

КОРРЕЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ И ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ АРТРИТАХ

ИВАНОВА С.В., КИРПИЧЕНКО Л.Н. КУНДЕР Е.В.

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Резюме. В данной работе исследована взаимосвязь между спектральными характеристиками и показателями протеолитической и ингибиторной активности сыворотки крови и синовиальной жидкости при артритах. Анализ полученных корреляционных зависимостей свидетельствует о том, что в синовиальной жидкости, так же, как и в сыворотке крови больных артритами, показатели флуоресценции тесно связаны с протеолитической активностью данных биологических жидкостей. Установлено комплексное влияние активности протеолиза и содержания основных ингибиторов на флуоресценцию сыворотки крови и синовиальной жидкости при артритах. Установленные корреляционные зависимости позволили также сделать вывод о том, что биохимические и спектральные показатели сыворотки крови отражают состояние синовиальной жидкости.

Ключевые слова: флуоресценция, протеолитическая активность, сыворотка крови, синовиальная жидкость.

Abstract. In the given work the interrelation between spectral characteristics and parameters of proteolytic and inhibitor activity of blood serum and synovial fluid in arthritis was investigated. The analysis of correlation dependences testifies that in synovial fluids as well as in blood serum of the patients suffering from arthritis parameters of fluorescence are closely connected with proteolytic activity of the given biological fluids. Complex influence of proteolytic and inhibitor activity on fluorescence of blood serum and synovial fluid in arthritis was established. The determined correlation dependences also allowed to draw a conclusion that biochemical and spectral parameters of blood serum reflect the condition of synovial fluid.

Одним из наиболее эффективных дополнительных методов контроля за гомеостазом живых систем является флуоресцентный метод. Известно, что сыворотка крови и синовиальная жидкость обладают собственной флуоресценцией как в ультрафиолетовой, так и в видимой областях [1]. В основном флуоресцентные исследования сыворотки крови и синовиальной жидкости при артритах проводились с помощью флуоресцентных зондов. Так, спектральные параметры ком-

понентов синовиальной жидкости были информативны при изучении различных заболеваний суставов с помощью зондовой флуоресценции [2, 3]. Сведений об исследовании собственной флуоресценции данных биологических материалов крайне мало. Было установлено, что определение спектрально-флуоресцентных характеристик синовиальной жидкости может быть использовано как дополнительный метод, позволяющий с высокой точностью диагностировать пигментный ворсинчато-узелковый синовит (ПВУС) [4]. Основные отличия собственной флуоресценции синовиальной жидкости при ПВУС зак-

Адрес для корреспонденции: 210041, г. Витебск, ул. Чкалова, д. 41, к. 2, кв. 9, моб. +375-297-124-124, e-mail: ablajey@yandex.ru. – Иванова С.В.

лючались в смещении положения максимума спектра в более длинноволновую область по сравнению с положением максимумов спектров флуоресценции синовитов другой этиологии.

Одними из основных компонентов, влияющих на количественный и качественный состав сыворотки крови и синовиальной жидкости при патологии, являются продукты протеолиза белков, называемые пептидами средней массы. Различные патологические состояния сопровождаются увеличением их содержания в сыворотке крови, синовиальной жидкости и нарушениями в работе протеолитической и ингибиторной системы. Они обладают токсическим действием и являются одним из показателей синдрома эндогенной интоксикации организма [5-7].

При заболеваниях суставов также срабатывают такие патогенетические механизмы развития синдрома эндогенной интоксикации, как биохимический и иммунологический – неконтролируемая активация протеолиза с угнетением его естественных ингибиторов, нарушением общего ферментативного гомеостаза организма и иммунологические нарушения с накоплением продуктов расщепления пластического материала [7]. Согласно литературным данным, протеолитическая активность сыворотки крови и синовиальной жидкости при артритах повышалась, а сведения о содержании основных ингибиторов протеолиза носили разнонаправленный характер [8-11]. Противоречивость литературных данных говорит о том, что до сих пор остается много неясных моментов в механизмах действия протеиназ-ингибиторной системы и отдельных ее компонентов при артритах.

