez-Gay, M.A., Llorca, J., Palomino-Morales, R., Gomez-Acebo, I., Gonzalez-Juanatey, C., & Martin, J. (2009) Influence of nitric oxide synthase gene polymorphisms on the risk of cardiovascular events in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*, 27 (1):116-119.
127. González-González, A., González, A., Rueda, N., Alonso-González, C., Menéndez-Menéndez, J., Gómez-Arozamena, J., & Cos S. (2019). Melatonin enhances the usefulness of ionizing radiation: involving the regulation of different steps of the angiogenic process. *Frontiers in Physiology*, 10. doi: 10.3389/fphys.2019.00879
128. Gossec, L., Paternotte, S., Aanerud, G., Balanescu, A., Boumpas, D., Carmona, L. & Kvien, T. K. (2011). Finalisation and validation of the rheumatoid arthritis impact of disease score, a patient-derived composite measure of impact of rheumatoid arthritis: a EULAR initiative. *Annals of The Rheumatic Diseases*, 70(6): 935-942. doi: 10.1136/ard.2010.142901
129. Grumbach, I., Chen, W., Mertens, S., & Harrison, D. (2005). A negative feedback mechanism involving nitric oxide and nuclear factor kappa-B modulates endothelial nitric oxide synthase transcription. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 39(4): 595-603. doi: 10.1016/j.yjmcc.2005.06.012
130. Gu, Z., Zhang, Y., & Qiu, G. (2015) Promoter polymorphism T-786C, 894G→T at exon 7 of endothelial nitric oxide synthase gene are associated with risk of osteoporosis in Sichuan region male residents. *Int J Clin Exp Pathol*. 8(11):15270-15274.
131. Hadi, M.A, Rao, N.G., & Rao, A.S. (2015) Formulation and evaluation of mini-tablets-filled-pulsincap delivery of lornoxicam in the chronotherapeutic treatment of rheumatoid arthritis. *Pak J Pharm Sci*, 28:185–193.
132. Hagen, M., Englbrecht, M., Haschka, J., Reiser, M., Kleyer, A., Hueber, A., ... Rech, J. (2019) Cost-effective tapering algorithm in rheumatoid arthritis patients: combination of Multibiomarker Disease Activity Score and autoantibody status. *J Rheumatol*, 46(5):460-466. doi: 10.3899/jrheum.180028.
133. Hanefeld, M., Engelmann, K., Appelt, D., Sandner, D., Weigmann, I., Ganz,

- X., ... Birkenfeld, A. L. (2017) Intra-individual variability and circadian rhythm of vascular endothelial growth factors in subjects with normal glucose tolerance and type 2 diabetes. *PLoS One*, 12(10):e0184234. doi: 10.1371/journal.pone.0184234.
134. Hedström, A. K., Stawiarz, L., Klareskog, L., & Alfredsson L. (2018) Smoking and susceptibility to rheumatoid arthritis in a Swedish population-based case-control study. *Eur J Epidemiol*, 33(4):415-423.
135. Heidari, B., Firouzjahi, A., Heidari, P., & Hajian, K. (2009). The prevalence and diagnostic performance of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in rheumatoid arthritis: the predictive and discriminative ability of serum antibody level in recognizing rheumatoid arthritis. *Annals of Saudi Medicine*, 29(6): 467-470. doi: 10.5144/0256-4947.2009.467
136. Helmick, C. G., Felson, D. T., Lawrence, R. C., Gabriel, S., Hirsch, R., Kwoh, C. K., ... John, H. S. (2008) Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States-Part I. *Arthritis & Rheum*, 58(1):15-25.
137. Herman, S., Fischer, A., Pfatschbacher, J., Hoffmann, M., & Steiner, G. (2011). A TLR 9 antagonist diminishes arthritis severity in a rat model of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 70 (Suppl 2): 39. doi: 10.1136/ard.2010.148973.8
138. Hernández-Cruz, B., Márquez-Saavedra, E., Caliz-Caliz, R., & Navarro-Sarabia, F. (2016) Comparative effectiveness of treatment with the first TNF antagonist in monotherapy, the first TNF antagonist plus one conventional synthetic disease-modifying antirheumatic drug, and the first TNF antagonist plus two or more conventional synthetic disease-modifying antirheumatic drugs in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 18(1):259. doi:10.1186/s13075-016-1137-4
139. Hetlanda, M.L, Christensenb, I. J., Lottenburgerc, T., Johansend, J. S., Svendsenb, M. N., Hørslev-Petersenc, K., ... Nielsen, H.J. (2008) Press Circulating VEGF as a biological marker in patients with rheumatoid arthritis?

- Preanalytical and biological variability in healthy persons and in patients. *Disease Markers*, 24: 1-10.
140. Hirata, S., & Tanaka, Y. (2016) Assessment of disease activity in rheumatoid arthritis by multi-biomarker disease activity (MBDA) score. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*, 39(1):37-41.
141. Hochberg, M., Chang, R., Dwosh, I., Lindsey, S., Pincus, T., & Wolfe, F. (1992). The american college of rheumatology 1991 revised criteria for the classification of global functional status in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 35(5): 498-502. doi: 10.1002/art.1780350502
142. Holten, K., Sexton, J., Kvien, T., Aga, A., & Haavardsholm, E. (2018). Comparative analyses of responsiveness between the Rheumatoid Arthritis Impact of Disease score, other patient-reported outcomes and disease activity measures: secondary analyses from the ARCTIC study. *RMD Open*, 4(2), e000754. doi: 10.1136/rmdopen-2018-000754
143. Hossain, M., Morandi, E., Tanasescu, R., Frakich, N., Caldano, M., Onion, D., ... Gran, B. (2018). the soluble form of toll-like receptor 2 is elevated in serum of multiple sclerosis patients: a novel potential disease biomarker. *Frontiers In Immunology*, 9. doi: 10.3389/fimmu.2018.00457
144. Houssen, M., El-Mahdy, R., & Shahin, D. (2014). Serum soluble toll-like receptor 2: a novel biomarker for systemic lupus erythematosus disease activity and lupus-related cardiovascular dysfunction. *International Journal of Rheumatic Diseases*, 19(7): 685-692. doi: 10.1111/1756-185x.12452
145. Hu, F., Li, Y., Zheng, L., Shi, L., Liu, H., Zhang, X., & Li, Z. (2014) Toll-like receptors expressed by synovial fibroblasts perpetuate Th1 and Th17 Cell responses in rheumatoid arthritis. *PLoS ONE*, 9(6): e100266. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100266>
146. Huber, R., Kunisch, E., Glück, B., Egerer, R., Sickinger, S., & Kinne, R. (2003). Comparison of conventional and real-time RT-PCR for the quantitation of jun protooncogene mRNA and analysis of jun B mRNA expression in synovial membranes and isolated synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis

- patients. *Zeitschrift für Rheumatologie*, 62(4): 378-389. doi: 10.1007/s00393-003-0472-4
147. Hutcheson, J., & Perlman, H. (2008). BH3-only proteins in rheumatoid arthritis: potential targets for therapeutic intervention. *Oncogene*, 27(S1): 168-175. doi: 10.1038/onc.2009.54
148. Hyndman, M., Parsons, H., Verma, S., Bridge, P., Edworthy, S., Jones, C. ... Anderson T. J. (2002). The T-786→C mutation in endothelial nitric oxide synthase is associated with hypertension. *Hypertension*, 39(4): 919-922. doi: 10.1161/01.hyp.0000013703.07316.7f
149. Ishiuchi, N., Yoshino, S., Yokoyama, M., & Asano, G. (1999) Expression of endothelial nitric oxide synthase and inducible nitric oxide synthase in synovium of rheumatoid arthritis. *Ryumachi*, 39(5):749-756.
150. Jansen, J. P., Buckley, F., Dejonckheere, F., & Ogale, S. (2014) Comparative efficacy of biologics as monotherapy and in combination with methotrexate on patient reported outcomes (PROs) in rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to conventional DMARDs--a systematic review and network meta-analysis. *Health Qual Life Outcomes*, 12:102. doi:10.1186/1477-7525-12-102
151. Jenko, B., Tomšič, M., Jekić, B., Milić, V., Dolžan, V., & Praprotnik, S. (2018) Clinical pharmacogenetic models of treatment response to methotrexate monotherapy in slovenian and serbian rheumatoid arthritis patients: differences in patient's management may preclude generalization of the models. *Front Pharmacol*, 9:20. doi: 10.3389/fphar.2018.00020.
152. Jensen, L. D., Gyllenhaal, C., & Block, K. (2014) Circadian angiogenesis. *BioMol Concepts*, 5(3): 245–256; doi: <https://doi.org/10.1515/bmc-2014-0009>
153. Jiang, S., Li, Y., Lin, T., Yuan, L., Li, Y., Wu, S., ... Lu, J. (2016). IL-35 inhibits angiogenesis through VEGF/Ang2/Tie2 pathway in rheumatoid arthritis. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 40 (5): 1105-1116. doi: 10.1159/000453165
154. Jung, S. M., Kwok, S. K., Ju, J. H., Lee, S. W., Song, J. J., Yoon, C. H., ...

