

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
MEDICINOS AKADEMIJA
MEDICINOS FAKULTETAS
LABORATORINĖS MEDICINOS BIOLOGIJA
ANTROS PAKOPOS STUDIJS

Viktorija Meilaitė

REUMATOIDINIO ARTRITO IMUNOLOGINĖS DIAGNOSTIKOS YPATUMAI

Baigiamasis magistro darbas

Darbo vadovas
Dr. Viltė Marija Gintauskienė

Kaunas, 2017 m.

TURINYS

TITULINIS.....	1
TURINYS.....	2
SANTRAUKA	4
SUMMARY	6
PADĖKA.....	8
INTERESŲ KONFLIKTAS	8
ETIKOS KOMITETO LEIDIMAS.....	8
SANTRUMPOS	9
ĮVADAS.....	10
DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI.....	12
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	13
1.1 Reumatoidinio artrito apibrėžimas, ligos paplitimas.....	13
1.2 Etiologija	13
1.2.1 Genetiniai faktoriai	13
1.2.2 Aplinkos faktoriai	14
1.2.3 Žalingi įpročiai ir kiti veiksniai.....	14
1.3 Patogenezė.....	15
1.4 Klinikiniai reumatoidinio artrito simptomai.....	17
1.5 Klasifikacija.....	17
1.6 Reumatoidinio artrito diagnostika	19
1.6.1 Reumatoidinis faktorius (RF)	19
1.6.2 Antikūnai prieš ciklinį citrulinizuotą peptidą (anti-CCP).....	19
1.6.3 Uždegiminiai žymenys.....	20
1.6.4 Antikūnai prieš branduolio antigenus (ANA).....	20
1.6.5 Anti-Ro	23
1.6.6 Naujausi RA žymenys.....	23
1.6.6.1 Anti-RA33	24
1.6.6.2 Anti-Savoie (anti-Sa).....	24
1.6.6.3 Anti-CarP	24

1.6.6.4 Anti-CEP1	24
2. TYRIMO METODIKA IR METODAI	25
2.1 Tiriamieji	25
2.2 Mėginių paruošimas tyrimams	26
2.3 Tyrimo metodai	27
2.3.1 Anti-CCP kraujo serume nustatymas.....	27
2.3.2 C-reaktyvaus baltymo (CRB) ir reumatoidinio faktoriaus (RF) kraujo serume nustatymas	28
2.3.3 Eritrocitų nusėdimo greičio (ENG) nustatymas.....	29
2.3.4 Antikūnų prieš ląstelių branduolių antigenus (ANA) serume nustatymas.....	29
2.3.5 Antikūnų prieš dvispiralę DNR (anti-dsDNR) nustatymas kraujo serume.....	31
2.3.6 Statistinė analizė	33
3. REZULTATAI	34
3.1 Tiriamųjų, sergančių reumatologinėmis ligomis, pasiskirstymas pagal lytį ir amžių	34
3.2 Laboratorinių kraujo tyrimų rezultatų sąsajos su sergančiųjų reumatologinėmis ligomis lytimi ir amžiumi	36
3.3 Laboratorinių kraujo tyrimų rezultatų tarpusavio ryšiai, sergantiesiems reumatologinėmis ligomis, priklausomai nuo lyties ir amžiaus	38
3.4 Kitų kliniškai reikšmingų veiksnių vertinimas sergantiesiems reumatologinėmis ligomis	39
4. REZULTATŲ APTARIMAS	42
5. IŠVADOS.....	45
6. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS.....	46
7. LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	47

SANTRAUKA

Viktorijos Meilaitės magistro baigiamasis darbas „Reumatoidinio artrito imunologinės diagnostikos ypatumai“. Darbo vadovė dr. Viltė Marija Gintauskienė.

Tyrimo tikslas. Išanalizuoti reumatoidinio artrito imunologinės diagnostikos ypatumus

Tyrimo uždaviniai. Išanalizuoti reumatologinėmis ligomis sergančių pacientų pasiskirstymą ir laboratorinių tyrimų rezultatus, atsižvelgiant į amžiaus ir lyties; įvertinti RF, anti-CCP ir uždegiminių žymenų tyrimų rezultatų sąsajas bei pakitimus atsižvelgiant į kitus kliniškai reikšmingus veiksnius sergantiesiems reumatoidiniu artritu bei kitomis reumatologinėmis ligomis.