Протеолитические процессы, образование комплекса между ферментом и субстратом, ферментом и ингибитором сопровождаются существенными перестройками в белковых молекулах, что, несомненно, должно отразиться на флуоресценции хромофорных аминокислотных остатков реагирующих веществ. Ранее нами была выявлена достоверная корреляционная взаимосвязь между интенсивностью флуоресценции продуктов ферментативной реакции и активностью протеолиза в мо-

дельных системах *in vitro* [12], что предполагает использование интенсивности флуоресценции в качестве параметра, достоверно описывающего изменения в белковых системах при фермент-субстратных взаимодействиях. Кроме того, эффективность флуоресцентных методов, малочисленность флуоресцентных исследований ферментативных взаимодействий и их кинетики *in vitro* [13, 14] и *in vivo* вызывают необходимость изучения возможной взаимосвязи между показателями протеолитической и ингибиторной активности и параметрами спектров флуоресценции данных биологических материалов при различных патологических процессах. Возможно, флуоресцентные исследования сыворотки крови и синовиальной жидкости позволят более досконально изучить молекулярные механизмы функционирования протеолитической системы при острых и хронических воспалительных процессах.

Поэтому целью данной работы было более детальное исследование корреляционных взаимосвязей между спектральными характеристиками данных биологических материалов и их протеолитической и ингибиторной активностью при артритах.

Методы

Для определения собственной флуоресценции, ферментативной и протеолитической активности сыворотки крови и синовиальной жидкости было обследовано 79 больных артритами. Исследования проводились у лиц обоего пола в возрасте 30-50 лет. В указанное выше общее число пациентов вошли 33 человека с ревматоидным артритом (РА), 21 человек с псориатическим артритом (ПА) и 25 человек с реактивным артритом (РеА). Контрольную группу (КГ) для сравнения с группами больных (пациентов) составили 46 практически здоровых доноров в возрасте 30-50 лет.

Исследуемым биологическим материалом являлась сыворотка крови и синовиальная жидкость людей, которые хранились не более 14 дней при температуре -20°C . Для проведения флуориметрического исследования сыворотку подвергали однократному раз-

мораживанию при комнатных условиях и затем разводили в 20 раз 0,89%-ным раствором NaCl. Образцы синовиальной жидкости после однократного размораживания разводили в 10 раз 0,9%-ным физиологическим раствором и центрифугировали в течение 15 минут при 1500 об./мин. Надосадочную жидкость отбирали и обозначали как бесклеточный экстракт синовиальной жидкости. Спектры флуоресценции регистрировали непосредственно после разведения при комнатной температуре на спектрофлуориметре CM-2203 (SOLAR, Беларусь) при длине волны возбуждения 286 нм в диапазоне 300-500 нм с использованием кварцевой кюветы размером 1,2x1,2 см. Ширина входной и выходной щелей монохроматоров составляла соответственно 5 нм и 2 нм соответственно [15-17]. Спектры флуоресценции всех образцов сыворотки крови, синовиальной жидкости и продуктов ферментативных реакций были откорректированы по спектральной квантовой чувствительности соответственно техническим характеристикам прибора [18]. Интенсивность флуоресценции (I) выражали в относительных единицах (отн. ед.) [17].

Определение протеолитической активности в сыворотке крови и синовиальной жидкости проводили с использованием в качестве субстратов высокостабильного в растворе низ-

комолекулярного хромогенного соединения – N- α -бензоил-D,L-аргинин паранитроанилид (БАПНА) и белкового субстрата – сывороточного альбумина человека (САЧ).

При использовании БАПНА для определения общей протеолитической активности (ОПА) за основу брали метод Erlander V. F. et al. [19, 20]. Основой для определения активности основных ингибиторов (антипротеиназного ингибитора (АПИ) и α_2 -макроглобулина (α_2 -МГ)) служил метод, предложенный Т.А. Хватовым и В.Б. Беловой [21].

Для определения ферментативной (белокрасящей, протеолитической) активности сыворотки крови и синовиальной жидкости в качестве субстрата был также использован САЧ [22], поскольку он является естественным субстратом для протеиназ и обладает собственной флуоресценцией в диапазоне 330-350 нм (в зависимости от условий возбуждения и регистрации спектра). Регистрацию активности осуществляли:

- а) по изменению интенсивности флуоресценции продуктов реакции ферментативного взаимодействия с САЧ ($I_{пр., 338}$);
- б) по концентрации ТХУ-растворимых продуктов реакции (ΔA_{280}).

