

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

**БІОХІМІЧНІ МАРКЕРИ ФІБРОЗНОГО УРАЖЕННЯ
БРОНХОЛЕГЕНЕВОЇ СИСТЕМИ ПРИ СИСТЕМНИХ ПАТОЛОГІЯХ
СПОЛУЧНОЇ ТКАНИНИ**

Дипломна робота
Рівень вищої освіти – другий (магістерський)

Виконала:
студентка VI курсу, групи 611М
спеціальності 091 – Біологія
(біохімія та лабораторна діагностика)
(шифр і назва спеціальності)

Прокоп'як Г.Д.

Керівник: к.б.н., доцент Кеца О. В.

До захисту допущено:
Протокол засідання кафедри № ____
від „____” _____ 2022 р.

зав. кафедри _____ проф. Копильчук Г. П.

АНОТАЦІЯ

Магістерська робота присвячена вивченню біохімічних маркерів активності запалення і стану дихальної системи за умов розвитку фіброзних уражень легень та системних захворювань сполучної тканини.

Показано зниження фагоцитарної активності нейтрофілів при пневмофіброзі, який розвивається на тлі РА, що може бути наслідком аутоагресивних та імунозапальних процесів в легеневій тканині за умов РА. Про це вказує підвищення ревматоїдного фактора в плазмі крові хворих. Підвищення показників фагоцитарної активності нейтрофілів за умов розвитку пневмофіброзу у пацієнтів без РА вказує на компенсаційну реакцією організму у відповідь на розвиток фібротичних процесів у легенях.

Встановлено, що розвиток пневмофіброзу на тлі РА супроводжується підвищенням вмісту С-реактивного протеїну та концентрації вільних сіалових кислот в плазмі крові порівняно із показниками пацієнтів із пневмофіброзом без супутньої патології. При пневмофіброзі спостерігається розвиток I ступеня кисневої недостатності із значенням сатурації $92 \pm 1,2\%$. Поєднання розвитку пневмофіброзу з РА ускладнює дихальну функцію, оскільки показник сатурації знаходився на рівні $87 \pm 2,1\%$, що вказує на II ступень кисневої недостатності.

Ключові слова: сіалові кислоти, С-реактивний протеїн, ревматоїдний фактор, нейтрофіли, лейкоцити, сатурація, пневмофіброз, ревматоїдний артрит, плазма крові.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ І ПОЗНАЧЕНЬ	4
ВСТУП	5
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	7
1.1. Класифікація та особливості патогенезу пневмофіброзу	7
1.2. Біохімічні маркери діагностики системних уражень сполучної тканини	11
1.2.1. Характеристика ревматоїдного фактора	11
1.2.2. С-реактивний протеїн як маркер стану сполучної тканини	12
1.2.3. Біологічна роль сіалових кислот	15
1.3. Фіброзне ураження легень асоційоване з системними ураженнями сполучної тканини	17
2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	21
2.1. Об'єкт і методи досліджень	21
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	31
ВИСНОВКИ	43
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	44
ДОДАТКИ	50

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ І ПОЗНАЧЕНЬ

ЕЦМ – екстрацелюлярний матрикс

Ig – імуноглобулін

IL – інтерлейкін

РА – ревматоїдний артрит

РФ – ревматоїдний фактор

СК – сіалові кислоти

СРП – С-реактивний протеїн

ФІ – фагоцитарний індекс

ФЧ – фагоцитарне число

ВСТУП

Захворювання сполучної тканини (ревматоїдний артрит (РА), системна склеродермія, системний червоний вовчак) виражаються аутоімуними змінами з ерозивно-деструктивними і системними проявами [1]. Під час розвитку в організмі системних захворювань сполучної тканини часто зустрічається ураження легень, яке досягає 50% у таких пацієнтів [2]. Встановлено, що ураження легень є безпосередньою причиною смерті у 10–20% пацієнтів із захворюваннями сполучної тканини [3]. Причому, такі зміни в легенях можуть проявлятися пневмофіброзом, у розвитку якого основну роль відіграють аутоімунні механізми. З іншого боку, основою патогенезу розвитку фіброзу легень є не запалення, а порушення процесів регенерації альвеолоцитів після пошкодження [4]. Патологічний процес запускається пошкодженими альвеолоцитами і характеризується міграцією і проліферацією фібробластів і міофібробластів, пригніченням апоптозу міофібробластів і підвищенням активності цитокінів, які стимулюють пневмофіброз. В результаті відбувається ремоделювання позаклітинного матриксу, включаючи деструкцію базальної мембрани, ангиогенез і фіброз [5].

Пневмофіброз – це процес заміни нормальної легеневої тканини на змінену патологічну сполучну тканину, у результаті чого буде прогресуючий розвиток дихальної недостатності [6].

Легеневі фібротичні ураження при системних ревматичних захворюваннях спостерігаються практично у всіх хворих. Це значною мірою визначає тяжкість перебігу патології і прогноз, і в той же час потребує корекції лікування. Пневмофіброз при цих захворюваннях, будучи результатом системного пошкодження сполучної тканини, має також і багато спільних рис. В основі цих патологій лежать різноманітні порушення в імунній системі. Патоморфологічну картину визначають різні фази дезорганізації сполучної тканини: фібриноїдний некроз, мукоїдне набухання, фаза клітинних реакцій, склероз [7].

Слід зауважити, що заміщення легеневої тканини на сполучну тканину вважається незворотним процесом [3, 6]. Тому, дослідження патогенетичних механізмів розвитку пневмофіброзу є досить актуальним для своєчасної диференційної діагностики і подальшого лікування цієї патології.

Мета роботи – визначити біохімічні маркери активності запалення і стану дихальної системи за умов розвитку фіброзних уражень легень та системних захворювань сполучної тканини.

У зв'язку з цим поставлені наступні **завдання**:

1. Визначити рівень лейкоцитів і фагоцитарну активність нейтрофілів у хворих з фіброзними ураженнями легень при системних патологіях сполучної тканини.
2. Дослідити аналіз крові на ревмопроби – концентрацію ревматоїдного фактора, С-реактивного протеїна (СРП), вмісту сіалових кислот у хворих з фіброзними ураженнями легень при системних патологіях сполучної тканини.
3. Оцінити рівень сатурації при фіброзних ураженнях легень та системних патологіях сполучної тканини.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Класифікація та особливості патогенезу пневмофіброзу

Пневмофіброз характеризується незворотнім патологічним заміщенням легеневої паренхіми сполучною (рубцевою) тканиною. Захворювання викликається різними дистрофічними чи запальними процесами та призводить до порушення газообміну та еластичності ураженої ділянки. Виразність патологічного процесу залежить від його поширеності [8].

Одними із причин розвитку пневмофіброзу є патологічні зміни сполучної тканини, переважно з автоімунним компонентом (РА, васкуліт, склеродермія, гранулематоз, вовчак) [7].

У випадку легких випадків захворювання фіброз легень на рентгенограмах не виявляється, а при поширеному процесі у хворого з'являється задуха, кашель та інші ознаки порушень дихання. При тяжкому прогресуючому перебігу ця патологія може призвести до інвалідності та смерті. Вікові обмеження при розвитку пневмофіброзу відсутні. Інколи цю патологію ще називають «пневмосклерозом» [9].

Класифікація пневмофіброзу

Розрізняють два види фіброзу легень залежно від причини розвитку: *інтерстиціальний* – при цьому типі причина розростань сполучної тканини ідентифікується; *ідіоматичний* – неможливо визначити причини та фактори, які викликають фіброз [10].

При пневмофіброзі ураження легеневої паренхіми може бути одно або двостороннім.

За поширеністю патологічного процесу виділяють дві основні форми пневмофіброзу [7]:

локальний (осередковий або обмежений) – фібротичним процесам піддається лише обмежена ділянка паренхіми легені. При цьому типі пневмофіброзу патологія ніяк себе не проявляє або незначно впливає на газообмін;

тотальний (дифузний) – фібротичний процес поширюється майже по всьому органу, легеня стає ригідною, об'єм вентиляції сильно зменшується.

Локальний пневмофіброз може бути дрібно- або великовогнищевим. Його особливим різновидом вважають карніфікацію, при якій легенева тканина нагадує сире м'ясо і в ній можуть виявлятися осередки нагноєння, фіброателектази, фібринозний ексудат тощо [11].

Залежно від локалізації виділяють кілька видів легеневого фіброзу [7, 12]:

лінійний – фіброзне ураження паренхіми легень;

апикальний – осередки фіброзу розташовуються у верхівці органа;

базальний – ураження торкаються нижніх відділів легені;

прикореневий – рубцеві зміни виявляються в зоні з'єднання легені з органами середостіння.

Також рентгенологи можуть використовувати для опису особливостей пневмофіброзу інші терміни: субплевральний, субсегментарний, променевий, інволютивний, перибронхіальний, перилобулярний, сітчастий, дрібнокомірчастий, метапневмонічний та ін [12].

Етіологія пневмофіброзу

Найчастішими причинами розвитку пневмофіброзу легень стають різні захворювання дихальної системи з ускладненим перебігом: мікози легень; туберкульоз; хронічні плеврити; хронічний бронхіт та бронхіоліт; ателектаз легені; вірусні, бактеріальні та аспіраційні пневмонії; сторонні тіла бронхів; саркоїдоз легень; фіброзуючий або алергічний альвеоліт; пневмоконіози (викликаються вдиханням пилу або промислових газів, променевими ураженнями); спадкові патології легень: муковісцидоз; травми та поранення грудної клітки та легень тощо [13].

Найчастішою причиною пневмофіброзу є стафілококова пневмонія, яка призводить до некрозу легеневої паренхіми та формування абсцесів. Також фіброз часто спричиняється туберкульозом. Хронічний перебіг бронхіоліту або бронхіту здатний провокувати розвиток дифузного перилобулярного або

перибронхіального пневмофіброзу. Альвеоліт та ураження легеневої тканини іонізуючим випромінюванням може призводити до формування «стільникової легені», що характеризується появою ділянок дифузного пневмосклерозу [6].

Пневмофіброз, причини якого не пов'язані із захворюваннями дихальної системи, може провокуватися деякими патологіями, що призводять до порушення кровообігу в легені та малому колі кровообігу. До таких патологій відносять: мітральний стеноз; лівошлуночкова серцева недостатність. Часто пневмофіброз розвивається при супутніх патологіях, зокрема системних захворюваннях сполучної тканини [13].

У деяких випадках пневмофіброз легень розвивається внаслідок прийому пневмотоксичних ліків [14].

Патогенез пневмофіброзу

Механізм розвитку пневмосклерозу визначається його першопричинами. При невеликих фіброзних ділянках самопочуття ніяк не змінюється, і хворий не потребує лікування. Значна заміна паренхіми легень зонами фіброзу завжди спричиняє порушення у функціонуванні органу. Легеня не може повноцінно рухатися, зменшується у розмірах та перестає виконувати у достатньому обсязі функцію газообміну [10].

Системні хвороби сполучної тканини – ревматичні хвороби або колагенози (РА; системний червоний вовчак; склеродермія тощо) становлять актуальну проблему сучасної медицини. Морфологічну основу зазначених патологій становить системна дезорганізація сполучної тканини. Більшість системних хвороб сполучної тканини належить до аутоімунних захворювань з ерозивно-деструктивним поліартритом та системними проявами [12]. При ревматоїдних захворюваннях нерідко зустрічається ураження легень. За допомогою комп'ютерної томографії високої роздільної здатності виявленість уражень легень досягає 50%. Окрім того, ураження легень є безпосередньою причиною смерті у 10–20% пацієнтів із ревматоїдними захворюваннями [14]. Показано, що у розвитку уражень легень при РА

основну роль відіграють аутоімунні механізми. Згідно з гіпотезою, висунутою М. Selman та співавт., основою патогенезу розвитку фіброзу легень є не запалення, а порушення процесів регенерації альвеолоцитів після пошкодження [12].

Так, під час розвитку системних ревматоїдних захворювань можуть пошкоджуватися епітеліальні клітини дихальних шляхів, що призводить до виділення медіаторів запального секрету і запуску активацію тромбоцитів, що призводить до підвищення проникності судин для рекрутування лейкоцитів (рис.1.1) [15].

