

Міністерство освіти і науки України
Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича
Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів
Кафедра біохімії та біотехнології

**ПОКАЗНИКИ ЗАПАЛЕННЯ ЯК МАРКЕРИ РІЗНИХ СТАДІЙ
РЕВМАТОЇДНОГО АРТИРИТУ**

Дипломна робота
ОКР «Бакалавр»

Виконав: студент IV курсу, групи
спеціальності 091-біологія
(шифр і назва спеціальності)

Михайло ДОЙЧУК

Керівник: к.б.н., доц. Волощук О.М.

До захисту допущено
на засіданні кафедри
протокол № _____ від _____ 2025 р.
Зав. кафедрою _____ доцент Волощук О.М.

Чернівці, 2025

АНОТАЦІЯ

Бакалаврська робота присвячена аналізу лабораторних маркерів запалення у пацієнтів з ранньою та пізньою стадією ревматоїдного артрити. Встановлено, що вже на ранніх стадіях ревматоїдного артрити спостерігається виражене підвищення вмісту С-реактивного протеїну та ШОЕ як маркерів запалення, які досягають максимальних значень у пацієнтів з пізньою стадією захворювання, та вказують на інтенсивність імунозапального процесу при ревматоїдному артриті.

Водночас показано, що навіть на ранній стадії захворювання спостерігається значне підвищення вмісту РФ ІgM, досягаючи максимальних значень у пацієнтів з пізньою стадією ревматоїдного артрити, що вказує на порушення механізмів імунорегуляції при ревматоїдному артриті.

Ключові слова: ревматоїдний артрит, С-реактивний протеїн, ШОЕ, ревматоїдний фактор ІgM

ABSTRACT

The bachelor's thesis analyzes laboratory markers of inflammation in patients with early and late stages of rheumatoid arthritis. It was established that already in the early stages of rheumatoid arthritis, there is a pronounced increase in the content of C-reactive protein and ESR as markers of inflammation, which reach maximum values in patients with a late stage of the disease, and indicate the intensity of the immunoinflammatory process in rheumatoid arthritis.

At the same time, it is shown that even in the early stage of the disease, there is a significant increase in the content of RF IgM, reaching maximum values in patients with a late stage of rheumatoid arthritis, which indicates a violation of the mechanisms of immunoregulation in rheumatoid arthritis.

Key words: rheumatoid arthritis, C-reactive protein, ESR, rheumatoid factor IgM

Зміст

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ I ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	
1. Основні аспекти патогенезу ревматоїдного артриту.....	7
2. Імунологічні механізми перебігу ревматоїдного артриту.....	9
3. Сучасні підходи до ранньої діагностики ревматоїдного артриту.....	10
4. Імунологічні маркери ревматоїдного артриту.....	12
5. Методи визначення маркерів ревматоїдного артриту.....	14
РОЗДІЛ II МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....	16
2.1. Об'єкти та методи дослідження.....	16
РОЗДІЛ III РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	20
ВИСНОВКИ.....	23
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	24
ДОДАТКИ.....	27

Вступ

Ревматоїдний артрит належить до хронічних запальних захворювань з прогресуючим перебігом, симетричним ураженням суглобів, що відноситься до системних форм аутоімунних станів, у патогенезі якого ключову роль відіграють зміни у складі гуморальної і клітинної ланки імунітету з формуванням аутоімунного синдрому [1, 2].

Характерною ознакою ревматоїдного артриту є ревматоїдне запалення, що зумовлене порушенням балансу між прозапальними (інтерлейкін-1, фактор некрозу альфа) та протизапальними (інтерлейкін-4, інтерлейкін-8) цитокінами з перевагою синтезу перших над другими [3].

Основним проявом ревматоїдного артриту є ураження суглобів. “На обмеження функції суглоба впливає як ступінь місцевого запалення, так і поява ознак кістково-деструктивних змін. Наявність персистувального запалення в суглобовій порожнині є основною причиною формування морфологічних кісткових змін. Важливим прогностичним чинником для хворих на ревматоїдний артрит є раннє призначення антиревматичної терапії, що пригнічує специфічну імунну відповідь і місцеве запалення в суглобах, а також перешкоджає формуванню органічних структурних змін” [2].

Одне із пріоритетних місць в ревматологічних дослідженнях займає пошук маркерів раннього ревматоїдного артриту [4]. Своєчасне встановлення правильного діагнозу вчасне призначення антиревматичних лікарських засобів на початкових стадіях захворювання значно знижує ризик інвалідизації та значно покращує якість життя таких хворих.

На сьогодні важлива роль відводиться дослідженню діагностичного та прогностичного значення різних імунологічних маркерів при ревматоїдному артриті. Для оцінки особливостей патогенезу захворювання визначають концентрацію аутоантитіл у сироватці крові.

Поява аутоантитіл при ревматоїдному артриті може відображати специфічну реактивність імунної системи, а серологічний статус хворого може визначати особливості патології і та її наслідки [5].

У роботі розглянуті механізми імунопатогенезу при ревматоїдному артриті та діагностична і прогностична значимість факторів аутоімунітету та імунозапальних реакцій у патогенезі ревматоїдного артритру.

Тому **метою** нашої роботи став аналіз лабораторних маркерів запалення у пацієнтів з ранньою та пізньою стадією ревматоїдного артритру.

Для досягнення мети були поставлені **завдання**:

1. Проаналізувати показники С-реактивного протеїну та ШОЕ у пацієнтів з ранньою та пізньою стадією ревматоїдного артритру.
2. Оцінити показники вмісту РФ ІgМ у хворих з різними стадіями ревматоїдного артритру.

РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1. Основні аспекти патогенезу ревматоїдного артриту

Ревматоїдний артрит – поширене системне запальне захворювання аутоімунної природи, “що характеризується розвитком хронічного деструктивного артриту та широким спектром позасуглобових проявів” [6]. В Україні щорічно відзначають збільшення кількості пацієнтів з ревматоїдним артритом. В останнє десятиліття показано, що половина пацієнтів втрачає працездатність, з яких кожний п’ятий хворий стає прикутим до ліжка [7].