Схема проведения эксперимента приведена в таблице 1.

Таблица 1

Схема проведения эксперимента по определению ферментативной (протеолитической) активности сыворотки крови и синовиальной жидкости (субстрат – САЧ)

	Ингредиенты	Количество, мкл	
а)	Сыворотка крови или бесклеточный экстракт СЖ	500	
	3% САЧ (конечная концентрация 5 г/л)	500	
	0,2 М Трис-НСI буфер (рН 8,0)	500	
	0,89% раствор NaCl	1600	
	Перемешать, инкубировать 90 минут при $t=37^\circ\text{C}$, измерить интенсивность флуоресценции продуктов реакции $I_{пр., 338}$ при длине волны возбуждения 286 нм в диапазоне 300-500 нм, кювета 12 мм		
б)	Сыворотка крови или бесклеточный экстракт СЖ	500	
	3% САЧ (конечная концентрация в растворе 5 г/л)	500	
	0,2 М Трис-НСI буфер (рН 8,0)	500	
	0,89% раствор NaCl	1600	
	Перемешать, инкубировать 90 минут при $t=37^\circ\text{C}$		
	20% ТХУ (конечная концентрация в растворе 2,78%)	0,5	
	Пробы охладить, центрифугировать (1500 об/мин в течение 10 мин при $+5^\circ\text{C}$). Измерить величину светопоглощения в надосадочной жидкости при 280 нм (ΔA_{280}), кювета 10 мм		

Для определения протеолитической активности реакцию останавливали путем добавления трихлоруксусной кислоты (ТХУ) в конечной концентрации 2,78%. Протеолитическую активность в надосадочной жидкости определяли после охлаждения проб и их центрифугирования (1500 об/мин в течение 10 мин при 5°C) по величине светопоглощения при 280 нм [22] и выражали в условных единицах (ΔA_{280}).

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с помощью пакета прикладных программ «Statistica 6.0». Выявление функциональных взаимосвязей между изучаемыми параметрами (корреляция) проводилось с помощью вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r Спирмена) с указанием вида и значимости (достоверности) коэффициента корреляции (P) [23, 24].

Результаты

Ранее [25, 26] нами было установлено, что такие параметры, как интенсивность собственной флуоресценции (I_{333}), продуктов ферментативной реакции взаимодействия с САЧ ($I_{пр., 338}$), показатели протеолитической и ингибиторной активности сыворотки крови и синовиальной жидкости (ОПА, АПИ, α_2 -МГ) при артритах достоверно описывают данный патологический процесс и могут использоваться в качестве его дополнительной характеристики.

Для установления наличия и степени связи между показателями протеолитической активности (ОПА, ΔA_{280}), содержанием основных ингибиторов в сыворотке крови (АПИ, α_2 -МГ) и ее спектральными характеристиками (I_{333} , $I_{пр., 338}$) нами исследовались соответствующие корреляционные связи между этими показателями в каждой отдельно взятой группе больных артритами и в КГ.

В контрольной группе (рисунок 1А) была установлена умеренная положительная корреляционная связь между показателями протеолиза ОПА и α_2 -МГ ($r=0,54$; $P<0,05$), что объясняется адаптивным синтезом и/или выбросом ингибиторов в ответ на повышение протеолитической активности. Умеренная отрица-

тельная связь между ОПА и АПИ ($r=-0,42$; $P<0,05$), вероятно, свидетельствует о повышении потребления АПИ не только как ингибитора протеолиза, но и как реактанта острой фазы. Было также установлено, что у здоровых доноров имелась умеренная отрицательная связь между $I_{пр., 338}$ и ΔA_{280} ($r=-0,41$; $P<0,05$), что соответствует данным, полученным нами ранее в эксперименте *in vitro* [12]. Кроме того, обнаружена умеренная положительная корреляционная связь между $I_{пр., 338}$ и α_2 -МГ ($r=0,42$; $P<0,05$) и умеренная отрицательная связь между $I_{пр., 338}$ и АПИ ($r=-0,42$; $P<0,05$), аналогично корреляционным связям между ОПА – α_2 -МГ и ОПА – АПИ. Однотипность корреляционных связей, вероятно, подтверждает, что показатель $I_{пр., 338}$ отражает активность протеолитических процессов в сыворотке крови КГ.