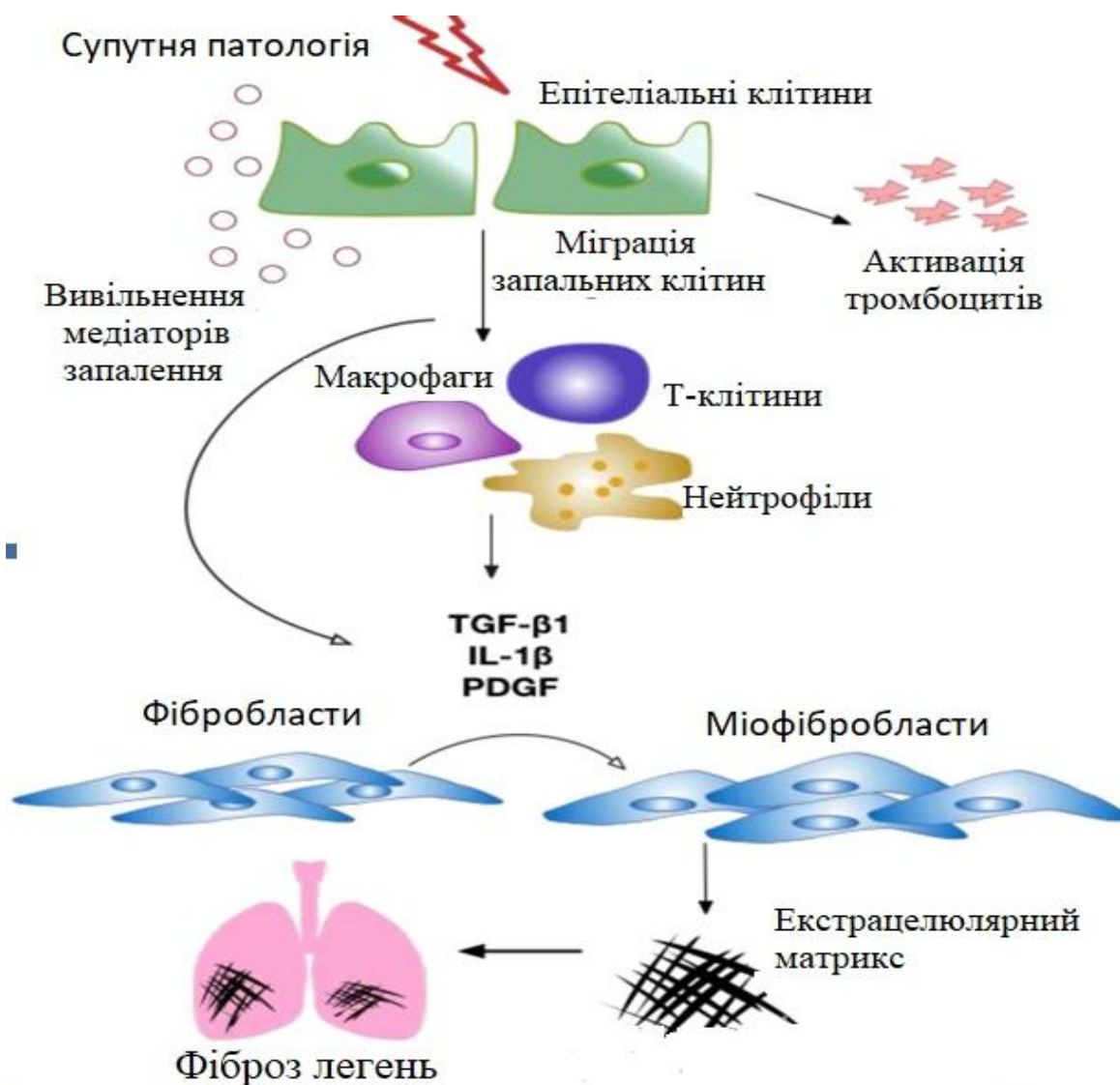


Рис.1.1. Механізми розвитку фіброзу легень

Макрофаги, Т-клітини і нейтрофіли вивільняють профіброзні цитокіни, такі як TGF- β 1, який опосередковує активацію та залучення фібробластів у патологічний процес. Також за дії цитокінів фібробласти диференціюються в міофібробласти, що сприяє подальшому вивільненню компонентів екстрацелюлярного матриксу (ЕЦМ). Це призводить до незворотного утворення надмірної рубцевої тканини в легені [15].

Отже, патологічний процес запускається пошкодженими альвеолоцитами та характеризується міграцією та проліферацією фібробластів та міофібробластів, пригніченням апоптозу міофібробластів та підвищенням активності цитокінів, що стимулюють пневмофіброз. В результаті відбувається ремоделювання позаклітинного матриксу, включаючи деструкцію базальної мембрани, ангіогенез та фіброз.

1.2. Біохімічні маркери діагностики системних уражень сполучної тканини

1.2.1. Характеристика ревматоїдного фактора

Імуноглобуліни (Ig, антитіла) – надзвичайно важливі молекули імунного захисту з безліччю ефекторних функцій. Структура імуноглобулінів і їх утворення в організмі відбувається у відповідь на інфекцію, як одна із реакцій імунного захисту [16]. Імуноглобуліни мають основну структуру з двома антигензв'язуючими ділянками і спочатку на поверхні В-клітин, які стимулюються антигеном, після чого починається процес дозрівання і диференціювання, з утворенням спочатку IgM, але пізніше IgG, IgA або IgE, залежно від стимулюючих антигенів/мікроорганізмів та місця інфікування [17].

Структури імуноглобулінів зображуються як Y-подібні молекули з двома антигенів'язуючими «плечами» (Fab) і ефекторною частиною (Fc). Ефекторні функції тісно пов'язані з частиною Fc і включають активацію комплементу та взаємодію з рецептором Fc (FcR) [18].

Ревматоїдний фактор (РФ) – це сукупність антитіл, що виробляються імунною системою та атакують частинки, що потрапляють у кров із уражених суглобів, які помилково приймаються антитілами як чужорідні та небезпечні речовини. Такі антитіла називаються аутоантитілами. Наявність РФ в крові вказує на розвиток у організмі запального процесу та аутоімунну активність [19].

У пацієнтів з аутоімунними захворюваннями сполучної тканини та у деяких на вигляд здорових осіб РФ присутні в низьких-високих титрах разом з IgG. Тобто, на молекулі IgG є місця зв'язування для РФ [20].

Природа РФ на сьогодні вивчена мало, але це, однак, не заважає його використовувати як маркер стану сполучної тканини при таких системних захворюваннях як РА. Встановлено, що РФ не ініціює запальний процес у суглобі, але, мабуть, сприяє його загостренню та збереженню [20].

Позитивний аналіз на РФ може з'явитись за кілька років до появи перших симптомів захворювання. У разі ревматоїдного артриту позитивний результат тесту на ревматоїдний фактор спостерігається у 70% пацієнтів, у другому випадку – приблизно у 60-70% [21].

Окрім того, РФ може бути підвищений при хронічних бактеріальних чи вірусних інфекціях, паразитарних інвазіях, деяких формах раку, а також хворобах нирок, печінки та легень. Сьогодні РФ все частіше розглядається як маркер стану сполучної тканини при фіброзних ураженнях органів дихання [15].

1.2.2. С-реактивний протеїн як маркер стану сполучної тканини

С-реактивний протеїн (СРП) – це гомопентамерний запальний білок гострої фази, який демонструє підвищену експресію під час запальних станів, таких як ревматоїдний артрит, деякі серцево-судинні хвороби та інфекційні захворювання. Докази свідчать про те, що СРП є важливим регулятором запальних процесів, а не просто маркером запалення або інфекції [22].

СРП є маркером системного запалення, який корелює зі станом захворювання при муковісцидозі. Клінічна корисність вимірювання СРП для прийняття рішень щодо лікування загострення захворювань легень залишається невизначеною. СРП є членом родини пентраксинів, до яких входять інші структурно споріднені молекули, наприклад сироватковий амілоїд А [23].

Переважно індукція транскрипції гена СРП відбувається в гепатоцитах у печінці у відповідь на підвищення рівня запальних цитокінів, особливо інтерлейкіна-6 (IL-6). СРП демонструє підвищену експресію під час запальних станів, таких як РА, деякі серцево-судинні захворювання та інфекції. Як білок гострої фази, його плазмова концентрація відхиляється щонайменше на 25% під час розвитку запальних захворювань. Найвищі концентрації СРП виявляються в сироватці, при деяких бактеріальних інфекціях, коли рівень цього протеїну зростає у 1000 разів. Однак, коли інфекційний процес призупиняється значення рівня СРП експоненціально зменшуються протягом 18-20 год, близько до періоду напіввиведення. Рівні СРП у плазмі зростають приблизно з 1 мкг/мл до понад 500 мкг/мл протягом 24-72 год після серйозного пошкодження тканин, наприклад травма та прогресуючий рак [24].

Сильним індуктором експресії гена СРП є IL-6, IL-1 посилює ефект. Однак, хоча IL-6 необхідний для індукції гена СРП, є ще інші фактори, які можуть змінити базові рівні СРП, включаючи вік, стать, статус куріння, вагу, рівень ліпідів і кров'яний тиск. Людський ген СРП локалізований на довгому плечі 1q23 хромосоми 1 [22].

СРП – пентамерний протеїн, який називають нативним СРП (nCRP), характеризується дископодібною конфігурацією п'яти ідентичних нековалентно зв'язаних субодиниць. Кожна субодиниця довжиною 206 амінокислот з молекулярною масою близько 23 кДа. Ці п'ять субодиниць розташовані в однаковій орієнтації навколо центральної пори. Характерною особливістю є наявність двох іонів кальцію, які важливі для стабільності та

зв'язування лігандів. Окрім гепатоцитів СРП може синтезуватися гладком'язовими клітинами, макрофагами, ендотеліальними клітинами, лімфоцитами та адипоцитами. СРП спочатку синтезується у вигляді мономерів, а потім збирається в пентамер в ендоплазматичному ретикулумі (ЕР) вихідної клітини. У нормі (без запалення) СРП повільно вивільняється з ЕР, а при підвищенні рівня запальних цитокінів, зв'язування СРП з карбоксилестеразами знижується і він швидко декретується [24].

Стимуляція синтезу СРП в основному відбувається у відповідь на прозапальні цитокіни, особливо ІЛ-6 і меншою мірою на ІЛ-1 і фактор некрозу пухлин альфа (TNF- α) [24].

Пентамерний СРП може бути необоротно дисоційований на вільні субодиниці і ставати мономерним (або модифікованим) СРП (mСРП). Дисоціація nСРП на вільні субодиниці спостерігається або при високих концентраціях сечовини, або при високих температурах за відсутності кальцію. Молекули mСРП відрізняються від nСРП за різними антигенними, біологічними, і електрофоретичною активностями, тому вони експресують різні неоепітопи. Дві ізоформи СРП мають різні біологічні функції у запальному процесі. Наприклад, Sproston et al. [25] показали, що nСРП пригнічує прилипання тромбоцитів до нейтрофілів, тоді як mСРП посилює ці взаємодії. Ця відмінність у функції можна пояснити тим, що дві ізоформи зв'язуються з різними типами Fc γ (Fc γ)-рецептор, який бере участь у процесі передачі сигналів.

Основна роль СРП у запаленні, як правило, фокусується навколо активації молекули C1q в комплементі, що веде до опсонізації патогенів. СРП ініціює шляхи різних фаз захисту господаря шляхом активації шляху комплементу. Він також може ініціювати опосередкований клітинами шлях активації комплементу, а також зв'язування з Fc рецепторами IgG. Це підтверджує той факт, що СРП є не лише маркером запалення, але також відіграє активну роль у запальному процесі [26].

Отже, СРП не просто маркер запалення або інфекції, але й важливий регулятор запальних процесів. Ключові ділянки опосередкованої дії СРП, включають шлях комплементу, апоптоз, фагоцитоз, вивільнення NO та цитокінів. Ізоформа nСРП активує класичний шлях комплементу, індукує фагоцитоз і сприяє апоптозу. З іншого боку, mСРП сприяє хемотаксису і залученню циркулюючих лейкоцитів до ділянок запалення і може затримувати апоптоз [27].

1.2.3. Біологічна роль сіалових кислот

Сіалові кислоти (СК) – аціальні похідні нейрамінової кислоти, присутні у всіх тканинах та рідинах організму тварин і людини та в деяких мікроорганізмів. У людини в нормі найбільша кількість СК виявляється у слинних залозах, у секретах різних слизових оболонок, а також у сироватці крові, де їх вміст різко підвищується при низці захворювань [28].

СК – поліфункціональні сполуки із сильними кислотними властивостями. Як правило, у вільному вигляді в нормі вони не зустрічаються, а входять до складу різних речовин, що містять вуглеводи, таких як глікопротеїни, гліколіпіди (гангліозиди), олігосахариди. Займаючи в молекулах цих речовин кінцеве положення, СК суттєво впливають на їх фізико-хімічні властивості і біологічну активність. Визначаючи негативний заряд молекул глікопротеїнів, СК обумовлюють витягнуту форму їх молекул і як наслідок високу в'язкість секретів слизових оболонок дихального, кишкового і статевих трактів, що містять ці глікопротеїни [29]. Це забезпечує захист слизових оболонок від механічних та хімічних ушкоджень. Наявність СК у складі білків крові (церулоплазміну, кислого α 1-глікопротеїну та ін.) та деяких гормонів (хоріонічного гонадотропіну, фолікулостимулюючого та лютеїнізуючого гормонів) визначає тривалість циркуляції цих сполук у кровотоку. Після відщеплення СК, коли кінцевим цукром у молекулах глікопротеїнів стає галактоза, ці білки поглинаються

клітинами печінки. Саме цим пояснюється втрата гормонами біологічної активності [28].