- Park, S. H. (2018) Risk factors associated with inadequate control of disease activity in elderly patients with rheumatoid arthritis: Results from a nationwide Korean College of Rheumatology BIOlogics (KOBIO) registry. *PLoS One*, 13(10):e0205651. doi:10.1371/journal.pone.0205651
155. Jung, Y., Isaacs, J., Lee, S., Trepel, J., & Neckers, L. (2003). IL-1 β -mediated up-regulation of HIF-1 α via an NF κ B/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *The FASEB Journal*, 17(14): 2115-2117. doi: 10.1096/fj.03-0329fje
156. Jurga, A., Rojewska, E., Piotrowska, A., Makuch, W., Pilat, D., Przewlocka, B., & Mika, J. (2016). Blockade of Toll-Like Receptors (TLR2, TLR4) attenuates pain and potentiates buprenorphine analgesia in a rat neuropathic pain model. *Neural Plasticity*, 2016: 1-12. doi: 10.1155/2016/5238730
157. Karantzoulis-Fegaras, F., Antoniou, H., Lai, S., Kulkarni, G., D'Abreo, C., Wong, G., ... Marsden, P.A. (1999). Characterization of the human endothelial nitric-oxide synthase promoter. *Journal of Biological Chemistry*, 274(5): 3076-3093. doi: 10.1074/jbc.274.5.3076
158. Karouzakis, E., Neidhart, M., Gay, R. E., & Gay, S. (2006) Molecular and cellular basis of rheumatoid joint destruction. *Immunol Lett*, 106:8–13.
159. Kavanaugh, A., & Wells, A. F. (2014) Benefits and risks of low-dose glucocorticoid treatment in the patient with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 53(10): 1742–1751. doi: 10.1093/rheumatology/keu135
160. Kim, H., Kim, K., Kim, B., Cho, M., & Lee, S. (2015). The effect of vascular endothelial growth factor on osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *PLOS ONE*, 10(4): e0124909. doi: 10.1371/journal.pone.0124909
161. Kim, K., Cho, M., Lee, S., Oh, H., Kang, C., Ju, J., ... Kim, H.Y. (2007). Human rheumatoid synovial fibroblasts promote osteoclastogenic activity by activating RANKL via TLR-2 and TLR-4 activation. *Immunology Letters*, 110(1): 54-64. doi: 10.1016/j.imlet.2007.03.004
162. Kirwan, J. R., Clarke, L., Hunt, L. P., Perry, M. G., Straub, R. H., & Jessop, D. S. (2010) Effect of novel therapeutic glucocorticoids on circadian rhythms of

- hormones and cytokines in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci*,1193:127-133. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05289.x.
163. Koivula, M. K., Aman, S., Karjalainen, A., Hakala, M., & Risteli, J. (2005) Are there autoantibodies reacting against citrullinated peptides derived from type I and type II collagens in patients with rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis*, 64:1443-1450.
164. Kostin, A., McGinty, D., Szymusiak, R., & Alam, M. N. (2013) Sleep-wake and diurnal modulation of nitric oxide in the perifornical-lateral hypothalamic area: real-time detection in freely behaving rats. *Neuroscience*, 254:275-284. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.09.022.
165. Kouri, V. P., Olkkonen, J., Kaivosoja, E., Ainola, M., Juhila, J., Hovatta, I., ... Mandelin, J. (2013) Circadian timekeeping is disturbed in rheumatoid arthritis at molecular level. *PLoS One*, 8(1):e54049. doi: 10.1371/journal.pone.0054049.
166. Kowanko, I.C., Pownall, R., Knapp, M.S., Swannell, A. J., & Mahoney, P. G. (1981) Circadian variations in the signs and symptoms of rheumatoid arthritis and in the therapeutic effectiveness of flurbiprofen at different times of day. *Br J Clin Pharmacol*, 11:477–484.
167. Krasselt, M., & Baerwald, C.(2016) Efficacy and safety of modified-release prednisone in patients with rheumatoid arthritis. *Drug Des Devel Ther*,10:1047-1058. doi:10.2147/DDDT.S87792
168. Krishnaveni, D., Chand, B. A., Kumar, S., Devi, M. U., Ramanna M, Jyothy, A., ... Venkateshwari, A. (2015) Association of endothelial nitric oxide synthase gene T-786C promoter polymorphism with gastric cancer. *World J Gastrointest Oncol*, 7(7):87-94. doi: 10.4251/wjgo.v7.i7.87.
169. Kunieda, T., Minamino, T., Miura, K, Katsuno, T., Tateno, K., Miyauchi H, ... Komuro, I. (2008) Reduced nitric oxide causes age-associated impairment of circadian rhythmicity. *Circ Res*, 102(5):607-614. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.162230.
170. Kypreos, K., Zafirovic, S., Petropoulou, P., Bjelogrljic, P., Resanovic, I.,

- Traish, A., & Isenovic, E. (2014). Regulation of endothelial nitric oxide synthase and high-density lipoprotein quality by estradiol in cardiovascular pathology. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 19(3): 256-268. doi: 10.1177/1074248413513499
171. Lacerte, P., Brunet, A., Egarnes, B., Duchêne, B., Brown, J., & Gosselin, J. (2016). Overexpression of TLR2 and TLR9 on monocyte subsets of active rheumatoid arthritis patients contributes to enhance responsiveness to TLR agonists. *Arthritis Research & Therapy*, 18(1). doi: 10.1186/s13075-015-0901-1
172. Lancaster, G. I., Khan, Q., Drysdale, P., Wallace, F., Jeukendrup, A. E., Drayson, M. T., & Gleeson, M. (2005) The physiological regulation of toll-like receptor expression and function in humans. *J Physiol*, 563(Pt 3):945-955.
173. Langjahr, P., Díaz-Jiménez, D., De la Fuente, M., Rubio, E., Golenbock, D., Bronfman, F., ... Hermoso, M. A. (2014). Metalloproteinase-dependent TLR2 ectodomain shedding is involved in soluble toll-like receptor 2 (sTLR2) production. *Plos ONE*, 9(12), e104624. doi: 10.1371/journal.pone.0104624
174. Lee, D. G., Woo, J. W., Kwok, S. K., Cho, M. L., & Park, S. H. (2013) MRP8 promotes Th17 differentiation via upregulation of IL-6 production by fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Exp Mol Med*, 45. Published online: doi: 10.1038/emm.2013.39.
175. Lee, K., Kim, J., Kwak, S., Lee, K., Lee, D., Ha, K., ... Kim, Y.M. (2014). Functional role of NF- κ B in expression of human endothelial nitric oxide synthase. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 448 (1): 101-107. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.04.079
176. Li, D., Yang, Z., Kang, P., & Xie, X. (2016) Subcutaneous administration of methotrexate at high doses makes a better performance in the treatment of rheumatoid arthritis compared with oral administration of methotrexate: a systematic review and meta-analysis. *Semin Arthritis Rheum*, 45(6):656–662.
177. Li, H., & Wan, A. (2013). Apoptosis of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes: possible roles of nitric oxide and the thioredoxin 1. *Mediators of Inflammation*, 2013: 1-8. doi: 10.1155/2013/953462

178. Lima, A., Monteiro, J., Bernardes, M., Sousa, H., Azevedo, R., Seabra, V., & Medeiros, R. (2014). Prediction of methotrexate clinical response in portuguese rheumatoid arthritis patients: implication of MTHFRrs1801133 and ATICrs4673993 polymorphisms. *Biomed Research International*, 2014: 1-11. doi: 10.1155/2014/368681
179. Lissoni, P., Rovelli, F., Brivio, F., Brivio, O., & Fumagalli, L.(1998) Circadian secretions of IL-2, IL-12, IL-6 and IL-10 in relation to the light/dark rhythm of the pineal hormone melatonin in healthy humans. *Nat Immun*, 16(1):1-5.
180. Liu, D., Zhang, Y., Hu, B., Zhang, J., & Zhao, Q. (2015). Association of AT1R polymorphism with hypertension risk: An update meta-analysis based on 28,952 subjects. *Journal Of The Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 16(4): 898-909. doi: 10.1177/1470320315584096
181. Liu, H. (2003). The role of apoptosis in rheumatoid arthritis. *Current Opinion In Pharmacology*, 3(3): 317-322. doi: 10.1016/s1471-4892(03)00037-7
182. Liu, Y., Mladinov, D., Pietrusz, J., Usa, K., & Liang, M. (2008). Glucocorticoid response elements and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases in the regulation of endothelial nitric oxide synthase expression. *Cardiovascular Research*, 81(1): 140-147. doi: 10.1093/cvr/cvn231
183. Liu, Y., Yin, H., Zhao, M., & Lu, Q. (2014) TLR2 and TLR4 in autoimmune diseases: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol*, 47(2):136-147.
184. Luo, J., Song, J., Zhang, H., Zhang, F., Liu, H., & Li, L., ... Zhou, R. (2018). Melatonin mediated Foxp3-downregulation decreases cytokines production via the TLR2 and TLR4 pathways in H. pylori infected mice. *International Immunopharmacology*, 64: 116-122. doi: 10.1016/j.intimp.2018.08.034
185. Luo, Y., Zhao, Y., Li, X., Zhao, J., & Zhang, W. (2014). ZNF580 mediates eNOS expression and endothelial cell migration/proliferation via the TGF- β 1/ALK5/Smad2 pathway. *Molecular And Cellular Biochemistry*, 393(1-2): 199-207. doi: 10.1007/s11010-014-2061-z

186. Luque, R. A., Redeker, I., Hoffmann, F., Callhoff, J., Zink A, & Albrecht K. (2019) Comorbidities in patients with rheumatoid arthritis and their association with patient-reported outcomes: results of Claims Data Linked to Questionnaire Survey. *J Rheumatol*. doi: 10.3899/jrheum.180668.
187. Lv, S., Fan, H., Li, J., Yang, H., Huang, J., Shu, X., ... Xiao, C. (2018) Genetic polymorphisms of TYMS, MTHFR, ATIC, MTR, and MTRR are related to the outcome of methotrexate therapy for rheumatoid arthritis in a Chinese population. *Front Pharmacol*, 9:1390. doi: 10.3389/fphar.2018.01390.
188. Maestroni, G.J.M. (2002) MLT and the immune-hematopoietic system. in: Olcese J. (eds) Melatonin After Four Decades. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 460. doi: https://doi.org/10.1007/0-306-46814-X_47
189. Mangoni, A., Tommasi, S., Zinellu, A., Sotgia, S., Carru, C., Piga, M., & Erre, G. (2018). Repurposing existing drugs for cardiovascular risk management: a focus on methotrexate. *Drugs In Context*, 7, 1-12. doi: 10.7573/dic.212557
190. Markowska, A., Liu, F., & Panjwani, N. (2010). Galectin-3 is an important mediator of VEGF- and bFGF-mediated angiogenic response. *J Exp Med*, 207(9): 1981–1993. doi: 10.1084/jem.20090121
191. Marsden, P. A., Heng, H. H., Scherer, S. W., Stewart, R. J., Hall, A. V., Shi, X. M., ... Schappert, K. T. (1993) Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem*, 268(23):17478-17488.
192. Maruotti, N., Cantatore, F. P., Crivellato, E., Vacca, A., & Ribatti, D.(2006) Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Histol. Histopathol*, 21(5):557-566.
193. Masson-Bessière, C., Sebbag, M., Girbal-Neuhauser, E., Nogueira, L, Vincent, C., Senshu, T., & Serre, G. (2001) The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the α - and β -chains of fibrin. *J Immunol*, 166:4177–4184.
194. Mateen, S., Zafar, A., Moin, S., Khan, A. Q., & Zubair, S. (2016) Understanding the role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.

