

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА**

ННІ біології, хімії та біоресурсів

Кафедра біохімії та біотехнології

Біохімічні маркери гонартрозу

Дипломна робота

ОР «бакалавр»

Виконала: студентка IV курсу

спеціальність – біологія

Маковей Марина Іванівна

Керівник: д.б.н., професор Копильчук Г.П.

До захисту допущено:

Протокол засідання кафедри № ____

від „____” _____ 2023 р.

зав. кафедри _____ проф. Копильчук Г.П.

Чернівці–2023

Анотація

Метою роботи було проаналізувати рівень прояву запалення та структурно-функціональний стан остеоцитів на основі дослідження маркерів запалення та активності кісткової лужної фосфатази в сироватці крові хворих на гостру та хронічну форми гонартрозу.

Аналіз основних біохімічних маркерів запалення в сироватці крові хворих на гонартроз надає підстави стверджувати про наявність запального процесу в колінних суглобах хворих на гострий та хронічний гонартроз, який більше виражений у групі з гострим гонартрозом.

Підвищений рівень сіалових кислот у сироватці крові обох досліджуваних груп свідчить про деструкцією протеогліканів матриксу суглобового хряща.

На основі встановленого підвищення активності кісткової лужної фосфатази в сироватці крові I групи хворих на 30 %, а у II групи – на 15 %, можна стверджувати про посилену загибель остеобластів у ділянці травми у I групи хворих та ушкодження суглобів унаслідок процесів старіння у II групи хворих.

Отже, незалежно від форми (гостра чи хронічна) гонартроз пов'язаний із руйнуванням остеобластів більшою чи меншою мірою і виходом індикаторних ферментів у кров, зокрема лужної фосфатази, та розвитком запального процесу в колінному суглобі, про що свідчать біохімічні маркери запалення у сироватці крові.

Зміст

ВСТУП.....	4
РОЗДІЛ I Огляд літератури	6
1.1. Патогенез гонартрозу.....	6
1.2. Епідеміологія гонартрозу	9
1.3. Лабораторна діагностика гонартрозу	9
1.4. Класифікація гонартрозів та клінічна картина захворювання.....	10
РОЗДІЛ II Матеріали і методи	12
РОЗДІЛ III Результати та їх обговорення... ..	18
ВИСНОВКИ	25
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	26
ДОДАТКИ.....	30

Вступ

Нині хвороби опорно-рухового апарату посідають одне з чільних позицій у структурі загальної захворюваності населення України. Особливе місце в цьому списку посідає гонартроз, який найчастіше визначають як зміни, пов'язані з ушкодженням суглобового хряща, аномальним формуванням кістки, змінами синовіальної оболонки та патологічною синовіальною рідиною.

Нині відомо, що у розвитку гонартрозу первинним є репаративна реакція хондроцитів, яка виражається в посиленому синтезі основних типів колагену, зокрема II, IX, XI, VI, а також протеогліканів на клітинному рівні. Кінцевим результатом патологічного процесу при гонартрозі є дисбаланс між синтезом суглобового хряща і пошкодженням, яке призводить до його деструкції. Кожен процес, пов'язаний із деградацією хряща, впливає на виникнення і прогресування гонартрозу.

Гонартроз діагностується на основі клінічних і рентгенологічних досліджень. Велике значення мають також магнітно-резонансна томографія, сцинтиграфія кісток і артроскопія. Проте майбутнє за визначенням маркерів продуктів деструкції хряща в рідинах організму [1].

Розвиток гонартрозу супроводжується запальним процесом; дедалі частіше згадується роль активних форм кисню. Організм захищений від окислювального пошкодження антиоксидантним бар'єром, фундаментальну роль у якому відіграють антиоксидантні ферменти, такі як супероксиддисмутаза (SOD), каталаза (CAT) і ферменти перетворення глутатіону, зокрема глутатіонпероксидаза (GPx) [2].

Актуальність дослідження гонартрозу зумовлена його надзвичайно високою поширеністю серед населення всіх вікових і соціальних груп і наслідками, до яких призводить це захворювання, зокрема обмеження рухливості суглобів, втрата працездатності та навіть інвалідність.

Мета роботи – проаналізувати рівень прояву запалення та структурно-функціональний стан остеоцитів на основі дослідження маркерів запалення та активності кісткової лужної фосфатази в сироватці крові хворих на гостру та хронічну форми гонартрозу.

Розділ I

Огляд літератури

1.1. Патогенез гонартрозу.