Тривалість циркуляції в кровотоку деяких клітин крові (еритроцитів, лімфоцитів) також залежить від наявності або відсутності СК на їхній поверхні. Процес старіння еритроцитів пов'язаний із зменшенням кількості СК на їхній оболонці. Перебуваючи у складі вуглеводної частини глікопротеїнів, СК маскують залишки цукрів, які є антигенними детермінантами і таким чином відіграють важливу роль в імунних реакціях, знижуючи імуногенні властивості нормальних та пухлинних клітин. Встановлено, що СК є компонентом рецепторів клітин, специфічних до вірусів грипу [29].

Вміст СК у сироватці крові здорової людини становить 620-730 мг/л (2,0-3,33 ммоль/л). Їх кількість у крові помітно підвищується при ряді захворювань, що супроводжуються запальними процесами (наприклад, РА, поліартриті та ін.) або посиленою проліферацією тканин (наприклад, при їх малігнізації). Відомі важкі спадкові захворювання при яких відбувається накопичення вільних і зв'язаних СК у тканинах і рідинах організму Це так звана хвороба накопичення сіалових кислот, пов'язана з невідомим поки що первинним біохімічним дефектом, і сіалідоз, причиною якого є генетично обумовлена недостатність ензиму сіалідази, що каталізує відщеплення СК від речовин, що їх містять [30]. Визначення кількості СК у крові використовують як діагностичний та прогностичний біохімічний тест.

СК властивий розвиток як суто неспецифічних захисних ефектів, так і специфічних, що забезпечують взаємодію мікробних агентів зі специфічними рецепторами імунокомпетентних клітин. Так, нині накопичені факти, що підтверджують найважливішу роль СК у забезпеченні стійкості макроорганізму до патогенів різної природи, а також у розвитку соматичної патології. Вміст СК у крові є додатковою діагностичною пробою при деяких запальних захворюваннях, що мають аутоімунний характер (артрити, поліартрити, РА), що характеризує ступінь запального процесу [31].

Концентрація СК у крові різко підвищується і при багатьох інших гострих та хронічних запальних захворюваннях. СК значною мірою визначають здатність клітин до адгезії. Припускають [28], що СК маскують залишки цукрів, які є антигенними детермінантами глікопротеїнів, тим самим сприяючи адаптації патогенів в макроорганізмі. Видалення СК із глікопротеїдів або з поверхні клітин підвищує їх імуногенність. Після відщеплення від білково-вуглеводних комплексів тканин вільні СК інактивують багато бактерій. Тому збільшення вмісту в крові сіалоглікопротеїнів може бути проявом компенсаторної, захисної реакції організму [30]. Інколи вміст СК залишається підвищеним за відсутності зрушень з боку інших показників та зникнення клінічних ознак хвороби, що може використовуватися для справжньої оцінки стану макроорганізму. При неспецифічних захворюваннях легень вміст СК може перевищувати норму у 1,5-2 рази [29].

Отже, СК це похідні нейрамінової кислоти, які є в невеликій кількості у всіх тканинах організму, в слизових оболонках і рідинах. При запальних захворюваннях вміст сіалових кислот збільшується. Норма вмісту СК є в межах 1,8-2,7 ммоль/л [28].

1.3. Фіброзне ураження легень асоційоване з системними ураженнями сполучної тканини

Одним із найпоширеніших захворювань, що характеризується системними ураженнями сполучної тканини є РА – хронічне запальне захворювання, яке уражає 0,5–1% населення у всьому світі [1]. Характеризується симетричним ерозивним синовітом і нерідко прогресуючою втратою працездатності та ускладнюється позасуглобовими проявами. Серед них поширене ураження легень, і це може включати широкий спектр розладів, починаючи від захворювань дихальних шляхів і плеври, бронхоектазів і вузликів, до інфекції та токсичності ліків [32].

Захворювання легень є серйозним легеневим ускладненням при РА з негативним впливом щодо загального прогнозу та використанням ресурсів охорони здоров'я [8]. Близько у 10% хворих на РА розвивається патологія дихальної системи, яка є причиною 10–20% смертності із середньою виживаністю 5–8 років. Проте реальна частота ураження легень, пов'язана з РА, досі невідома [33]. Звичайна інтерстиціальна пневмонія з подальшим розвитком фібротичних змін – одна із переважних гістологічних/рентгенологічних картин при РА, про яку повідомляють до 66% випадків [33]. Фібротичні зміни у легенях можуть виникнути в будь-який момент природного перебігу РА, іноді до появи ураження суглобів. Оскільки його клінічні прояви зазвичай з'являються на запущених стадіях захворювання легень, то рання діагностика легеневої деструкції при РА є складною [34].

Два потенційних шляхи пояснюють співіснування РА та розвитку фіброзу легень. Так, цитрулінування, посттрансляційна модифікація, що характеризується перетворенням аргініну на цитрулін, викликає імунну відповідь, яка призводить до синтезу антитіл проти цитрулінового протеїну. Процес цитрулінування пов'язаний з розвитком пошкодження суглобів при РА, проте цитруліновані протеїни виявлені в легенях хворих РА [21]. Виходячи з цих спостережень, можливі два потенційні механізми, які пояснюють співіснування РА та фібротичних змін у легенях. При першому шляху, імунна відповідь проти цитрулінованих пептидів, що відбувається в суглобах згодом зміщується в легені, що, швидше за все, призводить до інтерстиціального запалення легень [21]. При цьому в пацієнтів з легневими змінами і генетичною сприйнятливістю до РА посилюється імунна відповідь проти цитрулінованих пептидів у легенях, ініціюються запальні процеси, які вторинно уражають суглоб. Тобто, імунна відповідь починається в суглобах або легенях, після чого за допомогою ще не вивчених молекулярних механізмів, імунна відповідь зміщується з одного відділу тканини на інший [35]. Пояснення спільного націлювання на легені та суглоби при РА

включають: утворення та депонування імунних комплексів (причому РФ сприяє їх депонуванню за рахунок зв'язуванню з частиною Fc IgG), наявність структурного перекривання між ініціюючими антигенами та модифікованими мішенями (цитрулінований віментин, присутній як у легеневій, так і в синовіальній тканині у пацієнтів з РА), і імунологічний процес поширення епітопу (механізм, який призводить до розширення спектру імунної відповіді) [2, 8, 21, 36].

Більшість авторів вважає, що процес поширюється від суглобів до легень. Враховуючи, що у значної частини хворих на РА раніше розвиваються суглобові прояви до ураження легень, можливо, в основному має місце запальний процес в суглобах, який вторинно уражає легені. Після того, як запальний процес поширився на легені, він активує фіброblastи, які, у свою чергу, диференціюються в міофіброblastи, що здатні ініціювати фіброз тканин [37]. Це проявляється запальними інфільтраатами в альвеолярних перегородках різного ступеня фіброзу. Так, після початкової фази запалення Th1 профіль лімфоцитів (який відіграє ключову роль у патогенезі РА) може перетворитися на профіль Th2 з його добре відомим потенціалом активації фіброblastів шляхом синтезу та вивільнення IL4 та IL13. Ще одна важлива субпопуляція Т-лімфоцитів сприяє патогенезу РА і може потенційно активувати фіброblastи Th17-шляхом. Як Th2-, так і Th17-асоційовані каскади цитокінів можуть ініціювати перехід запального процесу у фіброзний, що призводить до такої патології як пневмофіброз [38].

Отже, пацієнти з РА та інтерстиціальним захворюванням легень мають у три рази більший ризик смерті порівняно з тими, у кого РА виникає за відсутності інтерстиціального захворювання легень, а смертність, пов'язана з інтерстиціальним захворюванням легень, зростає. РА з інтерстиціальним захворюванням легень найчастіше класифікується як звичайна інтерстиціальна пневмонія, яка механічно та фенотипово перекривається з ідіопатичним легневим фіброзом, але може виникнути у незвичайній формі пневмонії, переважно неспецифічній інтерстиціальній пневмонії. Іншою

причиною ураження легень при РА є використання лікарських засобів для лікування РА. Тому необхідні ранні параметри для оцінки ризику розвитку пневмофіброзу в пацієнтів з РА, яким запланована біологічна протиревматична терапія.

2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкт і методи досліджень

У роботі проаналізовано результати аналізу 19 пацієнтів хворих на пневмофіброз і системне захворювання сполучної тканини, зокрема ревматоїдний артрит. У дослідження включені результати як жінок, так і чоловіків віком від 45 до 60 років. У частини пацієнтів на фоні патології сполучної тканини спостерігався розвиток пневмофіброзу. У залежності від наявності або відсутності фіброзу тканин легень усіх хворих поділили на дві групи:

I група – 6 пацієнтів, у яких виявлено фібротичне ураження легень у вигляді пневмофіброзу;

II група – хворі (7 пацієнтів), у яких виявлено системне захворювання сполучної тканини у вигляді розвитку РА;

III група – 6 пацієнтів, у яких фібротичне ураження легень виявлено на тлі розвитку РА.

Під час виявлення досліджуваної патології бралися до уваги клінічні характеристики, які спостерігалися у пацієнтів; дані рентгенологічного дослідження органів, локалізованих у грудній клітці; біохімічні показники.

Лабораторні дослідження та визначення біохімічних показників проводили на момент звернення пацієнтів із досліджуваною патологією за медичною допомогою до початку проведення стаціонарного лікування. Кров відбирали з ліктьової вени натще у вакуумні пробірки з цитратом натрію (антикоагулянт). У роботі аналізувалися показники загального аналізу крові та біохімічного аналізу крові.

Для визначення активності запалення і стану дихальної системи за умов розвитку системних уражень сполучної тканини та фіброзних уражень легень визначали біохімічні маркери, а саме кількість лейкоцитів, фагоцитарну активність нейтрофілів, показник РФ, вміст СРП і сіалових кислот, показник сатурації.

Дослідження фагоцитарної активності нейтрофілів крові.

Нейтрофіли – це клітини імунної системи, які відповідають за клітинну ланку імунної відповіді та мають здатність до фагоцитозу – захоплення сторонніх клітин і частинок і, надалі, їх перетравлення з подальшою загибеллю самого фагоциту. Порушення цих процесів призводять до недостатності клітинного імунітету. Визначення активності фагоцитуючих нейтрофілів проводять з метою діагностики первинних та вторинних імунодефіцитних станів, визначення наявності інфекційно-запальних процесів в організмі [39].

Принцип методу. Принцип оцінки фагоцитарної активності заснований на визначенні поглинальної та перетравлюючої здатності клітин. Визначення фагоцитарної активності нейтрофілів здійснювали в імерсійній системі під мікроскопом спеціальним методом, заснованим на визначенні резервних можливостей нейтрофілів до виконання їх основної функції – поглинання та перетравлення чужорідних агентів. Визначали показники фагоцитозу: фагоцитарний індекс (ФІ) і фагоцитарне число (ФЧ). Фагоцитарну активність нейтрофілів оцінювали за їх здатністю поглинати бактерії *S.aureus* (штам 209) [40].

Процедура.

Для визначення фагоцитарної активності нейтрофілів змішували 1 мл суспензії клітин (107) та 1мл суспензії бактерій (209) у розчині Хенкса. Суміш інкубували 30хв при температурі 37°C при постійному помішуванні. По закінченню процедури на предметних скельцях готували мазки, які фарбували за Романовським-Гімзом. У препарати підраховували 200 клітин, з них кількість клітин, які фагоцитували – ФІ (у.о.) та кількість бактерій, які поглиналися однією клітиною – ФЧ (%).

Підрахунок кількості лейкоцитів.

Принцип методу. Підрахунок кількості лейкоцитів здійснювали в камері Горяєва за допомогою світлового мікроскопу.

Процедура.

Камера Горяєва повинна бути сухою та чистою. До неї притирають покривне скло до появи райдужних смуг. У змішувач (меланжер) для лейкоцитів (біла паличка в кулястому розширенні) до нижньої мітки "0,5" набирають кров, а потім до мітки "11" за кулястим розширенням 5% розчин оцтової кислоти, яка руйнує оболонки лейкоцитів (в камері підраховують їх ядра), а кров у меланжері розводиться в 20 разів. Лейкоцити рахують у 100 великих квадратах згідно з правилом Єгорова. Підрахунок роблять за такою формулою [41]:

$$Л = B \times 250 \times 20 \times 10^6 / 100$$

де L – кількість лейкоцитів в 1 л крові; B – сума лейкоцитів у 100 великих квадратах; 250 – множник, що веде до об'єму крові 1 мкл (об'єм великого квадрата 1/250 мкл); 20 – розведення крові; 100 – кількість великих квадратів; 10^6 – кількість мкл в одному літрі.