Совершенно иным был характер корреляции флуоресценции и показателей протеолиза в сыворотке крови больных РА, РеА и ПА (рисунок 1 Б, В, Г). Корреляция между интенсивностью флуоресценции продуктов расщепления САЧ ($I_{пр., 338}$) и α_2 -МГ имела место только при РА, но не положительная, как в КГ, а умеренная отрицательная ($r=-0,51$; $P<0,05$). В группах РеА и ПА, в отличие от КГ, интенсивность флуоресценции продуктов расщепления САЧ ($I_{пр., 338}$) при РеА и ПА не отражала интенсивность протеолиза ни по активности ферментов, ни по содержанию ингибиторов, поскольку не было выявлено достоверных корреляционных связей между интенсивностью флуоресценции продуктов ферментативной реакции взаимодействия сыворотки крови с САЧ ($I_{пр., 338}$) и показателями протеолиза.

Неожиданным было обнаружение однотипных корреляционных связей между собственной флуоресценцией сыворотки крови и активностью протеиназ и их ингибиторов: умеренная положительная корреляционная связь между I_{333} и ОПА ($r=0,58$; $P<0,05$) в группе РА и положительная связь между I_{333} и АПИ в группах РеА и ПА (для РеА – умеренная $r=0,61$; $P<0,05$; для ПА – сильная $r=0,76$; $P<0,05$). Это может быть связано с составом, конформационными изменениями белков сы-