Гонартроз – це артроз колінного суглоба. Його ще називають остеоартроз, остеоартрит. Як бачимо – це гетерогенна група захворювань різної етіології з подібними біологічними, морфологічними та клінічними проявами та результатами, в основі яких лежить ураження всіх компонентів колінного суглоба: хряща, субхондральної кістки, менісків, синовіальної оболонки, зв'язок, капсули, а також периартикулярних м'язів [3-4].

Фундаментальна причина розвитку остеоартрозу полягає у невідповідності між механічним осьовим навантаженням на нижню кінцівку і здатністю структурних елементів колінного суглоба протидіяти йому. Біологічні властивості тканин колінного суглоба можуть бути несприятливими генетично або змінюватися за дії екзогенних або ендогенних несприятливих чинників. Результати популяційних досліджень [5] дали можливість встановити фактори, асоційовані з розвитком і прогресуванням гонартрозу, серед яких виділяють наступні: вік, ожиріння, зміну осі нижньої кінцівки або дисплазію бедрено-надколінного з'єднання, зменшення об'єму та сили м'язів нижньої кінцівки, травми, запалення в синовіальній оболонці тощо.

Згідно з сучасними уявленнями, гонартроз являє собою результат взаємодії вікових, гормональних, запальних, імунологічних, генетичних і факторів середовища, які призводять до клітинного стресу та деградації екстрацелюлярного матриксу, що розвивається на тлі макро- та мікро- ушкоджень.

Отже, в основі патогенезу гонартрозу лежить перевага процесів катаболізму над процесами анаболізму, зокрема, неспроможність репаративної відповіді, в тому числі активації шляхів імунної системи.

Патологічні процеси на молекулярному рівні протікають одночасно у хрящовій тканині, субхондральній кістці, менісках і синовіальній оболонці, що призводить до деградації хряща, ремоделювання кістки, утворення остеофітів,

запалення, набряків. Надалі в патологічний процес втягуються капсульно-зв'язкові структури і м'язи, які оточують суглоб.

Для хондроцитів при гонартрозі характерна гіперекспресія ЦОГ-2, що являє собою ізоформу циклооксигенази, необхідної для синтезу простагландинів, а також індукованої форми синтази оксиду азоту, який здійснює токсичний вплив на хрящ. За дії ІЛ-1 хондроцити синтезують матриксні протеїнази, які руйнують колаген і протеоглікани хряща. Синтез анаболічних медіаторів хондроцитів, зокрема інсуліноподібного фактора росту, трансформуючого фактора росту β , за умов остеоартрозу порушений.

Сполучнотканинний матрикс, який забезпечує унікальні амортизаційні властивості хряща, поряд із хондроцитами становить основу суглобового хряща. До складу сполучнотканинного матриксу входять молекули колагену II типу та агрекану – протеоглікану, який складається з білкового ядра та периферійних ланцюгів хондроїтинсульфату, кератансульфату та гіалуронової кислоти. Ремодельовання матриксу контролюють хондроцити. Однак, за умов остеоартрозу їхня катаболічна активність перевищує анаболічну, що призводить до негативних змін якості хрящового матриксу. Заплення при гонартрозі має важливе значення в розвитку та прогресії цього захворювання, хоча воно і не таке інтенсивне, як при артриті. Тим не менше, при цьому наявні прозапальні медіатори, білки гострої фази та моноклеарна інфільтрація. У сироватці крові та синовіальній рідині відмічається дещо збільшена концентрація низки прозапальних цитокінів: ФНП-альфа, ІЛ-1, ІЛ-6, ІЛ-17, ІЛ-22 на тлі зниження протизапальних цитокінів, ІЛ-10, розвиток адаптивних імунних клітинних реакцій в хондроцитах.

При гістологічних дослідженнях у синовіальній оболонці визначаються зміни, характерні для хронічного запалення потовщення, інфільтрації моноклеарами, різного ступеня фібрози.

Механічна здатність суглобового хряща визначається правильною структурною організацією хрящового матриксу, тобто концентрацією та взаємодією води та макромолекул, зокрема колагену, протеогліканів і неколагенових

білків, що в свою чергу залежить від нормального функціонування хондроцитів. За дії вікового чи інших факторів функціональна активність хондроцитів, зокрема їхня здатність синтезувати макромолекули матриксу, а також відповідати на стимулюючу дію факторів росту, знижується, внаслідок чого порушується нормальне співвідношення компонентів суглобового хряща.