Ревматоїдний артрит – хронічне системне сполучнотканинне захворювання з “прогресуючим ураженням переважно периферичних (синовіальних) суглобів за типом ерозивно-деструктивного поліартриту. Співвідношення між чоловіками і жінками, які хворіють на ревматоїдний артрит, становить 2-3:1, при цьому вражаються представники всіх вікових груп, включаючи дітей та осіб похилого віку, однак пік захворюваності припадає на 30-55 років” [8].

Ревматоїдний артрит супроводжується запаленням синовіальної оболонки (синовітом) і деструкцією хряща, що є результатом посиленого утворення цитокінів та інших прозапальних медіаторів. Нині відомо, що у розвитку ревматоїдного синовіту задіяні три механізми – неімунний, імуногенетичний та апоптозний.

Основна причина ключового прояву ревматоїдного артриту – деградації хряща й кістки – є інфільтрація хрящової тканини “трансформованими” синовіальними фібробластами. “Одним із можливих механізмів активації вважають головний клітинний сигнальний каскад – онкогенну мережу, за участі так званих протоонкогенів – *myb*, *myc*, *sis*, *ras*, які трансформують нормальний клітинний цикл і призводять до інвазивної поведінки синовіальних фібробластів при ревматоїдному артриті” [9]. Це вказує на ймовірність неімунних, Т-незалежних способів виникнення ревматоїдного артриту.

Клінічна симптоматика раннього періоду ревматоїдного артриту значно відрізняється від стадії розгорнутих клінічних проявів. Часто пацієнти

відмічають початок розвитку хвороби після перенесеної вірусної або бактеріальної хвороби, травми, пологів, хірургічних операцій тощо. Ці фактори мають опосередковане значення і прискорюють клінічну реалізацію існуючих механізмів розвитку захворювання.

Розвитку артриту за кілька тижнів або місяців може передувати продромальний період: втома, схуднення, артралгія, міальгія, підвищена пітливість. У продромальний період часто розвивається ранкова скутість. Враження суглобів може бути нестійким і самовільно зникати на тривалий час.

В останні десятиліття при постановці діагнозу ревматоїдний артрит використовували класифікаційні критерії, розроблені Американською колегією ревматологів, і які отримали міжнародне визнання і характеризуються високою чутливістю і специфічністю. До них належать: “

1. Ранкова скутість протягом 1 год.
2. Артрит ≥ 3 суглобових зон (набряк м'яких тканин у наступних суглобових зонах: праві й ліві міжфалангові, п'ястно-фалангові, ліктьові, колінні, гомілковостопні, плюсне-фалангові суглоби).
3. Артрит суглобів кисті (припухлість променезап'ястних, п'ястно-фалангових і проксимальних міжфалангових суглобів).
4. Симетричний артрит (одночасне залучення в патологічний процес тих самих суглобових зон по обидва боки тіла).
5. Ревматоїдні вузлики (підшкірні вузлики на виступаючих ділянках кісток, розгинальних поверхнях або біля суглобів, виявлені лікарем).
6. Ревматоїдний фактор у сироватці крові (виявлення аномальної кількості ревматоїдного фактору в сироватці крові).
7. Рентгенологічні зміни (типові для ревматоїдного артриту зміни на рентгенограмі кисті й зап'ястя в передньозадній проекції: ерозії, чіткий остеопороз кісток ураженого суглоба і безпосередньо прилягаючих до нього кісток)” [10].

Якщо у пацієнта виявляють більше 4 із 7 критеріїв, можна встановити діагноз ревматоїдний артрит. Однак ці класифікаційні критерії були

сформульовані на групі пацієнтів із підтвердженим ревматоїдним артритом і не можуть використовуватися як діагностичні критерії для хворих із дебютом, початковими стадіями або у випадку атипового варіанту перебігу цього захворювання.

2. Імунологічні механізми перебігу ревматоїдного артриту

Основою патогенезу ревматоїдного артриту є складне “поєднання генетично детермінованих і набутих дефектів імунорегуляторних механізмів, що обмежують патологічну активацію імунної системи у відповідь на патогенні або фізіологічні стимули” [11].

Патологічні процеси при розвитку ревматоїдного артриту протікають у 3 етапи [12]:

1. Етап “врожденного імунітету”, коли активуються генетично обумовлені імунні механізми шляхом стимуляції дендритних клітин, макрофагів, фібробластів.

2. Етап “адаптивного імунітету”, що характеризується генералізацією процесу з включенням про- і антизапальних процесів.

3. Етап деструкції, коли прозапальні стимули перемагають, відбувається активація остеобластів з резорбцією кісткової тканини і проникнення проліферуючих синовіальних клітин у хрящ.

Розвиток ревматоїдного запалення на першому і частково на другому етапах потенційно найбільш підлягає зовнішнім впливам і в деякій мірі є зворотнім.

У хворих на ревматоїдний артрит спостерігаються зміни у Т-клітинній ланці імунітету, що зумовлені збільшенням субпопуляції Т-лімфоцитів, що експресують фактори активації В-лімфоцитів, що синтезують ревматоїдні фактори (РФ), антитіла до цитрулінованих пептидів [13]. Частота виявлення РФ при ревматоїдному артриті становить до 90 %. Даний показник володіє відносною специфічністю (80-90%) і чутливістю (60-70%) лише у групі хворих

з достовірним діагнозом ревматоїдний артрит, тоді як у групі з раннім ревматоїдним артритом ці показники мають низькі значення (45-50 %) [14].

Більш перспективним у діагностичному і прогностичному плані маркером є антитіла до циклічного цитрулінованого пептиду (аЦЦП) – група аутоантитіл, що містять амінокислоту цитрулін [15]. Виявлення ааЦЦП у хворих на ревматоїдний артрит є предиктором важчого перебігу хвороби. “Процес цитрулінування пептидів відбувається за участю ферменту пептидиларгініндеіменазі (ПАД). Цитрулінування синовіальних білків є активним процесом, що виникає під час запалення. Фізіологічна роль цитрулінування полягає у виконанні важливої ролі щодо підготовки внутрішньоклітинних білків до деградації під час апоптозу, а також у регуляції транскрипції внаслідок цитрулінування гістонів. У запальній синовіальній тканині цитрулінові білки представлені віментином, альфа- та бета-ланцюгами фібрину” [16]. Особлива роль у патогенезі ревматоїдного артриту належить порушенням цитокінової регуляції: спостерігається збільшення у крові інтерлейкінів, ростових факторів ендотеліоцитів, фактору некрозу пухлин α тощо.