Tyrimo metodai. Atlikti antikūnų prieš ciklinį citrulinizuotą peptidą (anti-CCP), antikūnų prieš dvispiralę dezoksiribonukleorūgštį (anti-dsDNR) (analizatorius Gemini, *Stratec Biomedical Systems*, Vokietija), RF, C-reaktyvaus baltymo (CRB) (analizatorius SYNCHRON UniCel® DxC 800, *Beckman Coulter*, JAV), eritrocitų nusėdimo greičio (ENG) (analizatorius Sedi-15, *BD Diagnostics*, Jungtiniai Arabų Emyratai), antikūnų prieš branduolio antigenus (ANA) (mikroskopas EuroPattern, *Euroimmune*, Vokietija) kraujyje nustatymo tyrimai. Atliekant statistinę analizę naudotos požymių dažnių lentelės (*Crosstabs*), dispersinė duomenų analizė (*ANOVA*), taikyti *Pearson'o* ir *Spearman'o* koreliacijos koeficientai.

Tyrimo objektas. Atlikta retrospektyvinė LSMUL Kauno klinikų 154 pacientų, 2 metų laikotarpiu gydytų Reumatologijos klinikoje dėl RA įtarimo ir kuriems buvo atlikti RF, anti-CCP, CRB, ENG, anti-dsDNR ir ANA tyrimai, duomenų analizė. Tiriamieji suskirstyti į amžiaus grupes: I grupė – iki 50-ies metų; II grupė – nuo 50-ies iki 70-ies metų; III grupė – 70-ies ir daugiau metų. Tiriamiesiems vertinti kiti kliniškai reikšmingi veiksniai, tokie kaip kitos autoimuninės ligos, streptokokinės infekcijos, radiologiniai sąnarių pakitimai.

Rezultatai ir išvados. Jaunesni nei 50-ies metų vyrai (22,9 proc.) bei vyresnės nei 70-ies metų moterys (15,1 proc.) dažniausiai sirgo seropozityviu reumatoidiniu artritu, seronegatyviu – vyresni nei 70-ies metų vyrai (12,5 proc.) ir moterys nuo 50-ies iki 70-ies metų (13,2 proc.), o tiriamųjų sergamumas kitomis artropatijomis ir sisteminėmis jungiamojo audinio ligomis tarp lyties ir amžiaus nesiskyrė.

Viršijantys normą RF ir anti-CCP tyrimų rezultatai nustatyti sergantiesiems seropozityviu reumatoidiniu artritu, ypač jaunesniems nei 70-ies metų vyrams (RF $97,16 \pm 34,02$ IU/ml, $146,91 \pm 45,97$ IU/ml, anti-CCP $127,54 \pm 47,01$ IU/ml, $94,66 \pm 31,33$ IU/ml), o CRB ir ENG padidėjimas būdingas visiems tiriamiesiems sergantiems reumatologinėmis ligomis.

Stipriausias ryšys ($r=0,559$, $p=0,030$) nustatytas tarp RF ir anti-CCP tyrimų rezultatų iki 50-ies metų sergantiesiems seropozityviu reumatoidiniu artritu, o tarp CRB ir ENG – seronegatyviu

reumatoidiniu artritu, ypač vyrams ($r=0,837$; $p<0,01$). Imunologiniai ir uždegiminiai žymenys tarpusavyje nesusiję tik sergantiesiems seropozityviu reumatoidiniu artritu.

Tiriamiesiems su nustatytais radiologiniais sąnarių pakitimais ar persirgtomis streptokokinėmis infekcijomis nustatyti aukštesni visų analizuotų imunologinių ir uždegiminių žymenų rezultatai (anti-CCP $101,43\pm 33,32$ IU/ml, RF $73,50\pm 11,63$ IU/ml, RF $159,48\pm 52,13$ IU/ml, CRP $96,18\pm 13,91$ IU/ml, CRB $68,69\pm 13,44$ mg/l, ESR $66,39\pm 9,92$ mm/val., $49,26\pm 3,29$ mm/val.).