До основних прозапальних цитокінів і медіаторів запалення належать інтерлейкін 1 (ІЛ-1), фактор некрозу пухлин α (ФНП- α), ІЛ- 6, 17, 18, оксид азоту (NO), простагландини (ПГ) та лейкотрієни (ЛТ). ІЛ-1 β індукує експресію металопротейнази (ММР) та ейкозаноїдів, що мають здатність викликати деградацію матриксних макромолекул та інгібувати синтез колагену та протеогліканів. ФНП- α може активуватися низкою агрекеназ, зокрема ADAM-17, мінімальна кількість яких визначається в нормальному суглобному хрящі, та значно зростає під час остеоартрози. NO активує ММР, індукує синтез ЦОГ-2, інгібує синтез колагену та протеогліканів, а також антагоніста рецептора ІЛ-1.

Підтримання нормальної структури кістки забезпечується збереженням балансу між її формуванням та резорбцією. Ключову роль у регуляції метаболізму остеоцитів відіграє тріада остеопротегерин/рецептор, активуючий фактор транскрипції NF κ B/ліганд цього рецептора (OPG/RANK/RANKL). Важливим фактором функціонування даної тріади є рівень статевих гормонів. Гормональна недостатність призводить до підвищення експресії RANKL стромальними клітинами. RANKL, зв'язуючись з RANK, що експресується на попередниках остеобластів, стимулює їх диференціацію та функціональну активність зрілих клітин. Водночас знижується експресія антагоніста RANK – OPG стромальними клітинами та остеобластами. Як наслідок сповільнюється процес утворення кістки – сповільнюється проліферація остеобластів. Відбувається неповноцінна мінералізація кістки та зниження її механічних спроможностей.

У патогенезі гонартрозу суттєва роль належить статичним перевантаженням. При надлишковому навантаженні активуються механорецептори у хондроцитах і остеоцитах, що призводить до активації останніх і стимулює

продукування протейназ і запальних цитокінів і, як наслідок, прогресування дегенеративних процесів.

Важлива роль в патогенезі гонартрозу належить ожирінню, яке з одного боку є фактором механічного перевантаження, а з іншого – жирова тканина може продукувати багато різних біологічно активних речовин з різноманітними негативними ефектами. Наприклад, адипокіни, такі як лептин, резистин, вісфатин тощо можуть посилювати катаболічні процеси в хрящі та підвищувати синтез прозапальних медіаторів у тканинах суглоба [5].

1.2. Епідеміологія гонартрозу.

Згідно з даними епідеміологічних досліджень останніх років частота артрозу колінного суглоба серед дорослого населення світу коливається в широких межах: від 2,0 до 42,4 % – це лише за клінічними критеріями, від 16,3 до 33,0 % – за рентгенологічними і від 1,5 до 15,9 % – згідно з комбінацією клінічних і рентгенологічних [6-8].

81 млн. хворих зареєстровано у 5 розвинутих країнах – Німеччині, Італії, Великобританії, Іспанії і біля 85 млн. – в Бразилії, Індії, Китаї [6].

Хоча у старших вікових групах як частота зустріваності гонартрозу, так і ступінь його вираженості зростає, все ж більше половини всіх пацієнтів належать до вікової групи, молодше 65 років. Водночас незалежно від віку у жінок це захворювання розвивається в 1,2-1,7 рази частіше, ніж у чоловіків. Прогресування захворювання впродовж кількох років або кількох десятиліть веде до інвалідності – хворі з деформуючим артрозом становлять близько 1/3 всіх осіб зі стійкою втратою працездатності внаслідок захворювання суглобів [9-12].

1.3. Лабораторна діагностика гонартрозу.

Нині відсутній «золотий стандарт» лабораторної діагностики гонартрозу, що пов'язано з надто низькою концентрацією біохімічних маркерів у крові та сечі, а також нашаруванням патологічних процесів у інших суглобах.

Рекомендують проведення загального аналізу крові та сечі, біохімічного аналізу крові: визначення креатиніну, глюкози, загального білірубіну, амінотрансфераз, загального холестеролу, ЛВГ, ЛНГ, дослідження синовіальної рідини, ревматоїдний фактор, концентрацію сечової кислоти, ШОЕ, С-реактивний білок [13-14].

1.4. Класифікація гонартрозів та клінічна картина захворювання.