3. Сучасні підходи до ранньої діагностики ревматоїдного артриту

Ревматоїдний артрит “характеризується непередбачуваним перебігом та різноманіттям клінічних проявів. Встановлено, що найбільш висока швидкість наростання рентгенологічних змін у суглобах спостерігається протягом перших 2 років захворювання, а в 70 % випадків ерозивно-деструктивні зміни виникають у суглобах протягом перших 3-6 місяців від дебюту захворювання, що корелює з несприятливим перебігом процесу” [17].

Різнманіття варіантів дебюту ревматоїдного артриту значно ускладнює точне встановлення діагнозу в перші місяці після появи ознак захворювання. Ревматоїдний артрит у дебюті – гетерогенне захворювання, в основі патогенезу якого – складне поєднання вроджених і набутих дефектів імунорегуляторних механізмів.

Ранній період захворювання характеризується вираженою активацією лімфоцитів периферійної крові і синовіальної рідини [18]. В периферійній крові відбувається активація Th2-лімфоцитів, в синовіальній рідині активація Th1-лімфоцитів. Інтенсивний синтез антитіл в периферійній крові з утворенням імунних комплексів викликаний В-клітинною активацією.

При артриті на поверхні імунокомпетентних клітин з'являються молекули адгезії. Вони відіграють важливу роль при взаємодії клітин одна з одною, а також з клітинами ендотелію і оточуючого матриксу. До клітинних молекул адгезії належать селектини, інтегрини та імуноглобуліни. Серед рецепторів інтегринів, що присутні на поверхні лімфоцитів, важливу роль відіграють ICAM-1, -2, -3, що експресуються під впливом інтерлейкіну-1, ФНП- α , INF- γ [19].

Герасименко С. з співавторами [20] пропонує діагностичний алгоритм ранньої діагностики ревматоїдного артриту на основі клінічних і лабораторних дослідженнях. За основу брали дані обстеження хворих:“

- анамнез (фактори ризику – інфекція, спадковість);
- скарги (біль, скутість у суглобах, погіршення загального стану і апетиту, швидка втома, втрата ваги);
- розповсюдженість патологічного процесу на інші суглоби.

Клінічне обстеження:

- множинність ураження суглобів;
- симетричність ураження суглобів;
- первинність ураження п'ястково-фалангових та проксимальних міжфалангових суглобів кистей;
- ознаки гострого, підгострого або хронічного синовіту: біль у суглобах, дефігурація суглобів, обмеження рухів, підвищення місцевої температури, напруження капсули суглоба;
- стадійність патологічного процесу в суглобі;
- хронічний прогресуючий характер захворювання” [20].

Інструментальні та лабораторні дослідження:

При рентгенологічному дослідженні – рівномірний остеопороз, порушення архітекτονіки коротких кісток, прогресивне зменшення субхондрального склерозу, порушення структури кісткової тканини.

При біомеханічному дослідженні – виявлено зниження функцій кінцівок, обумовлене процесом запалення суглобів та порушення функцій м'язів.

При серологічному дослідженні – високий рівень антистрептолізину-О у сироватці крові.

При біохімічному дослідженні – підвищення активності еластази, колагенази та катепсину В у крові та синовіальній рідині.

При ультразвуковому обстеженні – потовщення синовіальної оболонки та посилений кровообіг у ній.

При патоморфологічному дослідженні синовіального шару капсули суглобу – мукоїдний набряк, лімфоїдна та плазматична інфільтрація, гіпертрофія ворсин, проліферація синовіальних клітин, фібрин на поверхні синовіального шару [21].

4. Імунологічні маркери ревматоїдного артриту

Дослідження серологічних маркерів ревматоїдного артриту залишається пріоритетним у ревматології. “В останні роки виділений ряд аутоантитіл, які тісно корелюють з ревматоїдним артритом: антикератинові антитіла, антиперинуклеарний фактор, антитіла до РА-33-антигену, антицитруліновані антитіла” [22].

Розроблений “імуноферментний метод виявлення антицитрулінованих антитіл з використанням у ролі антигену іммобілізованого на твердій фазі циклічного цитрулінованого пептиду. Чутливість антитіл до циклічного цитрулінованого пептиду (аЦЦП) становить 82 %, специфічність (90 %). Важливим є те, що аЦЦП виявляють у 34-69,4 % пацієнтів з ревматоїдним артритом, серонегативних за РФ IgM. Це є свідченням діагностичної цінності цього серологічного маркера, адже дозволяє виявити ревматоїдний артрит у сумнівних випадках, або у серонегативних за IgM РФ пацієнтів. Одночасне

виявлення аЦЦП і IgM РФ дозволяє підвищити специфічність лабораторної діагностики ревматоїдного артриту до 93 %” [23].

Основним показником, що дозволяє діагностувати ревматоїдний артрит, є IgM ревматоїдний фактор (РФ IgM), який виявляється у більшості хворих із цим захворюванням на різних етапах розвитку патології. Наявність ревматоїдного фактору не тільки підтверджує діагноз, але і характеризує його перебіг і прогноз.

Виявлення РФ є основним лабораторним методом діагностики ревматоїдного артриту. Розрізняють дві основні його клініко-імунологічних різновиди: серонегативний і серопозитивний. “Ревматоїдний артрит, серопозитивний за РФ, супроводжується важчим ураженням суглобів і частіше позасуглобовими проявами порівняно з серонегативним ревматоїдним артритом. Виявлення РФ в дебюті артриту є одним із факторів несприятливого прогнозу ревматоїдного артриту, пов’язаного з раннім розвитком суглобових деструкцій та інвалідизацією пацієнтів, тоді як у серонегативних пацієнтів захворювання протікає легше. Зокрема, ревматоїдні вузлики та інші прояви васкуліту виявляються частіше у серопозитивних за РФ пацієнтів” [2].

“Проте в дебюті ревматоїдного артриту частота виявлення IgM РФ значно нижча, ніж у розгорнутій стадії хвороби, коли діагноз можна встановити навіть за клінічною картиною. З іншого боку, збільшення титрів IgM РФ не є специфічним для діагностики ревматоїдного артриту, адже виявляється у пацієнтів з іншими аутоімунними ревматологічними захворюваннями, хронічними інфекціями і навіть у здорових людей” [22].