- Clin Chim Acta*, 455:161-171. doi: 10.1016/j.cca.2016.02.010.
195. Mathsson, L., Mullazehi, M., Wick, M. C., Sjöberg, O., van Vollenhoven, R., Klareskog, L., & Rönnelid, J. (2008) Antibodies against citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis: higher sensitivity and extended prognostic value concerning future radiographic progression as compared with antibodies against cyclic citrullinated peptides. *Arthritis Rheum*, 58(1):36-45.
196. McGarry, T., Biniecka, M., Gao, W., Cluxton, D., Canavan, M., Wade, S., ... Fearon, U. (2017). Resolution of TLR2-induced inflammation through manipulation of metabolic pathways in Rheumatoid Arthritis. *Scientific Reports*, 7(1). doi: 10.1038/srep43165
197. McGarry, T., Veale, D., Gao, W., Orr, C., Fearon, U., & Connolly, M. (2015). Toll-like receptor 2 (TLR2) induces migration and invasive mechanisms in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 17(153). doi: 10.1186/s13075-015-0664-8
198. Melchers, I., Blaschke, S., Hecker, M., & Cattaruzza, M. (2006). The -786C/T single-nucleotide polymorphism in the promoter of the gene for endothelial nitric oxide synthase: Insensitivity to physiologic stimuli as a risk factor for rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 54(10), 3144-3151. doi: 10.1002/art.22147
199. Melchers, I., & Cattaruzza, M. A. (2007) Gene defect in the promoter of the endothelial NO synthase as a risk factor for rheumatoid arthritis. *Rheumatol*, 66(4):326-327.
200. Miyamoto, Y., Saito, Y., Nakayama, M., Shimasaki, Y., Yoshimura, T., Yoshimura, M., ... Nakao, K. (2000) Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a -786T/C mutation associated with coronary spastic angina. *Hum Mol Genet*, 9(18):2629-2637.
201. Mueller, R. B., Graninger, W., Sidiropoulos, P., Goger, C., & von Kempis, J. (2017) Median time to low disease activity is shorter in tocilizumab combination therapy with csDMARDs as compared to tocilizumab

- monotherapy in patients with active rheumatoid arthritis and inadequate responses to csDMARDs and/or TNF inhibitors: sub-analysis of the Swiss and Austrian patients from the ACT-SURE study. *Clin Rheumatol*, 36(10):2187-2192. doi: 10.1007/s10067-017-3779-2.
202. Mukherji, A., Kobiita, A., Ye, T., & Chambon, P. (2013) Homeostasis in intestinal epithelium is orchestrated by the circadian clock and microbiota cues transduced by TLRs. *Cell*, 153(4):812-827. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.020
203. Murphy, C. A., Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W., McClanahan, T., Kastelein, R. A., & Cua, D.J. (2003) Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med*, 198(12):1951–1957.
204. Nakagawa, T. (2007) Uncoupling of the VEGF-endothelial nitric oxide axis in diabetic nephropathy: an explanation for the paradoxical effects of VEGF in renal disease. *Am J Physiol Renal Physiol*, 292:1665-1672, doi:10.1152/ajprenal.00495.2006.
205. Nakagawa, T., Sato, W., Kosugi, T., & Johnson, R. (2013). Uncoupling of VEGF with endothelial NO as a potential mechanism for abnormal angiogenesis in the diabetic nephropathy. *Journal of Diabetes Research*, 2013: 1-7. doi: 10.1155/2013/184539
206. Nakano, K., Okada, Y., Saito, K., & Tanaka, Y. (2004) Induction of RANKL expression and osteoclast maturation by the binding of fibroblast growth factor 2 to heparan sulfate proteoglycan on rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*, 50:2450–2458.
207. Nakayama, M., Yasue, H., Yoshimura, M., Shimasaki, Y., Kugiyama, K., Ogawa, H., ... Nakao, K. (1999). T -786 →C Mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation*, 99(22): 2864-2870. doi: 10.1161/01.cir.99.22.2864
208. Neumann, P., Gertzberg, N., & Johnson, A. (2004). TNF- α induces a decrease in eNOS promoter activity. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 286(2): 452-459. doi:

- 10.1152/ajplung.00378.2002
209. Niu, W., & Qi, Y. (2011). An updated meta-analysis of endothelial nitric oxide synthase gene: three well-characterized polymorphisms with hypertension. *Plos ONE*, 6(9): e24266. doi: 10.1371/journal.pone.0024266
210. O'Dell, J. R., Cohen, S. B., Thorne, J. C., & Kremer, J. (2018) Treatment of rheumatoid arthritis in the USA: premature use of tumor necrosis factor inhibition and underutilization of concomitant methotrexate. *Open Access Rheumatol*, 10:97-101.
211. Ohgi, K., Kajiya, H., Goto-T, K., Okamoto, F., Yoshinaga, Y., Okabe, K., & Sakagami, R. (2018). Toll-like receptor 2 activation primes and upregulates osteoclastogenesis via lox-1. *Lipids In Health And Disease*, 17(132). doi: 10.1186/s12944-018-0787-4
212. Olkkonen, J., Kouri, V. P., Kuusela, E., Ainola, M., Nordström, D., & Kari, K., ... Mandelin, J.(2017) DEC2 Blocks the Effect of the ARNTL2/NPAS2 Dimer on the Expression of PER3 and DBP. *Journal of circadian rhythms*, 15, 6. <https://doi.org/10.5334/jcr.149>.
213. Ormezzano, O., Amar, J., Mounier, Vehier, C., Cambien, F., Poirier, O., ... Baguet, J., P. (2007) Association of eNOS Glu298Asp gene polymorphism with circadian blood pressure rhythm. *J Hum Hypertens*, 21(6):501-503.
214. Paleolog, E. (2009). The vasculature in rheumatoid arthritis: cause or consequence? *International Journal Of Experimental Pathology*, 90(3): 249-261. doi: 10.1111/j.1365-2613.2009.00640.x
215. Perlman, H., Georganas, C., Pagliari, L., Koch, A., Haines, K., & Pope, R. (2000). Bcl-2 Expression in synovial fibroblasts is essential for maintaining mitochondrial homeostasis and cell viability. *The Journal Of Immunology*, 164(10): 5227-5235. doi: 10.4049/jimmunol.164.10.5227
216. Perlman, H., Pagliari, L., Liu, H., Koch, A., Haines, G., & Pope, R. (2001). Rheumatoid arthritis synovial macrophages express the Fas-associated death domain-like interleukin-1 β -converting enzyme-inhibitory protein and are refractory to Fas-mediated apoptosis. *Arthritis & Rheumatism*, 44(1): 21-30.

doi: 10.1002/1529-0131(200101)44:1<21::aid-anr4>3.0.co;2-8

217. Perry, M. G., Kirwan, J. R., Jessop, D. S., & Hunt, L. P. (2009) Overnight variations in cortisol, interleukin 6, tumour necrosis factor alpha and other cytokines in people with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 68(1):63-68.
218. Piccoli, J., Manfredini, V., Faoro, D., Farias, F., Bodanese, L., & Bogo, M. (2013). Association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (-786T>C) and interleukin-6 in acute coronary syndrome. *Human & Experimental Toxicology*, 33(4): 396-402. doi: 10.1177/0960327113499046
219. Pierer, M., Rethage, J., Seibl, R., Lauener, R., Brentano, F., Wagner, U., & Kyburz, D. (2004) Chemokine secretion of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts stimulated by Toll-like receptor 2 ligands. *J Immunol*, 172:1256–1265.
220. Prevoo, M., Van'T Hof, M., Kuper, H., Van Leeuwen, M., Van De Putte, L., & Van Riel, P. (1995). Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 38(1): 44-48. doi: 10.1002/art.1780380107
221. Pundt, N., Peters, M., Wunrau, C., Strietholt, S., Fehrmann, C., Neugebauer, K., ... Meinecke, I. (2009). Susceptibility of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts to FasL- and TRAIL-induced apoptosis is cell cycle-dependent. *Arthritis Research & Therapy*, 11(1): R16. doi: 10.1186/ar2607
222. Qiu, Z., Miyamoto, H., Hongo, H., & Hasegawa, T. (2018) Role of Toll-like receptor 2 in osteoclastogenesis in chronic bone diseases. *Hokkaido J Dent Sci*, 39: 22- 24.
223. Radstake, T. R., Roelofs, M. F., Jenniskens, Y. M., Oppers-Walgreen, B., van Riel, P.L., Barrera, P., ... van den Berg, W.B. (2004) Expression of toll-like receptors 2 and 4 in rheumatoid synovial tissue and regulation by proinflammatory cytokines interleukin-12 and interleukin-18 via interferon-gamma. *Arthritis Rheum*, 50(12): 3856-3865.