Класифікація за етіологією:

Первинний гонартроз (ідіопатичний) – виникає без будь-яких явних зовнішніх причин. Вторинний гонартроз – в анамнезі є посилення на один або кілька факторів, що ведуть до розвитку захворювання. Найчастіше – це фактори травматичного генезу, рідше зустрічаються запальні фактори, наприклад, гострі і хронічні артрити будь-якої етіології, гемартрози та інші патології, які порушують нормальний гомеостаз синовіального середовища суглоба [15].

Існує ще клініко-рентгенологічна класифікація: I стадія, коли під час рентгенографії визначається незначне звуження суглобової щілини порівняно зі здоровим суглобом і легкий субхондральний остеосклероз. Клінічно захворювання проявляється болем, який виникає після або під час ходьби по сходах, який поступово заспокоюється, деколи біль може з'являтися після тривалого перебування на ногах, рухи в суглобі, як правило, не обмежені; II стадія – звуження рентгенологічної суглобової щілини в 2-3 рази перевищує норму, субхондральний склероз стає більш виражений, по краях суглобової щілини з'являються остеофіти. Клінічно – помірний больовий синдром, розвивається обмеження рухів у суглобі, гіпотрофія м'язів, накульгування, легка фронтальна деформація осі кінцівки. III стадія – стійкі згинальні-розгинальні контрактири, різко виражені болі та накульгування, нестабільність суглоба та атрофія м'язів бедра. Під час рентгенографії виявляється значна деформація і склерозування суглобових поверхонь епіфізів із ділянками субхондрального некрозу і локального остеопорозу, суглобова щілина відсутня, обширні кісткові розростання і вільні суглобові тіла.

Класифікація Kellgren & Lawrence – рентгенологічна: 0 – відсутні зміни; I – сумнівна – незначні остеофіти; II – мінімальна – чітко виражені поодинокі остеофіти і мінімально звужені суглобові щілини; III – помірна – помірне звуження суглобової щілини і множинні остеофіти; IV – важка – виражене звуження суглобової щілини з субхондральним склерозом, грубі остеофіти [16].

Провідним клінічним симптомом деформуючого артрозу колінного суглоба є біль, який посилюється під час ходьби, на холоді або в сиру погоду. На ранніх стадіях біль минає після відпочинку. Прямої кореляції між інтенсивністю больового синдрому та стадією захворювання і ступенем морфологічних змін у суглобі не спостерігається. Поступово біль набуває постійного характеру. По мірі прогресування патологічного процесу з'являється обмеження амплітуди руху (контрактура): на початку згинання, а потім розгинання, крепітація, деформація суглоба і збільшення в розмірах, періодичні синовіти.

До того ж гонартроз має хронічний прогресуючий перебіг та призводить до втрати працездатності й інавіть нвалідності значного відсотка хворих [17]. Останніми роками непрацездатність, як наслідок остеоартрозу, збільшилася в 3–5 разів. Особливо страждають від остеоартрозу жінки. Хронічний больовий синдром, обмеження функцій суглобів значно знижують якість життя хворих [18].

Розділ II

Матеріали та методи

Для дослідження обрали 40 хворих з діагнозом «гонартроз». Серед обраних хворих виділили групу I, які мали симптоми гострого артрозу і вік до 50 років та II група віком після 65 років з хронічним гонартрозом.

Визначення вмісту С-реактивного білка.

С-реактивний білок відносять до найчутливіших білків гострої фази – маркерів запалення, некрозу, травм. Синтез даного протеїну здійснюється в гепатоцитах. Надзвичайно швидко реагуючий маркер запалення, оскільки зростання його кількості в сироватці крові відбувається вже в перші години розвитку запального процесу (через 18-24 години) і навіть передуює появі клінічних симптомів [19-20].

С-реактивний білок стимулює імунну систему. Слід зазначити, що в сироватці крові здорової людини він не виявляється. При наявності запалення концентрація цього біохімічного маркера може стрімко підвищуватися в 1000 разів, а після зникнення запалення стрімко знижується. Підвищення рівня С-реактивного білка відбувається раніше, ніж підвищення ШОЕ. Допустимі величини – 4,5 мг / л [21].

Для визначення С-реактивного білка використовували метод імуноферментного аналізу (ІФА, enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA).

В основі ІФА лежить специфічна реакція антиген-антитіло.