Біохімічні тести використовуються для діагностики та моніторингу активності ревматоїдного артриту, а також контролю за безпекою використаної терапії. Обов’язковим для спостереження за хворим на ревматоїдний артрит є дослідження рівня гемоглобіну, кількості еритроцитів, кольорового показника, лейкоцитарної формули, кількості тромбоцитів, ШОЕ, рівня сироваткового білка, альбуміно-глобулінового коефіцієнта, вмісту С-реактивного білка, ревматоїдного фактору, антинуклеарних антитіл, визначення активності

серомукоїду, рівня креатиніну і сечовини, електролітів, активності печінкових ферментів (АЛТ, АСТ, ЛФ, ГГТП) і білірубину, наявності білка і глюкози у сечі. Оцінка результатів дослідження і визначення ступеня активності запального процесу проводяться згідно стандартним протоколам [24].

5. Методи визначення маркерів ревматоїдного артрити

Визначення ревматоїдного фактору ІgM (РФ ІgM) проводять імуноферментним методом. Принцип методу базується на зв'язуванні з антигенами специфічних антитіл класу ІgM, що наявні у досліджуваних зразках сироватки. Для виявлення зв'язаних антитіл проводять інкубацію, використовуючи мічені ферментом антитіла до ІgM людини (кон'югат ферменту), що здатні викликати кольорову реакцію. Інтенсивність утвореного забарвлення прямопропорційна концентрації ІgM ревматоїдного фактору у зразку.

При дослідженні використовують стандартний імуноферментний тест для визначення ІgM ревматоїдного фактору в сироватці крові. У набір (EUROIMMUN ІgM Rheumatoid Factor ELISA) входять мікропланшет, калібрувальні розчини ІgM людини, кон'югат ферменту (мічені пероксидазою антитіла кози до ІgM людини), буфери для розведення зразків, промивний буфер, хромоген/субстрат та стоп-реагент, а також інструкція щодо послідовності визначення ІgM ревматоїдного фактору.

В лунки планшету вносять згідно схеми внесення реактивів по 100 мкл калібраторів і зразки сироватки крові. Інкують при кімнатній температурі 30 хв. Потім вміст лунок промивають 3 рази, кожний раз використовуючи по 300 мкл промивного буферу. Після промивки ретельно видаляють залишки буферу із лунок, постукуючи перевернутим планшетом по фільтрувальному папері.

Потім вносять в лунки планшету по 100 мкл кон'югату ферменту і інкують при кімнатній температурі 30 хв. Знову тричі промивають лунки як описано вище. У лунки планшету вносять по 100 мкл розчину хромогену/субстрату. Інкують при кімнатній температурі 15 хв. Вносять у

лунки по 100 мкл стоп-реагенту. За допомогою спектрофотометру визначають інтенсивність забарвлення у лунках при довжині хвилі 450 нм протягом 30 хв після додавання стоп-реагенту.

Для визначення концентрації РФ IgM використовують калібрувальний графік. Для побудови калібрувального графіку використовують стандартний набір калібрувальних розчинів, що входить у набір.

Вміст РФ IgM визначають у МО/мл. Референтні значення до 14,0 МО/мл.

РОЗДІЛ II МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Об'єкт та методи дослідження

У роботі проаналізовані результати лабораторного обстеження 25 хворих у віці від 32 до 57 років. Пацієнти були поділені на 2 групи:

I – пацієнти з ранньою стадією ревматоїдного артриту (13 осіб);

II – пацієнти з пізньою стадією ревматоїдного артриту (12 осіб).

Для встановлення діагнозу використовували загальноприйняті класифікаційні критерії Американської колегії ревматологів, зокрема рентгенологічне обстеження периферійних суглобів.

У сироватці крові пацієнтів визначали маркери запалення: вміст С-реактивного білка та швидкість осідання еритроцитів (ШОЕ), а також ревматоїдний фактор IgM.

Визначення ШОЕ

ШОЕ визначають стандартним методом. «Проба ґрунтується на здатності еритроцитів осідати під дією гравітації. Питома маса еритроцитів перевищує питому масу плазми, тому вони поволі осідають на дно пробірки. Швидкість, з якою відбувається осідання еритроцитів в основному визначається ступенем їх агрегації, тобто їх здатністю злипатися разом. Через те, що при утворенні агрегатів зменшується відношення поверхні частинок до їх об'єму, опір агрегатів еритроцитів тертю виявляється меншим, ніж сумарний опір окремих еритроцитів; у зв'язку з цим швидкість осідання збільшується.

Агрегація еритроцитів головним чином залежить від їх електричних властивостей і білкового складу плазми крові. В нормі еритроцити несуть від'ємний заряд і відштовхуються один від одного. Ступінь агрегації (тобто ШОЕ) підвищується при збільшенні концентрації в плазмі білків гострої фази - маркерів запального процесу.

Визначення ШОЕ проводили методом Панченкова (в піпетці). У градуйований на 100 ділень капіляр Панченкова набирають до мітки «Р» 5 % розчин цитрату натрію і переносять його на годинне скло. Потім у той же

капіляр набирають двічі кров до мітки «К» і обидва рази видувають її на годинне скло. Кров, ретельно перемішану з цитратом натрію, знову набирають у капіляр до мітки «К». Капіляр ставлять в штатив суворо вертикально.

ШОЕ вираховують через 1 годину, при необхідності через 24 години і виражають у міліметрах за годину” [25].

Визначення ревматоїдного фактору IgM (РФ IgM) проводили імуноферментним методом.

Принцип методу базується на зв'язуванні з антигенами специфічних антитіл класу IgM, що наявні у досліджуваних зразках сироватки. Для виявлення зв'язаних антитіл проводять інкубацію, використовуючи мічені ферментом антитіла до IgM людини (кон'югат ферменту), що здатні викликати кольорову реакцію. Інтенсивність утвореного забарвлення прямо пропорційна концентрації IgM ревматоїдного фактору у зразку.