224. Rai, H., Parveen, F., Kumar, S., Kapoor, A., & Sinha, N. (2014). Association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with coronary artery disease: an updated meta-analysis and systematic review. *Plos ONE*, 9(11): e113363. doi: 10.1371/journal.pone.0113363
225. Ramasamy, T., Ruttala, H.B., Shanmugam, S., & Umadevi, S. K. (2013) Eudragit-coated aceclofenac-loaded pectin microspheres in chronopharmacological treatment of rheumatoid arthritis. *Drug Deliv*, 20:65-77.
226. Roberts, B. J., Dragon, J. A., Moussawi, M., & Huber, S. A. (2012). Sex-specific signaling through Toll-Like Receptors 2 and 4 contributes to survival outcome of Coxsackievirus B3 infection in C57Bl/6 mice. *Biology of sex differences*, 3(1): 25. <https://doi.org/10.1186/2042-6410-3-25>
227. Rocha S., H., Silva, D., Gomides, L., Dorta, M., Oliveira, M., & Ribeiro-Dias, F. (2017). TLR4 and TLR2 activation is differentially associated with age during Parkinson's disease. *Immunological Investigations*, 47(1): 71-88. doi: 10.1080/08820139.2017.1379024
228. Rodrigo, G. C. & Denniff, M. (2016) Time-of-day variation in vascular function. *Exp Physiol*, 101(8): 1030–1034. doi: 10.1113/EP085780
229. Roeleveld, D. M., & Koenders, M. I. (2015) The role of the Th17 cytokines IL-17 and IL-22 in Rheumatoid Arthritis pathogenesis and developments in cytokine immunotherapy. *Cytokine*, 74(1): 101-107.
230. Roodenrijs, N. M. T., de Hair, M. J. H., van der Goes, M. C., Jacobs, J. W. G., Welsing, P. M. J., van der Heijde, D., ... György Nagy, G. (2018) Characteristics of difficult-to-treat rheumatoid arthritis: result of an international survey. *Ann Rheum Dis*, 77 (12):1705-1709.
231. Rossi, G., Taddei, S., Viridis, A., Cavallin, M., Ghiadoni, L., & Favilla, S., ... Salvetti, A. (2003). The T-786C and Glu298Asp polymorphisms of the endothelial nitric oxide gene affect the forearm blood flow responses of Caucasian hypertensive patients. *Journal Of The American College Of Cardiology*, 41(6): 938-945. doi: 10.1016/s0735-1097(02)03011-5
232. Roy, H., Bhardwaj, S., & Ylä-Herttuala, S. (2006). Biology of vascular

- endothelial growth factors. *FEBS Letters*, 580(12): 2879-2887. doi: 10.1016/j.febslet.2006.03.087
233. rs2070744 RefSNP Report - dbSNP - NCBI. (2020). Retrieved 30 March 2020, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2070744#publications>
234. Saber, T., Veale, D. J., Balogh, E., McCormick, J., NicAnUltaigh, S., Connolly, M., ... Fearon, U. (2011) Toll-like receptor 2 induced angiogenesis and invasion is mediated through the tie2 signalling pathway in rheumatoid arthritis. *PLoS ONE*, 6:e23540 doi: 10.1371/journal.pone.0023540.
235. Salaffi, F., Di, Carlo, M., Vojinovic, J., Tincani, A., Sulli, A., Soldano, S., ... Cutolo, M. (2018). Validity of the rheumatoid arthritis impact of disease (RAID) score and definition of cut-off points for disease activity states in a population-based European cohort of patients with rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*, 85(3), 317-322. doi: 10.1016/j.jbspin.2017.05.020
236. Salimi, S., Naghavi, A., Firoozrai, M., Zand, H., Tavilani, H., Nakhaee, A., & Mohebbi, A. (2012). Association of plasma nitric oxide concentration and endothelial nitric oxide synthase T-786C gene polymorphism in coronary artery disease. *Pathophysiology*, 19(3):157-162. doi: 10.1016/j.pathophys.2012.04.003
237. Sanka, K., Pragada, R. R., & Veerareddy, P. R. (2015) A pH-triggered delayed-release chronotherapeutic drug delivery system of aceclofenac for effective management of early morning symptoms of rheumatoid arthritis. *J Microencapsul*, 32(8):794-803. doi: 10.3109/02652048.2015.1081417.
238. Searles, C. (2006). Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression. *American Journal Of Physiology-Cell Physiology*, 291(5): 803-816. doi: 10.1152/ajpcell.00457.2005
239. Seibl, R., Birchler, T., Loeliger, S., Hossle, J. P., Gay, R. E., Saurenmann, T., & Lauener, R.P. (2003) Expression and regulation of Toll-like receptor 2 in rheumatoid arthritis synovium. *Am J Pathol*, 162:1221–1227.
240. Semerano, L., Clavel, G., Assierb, E., Denys, A. & Boissier, M. C. (2011) Blood vessels, a potential therapeutic target in rheumatoid arthritis? *Joint Bone Spine*, 78: 118–123.

241. Sen, A., Most, P., & Peppel, K. (2014). Induction of microRNA-138 by pro-inflammatory cytokines causes endothelial cell dysfunction. *FEBS Letters*, 588(6): 906-914. doi: 10.1016/j.febslet.2014.01.033
242. Shahabi, A., Shafrin, J., Zhao, L., Green, S., Curtice, T. Marshall, A., Marshall, A. & Damemarie, P. (2019) The economic burden of switching targeted disease-modifying antirheumatic drugs among rheumatoid arthritis patients. *J Med Econ*, 22(4):350-358. doi: 10.1080/13696998.2019.1571498
243. Shakhanov, A.V., Uryasev, O.M. (2018) Effect of the NOS3 786C/T polymorphism on the levels of nitric oxide in patients with asthma and comorbid hypertension. *Bulletin of RSMU*, 3: 54-58. doi: 10.24075/vrgmu.2018.029.
244. Shankarishan, P., Borah, P., Ahmed, G., & Mahanta, J. (2014). Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and the risk of hypertension in an Indian Population. *Biomed Research International*, 2014 (ID 793040), 1-11. doi: 10.1155/2014/793040
245. Shao, G., Zhang, S., Nie, J., Li, J. & Tong, J. (2017) Effects of melatonin on mechanisms involved in hypertension using human umbilical vein endothelial cells. *J Toxicol Environ Health A*, 80(23-24):1342-1348. doi: 10.1080/15287394.2017.1384171.
246. Sierakowski, S. & Cutolo, M. (2011) Morning symptoms in rheumatoid arthritis: a defining characteristic and marker of active disease. *Scand J Rheumatol Suppl*, 125:1-5. doi:10.3109/03009742.2011.566433.
247. Silman, A. J. & Pearson, J. E. (2002) Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*,4(3): 265-272.
248. Silver, A., C., Arjona, A., Walker, W., E., & Fikrig, E. (2012) The circadian clock controls toll-like receptor 9-mediated innate and adaptive immunity. *Immunity*, 36(2):251-261. doi: 10.1016/j.immuni.2011.12.017.
249. Silver, A., C., Buckley, S., M., Hughes, M., E., Hastings, A., K., Nitabach, M., N., & Fikrig, E. (2018) Daily oscillations in expression and responsiveness of Toll-like receptors in splenic immune cells. *Heliyon*, 4(3):e00579. doi:

- 10.1016/j.heliyon.2018.e00579.
250. Simpson, J., McDonald, V., Baines, K., Oreo, K., Wang, F., Hansbro, P., & Gibson, P. (2013). Influence of age, past smoking, and disease severity on TLR2, neutrophilic inflammation, and MMP-9 levels in COPD. *Mediators Of Inflammation*, 2013, 1-13. doi: 10.1155/2013/462934
251. Singh, J. A., Saag, K., G., Bridges, S., L., Jr., Akl, E., A., Bannuru, R.R., Sullivan, M., ... Mcalindon, T. (2016) 2015 American College of Rheumatology guideline for the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol*, 68(1):1–26.
252. Smolen, J. S., Landewé, R., Bijlsma, J., Burmester, G., Chatzidionysiou, K., Dougados, M., ... van der Heijde, D. (2017) EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Ann Rheum Dis*, 76(6):960-977.
253. Sokka, T., Toloza, S., Cutolo, M., Kautiainen, H., Makinen, H. Gogus, F., ... QUEST-RA Group. (2009) Women, men, and rheumatoid arthritis: analyses of disease activity, disease characteristics, and treatments in the QUEST-RA Study. *Arthritis Res Ther*, 11(1):R7. doi: 10.1186/ar2591
254. Soósová, M. S., Macejová, Zamboriová, M. & Dimunová, L. (2017) Anxiety and depression in Slovak patients with rheumatoid arthritis. *J Ment Health*, 26(1):21-27.
255. Speer, T., Rohrer, L., Blyszczuk, P., Shroff, R., Kuschnerus, K., Kränkel, N., ... Landmesser, U. (2013). Abnormal high-density lipoprotein induces endothelial dysfunction via activation of toll-like receptor-2. *Immunity*, 38(4):754-768. doi: 10.1016/j.immuni.2013.02.009
256. Spurlock, C., Aune, Z., Tossberg, J., Collins, P., Aune, J., Huston, J., ... Aune, T.M. (2011). Increased sensitivity to apoptosis induced by methotrexate is mediated by JNK. *Arthritis & Rheumatism*, 63(9): 2606-2616. doi: 10.1002/art.30457
257. Stanislavchuk, M., Zaichko, K., & Sulaiman, A. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism as a risk factor of hypertension in patients with