Референтні величини: у нормі кількість лейкоцитів $4-5 \times 10^9$ /л.

Визначення вмісту ревматоїдного фактора.

РФ – аутоантитіло на ділянку Fc молекули IgG, яке, як правило, спостерігається у сироватці крові виявляється у великих концентраціях при захворюваннях сполучної тканини. Значення РФ вимірюють при діагностиці, терапії та прогнозуванні перебігу захворювання.

Принцип методу. Латексні частинки, вкриті людським гаммаглобуліном, аглютинуються при змішуванні із зразками, в яких присутній РФ [42].

Реагенти. Набір CORMAY RF Latex 100: РФ латекс (1 x 5 мл); РФ – контроль (+) червоний ковпачок (1 x 1 мл); РФ – контроль (-) блакитний ковпачок (1 x 1 мл); змішувачі (2 x 25 шт); слайди (по 6 дисків кожен).

Приготування робочого реагенту та стабільність. Реагенти готові до використання. При зберіганні при температурі $2-8^{\circ} \text{C}$ стабільні до терміну придатності, вказаної на упаковці.

Концентрації в аналізі. Латексні частинки, покриті γ -глобуліном людини (рН 8,2); розчин людської сироватки з концентрацією РФ >30 МЕд/мл; азид натрію 0,95 г/л.

Процедура.

Набір рекомендується використовувати для проведення якісного та напівкількісного аналізів.

Якісний метод

1. Необхідно, щоб усі реагенти та зразки досягли кімнатної температури. Чутливість тесту може знижуватися за низької температури.
2. Додайте 50 мкл зразка і по краплі кожного позитивного та негативного контролю в окремі лунки на тестовому слайді.
3. Делікатно збовтайте RF-латексний реагент перед використанням і додайте 1 краплю (50 мкл) в лунку, поряд з тестованим.
4. Змішайте всі порції, поширюючи їх по всій поверхні лунок. Для кожного зразка використовуйте різні мішалки.
5. Покладіть слайд на механічний ротатор при 80-100 об/хв. на 2 хвилини. Якщо зчитування результатів проводиться пізніше 2 хвилин, можливі помилкові результати.

Зчитування та інтерпретація: Відразу після зняття тестового слайда з механічного ротатора

оцініть за допомогою мікроскопа наявність чи відсутність візуальних грудок аглютинації.

Наявність таких грудок говорить про присутність РФ концентрації рівною або більше 8 Од/мл.

Напівкількісний метод

1. Зробити серійне подвійне розведення зразка 0,9% розчином NaCl.
2. Виконати для кожної порції розведеного зразка тест як описано в якісному методі.

Зчитування та інтерпретація: Результат (титр) у напівкількісному методі визначається як найбільше розведення, яке показує позитивний результат.

Приблизну концентрацію РФ можна визначити за такою формулою:

$$\text{Концентрація РФ (МЕд/мл)} = 8 \times \text{найбільше розведення}$$

Референтні величини: дорослі < 8 ОД/мл.

Визначення вмісту С-реактивного протеїну.

СРП – маркер гострих запальних процесів. У разі гострого запалення концентрація СРП збільшується та знижується швидше, ніж швидкість осідання еритроцитів. Збільшення СРП відбувається за різних видів тканинної агресії, як, наприклад, при інфекційних станах, ревматоїдному артриті тощо [26].

Принцип методу. Аналіз на СРП ґрунтується на турбідиметричному вимірюванні. Мутність викликається утворенням нерозчинних імунокомплексів антиген-антитіло. Утворення комплексів прискорюється та посилюється полі етиленгліколем [42].

Реагенти. Антитіл СРП – поліклональне козяче антитіло до СРП; азид натрію 0,095%; буфер PEG4; буферизований фосфатний соляний розчин, рН 7,4.

Приготування робочого реагенту та стабільність. Реагенти готові до використання. Захищати від світла, закривати відразу після використання. Стабільність: при 2-8°C до кінця терміну придатності, при 18-25°C 1 місяць.

Процедура.

Процедура аналізу без розведення зразка: Зразки/контролі: готові до використання. Калібрувальна крива: Для створення калібрувальної кривої використовуйте СРП-калібратор, який готують шляхом проведення розбавлень 1:2 з 0,9% соляним розчином як розріджувач. Як варіант, використовуйте калібратор 5 рівнів. Використовуйте 0,9% соляний розчин як нульову точку.

Внесіть до тестових пробірок	Калібратори	Зразки/Контролі
Буфер	900 мкл	900 мкл
Кал./Контролі/Зразки	60 мкл	60 мкл
Перемішати. Зчитати A1 калібраторів та зразків/контролів при 340 нм. Потім додати:		
Реагент антитіло	75 мкл	75мкл
Перемішати. Інкубувати 5 хвилин при температурі 37 °С. Зчитати A2 калібраторів та зразків/контролів при 340 нм. Розрахувати: $\Delta A = (A2-A1)$		

Розрахунки.

Обчисліть та виведіть $\Delta A = (A2 - A1)$ калібраторів проти концентрацій значень на лінійно-лінійному папері. Розрахуйте ΔA оптичні щільності зразків та контролю(ів) та перерахуйте на значення в мг/дл на референтній кривій. Зразки, що виходять за значення абсорбції найвищого калібратора повинні аналізуватися повторно після чергового розведення.

Референтний діапазон 0-5 мг/л.

Визначення вмісту сіалових кислот.

Сіалові кислоти – N-ацетил- і N-глицилпохідні нейрамінової кислоти. Ці сполуки розглядаються як нормальні компоненти всіх тканин та біологічних рідин організму людини та тварин і є важливою складовою частиною вуглевод-білкових (глікопротеїнів) та вуглевод-ліпідних (гліколіпідів) комплексів, в яких займають зазвичай крайове положення. Після відщеплення від глікопротеїнів вільні сіалові кислоти інактивують багато бактеріальних та вірусних хвороботворних агентів. Тому збільшення вмісту в крові сіалоглікопротеїнів може бути проявом компенсаторної, захисної запальної реакції. У вільному вигляді похідні нейрамінової кислоти

присутні в крові, лікворі, слизовій оболонці шлунка, щитовидної залози та ін. [29].

Принцип методу. Для визначення концентрації сіалових кислот у сироватці крові зазвичай використовують колориметричний метод Гесса. При цьому безбілковий фільтрат сироватки крові піддають гідролізу, в результаті чого зі складу сіалоглікопротеїнів виділяються сіалові кислоти, які взаємодіючи з оцтовою і сірчаною кислотами в умовах підвищеної температури, створюваної в киплячій водяній бані, дають зафарбовані сполуки, що змінюють колір розчину в бурофіолетовий. При цьому інтенсивність фарбування залежить від концентрації сіалових кислот [43].

Реагенти. Оцтово-сірчана суміш, 10% трихлороцтова кислота (ТХО).

Приготування робочого реагенту та стабільність. Реагенти готові до використання.

Процедура.

У центрифужну пробірку наливають 1 мл сироватки крові та, обережно струшуючи, додають 1 мл 10% розчину трихлороцтової кислоти. Пробірку поміщають на 5 хвилин у киплячу водяну баню, потім зазвичай охолоджують шляхом витримування її протягом 5 хвилин у крижаній бані або холодній воді, центрифугують 5 хвилин при 1000-2000 об/хв.

До 0,4 мл відібраної надосадової рідини додають 5 мл оцтово-сірчаної суміші та проби повторно нагрівають у киплячій водяній бані протягом 30 хвилин. При цьому безбарвний розчин поступово набуває червоно-фіолетового кольору. Після охолодження в крижаній бані або під струменем холодної води проби колориметрують на ФЕК із зеленим світлофільтром в к'юветі з шириною шару 10 мм. Як контроль використовують 5% розчин сірчаної кислоти в крижаній оцтовій кислоті.

Результат виражають або в умовних одиницях (за відсутності стандартного розчину), для чого отриману величину екстинкції множать на 1000, або значення концентрації ацетилнейрамінової кислоти. В останньому випадку розрахунок ведуть за калібрувальним графіком.

Побудова калібрувального графіка. З основного стандартного розчину N-ацетилнейрамінової кислоти готують робочі розчини, як показано в таблиці:

№ пробірки	Робочі стандартні розчини, мл		Концентрація нейрамінової кислоти в пробі	
	Основний стандартний розчин N-ацетилнейрамінової кислоти	Дистильована вода	мг%	ммоль/л
1	0,10	0,30	25	0,80
2	0,15	0,25	37,5	1,21
3	0,20	0,20	50	1,61
4	0,25	0,15	62,5	2,02
5	0,30	0,10	75	2,42
6	0,40	-	100	3,23

До розчинів додають 5 мл оцтово-сірчанокислого реактиву та обробляють їх так само, як дослідні проби.

Розрахунки проводять за калібрувальною кривою.

Референтні значення. У нормі вміст сілових кислот складає 1,8-2,7 ммоль/л.

Визначення сатурації.

Сатурація – це відсоток насичення крові киснем у момент виміру. Найбільш поширений засіб виміру – пульсоксиметр. У процесі аналізу використовували застосовували трансмісійні пульсоксиметри, які працюють на просвіт тканини, та рефракційні, що працюють на відображення світла від тканини [44].

Принцип методу. Принцип роботи пульсоксиметра заснований на здатності зв'язаного гемоглобіну (HbO_2) та незв'язаного (Hb) з киснем, абсорбувати світло різної довжини хвилі. Зв'язаний гемоглобін більше абсорбує інфрачервоне світло, а незв'язаний – червоне світло.

У пульсоксиметрі встановлені два світлодіоди, які випромінюють червоне та інфрачервоне світло. На протилежній частині датчика розташовується фотодетектор, який визначає інтенсивність світлового потоку, що потрапляє на нього. Вимірюючи різницю між кількістю світла, що абсорбується під час систоли та діастоли, пульсоксиметр визначає величину артеріальної пульсації. Сатурація розраховується як співвідношення кількості HbO_2 до загальної кількості гемоглобіну, виражене у відсотках [44]:

$$\text{SpO}_2 = \left(\frac{\text{HbO}_2}{\text{HbO}_2 + \text{Hb}} \right) \times 100 \, \%.$$

Похибки, які можуть виникнути при вимірюванні сатурації та частоти пульсу можна розділити на дві умовні групи: похибки, закладені в самому принципі виміру та похибки в його технічній реалізації.

Основні чинники, які можуть мати негативний вплив на визначення сатурації [44]:

Неправильне розташування датчика. При зміні положення датчика відбувається різке підвищення сатурації. Цей ефект може бути пов'язаний з непостійним кровотоком через пульсуючі шкірні венули;

Наповнення пульсу. Пульсоксиметр розпізнає лише пульсуючий кровотік. При низькому артеріальному тиску через зниження серцевого викиду або аритмії пульс може бути дуже слабким, і чутливість приладу буде недостатньо;

Вазоконстрикція. Пульсоксиметр може не визначити сигнал, якщо кінцівки холодні та є звуження периферичних судин;

Крім перерахованих вище факторів, негативний вплив також можуть надавати: яскраве світло, рухи, отруєння чадним газом, барвники, включаючи лак для нігтів. Однак слід зазначити, що вік, стать, жовтяниця та темний колір шкіри не впливають на роботу пульсоксиметра;

Існує кілька рекомендацій для запобігання виникненню похибки:

1. Рука повинна бути теплою і розслабленою;

2. Датчик пульсоксиметра повинен бути біля основи нігтя;
3. Для більш точних результатів слід стерти лак з нігтів або забрати накладні нігті;
4. Під час вимірювання не рухатися, неправильний кут падіння світла може вплинути на результат. У паралізованих хворих пульсоксиметр прищипка знижує сатурацію. Для них потрібен пульсоксиметр з електродами, що клеяться [7].

Референтні значення та ступені кисневої недостатності

Ступень	Сатурація, %
Норма	більше або дорівнює 95%
I ступень	90–94 %
II ступень	75–89 %
III ступень	менше 75 %
Гіпоксимічна кома	менше 60 %

Статистична обробка результатів дослідження.

Статистична обробка матеріалів проводилася з використанням методів математичної статистики для аналізу даних. Зокрема, методи оцінки, за допомогою яких з певною ймовірністю зроблено висновки щодо параметрів розподілу; для визначення розбіжності між середніми значеннями використовували параметричний t-критерій Стюдента. Перевірка знайдених розбіжностей проводилася лише на рівні значимості $P \leq 0,05$. Крім того, статистична обробка результатів була здійснена за допомогою Microsoft Excel 2007, згідно з рекомендаціями до статистичної обробки медико-біологічних даних [45].