При дослідженні використовували стандартний імуноферментний тест для визначення IgM ревматоїдного фактору в сироватці крові. У набір (EUROIMMUN IgM Rheumatoid Factor ELISA) входять мікропланшет, калібрувальні розчини IgM людини, кон'югат ферменту (мічені пероксидазою антитіла кози до IgM людини), буфери для розведення зразків, промивний буфер, хромоген/субстрат та стоп-реагент, а також інструкція щодо послідовності визначення IgM ревматоїдного фактору.

В лунки планшету вносили згідно схеми внесення реактивів по 100 мкл калібраторів і зразки сироватки крові. Інкубували при кімнатній температурі 30 хв. Потім вміст лунок промивали 3 рази, кожний раз використовуючи по 300 мкл промивного буферу. Після промивки ретельно видаляли залишки буферу із лунок, постукуючи перевернутим планшетом по фільтрувальному папері.

Потім вносили в лунки планшету по 100 мкл кон'югату ферменту і інкубували при кімнатній температурі 30 хв. Знову тричі промивали лунки як описано вище. У лунки планшету вносили по 100 мкл розчину хромогену/субстрату. Інкубували при кімнатній температурі 15 хв. Вносили у

лунки по 100 мкл стоп-реагенту. За допомогою спектрофотометру визначали інтенсивність забарвлення у лунках при довжині хвилі 450 нм протягом 30 хв після додавання стоп-реагенту.

Для визначення концентрації РФ IgM використовували калібрувальний графік. Для побудови калібрувального графіку використовували стандартний набір калібрувальних розчинів, що входить у набір.

Вміст РФ IgM визначали у МО/мл.

Визначення вмісту С-реактивного білка в сироватці крові проводили за допомогою реакції преципітації в капілярах. “Принцип методу базується на виявленні в сироватці крові С-реактивного білка, який вступає в реакцію аглютинації з антитілами проти С-реактивного білку, що адсорбовані на нейтральних частинках латексу.

Для аналізу використовували свіжу сироватку.

На скляну пластину наносили послідовно по 10 мкл реагентів № 3 і № 4 з інтервалом 2-3см, на вільні м'яся наносили по 10 мкл досліджуваного матеріалу.

На кожну краплю контрольного та досліджуваного матеріалу додавали по 10 мкл реагенту № 1 після легкого струшування флакону та перемішували паличкою.

Пластинку похитували протягом 3 хв. Оцінку результатів дослідження проводили через 5-6 хв. Більш пізню аглютинацію розрізняють як неспецифічну.

Кількісне визначення: З допомогою реагенту № 3 готували розведення досліджуваного матеріалу – 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 і т.д.

На скляну пластинку наносили по 10 мкл кожного розведення. Реагент № 1 перемішували легким струшуванням і до кожного розведення проби додавали по 10 мкл. Перемішували скляною паличкою. Пластинку похитували 3 хвилини, після чого проводили облік результатів дослідження.

Оцінка результатів дослідження

Реакцію вважають позитивною, коли спостерігається аглютинація частин латексу. Величину реакції оцінюють в плюсах:

4 плюси – всі частини аглютиновані, розчин прозорий;

3 плюси – $\frac{1}{2}$ частин аглютиновані, розчин прозорий по краю;

2 плюси – $\frac{1}{4}$ частин аглютиновані, розчин мутнуватий;

1 плюс – слабка аглютинація, розчин мутний.

При кількісному визначенні оцінку проводили згідно з останнім титром сироватки, який дав позитивний результат.

Для визначення кількості С-реактивного білку в мг/л в пробі, необхідно найбільше розведення сироватки, що дало видиму аглютинацію, помножити на 5 мг/л.

Наприклад, якщо аглютинація спостерігалася в титрі досліджуваної сироватки 1:16, то необхідно $16 \times 5 \text{ мг/л} = 80 \text{ мг/л}$ С-реактивного білка.

Вміст С-реактивного білка виражали в мг/л сироватки” [26].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми Microsoft Excel, використовуючи t-критерій Стьюдента. Вірогідними вважали результати, якщо $p \leq 0,05$

РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для діагностики та моніторингу за перебігом ревматоїдного артриту й ефективності використаної терапії у клінічній практиці використовують біохімічні тести, які дозволяють оцінити ступінь прояву запального процесу. До основних показників, визначення яких проводять для диференційної діагностики ранньої та пізньої стадії ревматоїдного артриту, є вміст С-реактивного білка, ШОЕ та РФ IgM.

Вміст С-реактивного протеїну належить до найчутливіших лабораторних маркерів процесу запалення при різноманітних патологічних станах. С-реактивний протеїн належить до гострофазних білків, і продукується під час запалення і пошкодження тканин. Цей протеїн практично відсутній у крові у нормі, проте під час запальної реакції його вміст підвищується у десятки або сотні разів. Аналіз лабораторних показників показав, що вже на ранній стадії ревматоїдного артриту у пацієнтів різко підвищується концентрація С-реактивного протеїну порівняно з нормою (рис. 1.).

