

## 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 ступеня доктора філософії з галузі знань 22 «Охорона здоров'я» 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 08<sup>00</sup> та максимальним рівнем (акрофазою) о 20<sup>00</sup>. У хворих на РА упродовж доби виявляється статистично значуще зниження рівнів NOS3 порівняно із групою контролю, із найбільшими відмінностями о 08<sup>00</sup> ( $401,4 \pm 123,7$  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 08<sup>00</sup>, о 20<sup>00</sup> та середньодобовий у осіб віком  $\leq 25$  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 08<sup>00</sup>, 20<sup>00</sup> 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 08<sup>00</sup> 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 08<sup>00</sup> та мінімальним рівнем (батіфазою) о 20<sup>00</sup>. У хворих на РА упродовж доби виявляються більш високі рівні sTLR2,

ніж у осіб групи контролю, особливо вранці о 08<sup>00</sup> (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 їх 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 08<sup>00</sup> ( $> 375$  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  $\leq 420$  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  $\geq 375$  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 08<sup>00</sup>), ввечері (о 20<sup>00</sup>) 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.

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 валідація 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 і 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) 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 Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова. - № и 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. - № и 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 ревматоїдний 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. *(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 ревматоїдний 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 ревматоїдний 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)*.