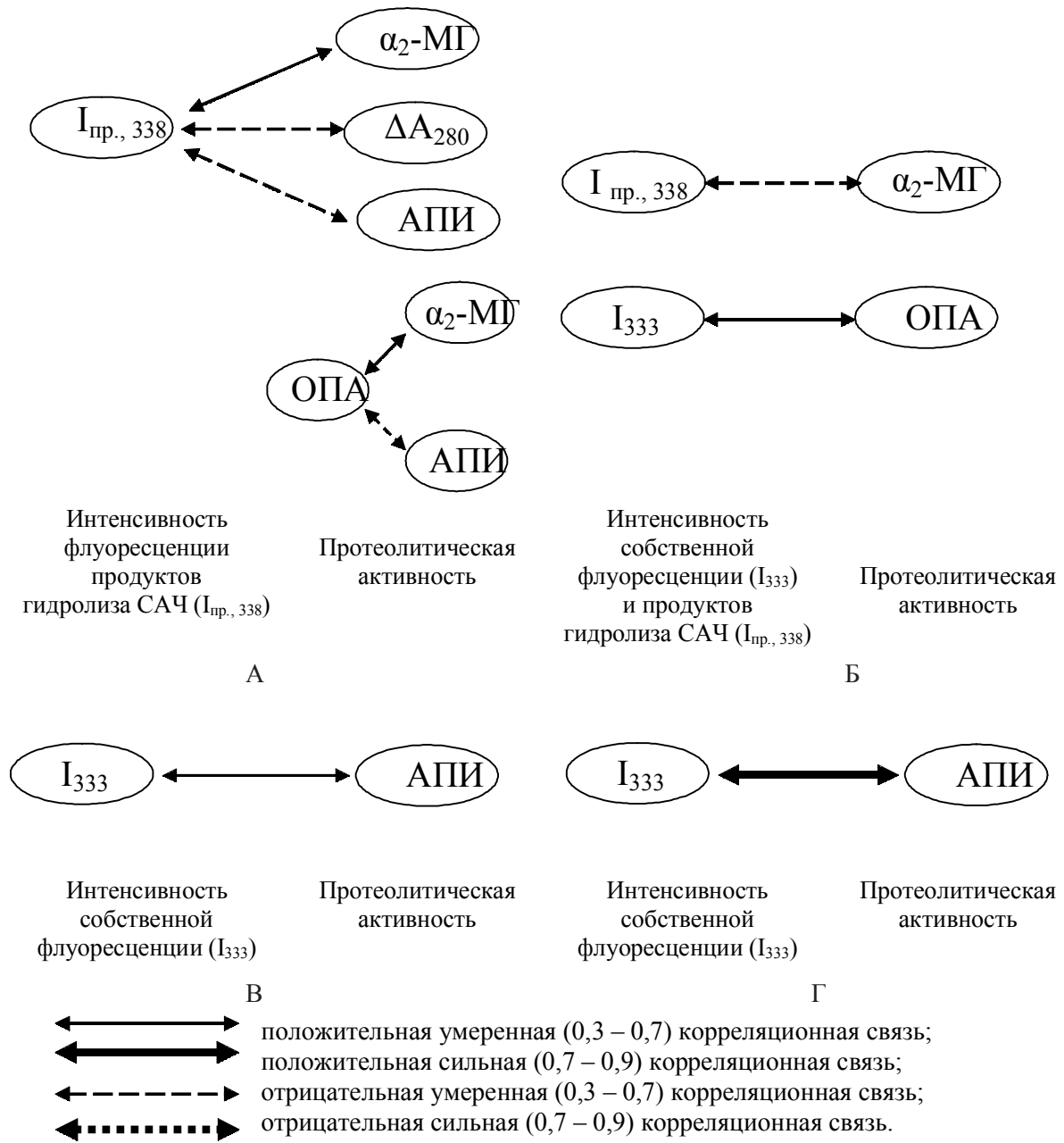


Рис. 1. Корреляционные зависимости между интенсивностью собственной флуоресценции сыворотки крови (I_{333}), флуоресценцией продуктов ферментативной реакции ($I_{пр., 338}$) и показателями протеолитической и ингибиторной активности сыворотки крови при артритах и в контрольной группе. А – контрольная группа; Б – ревматоидный артрит; В – реактивный артрит; Г – псориатический артрит.

воротки крови вследствие их ограниченного протеолиза, усилением процесса распада белков и накоплением продуктов протеолиза, низко- и среднемолекулярных органических веществ, поступающих в кровь при этих заболеваниях, продуктов нарушенного метаболизма соединительной ткани [7].

Взаимосвязь между интенсивностью флуоресценции и протеолитической активностью синовиальной жидкости при артритах в каждой отдельно взятой группе была несколько иной, чем в сыворотке крови, и выражалась в следующих корреляционных зависимостях (рисунок 2 А, Б, В).

В синовиальной жидкости больных РА (рисунок 2 А) наблюдалась сильная отрицательная связь между $I_{пр.,338}$ и ОПА ($r = -0,90$; $P < 0,05$) и умеренная отрицательная связь между $I_{пр.,338}$ и ΔA_{280} ($r = -0,41$; $P < 0,05$). В группе больных РеА (рисунок 2-Б) показатель $I_{пр.,338}$ имел умеренную отрицательную корреляционную связь с АПИ ($r = -0,53$; $P < 0,05$), а показатель I_{335} – сильную положительную связь с ОПА ($r = 0,80$; $P < 0,05$). Для синовиальной жидкости больных ПА (рисунок 2 В) была характерна сильная отрицательная корреляционная связь между $I_{пр.,338}$ и АПИ ($r = -0,89$; $P < 0,05$) и умеренная отрицательная связь между $I_{пр.,338}$ и ΔA_{280} ($r = -0,50$; $P < 0,05$). Отрицательные корреляционные связи между $I_{пр.,338}$ и ΔA_{280} в синовиальной жидкости в группах больных РА и ПА соответствуют результатам, полученным

нами ранее для модельной системы расщепления САЧ трипсином *in vitro* [12] (как и в сыворотке крови КГ).

Чтобы установить возможную взаимосвязь между процессами, происходящими в сыворотке крови и синовиальной жидкости, нами были исследованы дополнительные корреляционные связи. Для этого был проведен анализ соотношения показателей протеолитической активности (ОПА, ΔA_{280}), содержания основных ингибиторов (АПИ, α_2 -МГ) и спектральных характеристик (I_{333} , I_{335} , $I_{пр.,338}$) между синовиальной жидкостью и сывороткой крови для каждого показателя в отдельности (рисунок 3 А, Б).