Seropozityviu RA dažniausiai sirgo vyrai iki 50-ies metų amžiaus, jų imunologinių ir uždegiminių žymenų reikšmės buvo didžiausios, o moterys nuo 50-ies iki 70-ies metų – kitomis artropatijomis. Tiek vyrams, tiek moterims tarpusavyje susiję anti-CCP ir RF bei CRP ir ESR, o anti-CCP bei RF aukštesni rezultatai su uždegiminių žymenų padidėjimu dažniau stebėti jauniausioms ir vyriausioms moterims, todėl norint tinkamai diagnozuoti RA, būtina atsižvelgti į tiriamųjų amžių, lytį, laboratorinių kraujo tyrimų rezultatų tarpusavio sąsajas.

SUMMARY

Master's thesis of "Rheumatoid arthritis immunological diagnostic features" by Viktorija Meilaitė. Supervisor M.D. Viltė Marija Gintauskienė.

The aim of the research. Analyze rheumatoid arthritis immunological diagnostic features.

The tasks of the research. Analyze distribution of patients with rheumatic diseases and results of laboratory tests depending on age and gender groups; evaluate links of test results between rheumatoid factor (RF), antibodies against cyclic citrullinated peptides (anti-CCP) and the inflammatory markers and their alterations with regard to other clinically significant factors in patients with rheumatoid arthritis and other rheumatic diseases.

Methodology of the research. Antibodies against cyclic citrullinated peptides (anti-CCP), antibodies against double-stranded deoxyribonucleic acid (anti-dsDNA) (analyzer Gemini, Stratec Biomedical Systems, Germany), RF, C-reactive protein (CRP) (analyzer SYNCHRON UniCel® DxC 800, Beckman Coulter, USA), erythrocyte sedimentation rate (ESR) (analyzer Sedi-15, BD Diagnostics, United Arab Emirates), antibodies against nuclear antigens (ANA) (microscope EuroPattern, Euroimmune, Germany) tests were performed in blood. Frequency tables (Crosstabs), ANOVA analysis, Pearson and Spearman correlation coefficients were used for the evaluation of the statistical relations.

Object of the research. A retrospective analysis of RF, anti-CCP, CRP, ESR, anti-dsDNA, ANA tests results in 154 patients clinically suspected of having rheumatoid arthritis and treated in Rheumatology clinic in 2 years period, was done. Patients were divided into groups by age: I group – up to 50 years old, II group – from 50 to 70 years old, III group – 70 and more years old. Other clinically significant factors, such as other autoimmune diseases, streptococcal infections, radiological joint damage were also estimate in patients.

Results and conclusions. Men up to 50 years old (22,9 %) and women older than 70 years old (15,1 %) usually had seropositive RA, men older than 70 years old (12,5 %) and women from 50 to 70 years old (13,2 %) – seronegative RA, men up to 50 years old (10,4 %) and women from 50 to 70 years old (9,4 %) – other arthropathies and systemic connective tissue disease (SCTD) distribution by gender and age is similar in all groups.

Higher than excess rate RF and anti-CCP results are in patients with seropositive rheumatoid arthritis, especially men up to 70 years old (RF $97,16 \pm 34,02$ IU/ml, $146,91 \pm 45,97$ IU/ml, anti-CCP $127,54 \pm 47,01$ IU/ml, $94,66 \pm 31,33$ IU/ml). CRP and ESR high values are in all patients with rheumatic diseases.

Patients up to 50 years old with seropositive rheumatoid arthritis had strong correlation between RF and anti-CCP tests results ($r=0,559$, $p=0,030$). Men with seronegative rheumatoid arthritis had strong correlation between CRP and ESR tests results ($r=0,837$; $p<0,01$). Immunological and inflammatory markers just had no correlation in patients with seropositive rheumatoid arthritis.