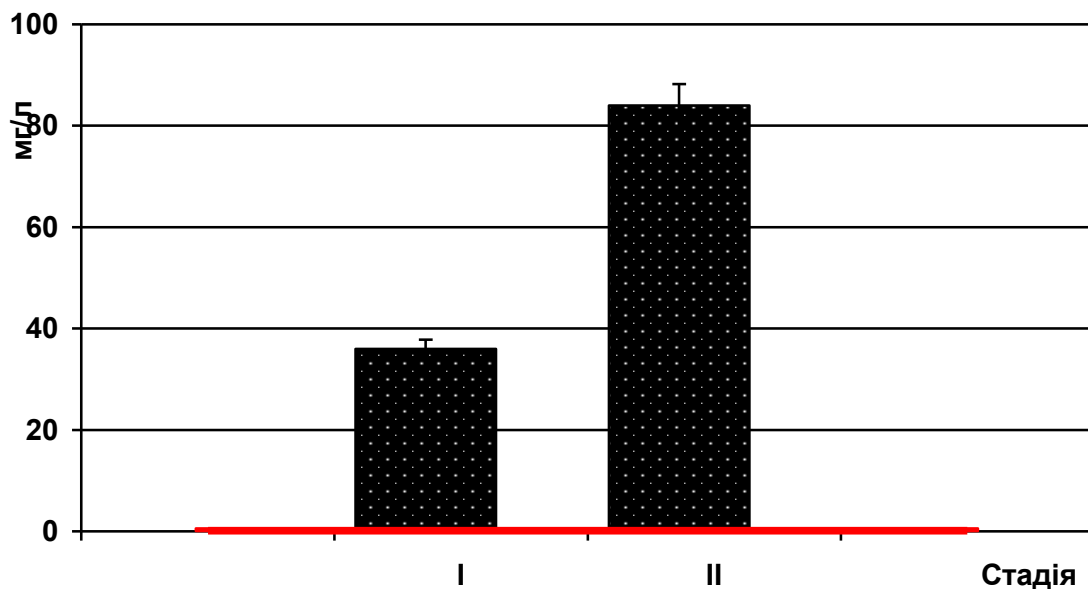


Рис. 1. Вміст С-реактивного протеїну у сироватці крові пацієнтів з ранньою та пізньою стадією ревматоїдного артриту

*Примітка (тут і надалі): I – рання стадія ревматоїдного артриту
II – пізня стадія ревматоїдного артриту*

У пізній стадії ревматоїдного артриту концентрація С-реактивного протеїну у понад 2 рази перевищує показники, характерні для початкової стадії захворювання. Продукування С-реактивного протеїну контролюється регулюється деякими прозапальними цитокінами, які належать до медіаторів запального процесу при цьому захворюванні, і його вміст вказує на інтенсивність імунозапального процесу при ревматоїдному артриті.

Ще одним показником, який вказує на інтенсивність запального процесу при ревматоїдному артриті, є швидкість осідання еритроцитів. ШОЕ виражають у мм стовпчика, що утворюється при осіданні еритроцитів за 1 год.

Оцінка ШОЕ показала, що на початковій стадії ревматоїдного артриту цей показник підвищується порівняно з верхньою межею норми (рис. 2). Проте вже на пізній стадії ревматоїдного артриту показник ШОЕ значно підвищується, що може бути також пов'язано з показаним нами підвищенням вмісту С-реактивного протеїну. Підвищення концентрації гострофазних білків призводить до зменшення міжеритроцитарних сил відштовхування та посилення злипання еритроцитів, що пришвидшує їх осідання.

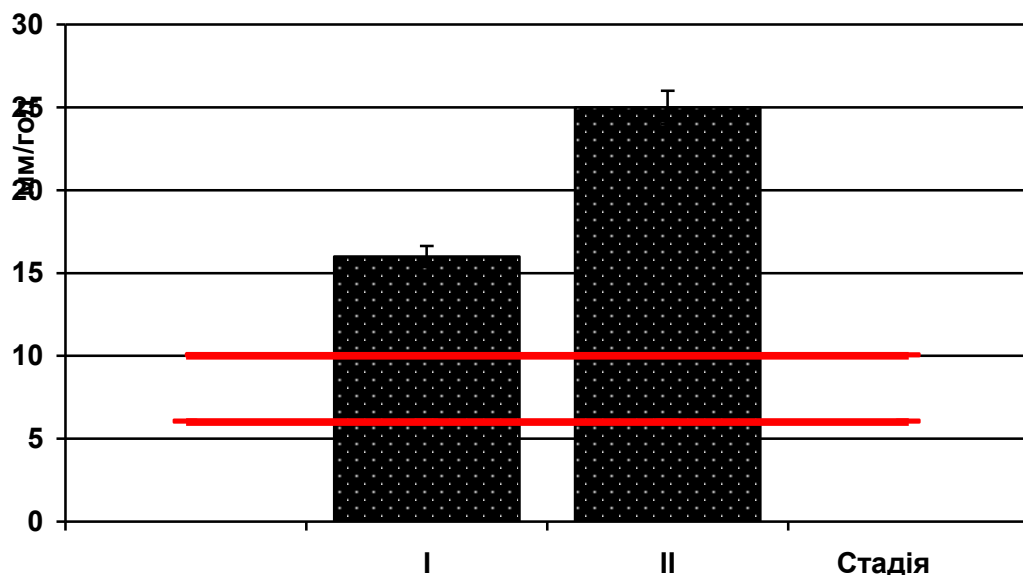


Рис. 2. ШОЕ у пацієнтів з ранньою та пізньою стадією ревматоїдного артриту

Обов'язковим етапом лабораторного обстеження пацієнтів з клінічними ознаками ревматоїдного артриту є визначення концентрації ревматоїдного

фактору IgM (РФ IgM). Аналіз результатів лабораторного дослідження показали, що навіть на ранній стадії захворювання спостерігається значне підвищення вмісту РФ IgM (рис. 3), досягаючи максимальних значень у пацієнтів з пізньою стадією ревматоїдного артриту.

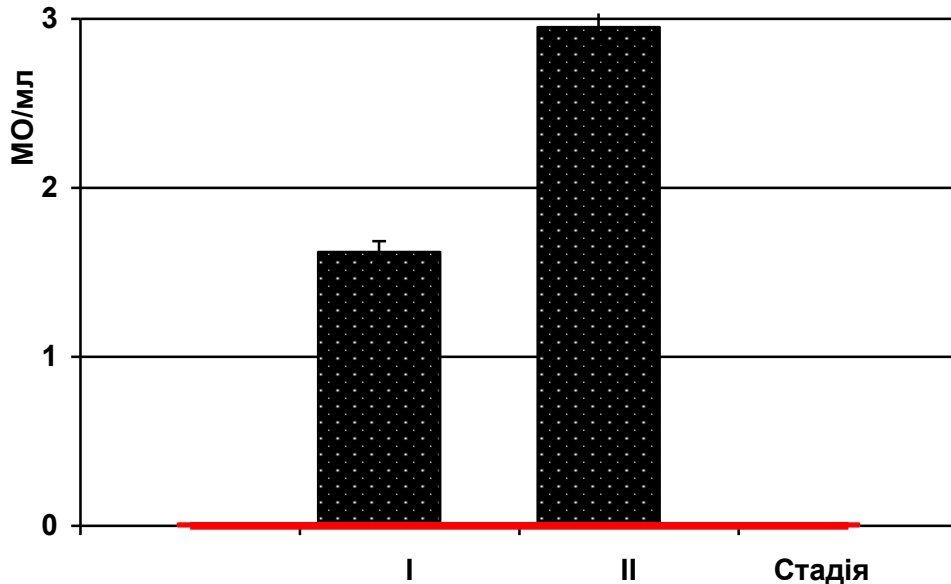


Рис. 3. Вміст ревматоїдного фактору (IgM РФ) у сироватці крові пацієнтів з ранньою та пізньою стадією ревматоїдного артриту