Процедура аналізу. Метод базується на твердофазному імунометричному аналізі по типу сендвіча. При додаванні в лунку з моноклональними антитілами до С-реактивного білка розведеної проби формується комплекс С-реактивного білка з антитілами з фіксацією його на мембрані. Далі додають кон'югат частинок золота з антитілами, який теж зв'язується з С-реактивним білком. Таким чином утворюється щось подібне на сендвіч. Незв'язаний

кон'югат видаляють шляхом промивання мембрани спеціальним розчином. Поява червоно-коричневого кольору мембрани свідчить про підвищений рівень С-реактивного білка. Кількість С-реактивного білка прямо пропорційна до інтенсивності цього забарвлення [22].

Швидкість осідання еритроцитів (ШОЕ) як показник запалення.

Стабілізована антикоагулянтном кров при стоянні розділяється на плазму, яка є прозора, формуючи верхній шар і форменні елементи крові на дні пробірки. Висота шару, який формує плазма, – це і буде ШОЕ, спосіб вираження якого в мм / год.

Розділення крові на шар плазми та формених елементів пояснюється вищою питомою масою еритроцитів та силою тяжіння, яка опускає їх на дно.

Оскільки питома маса еритроцитів більша, ніж питома маса плазми крові, то еритроцити з часом осідають на дно пробірки. Швидкість їх осідання залежить в основному від ступеня їх агрегації. Агрегація формених елементів крові визначається їх електричними властивостями та білковим складом плазми крові. За фізіологічних умов еритроцити електронегативні, вони відштовхуються один від одного, а тому не агрегують. В умовах запалення, коли з'являються білки гострої фази, які адсорбуються на поверхні еритроцитів, пришвидшується їх осідання.

Таким чином зростання концентрації гострофазних білків, зокрема С-реактивного білка, гаптоглобіну, альфа-1-антитрипсину, свідчить про розвиток гострого запалення і підвищує показник ШОЕ. Термін зростання ШОЕ при гострому запальному процесі спостерігається впродовж доби від підвищення температури.

Хронічне запалення теж супроводжується зростанням ШОЕ внаслідок підвищення вмісту фібриногену та імуноглобулінів у крові. Цей показник, як правило, дещо більший у жінок порівняно з чоловіками. При збільшенні концентрації альбумінів ШОЕ знижується.

Для визначення ШОЕ використовують метод Панченкова або Вестергрена.

Міжнародним методом є метод Вестергрена, який відмінний від методу Панченкова за використовуваними пробірками, калібруванням шкали результатів, а основне – має вищу чутливість.

Матеріалом для дослідження слугує венозна кров з 3,8% цитратом натрію (4:1) або з фізіологічним розчином з таким же розведенням. Аналіз здійснюється у пробірках Вестергрена [23].

Референсні величини: у жінок до 50 років – 0-20 мм / год, у чоловіків – 0 -15 мм / год; після 50 років: у жінок – 0 -30 мм / год, у чоловіків – 0-20 мм / год. [24].

Визначення лужнофосфатазної активності.

Лужна фосфатаза (КФ 3.1.3.1.) належить до класу гідролаз, каталізує реакції дефосфорилювання багатьох молекул. За структурою – це гомомерний димер з молекулярною масою 86 кДа. Кожен мономер містить 5 залишків цистеїну, 2 атоми цинку, 1 атом магнію, які є критичними для прояву його каталітичної активності. Ці кофактори входять до складу активного центру фермента. Максимальна активність даного ферменту проявляється в лужному середовищі (рН 8,6–10,1). Загальний вигляд реакції, яка каталізується даним ензимом наступний: $\text{монофосфат} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{спирт} + \text{фосфат}$.

Лужна фосфатаза наявна практично в усіх тканинах організму, проте найбільша кількість цього ензиму в мембранах клітин печінки та остеобластів. Відомо, що даний фермент впливає на відкладання кальцію в кістковій тканині. А тому основним джерелом лужної фосфатази в сироватці крові є печінка та кістки.

Визначення активності лужної фосфатази в сироватці крові в клініці використовують як маркер пошкодження печінки чи кісток. Рівень активності цього фермента залежить від таких факторів як стать, вік тощо. Зростає активність цього ензиму під час вагітності. Проте в основному підвищений рівень лужної фосфатази в сироватці крові пов'язують із патологією печінки, жовчового міхура та кісток.

Референсні значення загальної активності лужної фосфатази – 30-85 МО/мл (СІ: 42–128 ОД/л).

Відхилення від референсних величин у бік зростання спостерігається при пошкодженні скелетних м'язів і холестазі. Гострі захворювання печінки супроводжуються підвищенням активності лужної фосфатази ще до того, як зросте рівень білірубіну в сироватці крові [25-28].

Існує кісткова ізоформа лужної фосфатази, яка синтезується в остеобластах і вивільняється у кров при руйнуванні кістки.