3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Фібротичне ураження легень (пневмофіброз) – це патологічний процес, у результаті якого нормальна легенева тканина замінюється на сполучну тканину з прогресуючим розвитком дихальної недостатності. Пневмофіброз може розвиватися на фоні інших патологій та ускладнювати перебіг цих патологій. Основними чинниками розвитку пневмофіброзу вважають як захворювання бронхолегеневого апарату (захворювання бронхів, інфекційні захворювання, інтерстиціальні захворювання легень, тромбоемболії), так і системні захворювання сполучної тканини [46].

Запальні захворювання сполучної тканини відносять до інтерстиціальних захворювань легень, які призводять до розвитку пневмофіброзу, серед них ревматоїдний артрит. Проте поява пневмофіброзу спостерігається не у всіх хворих з ревматоїдним артритом, хоча часто. Окрім цього на розвиток пневмофіброзу впливають різні строки перебігу основного захворювання. Немає остаточних даних між активністю запального процесу, терміном розвитку захворювання сполучної тканини і формуванням пневмофіброзу [7].

Дифузні захворювання сполучної тканини, під час яких прогресують процеси фіброзу характеризуються вазоспастичними порушеннями опорно-рухового апарату та внутрішніх органів. Близько 40% хворих на РА мають ідіопатичне ураження легень [8].

Заміщення нормальної легеневої тканини на сполучну є незворотним процесом. Саме тому дослідження ранніх патогенетичних механізмів розвитку пневмофіброзу є актуальним завданням для воєчасного встановлення діагнозу і лікування (корекції) патології, яка призвела до розвитку пневмофіброзу з наступною дихальною недостатністю [10].

Фагоцити одні із головних компонентів вродженого імунітету. Вони забезпечують першу лінію захисту організму від інфекції. В основі захисної функції лейкоцитів лежить фагоцитарний процес, який полягає в їх здатності розпізнавати, поглинати, вбивати та перетравлювати чужорідні клітини [47].

Як високочутливий індикатор норми та патології, характеристики фагоцитів є корисним інструментом не тільки імунологічної, а й загальноклінічної діагностики. Дані щодо фагоцитарної активності нейтрофілів (кількість клітин, що фагоцитують при інкубації з бактеріями) дозволяють оцінити резервні можливості цих клітин щодо поглинання та перетравлення чужорідних агентів [48].

Результати проведених досліджень показали, що за умов розвитку пневмофіброзу спостерігалось підвищення фагоцитарної активності нейтрофілів. Так, фагоцитарне число (ФЧ) підвищувалося у 2,4 рази (рис.3.1а), а фагоцитарний індекс (ФІ) – у 1,9 рази (рис.3.1б) порівняно з показниками верхньої межі норми.

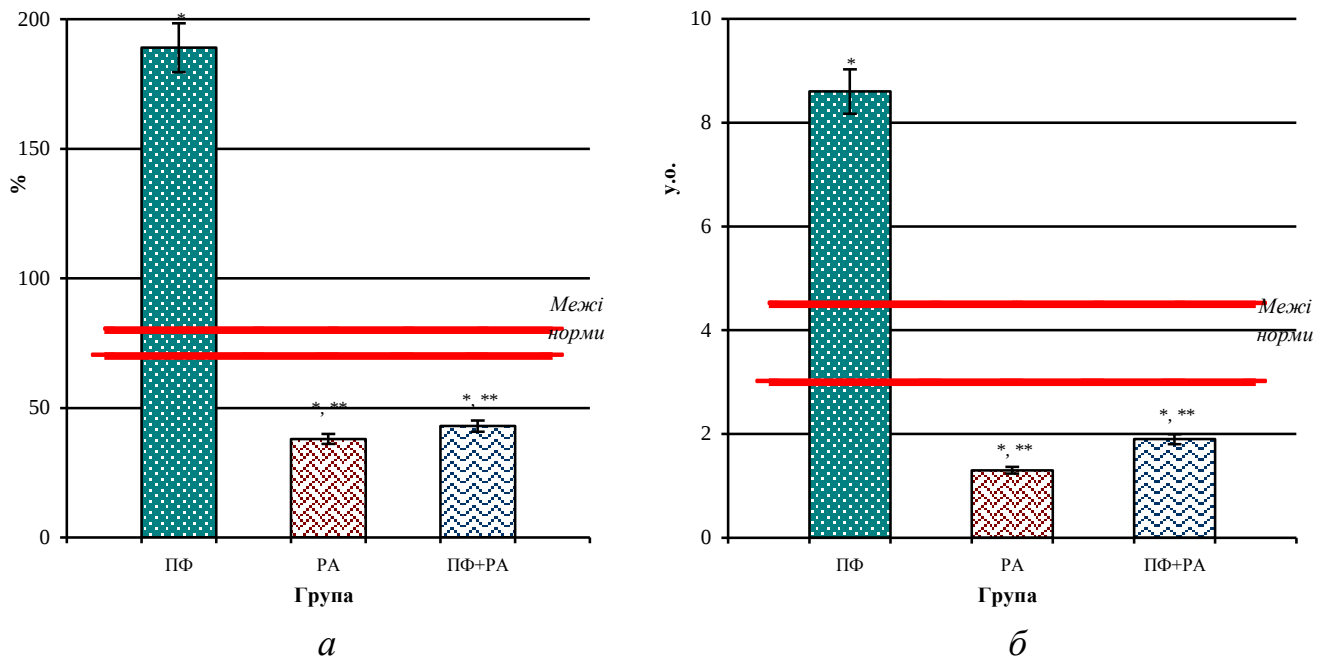


Рис.3.1. Показники фагцитарної активності нейтрофілів за умов фіброзного ураження бронхолегеневої системи при системних патологіях сполучної тканини

*Примітка (тут і надалі): ПФ – хворі, у яких спостерігалось фібротичне ураження легень у вигляді пневмофіброзу; РА – пацієнти, які хворіли на ревматоїдний артрит; ПФ+РА – хворі, у яких пневмофіброз розвивався на тлі розвитку ревматоїдного артриту; а – фагоцитарне число; б – фагоцитарний індекс; * – статистично достовірна різниця порівняно з показниками норми; ** – статистично достовірна різниця порівняно з показниками групи пацієнтів з виявленим пневмофіброзом, $P \leq 0,05$.*

Встановлений факт вказує на те, що фагоцитарна активність нейтрофілів відіграє важливе значення у захисті організму, оскільки таке підвищення може бути зумовлено компенсаторною реакцією організму у відповідь на розвиток інфекційного процесу [49]. Слід зауважити, що пневмофіброз часто виникає після перебігу важких бактеріальних та вірусних інфекцій в легеневій системі [47].

При розвитку РА спостерігалось зниження фагоцитарної активності нейтрофілів: показник ФЧ знижувався у 1,8 рази (рис.3.1а), а ФІ – у 2,3 рази (рис.3.1б) порівняно з нормою, що може бути пов'язано зі зниженою продукцією фагоцитів, оскільки у досліджуваної групи різко знижувалася кількість лейкоцитів у крові – у 2,1 рази порівняно з нижньою межею норми (рис.3.2).

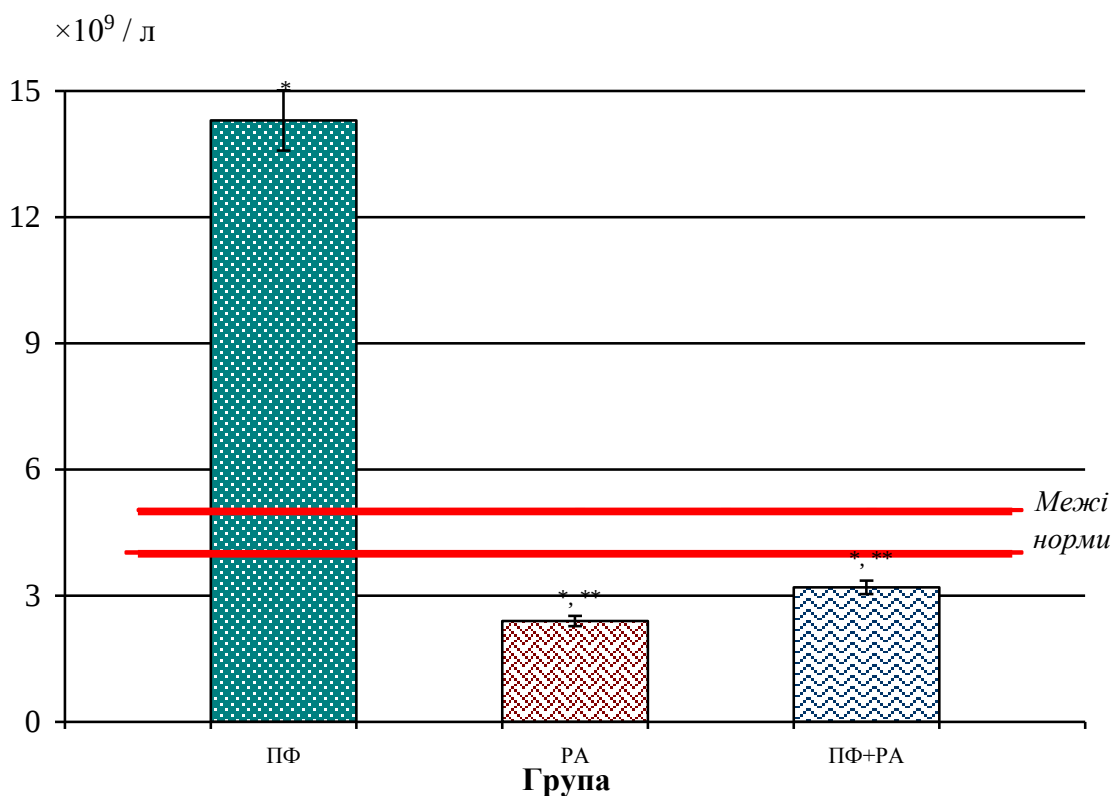


Рис.3.2. Кількість лейкоцитів у крові пацієнтів за умов фіброзного ураження бронхолегеневої системи при системних патологіях сполучної тканини

Іншою причиною зниження фагоцитарної активності нейтрофілів може бути швидкий їхній розпад, порушення рухливості, порушення самого процесу поглинання стороннього агента, порушення його знищення та ін. [50]. Все це говорить про зниження стійкості організму до інфекції, імовірно, у результаті аутоімунного захворювання.

У групи пацієнтів з поєднаними патологіями пневмофіброзу і РА також спостерігалось зниження фагоцитарної активності нейтрофілів порівняно з показниками норми та з показниками групи пацієнтів, у яких зустрічалася ізольована форма пневмофіброзу (рис.3.1). Імовірно, системні аутоімунні захворювання сполучної тканини не лише сприяють розвитку пневмофіброзу, але й ускладнюють його перебіг при поєднаній патології [51]. Встановлений факт підтверджує також зниження кількості лейкоцитів у крові хворих з пневмофіброзом і РА порівняно із нормою та групою пацієнтів, у яких спостерігався лише пневмофіброз (рис.3.2).

Отже, аналіз стану фагоцитарної активності клітин імунної системи у пацієнтів з фібротичним ураженням легень показав спонтанного посилення фагоцитарних показників нейтрофілів, що вказує на стимуляцію захисних систем організму. При пневмофіброзі, який розвивається на тлі розвитку РА, виявлені суттєві відхилення активності фагоцитозу нейтрофілів, що підтверджується встановленою нами тенденцією до зниження ФЧ (рис.3.1а) і ФІ (рис.3.1б) порівняно з нормою. Такі зміни активності фагоцитуючих клітин імунної системи, імовірно, сприяють формуванню аутоагресивних та імунозапальних процесів в легеневій тканині за умов РА, створюючи при цьому умови для активації імовірних латентних інфекцій [49].

Відомо, що бактеріальні (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* тощо) і вірусні (цитомегаловірусу, вірусу Епштейна-Барр, коронавірусу, вірусу герпесу) інфекції, яким властива тропність до легеневих структур, можуть проявляти активацію системи нейтрофільних фагоцитів. Проте, при системних захворюваннях сполучної тканини можуть

посилюватися імунозапальні васкулярні і фібротичні процеси у сполучній тканині, що стане ризиком розвитку пневмофіброзу [52].

Отже, дослідження фагоцитарної активності нейтрофілів та їх резервної здатності у хворих на пневмофіброз і РА дає змогу передбачити та визначити особливості пошкодження легень фібротичним процесом. Ці показники можуть бути додатковими біомаркерами для діагностики пневмофіброзу, що дасть змогу вчасно застосувати адекватну базову терапію при пневмофіброзі.

Відомо, що РА – це аутоімунне запальне захворювання, яке викликає хронічний біль у суглобах. Проте, згодом ця патологія може призвести до пошкодження тканини легень, що може спричинити розвиток легеневого фіброзу. При цьому стані тканина легень заміщається сполучною тканиною, внаслідок чого ушкоджується та потовщується, що ускладнює поглинання кисню [8].