- rheumatoid arthritis. 2017 ACR/ARHP Annual Meeting, November 3-8, 2017, San Diego, CA, USA. *Arthritis Rheumatol.* 69 (10), [abstract number: 2370]
258. Stevens, C. R., Blake, D. R., Merry, P., Revel, R., A. & Levick, J. R. (1991) A comparative study by morphometry of the microvasculature in normal and rheumatoid synovium. *Arthritis & Rheumatism*, 34(12):1508 - 1513.
259. Su, Q., & Weindl, G. (2018). Glucocorticoids and Toll-like receptor 2 cooperatively induce acute-phase serum amyloid A. *Pharmacological Research*, 128: 145-152. doi: 10.1016/j.phrs.2017.09.012
260. Su, Q., Pfalzgraff, A., & Weindl, G. (2017). Cell type-specific regulatory effects of glucocorticoids on cutaneous TLR2 expression and signalling. *The Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology*, 171: 201-208. doi: 10.1016/j.jsbmb.2017.03.023
261. Sulli, A., Maestroni, G. J., Villaggio, B., Hertens, E., Craviotto, C., Pizzorni, C., ... Cutolo, M. (2002) Melatonin serum levels in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci*, 966:276-283.
262. Sunil, S., A., Srikanth, M.,V., Rao, N.,S. & Murthy, K.,V. (2013) Chronotherapeutic drug delivery from indomethacin compression coated tablets for early morning pain associated rheumatoid arthritis. *Curr Drug Deliv*, 10:109-121.
263. Sydoruk, L., Bukach, O., Fediv, O., Sydoruk, A., Petrnych, O., ... Kazantceva, T., ... Boyko, V.V. (2017) Cytokines cascade changes in patients with rheumatoid arthritis depending on endothelial NO-synthase (T-786C) genes polymorphism. *Balkan Medical Union*, 1(52):32-38.
264. Sydoruk, L., Bukach, O., Fediv, O., Sydoruk, A., Semianiv, M. & Repchuk, Yu., ... Kriklyvetz , L. (2017) Association of T-786C polymorphism of endothelial oxide synthase gene with rheumatoid arthritis. *The Pharma Innovation J*, 6(2):116-120.
265. Taneja, V. (2018). Sex hormones determine immune response. *Frontiers In Immunology*, 9. doi: 10.3389/fimmu.2018.01931
266. Taranto, E., & Leech, M. (2006). Expression and function of cell cycle

- proteins in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Histol. Histopathol*, 21(2): 205-211.
267. Tasolar, H., Eyyupkoca, F., Akturk, E., Karakus, Y., Cansel, M., Yagmur, J., ... Altun, B. (2013). Endothelial nitric oxide synthase levels and their response to exercise in patients with slow coronary flow. *Cardiovascular Journal Of Africa*, 24(9): 355-359. doi: 10.5830/cvja-2013-072
268. Taylor, P.,C. (2002). VEGF and imaging of vessels in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*, 4(3): 99-107.
269. ten Oever, J., Kox, M., van de Veerdonk, F., Mothapo, K., Slavcovici, A., Jansen, T., ... Netea, M.,G. (2014). The discriminative capacity of soluble Toll-like receptor (sTLR)2 and sTLR4 in inflammatory diseases. *BMC Immunology*, 15(1). doi: 10.1186/s12865-014-0055-y
270. Tesauro, M., Thompson, W., Rogliani, P., Qi, L., Chaudhary, P., & Moss, J. (2000). Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: Cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 97(6): 2832-2835. doi: 10.1073/pnas.97.6.2832
271. To, H. (2016) Chronotherapy for rheumatoid arthritis: current perspectives. *ChronoPhysiology and Therapy*, 6:47–53.
272. To, H., Irie, S., Tomonari, M., Watanabe, Y., Kitahara, T. & Sasaki, H. (2009) Therapeutic index of methotrexate depends on circadian cycling of tumour necrosis factor-alpha in collagen-induced arthritic rats and mice. *J Pharm Pharmacol*, 61(10):1333–1338.
273. To, H., Yoshimatsu, H., Tomonari, M., Ida, H., Tsurumoto, T., Tsuji, Y., ... Eguchi, K. (2011) Methotrexate chronotherapy is effective against rheumatoid arthritis. *Chronobiol Int*, 28(3):267–274.
274. Tozzato, P.Z.G., Taipeiro, E.F., Spadella, M.A., Marabini Filho, M.P., de Assis, M.R., Carlos, C.P., ... Chies, A.B. (2016) Collagen-induced arthritis increases inducible nitric oxide synthase not only in aorta but also in the cardiac and renal microcirculation of mice. *Clin Exp Immunol*, 183(3): 341–349.

275. Tuncer, T., Gilgil, E., Kaçar, C. , Kurtaiş, Y., Kutlay, S., Bütün, B., ... Guillemain, F. (2018) Prevalence of Rheumatoid Arthritis and Spondyloarthritis in Turkey: A Nationwide Study. *Arch Rheumatol*, 33(2):128-136 doi: 10.5606/ArchRheumatol.2018.6480
276. Tuncer, T., Gilgil, E., Kaçar, C., Kurtaiş, Y., Kutlay, Ş., Bütün, B., ... Guillemain, F. (2017). Prevalence of Rheumatoid Arthritis and Spondyloarthritis in Turkey: A Nationwide Study. *Archives of rheumatology*, 33(2):128–136. <https://doi.org/10.5606/ArchRheumatol.2018.6480>
277. van Vollenhoven, R. (2009). Sex differences in rheumatoid arthritis: more than meets the eye... *BMC Medicine*, 7(1): 12. doi: 10.1186/1741-7015-7-12
278. Varoga, D., Paulsenm, F., Mentlein, R., Fay, J., Kurz, B., Schütz, R., ... Pufe T. (2006) TLR-2-mediated induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage in septic joint disease. *J Pathol*, 210(3):315-324.
279. Vecoli, C., Andreassi, M., Liga, R., Colombo, M., Cocceani, M., Carpeggiani, C. ... Danilo Neglia, D. (2012). T-786→C polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with insulin resistance in patients with ischemic or non ischemic cardiomyopathy. *BMC Medical Genetics*, 13(92). doi: 10.1186/1471-2350-13-92
280. Verhoeven, F., Totoson, P., Maguin-Gaté, K., Prigent-Tessier, A., Marie, C., Wendling, D., ... Demougeot, C. (2017). Glucocorticoids improve endothelial function in rheumatoid arthritis: a study in rats with adjuvant-induced arthritis. *Clinical & Experimental Immunology*, 188(2), 208-218. doi: 10.1111/cei.12938
281. Viswambharan, H., Carvas, J. M., Antic, V., Marecic, A., Jud, C., Zaugg, C.E., ... Yang, Z. (2007) Mutation of the circadian clock gene Per2 alters vascular endothelial function. *Circulation*, 115: 2188-2195.
282. Wang, C. Y., Wen, M. S., Wang, H. W., Hsieh, I. C., Li, Y., Liu, P. Y., ... Liao, J.K. (2008) Increased vascular senescence and impaired endothelial progenitor cell function mediated by mutation of circadian gene Per2. *Circulation*, 118: 2166-2173.
283. Wang, L., Wu, W., Chen, J., Li, Y., Xu, M., & Cai, Y. (2018). MicroRNA

- microarray-based identification of involvement of miR-155 and miR-19a in development of oral lichen planus (OLP) by modulating Th1/Th2 Balance via targeting eNOS and toll-like receptor 2 (TLR2). *Medical Science Monitor*, 24: 3591-3603. doi: 10.12659/msm.907497
284. West, S. K., & Oosthuizen, J. M. (1992). Melatonin levels are decreased in rheumatoid arthritis. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 3(1): 33-40.
285. WHO. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series 854. 1995. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/37003/1/WHO_TRS_854.pdf
286. Widdifield, J., Paterson, J. M., Bernatsky, S., Tu, K., Tomlinson, G., Kuriya, B., ... Bombardier, C. (2014) The epidemiology of rheumatoid arthritis in Ontario, Canada. *Arthritis Rheumatol*, 66(4):786-793. doi: 10.1002/art.38306.
287. Wu, X., Wang, Z., Xu, Y., Ren, R., Heng, B., & Su, Z. (2014). Association between three eNOS polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis. *Asian Pacific Journal Of Cancer Prevention*, 15(13): 5317-5324. doi: 10.7314/apjcp.2014.15.13.5317
288. Yan, L & Silver, R. (2016) Neuroendocrine underpinnings of sex differences in circadian timing systems. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 160:118-126. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.10.007>
289. Yan, Q., Feng, Q., & Beier, F. (2010). Endothelial nitric oxide synthase deficiency results in reduced chondrocyte proliferation and endochondral bone growth. *Arthritis & Rheumatism*, 62(7):2013-2022. doi: 10.1002/art.27486.
290. Yang, B., Xu, J., Liu, X., Yang, Y., Na, X., Li, M., & Wang, Y. (2013). Polymorphisms of rs1799983 (G>T) and rs1800780 (A>G) of the eNOS gene associated with susceptibility to essential hypertension in the Chinese Hui ethnic population. *Genetics And Molecular Research*, 12(3): 3821-3829. doi: 10.4238/2013.march.26.2
291. Yu, L., Guo, Y., Gong, Y., Yuan, J., Zhang, H., Yuan, Y., ... Zhang, D. (2012) Effects of bisoprolol on circadian rhythm of nitric oxide and endothelial nitric oxide synthase. *American Journal of Hypertension*, 26(1):149.