All laboratory tests results were higher in patients with radiological joint damage and who had streptococcal infections in the past (anti-CCP $101,43\pm33,32$ IU/ml, $73,50\pm11,63$ IU/ml, RF $159,48\pm52,13$ IU/ml, $96,18\pm13,91$ IU/ml, CRP $68,69\pm13,44$ mg/l, ESR $66,39\pm9,92$ mm/h, $49,26\pm3,29$ mm/h).

Men up to 50 years old usually had seropositive RA, their immunological and inflammatory markers were the highest values. Women from 50 to 70 years old usually had other arthropathies. Men and women had links between anti-CCP and RF, CRP and ESR. Higher values of anti-CCP and RF tests with inflammatory markers usually increase in group of the youngest and the oldest women. In order to properly diagnose RA, it is necessary to take regard into patients age, gender, laboratory blood tests results links.

PADĖKA

Dėkoju savo baigiamojo magistro darbo vadovei Gerb. V. M. Gintauskienei, kuri visapusiškai rėmė, konsultavo ir labai daug padėjo rašant magistro darbą.

INTERESŲ KONFLIKTAS

Autoriui interesų konflikto nebuvo.

ETIKOS KOMITETO LEIDIMAS

Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Bioetikos centro leidimas atlikti biomedicinį tyrimą 2015-11-11 Nr.: BEC-LMB(M)-84.

SANTRUMPOS

ACR	–	Amerikos reumatologų kolegija (<i>angl. American College of Rheumatology</i>)
ANA	–	antikūnai prieš branduolio antigenus
Anti-CCP	–	antikūnai prieš ciklinį citrulinizuotą peptidą
Ag	–	antigenas
Ak	–	antikūnas
CRB	–	C reaktyvusis baltymas
DNR	–	deoksiribonukleorūgštis
ENG	–	eritrocitų nusėdimo greitis (<i>angl. ESR – erythrocyte sedimentation ratio</i>)
EULAR	–	Europos Priešreumatinė Lyga (<i>angl. European League Against Rheumatism</i>)
FLS	–	fibroblastų tipo sinovijos ląstelės
HLA (ŽLA)	–	žmogaus leukocitų antigenai (<i>angl. Human leukocyte antigen</i>)
Ig	–	imunoglobulinas
IL	–	interleukinas
RA	–	reumatoidinis artritas
RF	–	reumatoidinis faktorius
SJAL	–	sisteminė jungiamojo audinio liga
TLK-10-AM	–	Tarptautinė statistinė ligų ir susijusių sveikatos sutrikimų klasifikacija, dešimtas peržiūrėtas ir pataisytas leidimas, Australijos Modifikacija
TNF α	–	navikų (<i>angl. tumor</i>) nekrozės faktorius α
VLK	–	valstybinė ligonių kasa

IVADAS

Reumatoidinis artritas (RA) – nežinomos etiologijos lėtinis uždegiminis, nuolat progresuojantis autoimuninės kilmės erozinis, destruktinis poliartritas. Tai jungiamojo audinio liga, kuri gali pažeisti aplinkinius sąnarių audinius, vidaus organus, akis, gali vystytis vaskulitai, amiloidozė ir kiti pažeidimai. Ilgainiui negydomas reumatoidinis artritas blogina gyvenimo kokybę, sukelia invalidumą, negrįžtamus organų pažeidimus, kurie didina mirtingumą. RA serga apie 0,3–1 proc. suaugusių žmonių (apie 30 sergančiųjų 100000 gyventojų). Moterys serga 3–4 kartus dažniau negu vyrai. Ligos pasireiškimo pikas apie 50-uosius gyvenimo metus (1). Epidemiologinių tyrimų duomenimis, RA paplitimas Lietuvoje siekia 0,55 proc. suaugusių asmenų (2). Pagal Higienos instituto Sveikatos informacijos centro duomenis 2015 metais reumatoidiniu artritu Lietuvoje sirgo 9778 moterys ir 2543 vyrai (iš viso 12321 žmonės) (3, 4). Imunologiniai tyrimai labai svarbūs seropozityvaus ir seronegatyvaus RA diagnostikai ir diferenciacijai su kitomis autoimuninėmis ligomis.