Оскільки РФ IgM синтезується внаслідок індукції агрегованим модифікованим IgG або через взаємодію з перехресно реагуючим антигеном, то підвищення вмісту досліджуваного показника вказує на порушення механізмів імунорегуляції при ревматоїдному артриті. РФ IgM здатний відкладатися у периваскулярному просторі, активуючи при цьому клітинно-опосередовані цитотоксичні реакції, тому чим вища концентрація РФ IgM, тим вираженішим буде запальний процес.

Отже, підвищення титрів IgM РФ, вмісту С-реактивного протеїну і ШОЕ характерне для усіх пацієнтів з ревматоїдним артритом, проте вираженість змін корелює із стадією захворювання.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що вже на ранніх стадіях ревматоїдного артрити спостерігається виражене підвищення вмісту С-реактивного протеїну та ШОЕ як маркерів запалення, які досягають максимальних значень у пацієнтів з пізньою стадією захворювання, та вказують на інтенсивність імунозапального процесу при ревматоїдному артриті.

2. Показано, що навіть на ранній стадії захворювання спостерігається значне підвищення вмісту РФ ІgM, досягаючи максимальних значень у пацієнтів з пізньою стадією ревматоїдного артрити, що вказує на порушення механізмів імунорегуляції при ревматоїдному артриті.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Клубова Г.Ф. Ревматоїдний артрит: стан системного та локального імунітету на фоні застосування глюкокортикостероїдів і базисної терапії. *Укр. ревматолог. журн.* 2003. № 1. С. 45-50.
2. Коваленко В.М., Гавриленко Т.І., Рижкова Н.О. Визначення ролі факторів аутоімунної та імунозапальної реакції в патогенезі ревматоїдного артриту. *Укр. ревматолог. журн.* 2008. № 3. С. 42-49.
3. Борткевич О.П., Гавриленко Т.І., Білявська Ю.В., Рижкова Н.О. Сучасні аспекти імунологічної діагностики раннього ревматоїдного артриту. *Укр. мед. часопис.* 2009. № 1. С. 77-82.
4. Коваленко В.Н. Ревматоїдний артрит: етіопатогенез, клініка, діагностика, лікування. *Ліки України.* 2005. № 3. С. 18-20.
5. Школьник В.В. Ревматоїдний артрит: діагностичні критерії, принципи терапії. *Ліки України.* 2008. № 4. С. 146-150.
6. Рекалов Д.Г., Медведчук Г.І., Свистун С.С., Шевченко М.І. Сучасні підходи до ранньої діагностики ревматоїдного артриту. *Запорізький медичний журнал.* 2009. № 1. С. 63-66.
7. Євстигнєєв І.В. Імунологічні, імуногенетичні та інструментальні методи в діагностиці раннього ревматоїдного артриту. *Клінічна імунологія, алергологія, інфектологія.* 2012. № 3. С. 5-13.
8. Герасименко С., Скляренко Є., Полулях М. Ранні клінічні та лабораторні прояви ревматоїдного артриту. *Вісник ортопедії, травматології та протезування.* 2004. № 1. С. 12-16.
9. Маєвський О.Є., Король А.П., Гриценко А.С., Щербич Ю.В. Сучасні погляди на етіопатогенез, патоморфологічні особливості ревматоїдного артриту, актуальні підходи до діагностики та лікування ревматоїдного артриту. *Biomedical and biosocial anthropology.* 2017. № 28. С. 202-208.
10. Режим доступу: <https://compendium.com.ua/uk/tutorials-uk/natsionalnij-pidruchnik-z-revmatologiyi/rozdil-i-klasifikatsiyi-ta-diagnostichni-kriteriyi-v-revmatologiyi/>

11. Режим доступу: <https://referatu.net.ua/referats/%207569/164798>

12. Гонт А.А., Зарудна О.І. Ревматоїдний артрит – історія, сучасні погляди, тактика, результат. *Медсестринство*. 2020. № 4. С. 30-36

13. Головач І.Ю. Антицитруліновані антитіла в ревматології – вчора, сьогодні, завтра. *Здоров'я України*. 2012. № 4. С. 77-79.

14. Нейко Є.М., Яцишин Р.І., Штефюк О.В. Ревматоїдний артрит: сучасний погляд на проблему. *Український ревматологічний журнал*. 2009. № 2 (36). С. 35-39.

15. Яременко О.Б., Микитенко Г.М. Клінічна та лабораторна характеристика ревматоїдного артриту залежно від наявності антитіл до циклічного цитрулінованого пептиду. *Укр. ревматолог. журн.* 2008. № 4. С. 51-55.

16. Головач І.Ю. Діагностичне і прогностичне значення антицитрулінованих антитіл у ревматології. *Укр. ревматолог. журн.* 2016. № 63 (1). С. 27-32.

17. Хіміон Л.В., Ященко О.Б., Данилюк С.В. Тактика ведення хворих на ревматоїдний артрит лікарем загальної практики – сімейним лікарем. *Сімейна медицина*. 2016. № 2 (64). С. 6-15.

18. Борткевич О.П., Гавриленко Т.І., Білявська Ю.В., Рижкова Н.О. Діагностика раннього ревматоїдного артриту. *Укр. мед. часопис*. 2009. Т. 69, № 1. С. 77-83.

19. Білявська Ю.В. Особливості клініки та діагностики ревматоїдного артриту на ранніх стадіях. *Укр. ревматол. журн.* 2007. № 2. С. 66-68.

20. Герасименко С.І., Полулях М.В., Бабко А.М., Герасименко А.С., Гужевський І.В. Ортопедичне лікування хворих на ревматоїдний артрит. *Здоров'я України 21 сторіччя*. 2020. № 17 (486). С. 88-96.