292. Zaichko, K., & Stanislavchuk, M. (2017) Endothelial nitric oxide synthase T-786C gene promoter polymorphism as a possible predictor of high disease activity in patients with rheumatoid arthritis and arterial hypertension in Ukraine population. Medical International Conference for Students MEDICS 2017, 30 March - 2 April, Bucharest, Romania: 31.
293. Zaichko, K., & Stanislavchuk, M. (2018) Association between eNOS gene polymorphism and the level of Toll-like receptors 2 in women with rheumatoid arthritis. *Ukr Rheum J*, 3 (73): 94.
294. Zaichko, K., Gumeniuk, O., & M. Stanislavchuk, M. (2018) Urinary 6-sulfatoxymelatonin excretion and galectin-3 plasma level in patients with osteoarthritis. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR-2018), 13–16 June, 2018, Amsterdam, The Netherlands. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 77 (2): 797. DOI: 10.1136/annrheumdis-2018-eular.3778
295. Zaichko, K., Stanislavchuk, M., & Zaichko, N. (2020) Circadian fluctuations of endothelial nitric oxide synthase activity in females with rheumatoid arthritis: a pilot study. *Rheumatology International*, 40(4): 449-554. DOI: 10.1007/s00296-020-04525-4
296. Zaichko, K., Stanislavchuk, M., & Shapoval, I. (2017) Endothelial nitric oxide synthase T-786C gene promoter polymorphism is a potential predictor of low response to the therapy in patients with rheumatoid arthritis, Ukraine population. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR-2017), 14–17 June, 2017, Madrid, Spain. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 76 (2): 1038-1039. DOI: 10.1136/annrheumdis-2017-eular.3962
297. Zaichko, K., Stanislavchuk, M., Zaichko, N., & Khomenko, V. (2020) Associations between efficacy of the therapy and circadian fluctuations of endothelial nitric oxide synthase with toll-like receptors 2 expression, and NOS3 polymorphism in females with rheumatoid arthritis. *Georgian Medical News*, 2(299): 93-100.
298. Zaichko, K., Zaichko, N., Maievskiy, O., Korotkiy, O., Falalyeyeva, T., Fagoonee, Sh., Pellicano, R., Abenavoli, L. & Stanislavchuk, M. (2020)

- Circadian rhythms of endothelial nitric oxide synthase and toll-like receptors 2 production in females with rheumatoid arthritis depending on *NOS3* gene polymorphism. *Reviews on Recent Clinical Trials*. 15(2): 145-151 doi: 10.2174/1574887115666200416143512
299. Zaichko, K. & Stanislavchuk, M. (2020) 203. T-786C Gene promoter polymorphism of endothelial nitric oxide synthase: its association to the disease activity and arterial hypertension in patients with rheumatoid arthritis in the Ukraine population. British Society of Rheumatology (BSPR) Annual conference, 25-27 April, 2017, Birmingham, United Kingdom. *Rheumatology*. 56 (Suppl 2), ii 129. doi: 10.1093/rheumatology/kex062.204
300. Zhang, R., Min, W. & Sessa, W. C. (1995) Functional analysis of the human endothelial nitric oxide synthase promoter. Sp1 and GATA factors are necessary for basal transcription in endothelial cells. *J Biol Chem*, 270(25):15320–15326.
301. Zoli, A., Lizzio, M. M., Ferlisi, E. M., Massafra, V., Mirone, L. & Barini A., ... Magaro, M. (2002) ACTH, cortisol and prolactin in active rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*, 21(4):289-293.

ДОДАТОК А
СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Станіславчук, М. А. Патогенетичне значення ендотеліальної NO-синтази та поліморфізму промотора гена NOS3 при ревматоїдному артриті / М.А. Станіславчук, К.О. Заїчко // Укр. ревматол. журн. - 2018. - № 1 (17). – С. 35-40. *(Дисертантом особисто проведено збір та узагальнення наукової інформації з проблеми, написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*
2. Станіславчук, М. А. Крос-культуральна адаптація та валідизація україномовної версії RAID у хворих на ревматоїдний артрит / М.А. Станіславчук, К.О. Заїчко // Укр. ревматол. журн. - 2019.- № 3 (77). - С. 51-55. *(Дисертантом особисто проведено клінічні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, участь у перекладі опитника RAID, написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*
3. Заїчко, К. О. Добова варіабельність рівня розчинних тол-подібних рецепторів 2 в сироватці крові жінок, хворих на ревматоїдний артрит: зв'язок з перебігом захворювання / К. О. Заїчко, М. А. Станіславчук, Н. В. Заїчко // Медична та клінічна хімія. - 2019. - № 21 (4). - С. 5-12. DOI 10.11603/mcch.2410-681X.2019.v.i4.10820 *(Видання включене до міжнародних наукометричних баз. Дисертантом особисто проведено клінічні дослідження, статистичний аналіз матеріалу, участь у визначенні рівня TLR2, оформлення статті виконано у співавторстві).*
4. Zaichko, K. Circadian fluctuations of endothelial nitric oxide synthase activity in females with rheumatoid arthritis: a pilot study / K. Zaichko, M. Stanislavchuk, N. Zaichko // Rheumatology International. - 2020. - Vol. 4. - P.1-6. DOI 10.1007/s00296-020-04525-4 *(Фахове видання Німеччини, включено до баз даних Scopus i Web of Science. Дисертантом особисто*

проведено клінічні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, участь у визначенні рівня NOS3, написання та оформлення статті виконано у співавторстві).

5. Заїчко, К. О. Добова варіабельність рівня ендотеліальної NO-синтази (NOS3) в сироватці крові у жінок, хворих на ревматоїдний артрит: зв'язок з перебігом захворювання / К. О. Заїчко, М. А. Станіславчук // Укр. ревматол. журн. - № 1 (79). - С. 48-53. DOI 10.32471/rheumatology.2707-6970.79.13183 *(Дисертантом особисто проведено клінічні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, аналіз рівня NOS3, написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*
6. Zaichko K. Associations between efficacy of the therapy and circadian fluctuations of endothelial nitric oxide synthase with toll-like receptors 2 expression, and NOS3 polymorphism in females with rheumatoid arthritis. / Zaichko K., Stanislavchuk M., Zaichko N., Khomenko V. // Georgian Medical News. – 2020. - Vol. 2 , No 299.- P. 93-100. *(Фахове видання Грузії, включено до бази даних Scopus. Дисертантом особисто проведено клінічні дослідження, аналіз варіабельності рівнів NOS3 та TLR2, статистичний аналіз, узагальнення матеріалу; написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*
7. Zaichko K. Circadian rhythms of endothelial nitric oxide synthase and toll-like receptors 2 production in females with rheumatoid arthritis depending on NOS3 gene polymorphism / K. Zaichko, N. Zaichko, O. Maievskiy , O. Korotkiy, T. Falalyeyeva, Sh.Fagoonee, R. Pellicano, L. Abenavoli, M. Stanislavchuk // Reviews on Recent Clinical Trials. – 2020.- Vol. 15, No 2. - P. 145-151. DOI: 10.2174/1574887115666200416143512 *(Фахове видання Італії, включено до бази даних Web of Science. Дисертантом особисто проведено клінічні дослідження, участь у визначенні циркадних ритмів рівнів NOS3 та TLR2, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*

8. Пат. №107770 Україна UA МПК (2016) A61B 5/145 (2006.01) G01N33/53 (2006.01) Спосіб прогнозування ефективності лікування ревматоїдного артриту / Станіславчук М.А., Заїчко К. О., Заїчко Н.В.; заявник та патентовласник НДІ реабілітації інвалідів Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова.- № у 2015 11681; заявл. 26.11.2015; опубл. 24.06.2016; Бюл. №12. *(Дисертантом особисто проведено клінічні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу; написання та оформлення патенту виконано у співавторстві)*
9. Пат. №116869 Україна UA МПК (2016) G01N 33/50 (2006.01). Спосіб прогнозування перебігу ревматоїдного артриту за коморбідності з артеріальною гіпертензією / Станіславчук М.А., Заїчко К. О., Заїчко Н.В.; заявник та патентовласник НДІ реабілітації інвалідів ВНМУ ім. М.І. Пирогова. - № у 2016 12366; заявл. 05.12.2016; опубл. 12.06.2017; Бюл. № 11. *(Дисертантом особисто проведено клінічні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу; написання та оформлення патенту виконано у співавторстві).*

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

10. Станіславчук, М. А. Поліморфізм промотору гена eNOS T-786C та вміст галектину-3 в сироватці крові у жінок з ревматоїдним артритом та артеріальною гіпертензією / М.А. Станіславчук, К.О. Заїчко // Матеріали науково-практичної конференції «Стандарти діагностики та лікування в клініці внутрішніх хвороб» 15-16 квітня 2015 р., Вінниця, 2015. - С. 99. *(Дисертантом особисто проведено клінічні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез).*
11. Станіславчук, М.А. Поліморфізм промотору гену eNOS T-786C та ефективність базисної терапії метотрексатом у хворих на ревматоїдний артрит / М.А. Станіславчук, К.О. Заїчко // Матеріали VIII Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Досягнення клінічної фармакології та фармакотерапії на шляхах доказової медицини» 9-10 листопада 2015 р., Вінниця, 2015. – С. 128-129. *(Дисертантом*

особисто проведено клінічні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез).

12. Станіславчук, М.А. Вміст ендотеліальної синтази оксиду азоту у хворих на рематоїдний артрит / М.А. Станіславчук, К.О. Заїчко // Збірник тез наукових робіт учасників всеукраїнської науково-практичної конференції «Актуальні питання лабораторної діагностики та медицини сьогодні» 24 лютого 2016 р., Вінниця, 2016. – С. 58-59. *(Дисертантом особисто проведено клінічні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез).*
13. Заїчко, К.О. Поліморфізм гену ендотеліальної синтази оксиду азоту як фактор ризику артеріальної гіпертензії у хворих на ревматоїдний артрит / К.О. Заїчко // Матеріали XIII міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених «Перший крок у науку», 7-8 квітня 2016 р., Вінниця, 2016. - С. 242.
14. Заїчко, К.О. Алельний поліморфізм гену ендотеліальної синтази оксиду азоту NOS3 T-786C як предиктор перебігу ревматоїдного артрити / К.О. Заїчко // Матеріали XX міжнародного медичного конгресу студентів і молодих вчених, 25-27 квітня 2016 р., Тернопіль, 2016. – С. 27.
15. Заїчко, К.О. Артеріальна гіпертензія у жінок з ревматоїдним артритом: зв'язок з перебігом захворювання / К.О. Заїчко, М.А. Станіславчук // Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції «Стандарти діагностики та лікування в клініці внутрішніх хвороб», 27-28 квітня 2016 р., Вінниця, 2016. - С.27-28. *(Дисертантом особисто проведено клінічні дослідження, статистичний аналіз матеріалу, написання тез).*
16. Zaichko, K. 203. T-786C Gene promoter polymorphism of endothelial nitric oxide synthase: its association to the disease activity and arterial hypertension in patients with rheumatoid arthritis in the Ukraine population / K. Zaichko, M. Stanislavchuk // British Society of Rheumatology (BSPR) Annual conference, 25-27 April, 2017, Birmingham, United Kingdom. Rheumatology. – 2017. - Vol. 56 (Suppl. 2), ii 129. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kex062.204>

(Дисертантом особисто проведено клінічні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез).