Vienas iš pagrindinių RA diagnostinių imunologinių žymenų yra reumatoidinis faktorius (RF). RF nėra specifiškas tik RA, jis gali būti aptinkamas pacientams, sergantiems hepatitu C bei kitomis ligomis, taip pat ir sveikiems vyresnio amžiaus asmenims. Tai imunoglobulinų M, G arba A klasės autoantikūnai, gali būti nustatomi įvairiais tyrimo metodais: ELISA (imunofermentinė analizė), nefelometrija, turbidimetrija ir kitais (1).

Antikūnai prieš ciklinį citrulinizuotą peptidą (anti-CCP) – tai ankstyvas RA žymuo, kraujyje aptinkamas dar prieš pasireiškiant ligos simptomams. Antikūnai prieš ciklinį citrulinizuotą peptidą yra specifiškesni RA. Pagrindiniai anti-CCP taikiniai yra citrulinizuoti peptidai, kurie transliacijos metu argininą pakeičia citrulino baze. Susidarę anti-CCP būdingi sergantiejiems agresyvesne RA ligos forma (5). Maždaug 50–80 proc. RA sergančių pacientų kraujyje nustatomi anti-CCP, RF arba abu. Atliekant kartu abiejų žymenų tyrimus padidėja RA diagnostikos jautrumas ir specifiskumas (6).

Autoimuninės ligos, tokios kaip RA, dažnai charakterizuojamos kaip kitų įvairių autoantikūnų ir uždegiminių rodiklių atsiradimas kraujyje. Daugeliui sergančiųjų RA nustatomi antikūnai prieš branduolio antigenus (ANA), būdingas uždegiminių žymenų – CRP ir ENG padidėjimas. Šie rodikliai gali būti stebimi siekiant įvertinti ligos aktyvumą bei atsaką į paskirtą gydymą (8, 9).

Progresuojanti liga sukelia pacientų negalią, sutrikdo pilnavertišką gyvenimą, tai lemia didėjantį mirtingumą. Ligos valdymas reikalauja daug medicininių išlaidų, pastovios priežiūros. Ankstyva diagnozė ir laiku pradėtas gydymas galėtų užkirsti kelią nepataisomai žalai bei padėti gerinti pacientų fizinę būklę ir gyvenimo kokybę (10).

Iki šiol Lietuvoje mažai nagrinėtos laboratorinių tyrimų sąsajos, rezultatų interpretacijos, diagnozuojant seropozityvų ir seronegatyvų RA bei diferencijuojant RA nuo kitų reumatologinių ligų. Tyrimo metu analizuojami reumatoidinio artrito imunologinės diagnostikos ypatumai ir vertinamos RF, anti-CCP tyrimų rezultatų ir uždegiminių žymenų tarpusavio sąsajos.

DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Darbo tikslas: išanalizuoti reumatoidinio artrito imunologinės diagnostikos ypatumus.

Darbo uždaviniai:

1. Nustatyti tiriamųjų, sergančių reumatologinėmis ligomis, pasiskirstymą pagal lytį ir amžių;
2. Išanalizuoti RF, anti-CCP ir uždegiminių žymenų CRB ir ENG tyrimų rezultatus, sergantiesiems reumatoidiniu artritu bei kitomis reumatologinėmis ligomis, atsižvelgiant į amžių ir lytį;
3. Įvertinti RF, anti-CCP ir uždegiminių žymenų CRB ir ENG tyrimų rezultatų tarpusavio sąsajas sergantiesiems reumatoidiniu artritu bei kitomis reumatologinėmis ligomis;
4. Įvertinti laboratorinių tyrimų rezultatų pakitimus atsižvelgiant į kitus kliniškai reikšmingus veiksnius sergantiesiems reumatologinėmis ligomis.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Reumatoidinio artrito apibrėžimas, ligos paplitimas

Reumatoidinis artritas (RA) – tai labiausiai paplitęs autoimuninės kilmės uždegiminis artritas su ryškia makrofagų ir aktyvuotų T leukocitų infiltracija (11, 12).