Полученные корреляционные зависимости были следующими. В группах больных РА и РеА (рисунок 3 А) была обнаружена силь-

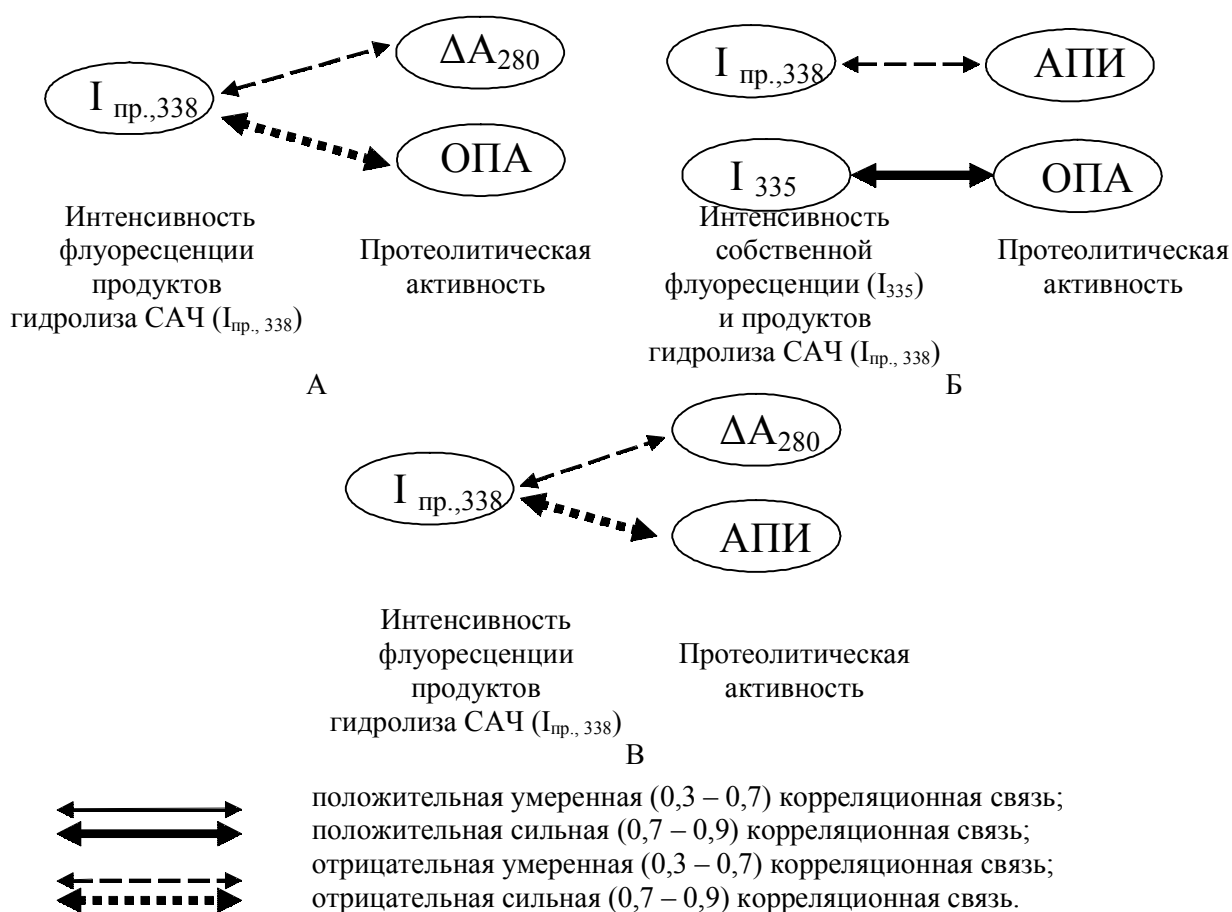


Рис.2. Корреляционные зависимости между интенсивностью собственной флуоресценции синовиальной жидкости (I_{335}), флуоресценцией продуктов ферментативной реакции $I_{пр.,338}$ и показателями протеолитической и ингибиторной активности синовиальной жидкости при артритах. А – ревматоидный артрит; Б – реактивный артрит; В – псориатический артрит.



Рис.3. Корреляционные взаимосвязи между сывороткой крови и синовиальной жидкостью по показателям протеолитической и ингибиторной активности у больных артритами. А – ревматоидный и реактивный артриты; Б – псориатический артрит.

ная положительная корреляционная связь между сывороткой крови и синовиальной жидкостью по показателю ОПА ($r=0,71$; $P<0,05$ и $r=0,80$; $P<0,05$ соответственно). В группе ПА между сывороткой крови и синовиальной жидкостью также имела место сильная корреляционная связь по содержанию АПИ ($r=0,91$; $P<0,05$). Вероятно, уровень ОПА в сыворотке крови при РА и РеА в какой-то степени отражает протеолитическую активность в синовиальной жидкости, а содержание АПИ в сыворотке крови при ПА – его содержание в синовиальной жидкости.