Ревматоїдний фактор – це особливі протеїни, які є аутоантитілами до імуноглобулінів класу G – IgG [19].

Результати проведених досліджень показали, що у пацієнтів із пневмофіброзом рівень РФ в плазмі крові залишався в межах норми, що вказує на відсутність аутоімунних процесів цієї групи хворих (рис.3.3.). В той же час, у пацієнтів, у яких пневмофіброз розвивається на тлі РА виявлено підвищення РФ у 2,5 рази порівняно з показниками верхньої межі норми (рис.3.3). Досліджуваний показник не тільки у 3,5 рази перевищував показник групи пацієнтів з ізольованим пневмофіброзом, але й у 1,2 рази перевищував значення пацієнтів з РА, у яких не виявлений пневмофіброз (рис.3.3). Очевидно, в процесі поєднаної патології пневмофіброзу і РА, деструктивні зміни в сполучній тканині сприяють звільненню нових антигенів, у відповідь на які формуються нові механізми аутоімунних реакцій [12].

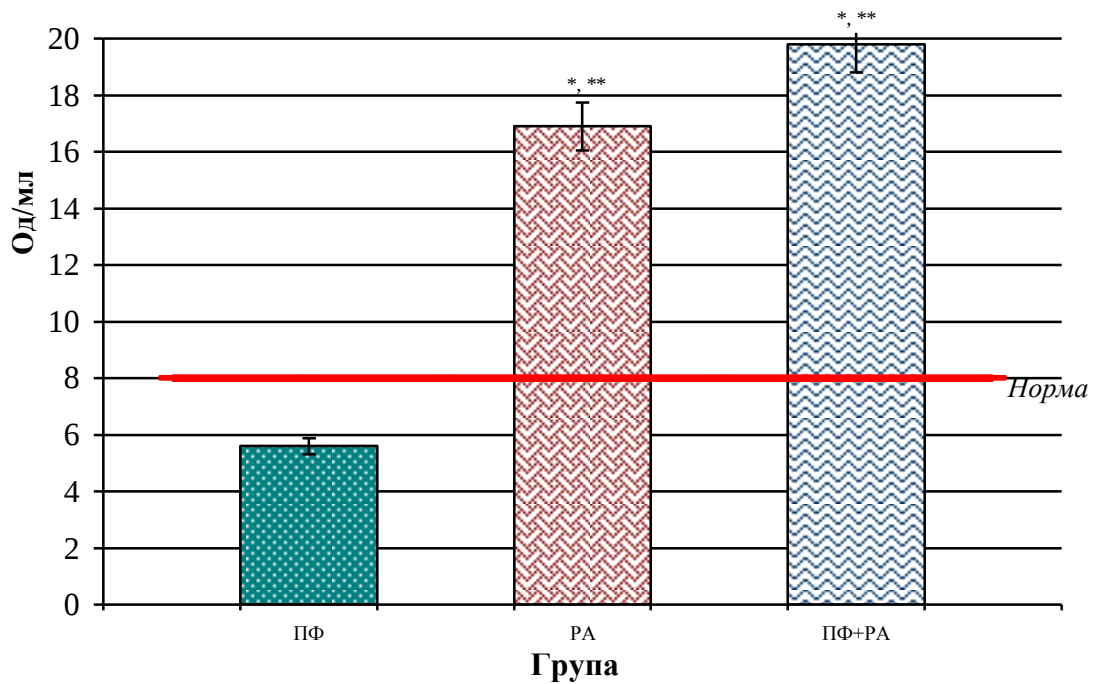


Рис.3.3. Вміст ревматоїдного фактора у плазмі крові пацієнтів за умов фіброзного ураження бронхолегеневої системи при системних патологіях сполучної тканини

Іншою причиною підвищення РФ у плазмі крові при РА може бути його утворення в суглобі при РА, з якого потім РФ потрапляє у кров. Це пояснює той факт, що при РА та деяких інших аутоімунних захворюваннях виникає такий стан, при якому імунна система приймає власні структури як чужорідні тіла та починає виробляти аутоантитіла, покликані усувати власні тканини як чужорідні утворення [21]. При РА таким аутоантитілом стає РФ, який атакує власні імуноглобуліни класу G – IgG, що змінили свій стан під впливом вірусів або інших негативних впливів. Розвиток пневмофіброзу на тлі РА ускладнює перебіг аутоімунного процесу при РА [15].

Отже, на тлі ревматичних захворювань уражаються практично всі компоненти дихальної системи, включаючи інтерстиції легень і легеневу тканину, бронхи, плевру та дихальні м'язи. Легенева симптоматика, яка зустрічається приблизно у 40-80% хворих з різними ревматичними захворюваннями, може ускладнювати перебіг РА [8]. Однак, крім цього,

компоненти дихальної системи можуть пошкоджуватися і вдруге, внаслідок токсичної дії препаратів, що використовуються для лікування РА. Тому, первинне ураження легень може бути викликане власне самим захворюванням, а вторинне ураження – обумовлене бронхопульмонарною токсичністю препаратів, що використовуються для лікування РА. РФ – аутоантитіло (як правило, це IgM), що реагує на власний IgG, які змінили свої звичайні властивості під впливом стрептокока, і деяких інших бактерій і вірусів. РФ переважно синтезується плазматичними клітинами, що знаходяться в синовіальній оболонці суглобів. Максимально високі значення вмісту РФ в крові досягається при поєднанні пневмофіброзу і РА, що супроводжує виражене ураження суглобів та ускладнює перебіг пневмофіброзу [8].

Однією із причин ускладнення РА та розвитку пневмофіброзу може бути розвиток запальних процесів у організмі. Одним із основних маркерів, який дозволяє оцінити розвиток запальних процесів у організмі є визначення С-реактивного протеїну (СРП) в плазмі крові [26].

Аналіз результатів визначення цього маркера гострої фази запалення в організмі показав його підвищення у пацієнтів всіх досліджуваних груп з максимальним значенням у пацієнтів з поєднаною патологією пневмофіброзу і РА (рис.3.4). Так, якщо при пневмофіброзі концентрація СРП у 2,8 рази перевищувала показник норми, а при РА – у 2,2 рази перевищувала значення норми, то при поєднаній патології пневмофіброзу і РА концентрація СРП у 3,4 рази перевищувала значення норми (рис.3.4).

СРП – протеїн, що утворюється переважно в гепатоцитах і стимулює імунні реакції в організмі, тому в нормі в плазмі крові він знаходиться у дуже малих кількостях. При розвитку гострого запалення СРП швидко з'являється в крові, що супроводжується ушкодженням тканин [27].

Тому, дослідження крові на СРП не є суворо специфічним саме для ревматичного запального процесу, але воно дуже корисне як для визначення гостроти захворювання, так і міри ушкодження запальних тканин. Імовірно,

тому цей протеїн підвищується і при ізольованому пневмофіброз, який може розвиватися на тлі інфекційних процесів у легенях. Характерно, що при вірусних інфекціях вміст СРП незначно підвищується, порівняно з бактеріальними [27].

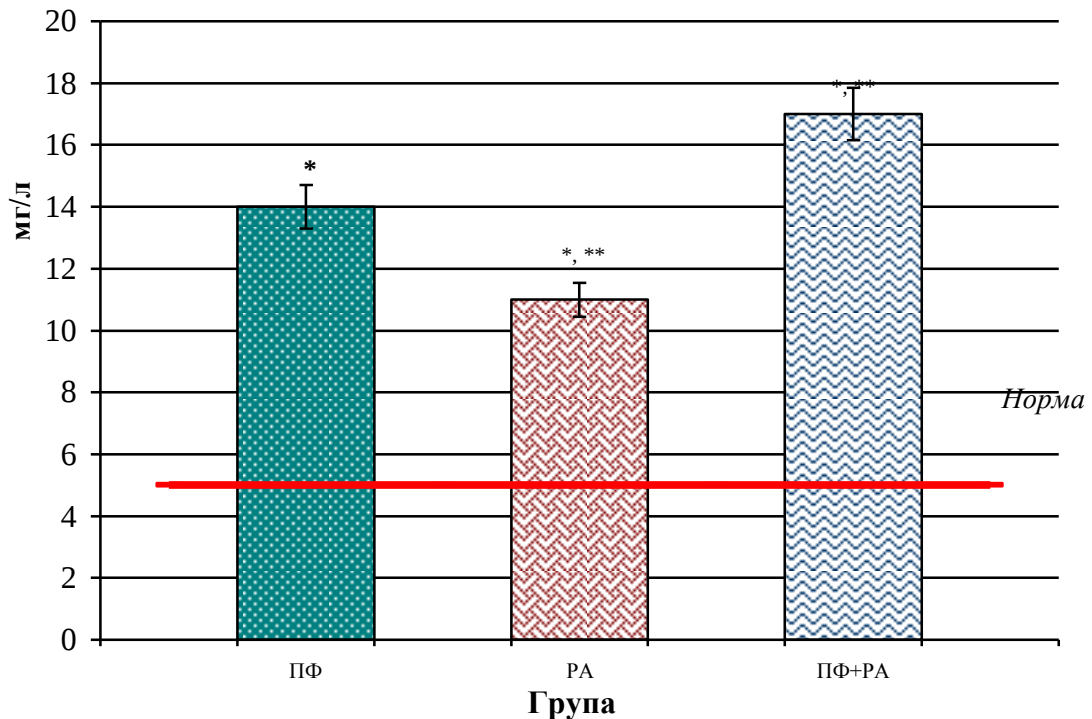


Рис.3.4. Вміст С-реактивного протеїну в плазмі крові пацієнтів за умов фіброзного ураження бронхолегеневої системи при системних патологіях сполучної тканини

Іншим біохімічним маркером, який підвищується в плазмі крові у відповідь на розвиток захворювань запального генезу є сіалові кислоти – група сполук, які присутні у всіх тканинах та рідинах організму та володіють сильними кислотними властивостями. Частина сіалових кислот сконцентрована в секретах залоз слизових оболонок, зокрема дихального тракту, що забезпечує захист слизових оболонок від механічного та хімічного впливу. У сироватці крові міститься невелика кількість сіалових кислот, які з'єднані з білками та деякими гормонами, що забезпечують більш тривалу циркуляцію цих сполук у кровотоці [29].

Результати проведених досліджень показали, що у плазмі крові хворих пневмофіброзом виявляються зміни кількісного складу вільних сіалових кислот. Так, виявлено підвищення вмісту сіалових кислот у плазмі крові пацієнтів, яке у 1,3 рази перевищувало показник верхньої межі норми (рис.3.5). Подібна тенденція спостерігається і при РА, оскільки виявлено статистично достовірне збільшення рівня сіалових кислот у 2,8 рази порівняно з показниками норми (рис.3.5). Імовірно, зміни кількісного складу сіалових кислот у плазмі крові відбуваються внаслідок відщеплення від термінально розташованих залишків сіалових кислот від глікопротеїнів за дії ферменту сіалідази, активність якої збільшується у крові хворих при запальних процесах [30]. При поєднаній патології пневмофіброзу і РА рівень сіалових кислот в плазмі крові підвищується найсуттєвіше – у 3,3 рази порівняно з показником верхньої межі норми (рис.3.5).