21. Коваленко В.М., Шуба Н.М., Борткевич О.П., Білявська Ю.В. Основні підходи до ведення пацієнтів із ревматоїдним артритом згідно з останніми рекомендаціями Європейської антиревматичної ліги (2010). *Укр. ревматол. журн.* 2010. № 4 (42). С. 6-17.

22. Шищук В.Д., Шищук Д.В., Терехов А.М., Нурейн Н.М. Артрит: класифікація, діагностика, лікування та профілактика: навчальний посібник. Суми: ТОВ «ВПП «Фабрика друку», 2018. 104 с.

23. Режим доступу: <https://docplayer.net/54294849-Poglyad-na-problemu-revmatoyidniy-artrit-suchasniy-poglyad-na-problemu.html>

24. Режим доступу: guidelines.moz.gov.ua/documents/5014

25.Режим

доступу:

https://uk.wikipedia.org/wiki/Швидкість_осідання_еритроцитів

26. Режим доступу: <https://med.com.ua/articles/authors/14/175.html>

ДОДАТКИ

Вимоги безпеки під час виконання роботи

Дозволяється працювати тільки на заземлених об'єктах.

Забороняється встановлювати запобіжники, що не відповідають номінальному значенню.

Забороняється виконувати заміну запобіжників при включеному обладнанні.

Не виконувати ніяких ремонтних робіт об'єкту без зняття з нього напруги живлення.

При роботі на центрифугах:

не працювати на частоті обертання, вищій за максимальну для даного ротору;

не працювати з неповним та нерівномірно заповненими стаканами роторів типу РПУ К та з неповністю завантаженим ротором РЗ-21Т;

не центрифугувати препарат із густиною, більшою за $1.2 \cdot 10^3$ кг/м³ на максимальній частоті обертання ротору;

не працювати з роторами, що відпрацювали свій термін експлуатації.

Не запускайте жодного приладу без попередньої перевірки. Не залишайте діючий прилад без догляду.

Для попередження нещасних випадків через можливий викид реакційної суміші не заглядайте в пробірку чи колбу зверху.

Не виносити із лабораторії прилади, посуд та реактиви.

Роботу з отруйними речовинами проводити у витяжній шафі.

Дотримуйтесь запобіжних заходів при роботі з вибуховими та легкозапальними речовинами.

Не виливайте до раковини залишки кислот, лугів, вогненебезпечних рідин та ін. Зливайте ці речовини до спеціальних склянок, що знаходяться під витяжною шафою. Не кидайте до раковини пісок, папір та інші тверді речовини.

Розчини, що містять кислоти та луги, перед тим як вилити до каналізаційної системи, необхідно нейтралізувати. Речовини, що мають різкий

запах, та отруйні речовини повинні бути знешкоджені хімічною обробкою або спалені у спеціально відведеному місці за межами лабораторії, бажано на повітрі.

Не залишайте жодних речовин у посуді без етикеток.

Вимоги безпеки в аварійних ситуаціях

При виникненні пожежі негайно вимкніть газ у всій лабораторії, приберіть із помешкання всі горючі речовини, засипте піском або закрийте ковдрою полум'я та повідомте черговому пожежної охорони про те, що сталося (тел. – 01). Дотримуйтесь правил протипожежної безпеки.

Якщо в лабораторії за якихось причин пролита значна кількість легко запальної рідини, то необхідно загасити всі горілки та електронагриваючі прилади, відчинити вікна та збирати пролиту рідину ганчіркою або рушником, місце проливу засипати піском, потім зібрати його дерев'яною лопаткою і винести у спеціально відведене місце.

При легких термічних опіках шкіру необхідно обмити спиртом, а потім змастити гліцерином або вазеліном. При більш сильних опіках обпечене місце, після промивання концентрованим розчином перманганату калія та спиртом, необхідно змастити засобом від опіків (наприклад, сульфідиновою емульсією).

При опіках сильними кислотами потрібно промити обпечене місце великою кількістю води, а потім 3% розчином соди.

При опіках сильними лугами шкіру необхідно промити водою, а потім нейтралізувати 1% розчином борної кислоти. Аміак майже не діє на шкіру, але при попаданні в очі може викликати сильне пошкодження чи навіть сліпоту.

При випадковому попаданні реактивів всередину рекомендується випити більше води. Поряд із цим необхідно: а) при отруєнні кислотами випити склянку 2% вуглекислої соди; б) при отруєнні лугами випити склянку 2% оцтової або лимонної кислоти.

При отруєнні необхідно вивести того, хто постраждав, на свіже повітря, зробити штучне дихання та викликати лікаря.

При необережному згинанні трубок, вставленні трубок або термометра до отвору колби, можливі порізи та поранення. При порізах у першу чергу необхідно видалити з рани уламки скла, краї рани продезинфікувати 3% спиртовим розчином йоду, а потім накласти стерильну пов'язку. При сильних кровотечах слід накласти вище рани джгут та викликати лікаря або направити постраждалого до амбулаторії (поліклініки).

У випадку загоряння горючої рідини необхідно загасити всі горілки, прикрити полум'я азбестовим рушником або засипати його піском, або скористатися вогнегасником із вуглекислим газом. Розчинні у воді вогнебезпечні речовини, такі як спирт, ацетон та інші, можна загасити водою. Якщо горить нерозчинна у воді речовина (наприклад, ефір, бензол, бензин, скипидар), то воду використовувати для гасіння пожежі не можна, оскільки вона не лише не буде ліквідована, але може навіть збільшитися. У цьому випадку полум'я слід гасити піском та використовувати вогнегасник.

Вимоги безпеки після закінчення роботи

По закінченню тієї чи іншої операції необхідно вимкнути газ та електроприлади, що використовувалися при виконанні даної роботи. Посуд, у якому проводили роботу із вогнебезпечними реактивами, після закінчення роботи повинен бути одразу вимитий.

По закінченні роботи привести до ладу робоче місце, прилади та апаратуру, вимкнути головний газовий кран, головний електрорубільник, вентиляцію та світло, а також перевірити, чи видалені з приміщення лабораторії надлишки горючих та легкозапальних речовин, відпрацьовані рідини, сміття, промаслене ганчір'я, перевірити, чи весь посуд із реактивами закритий пробками та покладений на відведені місця.