17. Заїчко, К.О. Клініко-патогенетичне значення ендотеліальної синтази оксиду азоту у хворих на рематоїдний артрит / К.О. Заїчко // Матеріали VII національного конгресу ревматологів України, Київ, 18-20 жовтня 2017 р. Український ревматологічний журнал. – 2017. – № 3 (69). – С. 58.
18. Заїчко, К.О. Діагностичне значення галектину-3 у хворих на рематоїдний артрит / К.О. Заїчко, М.А. Станіславчук, Н.В. Школіна, Л.Б. Веденко // Матеріали науково-практичної конференції «Стандарти діагностики та лікування в клініці внутрішніх хвороб», 25-26 квітня 2017 р., Вінниця, 2017. – С. 94-95. *(Дисертантом особисто проведено клінічні дослідження, статистичний аналіз матеріалу, написання тез).*
19. Zaichko, K. Endothelial nitric oxide synthase T-786C gene promoter polymorphism as a possible predictor of high disease activity in patients with rheumatoid arthritis and arterial hypertension in Ukraine population / K. Zaichko, M. Stanislavchuk // Medical International Conference for Students MEDICS 2017, 30 March - 2 April, Bucharest, Romania, 2017. – P. 31. *(Дисертантом особисто проведено клінічні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез).*
20. Zaichko, K. Endothelial nitric oxide synthase T-786C gene promoter polymorphism is a potential predictor of low response to the therapy in patients with rheumatoid arthritis, Ukraine population / K. Zaichko, M. Stanislavchuk, I. Shapoval // Annual European Congress of Rheumatology (EULAR-2017), 14–17 June, 2017, Madrid, Spain. Annals of the Rheumatic Diseases. – 2017. - 76 (Suppl 2). – P. 1038-1039. DOI: 10.1136/annrheumdis-2017-eular.3962 *(Дисертантом особисто проведено клінічні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез).*
21. Stanislavchuk, M. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism as a risk factor of hypertension in patients with rheumatoid arthritis [abstract number: 2370] / Stanislavchuk M., Zaichko K., Sulaiman A. // 2017

- ACR/ARHP Annual Meeting, November 3-8, 2017, San Diego, CA, USA. Arthritis Rheumatol. – 2017. - Vol. 69 (Suppl 10). <https://acrabstracts.org/abstract/endothelial-nitric-oxide-synthase-gene-polymorphism-as-a-risk-factor-of-hypertension-in-patients-with-rheumatoid-arthritis/> *(Дисертантом особисто проведено клінічні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез).*
- 22.Zaichko, K. Urinary 6-sulfatoxymelatonin excretion and galectin-3 plasma level in patients with osteoarthritis / K. Zaichko, O. Gumeniuk, M. Stanislavchuk // Annual European Congress of Rheumatology (EULAR-2018), 13–16 June, 2018, Amsterdam, The Netherlands. Annals of the Rheumatic Diseases. – 2018. - Vol.77 (Suppl 2). – P.797. DOI: 10.1136/annrheumdis-2018-eular.3778 *(Дисертантом особисто проведено клінічні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез).*
- 23.Zaichko, K. Association between eNOS gene polymorphism and the level of Toll-like receptors 2 in women with rheumatoid arthritis/ K. Zaichko, M. Stanislavchuk // Матеріали науково-практичної конференції «Ревматоїдний артрит та споріднені з ним хвороби: локальні та системні ураження. Стратегія персоніфікованого лікування», 28-29 листопада 2018 р, Київ. Ukr. Rheum. J. – 2018. – Vol. 3 (73). – P. 94. *(Дисертантом особисто проведено клінічні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез).*
- 24.Заїчко, К.О. Досвід застосування опитника RAID у хворих на ревматоїдний артрит / К.О. Заїчко, Н.В. Школіна, Т. І. Плазовський // Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Стандарти діагностики та лікування в клініці внутрішніх хвороб», 25 квітня 2019 р., Вінниця, 2019. – С.19-20. *(Дисертантом особисто проведено клінічні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез).*

ДОДАТОК Б
АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

Основні положення роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях та конгресах різного рівня:

1. Науково-практична конференція «Стандарти діагностики та лікування в клініці внутрішніх хвороб» (Вінниця, 15-16 квітня 2015 р., форма участі – публікація тез).
2. VIII Всеукраїнська науково-практична конференції з міжнародною участю «Досягнення клінічної фармакології та фармакотерапії на шляхах доказової медицини» (Вінниця 9-10 листопада 2015 р., форма участі – усна доповідь, публікація тез).
3. Всеукраїнська науково-практична конференція «Актуальні питання лабораторної діагностики та медицини сьогодні» (Вінниця, 24 лютого 2016 р., форма участі – публікація тез).
4. XIII міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Перший крок у науку» (Вінниця, 7-8 квітня 2016 р., форма участі – усна доповідь, публікація тез, 1-ше місце на конкурсі молодих вчених).
5. XX міжнародний медичний конгрес студентів і молодих вчених (Тернопіль, 25-27 квітня 2016 р., форма участі – публікація тез).
6. Всеукраїнська науково-практична конференція «Стандарти діагностики та лікування в клініці внутрішніх хвороб» (Вінниця, 27-28 квітня 2016 р., форма участі – усна доповідь, публікація тез).
7. Науково-практична конференція «Стандарти діагностики та лікування в клініці внутрішніх хвороб» (Вінниця, 25-26 квітня 2017 р., форма участі – постерна доповідь, публікація тез, 1-ше місце у постерній сесії молодих вчених).
8. British Society of Rheumatology (BSPR) Annual conference 2017 (Birmingham, United Kingdom, 25-27 April, 2017, форма участі – публікація тез).

ПРОДОВЖЕННЯ ДОДАТКУ Б

9. Medical International Conference for Students MEDICS 2017 (Bucharest, Romania, 30 March - 2 April, 2017, форма участі – публікація тез).
10. Annual European Congress of Rheumatology EULAR-2017 (Madrid, Spain 14–17 June, 2017, форма участі – постерна доповідь, публікація тез).
11. 2017 ACR/ARHP Annual Meeting (San Diego, CA, USA, November 3-8, 2017, форма участі – постерна доповідь, публікація тез).
12. VII Національний конгрес ревматологів України (Київ 18-20 жовтня 2017 р, форма участі – усна доповідь, диплом II ступеня на конкурсі молодих вчених).
13. Annual European Congress of Rheumatology EULAR-2018 (Amsterdam, The Netherlands, 13-16 June, 2018, форма участі – постерна доповідь, публікація тез).
14. Науково-практична конференція Асоціації ревматологів України «Ревматоїдний артрит та споріднені з ним хвороби: локальні та системні ураження. Стратегія персоніфікованого лікування» (Київ, 28-29 листопада 2018 р., форма участі – усна доповідь, публікація тез, диплом II ступеня на конкурсі молодих вчених).
15. Науково-практична конференція з міжнародною участю «Стандарти діагностики та лікування в клініці внутрішніх хвороб» (Вінниця, 25 квітня 2019 р., форма участі – усна доповідь, публікація тез).
16. Науково-практична мультидисциплінарна конференція «Досягнення сучасної медицини та фармакології на засадах медичної біохімії», до 70-річчя від дня народження професора О.О. Пентюка (Вінниця, 17 жовтня 2019 р., форма участі – усна доповідь).
17. Науково-практична конференція, присвячена пам'яті академіка М.Д. Стражеска «Особливості надання медичної допомоги хворим на серцево-судинні захворювання в сучасних умовах» (Київ, 13-14 лютого 2020 р., форма участі – усна доповідь, 1-ше місце на конкурсі молодих вчених).

ДОДАТОК В



**Внутрішньої медицини №1
АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

- 1. Назва пропозиції для впровадження:** Добова варіабельність рівнів розчинних тол-подібних рецепторів 2 в сироватці крові у хворих на ревматоїдний артрит: зв'язок з перебігом захворювання.
- 2. Установа, її адреса, виконавці:** кафедра внутрішньої медицини №1 Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, аспірант Заїчко Катерина Олександрівна.
- 3. Джерела інформації:**
1. Заїчко, К. О. Добова варіабельність рівня розчинних тол-подібних рецепторів 2 в сироватці крові жінок, хворих на ревматоїдний артрит: зв'язок з перебігом захворювання / К. О. Заїчко, М. А. Станіславчук, Н. В. Заїчко // Медична та клінічна хімія. - 2019. - № 21 (4). - С. 5-12.
- 4. Де і коли впроваджено:** в науково-педагогічну роботу кафедри внутрішньої медицини №1 Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова у 2019-2020 році.
- 5. Результати впровадження:** Використання результатів наукових досліджень К.О. Заїчко в науково-навчальному процесі дозволяє поглибити знання студентів, аспірантів, лікарів-інтернів щодо клініко-патогенетичної ролі хронобіологічних порушень синтезу медіаторів запалення та ангіогенезу, діагностичної та прогностичної цінності тол-подібних рецепторів 2 за умов ревматоїдного артрити.
- 6. Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Відповідальний за впровадження:
Завідувач кафедри
внутрішньої медицини №1
Вінницького національного
медичного університету ім. М.І. Пирогова,
д.мед.н., професор

М.А. Станіславчук

ПРОДОВЖЕННЯ ДОДАТКУ В

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор
Комунального некомерційного підприємства
«Хмельницька обласна лікарня
Хмельницької обласної Ради»
Цибуляч Я.М.