Интенсивность протеолиза в сыворотке крови по флуоресценции продуктов ферментативной реакции (показатель $I_{пр., 338}$) при РА также имела умеренную положительную корреляционную связь с аналогичным показателем в синовиальной жидкости ($r= - 0,55$; $P<0,05$). По-видимому, основное значение при РА в синовиальной жидкости имеет активность не клеток суставной жидкости, а ферментов сыворотки крови, т. к. воспаление приводит к разрушению тканей пораженных суставов, усилению дренирования пораженных тканей, вследствие чего повышается проницаемость гистогематических барьеров, что увеличивает темпы поступления аутоантител, а также цитолитических и цитотоксических лимфоцитов [27].

Заключение

Анализ полученных корреляционных зависимостей свидетельствует о том, что в синовиальной жидкости, так же, как и в сыворотке крови больных артритами, показате-

ли флуоресценции тесно связаны с их протеолитической активностью. Интенсивность собственной флуоресценции сыворотки крови и синовиальной жидкости в максимуме спектра во всех группах больных коррелировала с интенсивностью протеолиза, что выразилось в положительной корреляционной связи с ОПА или АПИ.

Интенсивность флуоресценции продуктов ферментативной реакции взаимодействия и сыворотки крови и синовиальной жидкости с САЧ ($I_{пр., 338}$) имела в основном отрицательную корреляционную связь с интенсивностью протеолиза и содержанием основных ингибиторов.

Установленная *in vivo* в КГ в сыворотке крови, у больных РА и ПА в синовиальной жидкости корреляционная взаимосвязь между интенсивностью флуоресценции продуктов реакции гидролиза САЧ энзимами сыворотки крови и синовиальной жидкости ($I_{пр., 338}$) и белок-расщепляющей активностью (ΔA_{280}) носила такой же характер, как и для модельной системы расщепления САЧ трипсином, установленная нами ранее. При РеА подобной зависимости выявлено не было.

Корреляционные связи между сывороткой крови и синовиальной жидкостью по аналогичным показателям выявили сильную положительную корреляцию в группах больных Ра и РеА по показателю ОПА, а также сильную положительную корреляционную связь в группе ПА по содержанию АПИ.

Обнаруженные изменения интенсивности показателей флуоресценции и протеолитической активности в сыворотке крови и синовиальной жидкости и различные типы кор-

реляции между ними свидетельствуют о первые выявленной взаимосвязи собственной флуоресценции, флуоресценции продуктов ферментативной реакции с активностью протеолитических ферментов и их ингибиторов.