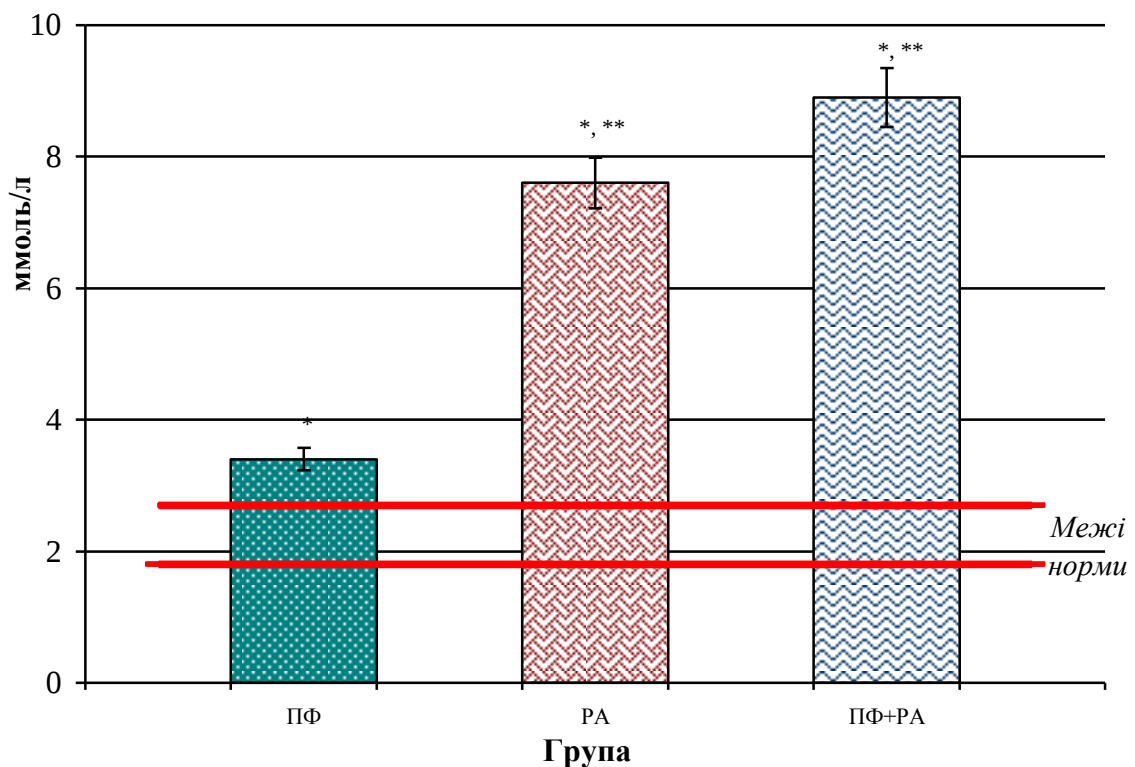


Рис.3.5. Вміст вільних сіалових кислот у плазмі крові пацієнтів за умов фіброзного ураження бронхолегеневої системи при системних патологіях сполучної тканини

Слід зазначити, що вміст сіалових кислот може бути пов'язаний з рівнем гострофазових білків, зокрема α -1-кислого глікопротеїну, концентрація якого може зростати за будь-якого патологічного процесу [31]. Більшість молекул α -1 кислого глікопротеїну представлена вуглеводним компонентом, що характеризується наявністю кінцевих N-ацетилнейрамінових залишків – сіалових кислот. Зменшення кількості кінцевих N-ацетилнейрамінових залишків обумовлює появу вільних сіалових кислот у крові. Оскільки загальний рівень сіалових кислот є сумою двох фракцій: зв'язаних із глікокон'югатами та вільно циркулюючих у кровотоці, то визначення вільних сіалових кислот дає повну інформацію про активність десіалювання білків в організмі при пневмофіброзі і РА [30].

Отже, рівень вільних сіалових кислот у плазмі крові підвищується як при розвитку пневмофіброзу, так і при РА, з максимальними значеннями при поєднанні цих патологій у організмі. Це підтверджує принципову можливість застосування даного маркера для первинної діагностики патології легень загалом при пневмофіброзі, проте для диференційної діагностики стану дихальної функції визначення рівня сіалових кислот є малоінформативним, тому доречно застосовувати інші маркери, які показують функцію дихальної системи – сатурацію кисню – відношення концентрації оксигемоглобіну до загальної кількості гемоглобіну в крові. Показник сатурації пов'язаний з парціальним тиском кисню в крові (P_{aO_2}). Тому зниження P_{aO_2} тягне за собою зниження сатурації [44].

Аналіз визначення сатурації крові у пацієнтів з пневмофіброзом показав зниження цього показника при пневмофіброзі до рівня $92 \pm 1,2\%$, що вказує на I ступень кисневої недостатності (рис.3.6). Водночас розвиток РА не впливав на рівень сатурації, оскільки досліджуваний показник залишався в межах норми у цієї групи пацієнтів. Поєднання розвитку пневмофіброзу з РА ускладнює дихальну функцію, оскільки показник сатурації знаходився на рівні $87 \pm 2,1\%$, що вказує на II ступень кисневої недостатності (рис.3.6).

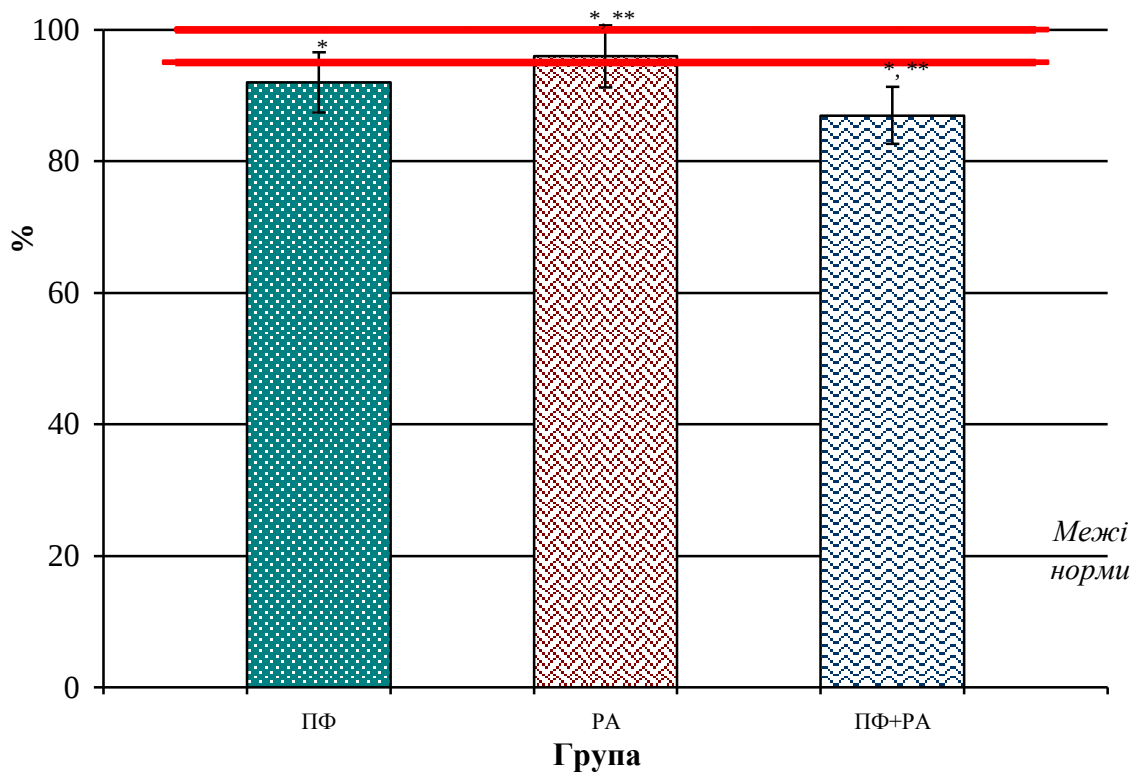


Рис.3.6. Сатурація крові у пацієнтів за умов фіброзного ураження бронхолегеневої системи при системних патологіях сполучної тканини

Порушення функції легень при пневмофіброзі, і особливо при його поєднанні з РА, може бути пов'язано з пошкодженням клітини епітелію в пізній фазі запалення суглобів, що викликає некротичні явища бронхолегеневого епітелію з оголенням базальної мембрани, деструкцією, клітинною проліферацією та лімфоїдною інфільтрацією. Викид еластаз із цих клітин викликає пошкодження епітелію та сполучнотканинного матриксу [13]. Надалі відбуваються репаративні процеси з прогресуванням фіброзу, що може призводити до закриття просвітів бронхіол і альвеол. У цьому процесі відіграє роль накопичення імуноглобулінів G, A, M, фібрoneктину, фактора VII, X, фібриногену [16]. У запальній реакції беруть участь еозинофіли, макрофаги, лімфоцити. У просвітах частини альвеол можуть зустрічатися пінисті макрофаги. В результаті надлишкового розвитку сполучної тканини відбуваються концентричні звуження та облітерація термінальних бронхіол та альвеолярного апарату, що порушує процес дихання у пацієнтів з РА [8].

Отже, розвиток пневмофіброзу на тлі РА ускладнює запальні процеси в організмі, про що свідчать підвищення СРП і сіалових кислот у плазмі крові. З іншого боку, при пневмофіброзі, який розвивається на тлі РА більшою мірою виявляється киснева недостатність ніж при ізольованому пневмофіброзі.

ВИСНОВКИ

1. За умов фібротичного ураження легень, яке розвивається на тлі РА знижується фагоцитарна активність нейтрофілів, на що вказує зниження фагоцитарного числа у 1,8 рази і фагоцитарного індекса у 2,3 рази порівняно з показниками норми. Це може бути наслідком аутоімунних процесів у легеневій тканині за умов РА, оскільки в плазмі крові підвищується вміст ревматоїдного фактора порівняно з нормою.

2. Розвиток пневмофіброзу на тлі РА супроводжується підвищенням вмісту С-реактивного протеїну та концентрації вільних сіалових кислот в плазмі крові порівняно із показниками пацієнтів із пневмофіброзом без супутньої патології.

3. При пневмофіброзі спостерігається розвиток I ступеня кисневої недостатності із значенням сатурації $92 \pm 1,2\%$. Поєднання розвитку пневмофіброзу з РА ускладнює дихальну функцію, оскільки показник сатурації знаходиться на рівні $87 \pm 2,1\%$, що вказує на II ступень кисневої недостатності.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Системні хвороби сполучної тканини. Системна склеродермія. Дерматоміозит/ уклад. О.М. Біловол, І.І. Князькова, В.П. Денисенко та ін. – Харків : ХНМУ, 2018. 36 с.
2. Чоп'як В.В., Потьомкіна Г.О., Синенька М.Ю., Гаврилук А.М., Синенький О.В., Вальчук І.В. та ін. Системні хвороби сполучної тканини: досвід роботи. *Український ревматологічний журнал*. 2019. № 2 (36). С. 15-21.
3. Синяченко О.В., Єрмолаєва М.В., Степко П.А., Верзілов С.М., Лівенцова К.В. Системні хвороби сполучної тканини як прояв паранеопластичного синдрому у хворих на рак легені. *Український ревматологічний журнал*. 2020. № 2 (80). С. 30-35.
4. Бестаев Д.В., Каратеев Д.Е., Насонов Е.Л. Поражение легких при ревматоидном артрите. *Медицина науки України*. 2020. Vol. 16, № 3. С. 21-32.
5. Гринюк О.Є., Давиденко І.С., Хухліна О.С., Антонів А.А., Гайдичук В.С. Патоморфологія фіброзувальних процесів у печінці та легенях у хворих на неалкогольний стеатогепатит та ожиріння закоморбідності з хронічним обструктивним захворюванням легень. *Клінічна та експериментальна патологія*. 2021. Т.20, № 1 (71). С. 18-26.
6. Хворостенко М.І., Кіхтенко І.М., Хворостенко Ю.М., Кіхтенко С.І. Кількісна оцінка променевих ушкоджень легень. *Український радіологічний журнал*. 2014. №2. С. 134-137.
7. Сайковский Р.С., Верхотин А.А., Чигирин Ю.А. и др. Анемия и интерстициальное поражение легких как системные проявления ревматоидного артрита: случай из практики. *Клиническая практика*. 2010. (4). С. 26-30.
8. Мазуров В.И., Богданов А.Н. Диагностика и лечение поражений легких у больных ревматоидным артритом. *Научно-практическая ревматология*. 2013. (1). С. 52-56.

9. Синяченко О.В., Егудина Е.Д., Микукстс В.Я. Ангиопатия при системной склеродермии. *Український ревматологічний журнал*. 2017. № 1. С. 5-12.
10. Цимбаліста О.Л. Ураження бронхолегеневої системи при ревматичних захворюваннях у дітей. *Перинатология и педиатрия. Украина*. 2017. 3(71). С.120-126.
11. Боярчук О.Р. Сучасні погляди на діагностику гострої ревматичної лихоманки відповідно до перегляду критеріїв Джонса 2015 року. *Современная педиатрия*. 2016. № 8. С. 90-93.
12. Конева О.А., Овсянникова О.Б., Старовойтова М.Н. Изолированное снижение диффузионной способности легких при системной склеродермии без легочной артериальной гипертензии: длительное проспективное наблюдение. *Пульмонология*. 2016. Т 26, № 6. С. 708-714.
13. Петрова Д.В., Шойхет Я.Н., Берестов С.А., Дорохов Л.Е. Клинические особенности системной красной волчанки, протекающий с поражением органов дыхания. *Пульмонология*. 2012. № 3. С. 88-92.
14. Проценко Г.О., Стренко Ю.М. Легенева гіпертензія у хворих на системну склеродермію. *Український ревматологічний журнал*. 2016. № 4. С. 75-78.
15. Hadjicharalambous M.R., Lindsay M.A. Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and the emerging role of long non-coding RNAs. *Int. J. Mol. Sci*. 2020. 21. P. 1-19.
16. Разнатовська О.М., Мирончук Ю.В., Литвиненко О.С. Рівні імуноглобулінів Е, А, М, G у дітей, які хворі на вперше діагностований туберкульоз, на початку антимікобактеріальної терапії. *Запорожский медицинский журнал*. 2020. Т. 20, №1(106). С. 86-90.
17. Уштан С.В. Зміни імуноглобулінового спектра слини при травмах слинних залоз. *Вісник наукових досліджень*. 2015. 4. С. 23-32.
18. Бобровник С.А., Демченко М.А., Комисаренко С.В. Влияние полиреактивных иммуноглобулинов сыворотки крови на определение аффинности сывороточных антител. *Укр. біохім. журн*. 2010. Т. 82, №1. С. 62-69.