Даний фермент являє собою глікопротеїн і є мембранним ферментом остеобластів. Кісткова ізоформа у кров вивільняється остеобластами під час утворення кістки. Рівень кісткової лужної фосфатази у сироватці крові відображає активність остеобластів у процесі первинного формування кістки або при їх стимуляції під час руйнування кістки, необхідної для її відновлення [29].

В основі методу визначення активності лужної фосфатази лежить здатність даного ензиму гідролізувати фенілфосфат. Продуктом реакції є фенол. Комплекс фенолу з 4-амінофеназоном дає червоне забарвлення. Активність ензиму прямо пропорційна до приросту оптичної густини досліджуваної проби.

Метод електрофорезу дає можливість розділити загальну лужну фосфатазу на ізоформи і визначити кістковий ізофермент. Враховуючи термолабільність кісткового ізоензиму, можна розділити печінкову та кісткову ізоформи методом визначення теплової стабільності. Референсні величини: 0,2-0,6 ммоль/год*л [30].

Визначення вмісту сіалових кислот у сироватці крові.

Сіалові кислоти – це ацильні похідні нейрамінової кислоти, наявні практично у всіх тканинах і рідинах організму тварин, людини і деяких мікроорганізмів.

Сіалові кислоти являють собою компонент глікокон'югатів глікокаліксу – це глікопротеїни, гліколіпіди, протеоглікани, вуглеводні компоненти яких містять переважно кінцеві сіалові кислоти, як правило – це N-ацетилнейрамінова кислота (Schnaar, 2014).

Сіалові кислоти, які входять до складу протеогліканів, задіяні в процесах адгезії, розпізнавання речовин, є визначальними щодо тривалості циркуляції у крові окремих гормонів та протеїнів, забезпечують зв'язування гормонів зі своїми рецепторами. (Varki and Gagneux, 2012). Сіалові кислоти сприяють виконанню функцій протеогліканами щодо захисту слизових оболонок від ушкоджень різної природи.

Загальний вміст сіалових кислот у сироватці крові зростає при запальних процесах.

У нормі концентрація вільних сіалових кислот у плазмі крові мінімальна [31-32].

Вміст сіалових кислот у сироватці крові визначали методом Гесса за реакцією з оцтово-сірчанним реактивом з використанням колориметра.

Принцип методу. Сіалові кислоти виділяються внаслідок гідролізу безбілкового фільтрату сироватки крові. Сіалові кислоти при взаємодії з оцтовою та сульфатною кислотами на киплячій водяній бані утворюють сполуки, буророжевого або червоно фіолетового кольору. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна до концентрації сіалових кислот.

Хід визначення. У центрифужну пробірку додають 1 мл сироватки крові, 1 мл 10% розчину ТХО. Після 5 хвилинного нагрівання та подальшого охолодження центрифугують 5 хвилин при 1000-2000 од / хв. Для відокремлення білкового осаду.

Змішуючи аліквоту супернатанту з оцтово-сірчанокислим реактивом, її знову півгодини нагрівають в киплячій водяній бані, внаслідок чого розвивається червоно-фіолетове забарвлення. Колориметрування проводять при зеленому світлофільтрі в кюветі з товщиною шару 10 мм. Контролем слугує 5%

розчин сульфатної кислоти в крижаній оцтовій кислоті. Референсні значення – 2-2,3 ммоль/л. [33].

Розділ III

Результати та їх обговорення

Гонартроз є різновидом артрозів, пов'язаних із запаленням суглобів. Він характеризується дегенерацією усіх структур суглоба. Найчастіше процеси деструкції торкаються колінних та кульшових суглобів, тобто тих, які підлягають найбільшим навантаженням.

Під час артрозу суглобовий хрящ ущільнюється внаслідок зменшення у ньому кількості рідини. У суглобі з'являються сольові утворення, які зумовлюють сильний біль під час ходьби. Причиною розвитку артрозу може стати перевантаженість суглобів. До груп ризику в першу чергу належать люди похилого віку, спортсмени, люди, чия діяльність пов'язана з перенесенням тягарів або постійного стояння, а також люди із ожирінням [34].

Розрізняють гонартроз первинний, пов'язаний із вродженими дефектами або генетичними змінами; та вторинний, або травматичний, який розвивається внаслідок травм, запальних процесів, оперативного втручання та природного старіння.