Литература

1. Черницкий, Е. А. Спектральный люминесцентный анализ в медицине / Е.А. Черницкий, Е. И. Слобожанина. – Минск: Наука и техника, 1989. – 141 с.
2. Использование флуоресцентных зондов в исследовании компонентов синовиальной жидкости при патологии суставов / Е. И. Слобожанина [и др.] // Вест. Нац. Акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2006. – № 4. – С. 10-14.
3. Козлова, Н. М. Исследование синовиальной жидкости с помощью флуоресцентных зондов / Н. М. Козлова [и др.] // IV съезда фотобиологов России: сб. тез. докл. на IV съезде фотобиологов России, 26-30 сент. 2005. г. Саратов. – С. 76-78.
4. Спектрально-флуоресцентное исследование синовиального выпота в диагностике хронических заболеваний суставов / Е. И. Слобожанина [и др.] // Ревматология. – 1990. – №1. – С.32-34.
5. Зубовская, Е. Т. Синдром эндогенной интоксикации. / Е.Т. Зубовская, В. Г. Колб // Здоровоохранение Беларуси. – 1994. – №9. – С. 60-65.
6. Зайденберг, М. А. Изменение флуоресценции триптофана в сыворотке крови как возможный показатель развития генерализации гнойной инфекции / М.А. Зайденберг, Р. П. Терехова // Биохимические проблемы хирургии: сб. научн. тр. – М., 1991. – С. 47-61.
7. Корякина, Е. В. Особенности патогенетических механизмов эндогенной интоксикации у больных ревматоидным артритом / Е. В. Корякина, С. В. Белова // Научно-практическая ревматология. – 2001. – №1. – С. 1-7.
8. Руденко, В. Г. Протеолитические ферменты и их ингибиторы при артритах / В. Г. Руденко, Ю. В. Руденко // Ревматология. – 1990. – № 4. – С. 42-50.
9. Трофименко, Н. А. Особенности воспалительной реакции при коллагенозах. / Н. А. Трофименко [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2004. – №4. – С. 21- 25.
10. α -2-макроглобулин, его комплексы с IgG и некоторые факторы гуморального иммунитета при ревматоидном артрите / В. Н. Зорина [и др.] // Научно-практическая ревматология. – 2006. – №1. – С. 22-27.
11. Комплексы альфа-2-макроглобулина с антителами класса IgG, плазмином и их взаимосвязь с другими факторами гуморального иммунитета при развитии ревматоидного артрита / В. Н. Зорина [и др.] // Медицинская иммунология. – 2005. – Т. 7, № 5-6. – С. 557-562.
12. Иванова, С. В. Собственная флуоресценция человеческого сывороточного альбумина и продуктов его протеолитического расщепления / С. В. Иванова, Л. Н. Кирпиченок // Вести НАН Беларуси. Сер. биол. наук. – 2009. – №4. – С. 82-88.
13. Бурштейн, Э. А. Люминесценция ароматических аминокислот и белков в растворах при возбуждении в коротковолновой ультрафиолетовой области. / Э. А. Бурштейн // Биофизика. – 1961. – Т. 6, В.6. – С. 753-763.
14. Исследование конформационных переходов в уреазе / Е. А. Черницкий [и др.] // Биофизика. – 1968. – Т. 13, В.4. – С. 581-586.
15. Дюбко, Т. С. О некоторых аспектах применения флуоресцентного анализа в криобиологии. 1. Собственная флуоресценция белков / Т. С. Дюбко // Вестник Харьков. нац. ун-та. Сер. биология. – 2006. – В. 3. – № 729. – С. 221-231.
16. Черницкий, Е. А. Люминесценция и структурная лабильность белков в растворе и клетке / Е. А. Черницкий. – Минск: Наука и техника, 1972. – 258 с.
17. Лакович, Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии / Дж. Лакович. – М.: Мир, 1986. – 496 с.
18. Левшин, Л. В. Оптические методы исследования молекулярных систем / Л.В. Левшин. ч. 1.: Молекулярная спектроскопия / Л. В. Левшин, А. М. Салецкий – М.: Изд-во МГУ, 1994. – 158 с.
19. Erlanger, D.F. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin / D.F. Erlanger, N. Kokowsky // Arch. Biochem. Biophys. – 1961. – Vol. 95, N 2. – P. 271-278.
20. Назаренко, Г. И. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. / А. А. Кишкун, Г. И. Назаренко – М.: Медицина, 2000. – 542 с.
21. Хватов, В.Б. Ускоренный метод определения основных ингибиторов протеиназы в плазме крови человека: метод. рекомендации / В. Б. Хватов, Т.А. Белова; МЗ РСФСР. – М., 1981. – 16 С.
22. Алексеенко, Л. П. Современные методы в биохимии / Л. П. Алексеенко – М., 1968. – С. 115–130.
23. Авива, П. Наглядная медицинская статистика: пер. с англ. / П. Авива, К. Сэбин; под ред. В. П. Леонова. – 2-е изд. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 168 с.
24. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica / О. Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера, 2003. – 312 с.
25. Иванова, С. В. Спектрально-флуоресцентный анализ и протеолитическая активность сыворотки крови и синовиальной жидкости при артритах. / С. В. Иванова [и др.] // Журн. Гродн. гос. мед. ун-та. – 2009. – № 4. – С. 73-77.
26. Иванова, С. В. Сравнительный анализ собственной флуоресценции и протеолитической активности сыворотки крови и синовиальной жидкости при артритах / С. В. Иванова // Вестн. ВГМУ. – 2009. – Т. 8, № 4. – С.100-105.
27. Молекулярные механизмы иммунопатогенеза и терапии при ревматоидном артрите / Н. А. Зорин [и др.] // Тер. архив. – 2005. – №12. – С. 88-91.

Поступила 14.07.2010 г.

Принята в печать 02.09.2010 г.