19. Шманько О.В. Предиктори розвитку ревматоїдного артриту у хворих із недиференційованим суглобовим синдромом. *Ліки України*. 2011. №1(5). С. 61-64.
20. Головач І.Ю. Діагностичне і прогностичне значення антицитрулінованих антитіл у ревматології. *Український ревматологічний журна.* 2016. №1(63). С. 25-32.
21. Нейко Є.М. Антитіла до циклічного цитрулінованого пепетиду та антитіла до модифікованого цитрулінованого віментину як сучасні діагностичні маркери раннього ревматоїдного артриту. *Журн. АМН України*. 2010. 16(1). С. 38-46.
22. Телекі Я.М. С-реактивний протеїн як біомаркер запального процесу при поєднанні хронічного обструктивного захворювання легень та хронічного панкреатиту. *Буковинський медичний вісник*. 2015. Т.19, №2(74). С. 197-199.
23. Фещенко Ю.І., Панасюкова О.Р., Рекалова О.М., Кадан Л.П., Чернушенко К.Ф., Матвієнко Ю.О. та ін. С-реактивний білок як показник системних та легеневих запальних процесів у хворих на хронічне обструктивне захворювання легень. *Астма та алергія*. 2011. № 1. С. 23-28.
24. Гецько Н.В., Криницька І.Я. Зміни вмісту С-реактивного протеїну та фактору некрозу пухлин- α у сироватці крові щурів різного віку за умови пасивного тютюнокуріння на тлі тривалого введення натрій глутамат. *Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біол.* 2020. № 1–2 (79). С. 54-62.
25. Sproston N.R., Ashworth J.J. Role of C-reactive protein at sites of inflammation and infection. *Front Immunol*. 2018. 9. P. 754.
26. Абдрахманова А. И., Амиров Н. Б., Ким З. Ф., Гайфуллина Р. Ф. С-реактивный белок при остром коронарном синдроме: содержание в плазме и прогностическое значение. *Вестник современной клинической медицины*. 2019. Т. 12, Вып. 1. С. 79-85.

27. Клименко М.О., Шелест М.О. С-реактивный білок як маркер перебігу хронічних запальних захворювань. *Медицина сьогодні і завтра*. 2013. Т.58, №1. С. 22-29.
28. Маслак Г.С., Костюк О.В., Мінченко Д.О., Бразалук О.З., Шевцова А.І., Мінченко О.Г. Сіальованість глікопротеїнів і рівень експресії нейрамінідази NEU1 та сіалілтрансферази ST6GAL1 у лімфоцитах хворих на еритремію. *Фізіол.журнал*. 2014. Т. 60, № 5. С. 14-22.
29. Нетроніна О.В. Вільні та зв'язані форми сіалових кислот у плазмі крові хворих на хронічний лімфолейкоз. *Visn. Dnìpropetr. Univ. Ser. Biol. Med.* 2015. 6(2). Р. 108–112.
30. Маслак Г.С., Костюк О.В., Кулініч А.О., Машейко І.В. Ступінь сіальованості й галактазильованості глікопротеїнів плазми крові за умов алкілюючої поліхіміотерапії хворих на хронічний лімфолейкоз. *Біологічні студії*. 2014. Т.7, № 2. С. 5-19.
31. Костюк О.В., Маслак А.С., Бразалук А.З. Влияние алкилирующей терапии на сиалированность мембран лимфоцитов при хроническом лимфолейкозе. *Лабораторная диагностика. Восточная Европа*. 2015. № 1 (13). С. 120-128.
32. Єрмолаєва М.В., Суярко В.І., Помазан Д.В., Синяченко Т.Ю. Ураження легень у хворих на мікроскопічний поліангіт. *Український пульмонологічний журнал*. 2018, № 3. С. 34-43.
33. Carapetis I.R., Beaton A., Cunningham M.W. Acute rheumatic fever and rheumatic heart disease. *Disease Primes*. 2016. Vol. 2. Р. 1-24.
34. Боярчук О.Р. Особливості субклінічного перебігу хронічної ревматичної хвороби серця. *Український ревматологічний журнал*. 2012. № 2. С. 28-32.
35. Савченко А.А., Гвоздев И.И., Борисов А.Г., Черданцев Д.В. Особенности фагоцитарной активности и состояния респираторного взрыва нейтрофилов крови у больных распространенным гнойным перитонитом в динамике послеоперационного периода. *Инфекция и иммунитет*. 2017. 7(1). С.51-60.

36. Ференц І.В., Бродяк І.В., Люта М.Я., Сибірна Н.О. Структурні та кількісні зміни вуглеводних детермінант глікопротеїнів еритроцитарних мембран при введенні агматину за умов експериментального цукрового діабету. *Цитологія і генетика*. 2013. Т.47(4). С.69-79.
37. Гаєвська В.Ю., Гаєвський В.Ю., Ковалишин О.А. Фагоцитарна активність нейтрофілів і моноцитів у хворих на системну склеродермію за умов ушкодження легень. *Фізіол. журн.* 2017. Т. 63, № 2. С. 80-85.
38. Легенчук О. В., Немирович Ю. П. Фагоцитарна активність нейтрофільних гранулоцитів ротової рідини у дітей з гострими формами лейкемії. *Медична наука України*. 2022. Vol. 18, № 1. С. 30-34.
39. Чугай О.О., Любінець Л.А. Фагоцитарна активність лейкоцитів у динаміці розвитку експериментальної пневмонії. *Актуальні проблеми транспортної медицини*. 2017. № 2 (48). С. 87-91.
40. Кудрявицкий А. И. Оценка киллерной бактерицидности нейтрофилов периферической крови здоровых доноров и больных в прямом визуальном методе. *Лаб. дело*. 1985. № 1. С. 45-47.
41. Запорожан В.М., Напханюк В.К., Горянова Н. О. Морфологія клітин крові лабораторних тварин і людини. Одеса: Одес.держ. мед. ун-т, 2002. 118 с.
42. Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство в 2 т. / под ред. С.С. Долгова, В.О. Меньшикова. М.: ГЕОТАРМедіа, 2012. 928 с.
43. Клиническая лабораторная диагностика: методы исследования. / И.А. Зупанец, С.В. Мисюрева, В.В. Прописнова и др.; Под ред. И.А. Зупанца. 3-е изд., перераб. и доп. Харьков: Изд-во НФаУ: Золотые страницы, 2005. 200 с.
44. Опімах С.Г. Оцінка порушень обміну кисню у хворих на хронічне обструктивне захворювання легень. *Астма та алергія*. 2013. № 4. С. 34-39.
45. Крюкова М.І. Статистичні методи в біологічних дослідженнях. Одеса, ОДЕКУ, 2012. 45 с.

46. Чурилін Р.Ю. Структура та особливості уражень легень у дітей та підлітків, хворих на системний червоний вовчак за даними променевих методів дослідження. *Український радіологічний журнал*. 2014. № 12. С. 243-248.
47. Попов М.М., Скляр А.І. Фагоцитарна активність моноцитів периферичної крові у хворих на HBV-інфекцію. *Клінічна та експериментальна патологія*. 2017. Т.16, №3 (61). С. 42-47.
48. Попов М.М., Скляр А.І. Фагоцитарна активність нейтрофілів у хворих на гострий гепатит В. *Інфекційні хвороби*. 2017. №3 (89). С. 45-51.
49. Татарко С.В. Порівняльна характеристика фагоцитарної активності нейтрофілів периферичної крові при різних за течією і етіологією видах запалення. *Вістник проблем біології і медицини*. 2014. Т.1, №4 (113). С. 203-207.
50. Кузнецова Е.И., Чепелева М.В., Камшилов Б.В. Показатели фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови у больных с развившейся нестабильностью эндопротеза в отдаленные сроки после имплантации крупных суставов. *Гений ортопедии*. 2011. № 4. С. 82-84.
51. Коленчукова О.А., Сарматова Н.И., Мошев А.В. Функциональная активность моноцитов крови в ответ на метициллинрезистентные штаммы *Staphylococcus aureus*. *Инфекция и иммунитет*. 2020 .10(3). С. 551-557.
52. Єлисеєва І. В., Ждамарова Л. А., Білозерський В. І., Колпак С. А. Вивчення динаміки фагоцитарної активності нейтрофілів після повторних щеплень лабораторних тварин експериментальним дифтеріїним бактеріальним антигенним препаратом. *УЖМБС*. 2020. 5(1). С. 50-55.

ДОДАТКИ

Додаток А. Охорона праці та безпека в надзвичайних ситуаціях

Вимоги безпеки перед початком роботи

При вході в приміщення лабораторії співробітники зобов'язані залишати верхній одяг, сумки у відведеному для цього місці.

Надягти спецодяг і перевірити наявність і справність засобів індивідуального захисту. Забороняється зберігати в кишенях шпильки, скляні та колючі предмети.

Переконайтеся в справності вентиляції, перевірте освітленість робочого місця. Приточно-витяжну вентиляцію у всіх приміщеннях лабораторії необхідно включати не пізніше, ніж за 5 хв до початку роботи.

Вимоги безпеки під час роботи

Робоче місце повинне утримуватися в чистоті і порядку.

При роботі необхідно застосовувати призначені засоби індивідуального захисту. Не носити взуття на високому підборі і ковзній підшві.

Вихід з лабораторії в спец. одягу заборонений.

Пити воду, зберігати і приймати їжу, користатися книгами, зберігати особисті речі дозволяється тільки в спеціально відведеному місці.

При експлуатації холодильників не можна допускати переміщення їх без участі фахівця.

Для запобігання перевтоми і псування зору при мікроскопіюванні і користуванні іншими оптичними приладами необхідно забезпечити правильне освітлення поля зору.

При експлуатації центрифуги *забороняється*:

- включати центрифугу без ротора, працювати без кришки і з відкритою кришкою центрифуги, ротор і кришка повинні бути ретельно закріплені,
- відкривати кришку ротора до повної зупинки центрифуги,
- несиметрично завантажувати ротор,
- працювати зі скляними пробірками на частоті обертання ротора понад 4000 об./хв для ЦЛН-2 і понад 2000 об./хв – для ОС-6М,

- застосовувати центрифугат із щільністю більшої, ніж зазначено в паспорті,
- застосовувати саморобні плавкі, нестандартні пробірки.

При експлуатації рН-метра перевіряти надійність заземлення блоку мережного живлення.

При експлуатації сушильної шафи: не доторкатися до корпусу при установці високих температур щоб уникнути опіку; чищення робити тільки при відключенні від мережі.

При роботі з їдкими і вогненебезпечними засобами:

- переливання, наповнення судин концентрованою кислотою чи лугом варто проводити піпеткою;
- концентровані розчини кислот повинні зберігатися в посудинах із притертою пробкою;
- луг повинен зберігатися в закритих посудинах, залитих парафіном.
- усі реактиви повинні мати чіткі написи.
- при розведенні концентрованої кислоти, щоб уникнути розбризкування, в кислоту варто додавати воду, а не навпаки.
- категорично забороняється спільне збереження легкозаймистих, вогне- і вибухонебезпечних речовин з кислотами і лугами.

Вимоги безпеки при митті лабораторного посуду

Скляний посуд миють різними способами: очищають механічно за допомогою йоржів, потім обробляють хімічним шляхом. Занурюють у мильний содовий розчин. Розчин повинний бути гарячим чи ж посуду кип'ятять у цьому миючому розчині.

Перед миттям посуду хромовою сумішшю її необхідно промити водою, щоб уникнути вибуху і викидання продукту реакції. При митті піпеток хромовою сумішшю, вона набирається в них за допомогою гумової груші.

Лабораторний посуд варто мити в гумових рукавичках.

В приміщенні лабораторії забороняється:

- залишати без догляду запалені спиртівки і включені електронагрівач;
- тримати голову під тягою при роботі у витяжній шафі;

- пробувати на смак і вдихати невідомі речовини;
- нахиляти голову над посудиною, у якій налита чи кипить рідина;
- зберігати і використовувати реактиви без етикеток;
- працювати без спеціального санітарного одягу.

Вимоги безпеки по закінченні роботи

Упорядкувати робоче місце. Після роботи з кров'ю брудний посуд замочують у дезінфікуючих розчинах.

Поверхню робочих столів обробляють дезінфікуючим розчином, руки обмивають 70 % етиловим спиртом, а потім миють у теплій воді з милом.

Черговий співробітник зобов'язаний: перевірити і закрити крани; відключити від мережі електроустаткування, за винятком устаткування, що по технічному регламенті повинне функціонувати цілодобово; видалити з приміщення виробничі і побутові відходи; закрити вікна, кватирки, двері; замкнути лабораторію, а ключ здати вчерговому.