За ступенем розвитку гонартроз поділяється на окремі фази: I – початкова фаза, коли на рентгені, МРТ, УЗД виявляють тільки окремі остеофіти. II – це, коли з'являються виражені звуження суглобової щілини поряд із вогнищами дегенерації у хрящовій тканині. III стадія – це деформація суглоба та поява великої кількості остеофітів. IV – характеризується повною деградацією хряща та деформацією кісток [35].

Як показано [36] існує пряма залежність між величинами ШОЕ, С-реактивного білка, прозапальних цитокінів та інтенсивністю больових відчуттів, а також іншими показниками, властивими для запальних процесів у суглобах. Це надає підстави вважати вищевказані біохімічні маркери як критерії глибини розвитку запального процесу в суглобах при остеоартрозі, зокрема, при гонартрозі.

Оскільки артрози супроводжуються запаленням суглобів, то визначення концентрації С-реактивного білка гострої фази запалення буде досить доцільним для лабораторної діагностики гонартрозу. Результати аналізу даного показника запалення подані на рис.1.

Рис. 1. Концентрація С-реактивного білка в сироватці крові хворих на гонартроз

Примітка (тут і надалі):

I група – пацієнти з симптомами гострого артрозу і віком до-50 років

II група – пацієнти з хронічним гонартрозом і віком після 65 років.

З рисунка 1 видно, що у I групи хворих вміст С-реактивного білка в сироватці крові приблизно в 4,4 рази перевищує референсні значення, тоді як у II групи це перевищення становить лише 2,7 рази.

Очевидно, що у I групи пацієнтів, яка сформована з людей молодшого віку порівняно з II групою, спостерігається загострення гонартрозу, яке супроводжується розвитком гострої фази запалення, викликаного, можливо, бактеріальною інфекцією, яка приєдналася, або розвитком гострого запалення внаслідок травми колінного суглоба тощо.

Водночас II група – це люди старшого віку, у яких відбувається поступове руйнування суглобів внаслідок зношування та існує хронічне запалення, яке періодично заліковується, а потім знову з'являються болі та симптоми хронічного запалення

Рис. 2. Швидкість осідання еритроцитів у хворих на гонартроз

Ще одним підтвердженням висловленого припущення щодо розвитку запалення в досліджуваних групах хворих є проаналізована нами величина

ШОЕ із загального аналізу крові (рис.2), який засвідчує аналогічну тенденцію. Величина ШОЕ у I групи хворих у 2,4 рази перевищує референсні значення, тоді як у I групи – лише у 1,6 рази. Слід зазначити, що С-реактивний білок є більш швидко реагуючим показником порівняно із величиною ШОЕ. Підвищення рівня С-реактивного білка відбувається раніше, ніж підвищення ШОЕ при розвитку запалення.

Саме налипання гострофазних білків на поверхні еритроцитів і спричиняє їх посилену агрегацію, підвищуючи тим самим швидкість осідання еритроцитів.

Ще одним біохімічним маркером запалення вважають сіалові кислоти.

Сіалові кислоти являють собою сполуки з яскраво вираженими кислотними властивостями. Вони наявні практично у всіх тканинах і біологічних рідинах організму людини. Ці сполуки забезпечують в'язкість секретів слинних та інших залоз, що робить їх стійкими до дії вірусів та інших впливів біологічного та небіологічного походження.

У крові сіалових кислот дуже мало. Вони циркулюють у комплексі з білками та гормонами. Лише незначний відсоток їх перебуває у вільному вигляді. Окрім того, сіалові кислоти задіяні у знешкодженні вірусів, бактерій, мобілізують імунну систему на подолання запальних процесів.

Відомо, що аналіз на сіалові кислоти призначають за умови болю в одному або кількох суглобах або обмеження рухливості суглобів тощо. Високий рівень сіалових кислот у сироватці крові може свідчити про деструктивні зміни у сполучній тканині, поліартрит, ревматоїдний артрит, активні запальні процеси тощо [37].

З огляду на все сказане вище можна зрозуміти доцільність визначення вмісту сіалових кислот у сироватці крові при гонартрозі. Гонартроз супроводжується болями в колінних суглобах, обмеженнями рухів і запальним процесом, вираженим більшою чи меншою мірою.

Результати аналізу на вміст сіалових кислот у сироватці крові досліджуваних нами груп хворих на гонартроз подані на рисунку 3.

Результати аналізу засвідчують підвищений рівень сіалових кислот в обох досліджуваних групах та відсутність відмінностей між показниками рівня сіалових кислот у них між собою.