2019 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** застосування україномовної версії опитника RAID для оцінювання впливу захворювання на стан хворих на ревматоїдний артрит.
2. **Установа, її адреса, виконавці:** кафедра внутрішньої медицини №1 Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, аспірант Заїчко Катерина Олександрівна.
3. **Джерела інформації:**
 1. Станіславчук, М.А. Крос-культуральна адаптація та валідація україномовної версії RAID у хворих на ревматоїдний артрит / М.А. Станіславчук, К.О. Заїчко // Український ревматологічний журнал. - 2019.- № 3 (77). - С. 51-55.
4. **Де і коли впроваджено:** в клінічну роботу ревматологічного відділення Комунального некомерційного підприємства «Хмельницька обласна лікарня Хмельницької Вінницької обласної Ради» 2019 році.
5. **Результати впровадження:** Використання результатів наукових досліджень К.О. Заїчко, а саме валідизованої україномовної версії опитувальника RAID, підвищує ефективність оцінювання лікарем-ревматологом впливу захворювання на стан пацієнтів з ревматоїдним артритом на етапах діагностики та лікування.
6. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Відповідальний за впровадження:

Завідувачка ревматологічним відділенням,
к.мед.н

Н.Б. Урсол

ПРОДОВЖЕННЯ ДОДАТКУ В

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Генеральний директор
 КНП «Обласна клінічна лікарня»
 Івано-Франківської обласної ради,
 заслужений лікар України,
 Козак О.І.



2019 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** застосування україномовної версії опитника RAID для оцінювання впливу захворювання на стан хворих на ревматоїдний артрит.
2. **Установа, її адреса, виконавці:** кафедра внутрішньої медицини №1 Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, аспірант Заїчко Катерина Олександрівна.
3. **Джерела інформації:**
 1. Станіславчук, М.А. Крос-культуральна адаптація та валідизація україномовної версії RAID у хворих на ревматоїдний артрит / М.А. Станіславчук, К.О. Заїчко // Український ревматологічний журнал. – 2019. – № 3 (77). – С. 51-55.
4. **Де і коли впроваджено:** в клінічну роботу ревматологічного відділення КНП «Обласна клінічна лікарня» Івано-Франківської обласної ради у 2019 році.
5. **Результати впровадження:** Використання результатів наукових досліджень К.О. Заїчко, а саме валідизованої україномовної версії опитувальника RAID, підвищує ефективність оцінювання лікарем-ревматологом впливу захворювання на стан пацієнтів з ревматоїдним артритом на етапах діагностики та лікування.
6. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Відповідальний за впровадження:
 Завідувач ревматологічним відділенням



Х.М. Федорович

ПРОДОВЖЕННЯ ДОДАТКУ В

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор
 Комунального некомерційного підприємства
 «Вінницька обласна клінічна лікарня
 імені М.І. Пирогова Вінницької обласної Ради»
 Жупанов О.Б.

« 14 »

2019 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** застосування україномовної версії опитника RAID для оцінювання впливу захворювання на стан хворих на ревматоїдний артрит.
2. **Установа, її адреса, виконавці:** кафедра внутрішньої медицини №1 Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, аспірант Заїчко Катерина Олександрівна.
3. **Джерела інформації:**
 1. Станіславчук, М.А. Крос-культуральна адаптація та валідизація україномовної версії RAID у хворих на ревматоїдний артрит / М.А. Станіславчук, К.О. Заїчко // Український ревматологічний журнал. - 2019.- № 3 (77). - С. 51-55.
 2. Заїчко, К.О. Досвід застосування опитника RAID у хворих на ревматоїдний артрит / К.О. Заїчко, Н.В. Школіна, Т. І. Плазовський // Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Стандарти діагностики та лікування в клініці внутрішніх хвороб», 25 квітня 2019 р., Вінниця, 2019. – С.19-20.
4. **Де і коли впроваджено:** в клінічну роботу високоспеціалізованого клінічного центру ревматології, остеопорозу та біологічної терапії Комунального некомерційного підприємства «Вінницька обласна клінічна лікарня імені М.І. Пирогова Вінницької обласної Ради» у 2019 році.
5. **Результати впровадження:** Використання результатів наукових досліджень К.О. Заїчко, а саме валідизованої україномовної версії опитувальника RAID, підвищує ефективність оцінювання лікарем-ревматологом впливу захворювання на стан пацієнтів з ревматоїдним артритом на етапах діагностики та лікування.
6. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Відповідальний за впровадження:

Відповідальний за впровадження:
 Завідувачка
 Високоспеціалізованого клінічного
 центр ревматології,
 остеопорозу та біологічної терапії

Н.В. Школіна

ПРОДОВЖЕННЯ ДОДАТКУ В

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Т.в.о. директора
Багатопрофільного медичного центру
Одеського національного
медичного університету
Подуст О.А.

“ 20 ” _____ 2020 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** застосування україномовної версії опитника RAID для оцінювання впливу захворювання на стан хворих на ревматоїдний артрит.
2. **Установа, її адреса, виконавці:** кафедра внутрішньої медицини №1 Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, аспірант Заїчко Катерина Олександрівна.
3. **Джерела інформації:**
 1. Станіславчук, М.А. Крос-культуральна адаптація та валідизація україномовної версії RAID у хворих на ревматоїдний артрит / М.А. Станіславчук, К.О. Заїчко // Український ревматологічний журнал. - 2019.- № 3 (77). - С. 51-55.
4. **Де і коли впроваджено:** в клінічну роботу ревматологічного відділення Багатопрофільного медичного центру Одеського національного медичного університету у 2019 році.
5. **Результати впровадження:** Використання результатів наукових досліджень К.О. Заїчко, а саме валідизованої україномовної версії опитувальника RAID, підвищує ефективність оцінювання лікарем-ревматологом впливу захворювання на стан пацієнтів з ревматоїдним артритом на етапах діагностики та лікування.
6. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Відповідальний за впровадження:

Головний позаштатний ревматолог Департаменту
Охорони здоров'я Одеської міської ради

В.В. Василюк

ПРОДОВЖЕННЯ ДОДАТКУ В

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор

Науково-дослідного інституту реабілітації
осіб з інвалідністюВінницького національного медичного
університету імені М.І. Пирогова,

д.мед.н., проф. Шевчук В. І.



2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження: застосування україномовної версії опитника RAID для оцінювання впливу захворювання на стан хворих на ревматоїдний артрит.

2. Установа, її адреса, виконавці: кафедра внутрішньої медицини №1 Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, аспірант Заїчко Катерина Олександрівна.

3. Джерела інформації:

1. Станіславчук, М.А. Крос-культуральна адаптація та валідація україномовної версії RAID у хворих на ревматоїдний артрит / М.А. Станіславчук, К.О. Заїчко // Український ревматологічний журнал. - 2019.- № 3 (77). - С. 51-55.

2. Заїчко, К.О. Досвід застосування опитника RAID у хворих на ревматоїдний артрит / К.О. Заїчко, Н.В. Школіна, Т. І. Плазовський // Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Стандарти діагностики та лікування в клініці внутрішніх хвороб», 25 квітня 2019 р., Вінниця, 2019. - С.19-20.

4. Де і коли впроваджено: в клінічну роботу ревматологічного відділення Науково-дослідного інституту реабілітації осіб з інвалідністю Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова у 2019 році.

5. Результати впровадження: Використання результатів наукових досліджень К.О. Заїчко, а саме валідизованої україномовної версії опитувальника RAID, підвищує ефективність оцінювання лікарем-ревматологом впливу захворювання на стан пацієнтів з ревматоїдним артритом на етапах діагностики та лікування.

6. Зауваження та пропозиції: не вносилися.

Відповідальний за впровадження:

Завідувачка ревматологічним відділенням,

к.мед.н., доцент

О.Ю. Гашотіна

ПРОДОВЖЕННЯ ДОДАТКУ В



- 1. Назва пропозиції для впровадження:** Добова варіабельність рівнів розчинних тол-подібних рецепторів 2 та ендотеліальної синтази оксиду азоту в сироватці крові у хворих на ревматоїдний артрит: зв'язок з перебігом захворювання.
- 2. Установа, її адреса, виконавці:** кафедра внутрішньої медицини №1 Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, аспірант Заїчко Катерина Олександрівна.
- 3. Джерела інформації:**
1. Заїчко, К. О. Добова варіабельність рівня розчинних тол-подібних рецепторів 2 в сироватці крові жінок, хворих на ревматоїдний артрит: зв'язок з перебігом захворювання / К. О. Заїчко, М. А. Станіславчук, Н. В. Заїчко // Медична та клінічна хімія. - 2019. - № 21 (4). - С. 5-12.
 2. Zaichko, K. Circadian fluctuations of endothelial nitric oxide synthase activity in females with rheumatoid arthritis: a pilot study / K. Zaichko, M. Stanislavchuk, N. Zaichko // Rheumatology International. - 2020. - Vol. 4. – 6 p. DOI 10.1007/s00296-020-04525-4
- 4. Де і коли впроваджено:** в науково-педагогічну роботу кафедри внутрішньої медицини №2 Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова у 2019-2020 році.
- 5. Результати впровадження:** Використання результатів наукових досліджень К.О. Заїчко в науково-навчальному процесі дозволяє поглибити знання студентів, аспірантів, лікарів-інтернів щодо клініко-патогенетичної ролі хронобіологічних порушень синтезу медіаторів запалення та ангіогенезу, діагностичної та прогностичної цінності тол-подібних рецепторів 2 та ендотеліальної синтази оксиду азоту, за умов ревматоїдного артриту.
- 6. Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Відповідальний за впровадження:
Завідувач кафедри
внутрішньої медицини №2
Вінницького національного
медичного університету ім. М.І. Пирогова,
д.м.н., професор

С.В. Шевчук