Рис. 3. Вміст сіалових кислот у сироватці крові хворих на гонартроз

Остеоартроз супроводжується деструкцією протеогліканів матриксу суглобового хряща, які забезпечують міцність та еластичність сполучної тканини. При руйнуванні хряща і протеогліканів, до складу яких входять сіалові кислоти, останні надходять в кров, де їх можна визначити кількісно.

У даному випадку спостерігаємо відсутність відмінностей щодо вмісту сіалових кислот у сироватці крові пацієнтів з гострим гонартрозом та пацієнтів старшого віку з хронічним гонартрозом.

Можливо, у пацієнтів обох досліджуваних груп гонартроз перебуває на II ступені розвитку, коли з'являються виражені звуження суглобової щілини поряд із вогнищами дегенерації у хрящовій тканині, тобто ступінь дегенерації хряща перебуває на середній стадії, незважаючи на вік пацієнтів.

Пацієнти старшої вікової групи хворіють на гонартроз тривалий час, проте вони постійно підтримують свій стан постійним підліковуванням запалення, яке періодично розвивається. Щодо пацієнтів I групи, то вони отримали гострий гонартроз через травми чи інфекцію і також їхній хрящ ще не досяг таких стадій дегенерації, коли внаслідок посиленого руйнування протеогліканів сіалові кислоти виходять у кров. Окрім того, клініцисти вважають, що посилений вихід сіалових кислот в кров свідчить про розвиток артритів, тобто, коли ураження досягло різних суглобів, і процес зайшов надто далеко. У даному випадку такого поки що не відбулося.

Однак, підвищений рівень сіалових кислот в сироватці крові обох дослідних груп пацієнтів свідчить про наявність запальних процесів у їх колінних суглобах.

Таким чином, проаналізувавши основні біохімічні маркери запалення в сироватці крові хворих на гонартроз, можна стверджувати про наявність запального процесу в колінних суглобах хворих на гострий та хронічний гонартроз, який більше виражений у групі з гострим гонартрозом.

Ще одним маркером остеоартрозу є індикаторний фермент – кісткова ізоформа лужної фосфатази, яка вивільняється в кров при дегенеративних змінах хряща. Рівень лужної фосфатази в сироватці крові напряму залежить від ступеня резорбції хрящової та кісткової тканини, вона відображає функціональний стан остеобластів [38].

На рисунку 4 подані результати аналізу активності кісткової ізоформи лужної фосфатази в сироватці крові хворих на гонартроз. Встановлено підвищений рівень активності лужної фосфатази в сироватці крові хворих обох дослідних груп. У I групи хворих активність лужної фосфатази перевищує референсні значення на 30 %, а у II групи – на 15 %. Таким чином можна стверджувати про посилену загибель остеобластів у ділянці травми, оскільки гострий гонартроз у I групи хворих в основному був викликаний травмуванням колінного суглоба.

У II групи хворих загибель остеобластів і вихід фермента в плазму крові, очевидно, пов'язані зі зношенням суглобів унаслідок процесів старіння.

Рис. 4. Активність кісткової ЛФ у сироватці крові хворих на гонартроз

Отже, незалежно від форми (гостра чи хронічна) гонартроз пов'язаний із руйнуванням остеобластів більшою чи меншою мірою і виходом індикаторних ферментів у кров, зокрема лужної фосфатази, та розвитком запального процесу у колінному суглобі, про що свідчать біохімічні маркери запалення у сироватці крові.

Висновки

1. Аналіз основних біохімічних маркерів запалення в сироватці крові хворих на гонартроз, надає підстави стверджувати про наявність запального процесу в колінних суглобах хворих на гострий та хронічний гонартроз, який більше виражений у групі з гострим гонартрозом.
2. Підвищений рівень сіалових кислот у сироватці крові обох досліджуваних груп свідчить про деструкцією протеогліканів матриксу суглобового хряща.
3. На основі встановленого підвищення активності кісткової лужної фосфатази в сироватці крові I групи хворих на 30 %, а у II групи – на 15 %, можна стверджувати про посилену загибель остеобластів у ділянці травми у I групи хворих та ушкодження суглобів унаслідок процесів старіння у II групи хворих.

Отже, незалежно від форми (гостра чи хронічна) гонартроз пов'язаний із руйнуванням остеобластів більшою чи меншою мірою і виходом індикаторних ферментів у кров, зокрема лужної фосфатази, та розвитком запального процесу в колінному суглобі, про що свідчать біохімічні маркери запалення у сироватці крові.