Pasaulinės sveikatos organizacijos duomenimis, visame pasaulyje reumatoidiniu artritu serga 1–2 proc., tai yra apie 21 milijoną žemės gyventojų. Reumatoidiniu artritu Lietuvoje serga daugiau nei 12 tūkstančių šalies gyventojų (13). Dažniausiai susergama 5–6-ame dešimtmetyje, tačiau RA gali sirgti ir jauni žmonės (14). Valstybinės ligonių kasos (VLK) statistiniais duomenimis 2012 metais į gydymo įstaigas kreipėsi apie 9000 RA sergančių pacientų, iš kurių 1786-iems naujai diagnozuotas RA (2). Remiantis 2014 metų visuomenės sveikatos stebėsenos duomenų fondo duomenimis, asmenų, kuriems ambulatorinėse ar stacionarinėse sveikatos priežiūros įstaigose užregistruotas bent vienas susirgimas reumatoidiniu artritu, skaičius yra 12584 (15).

2010 metais Amerikos reumatologų kolegija (ACR, *angl. American College of Rheumatology*) ir Europos lyga prieš reumatą (EULAR, *angl. European League Against Rheumatism*) apibendrinė ir aprašė naujus reumatoidinio artrito klasifikacijos kriterijus. Remdamiesi šiais kriterijais ir atlikdami nurodytus diagnostinius tyrimus (RF, anti-CCP, CRP, ESR), bei papildomus tyrimus (ANA, anti-dsDNA), kuriuos rekomenduoja atlikti įvairių mokslinių studijų autoriai (Biesen R, Malaise O, Halleux S ir kiti), galime aiškiau suprasti reumatoidinio artrito mechanizmą, diferencijuoti RA (seropozityvus ar seronegatyvus), taip pat atskirti nuo kitų sisteminių jungiamojo audinio ligų, pateikti tikslesnę diagnozę (16, 17).

1.2 Etiologija

Tiksli RA etiologija iki šiol nėra išaiškinta. Lietuvos ir pasaulio mokslininkai teigia, kad su RA atsiradimu susiję daug faktorių, tokių kaip genetiniai (šeiminė anamnezė, žmogaus leukocitų antigenai), aplinkos veiksniai (klimato sąlygos, vitaminų kiekis, oro tarša), žalingi įpročiai (alkoholis, rūkymas), lytis, su amžiumi susiję pokyčiai (osteoporozė po menopauzės). Analizuojant ligos atsiradimo kilmę bei vystymosi mechanizmą, būtina atsižvelgti į visus veiksnius, nes jie gali turėti įtakos laboratorinių tyrimų rezultatams ir vaistų, skirtų gydyti RA, veiksmingumui (18).

1.2.1 Genetiniai faktoriai

Genetikos įtaką įrodo giminės genealoginio medžio sudarymas, tai yra, didesnę tikimybę susirgti turi tas asmuo, kurio giminėje jau buvo RA atvejų. Pastebima ir priklausomybė nuo lyties. Moterys RA

serga 3 kartus dažniau nei vyrai, tačiau priežastys nėra tiksliai išaiškintos (19). Kai kurie mokslininkai teigia, kad didelę įtaką turi lytiniai hormonai bei lytinės chromosomos (20). 2012 metais publikuota „ImmunoChip“ studija pirmą kartą nurodė, kad sergančiųjų reumatoidiniu artritu X chromosomoje yra randamas *IRAK1* (su interleukino-1 receptoriumi susijusi kinazė-1) genas (21, 22). Stipriausias genetinis ir RA ryšys yra žmogaus leukocitų antigenai (*angl. Human leukocyte antigen – HLA*). Nustatyta ryški koreliacija tarp sergančiųjų RA ir tam tikrų HLA: HLA-DRB1*01 ir DRB1*04, HLA-DRB1*13 ir DRB1*15 alelių (23). Atliktos įvairios genomo studijos įrodo *STAT4* geno ir CD40 lokuso daromą įtaką RA išsivystymui (24).

1.2.2 Aplinkos faktoriai

- Socialinis ir ekonominis statusas. Danų atliktos studijos rezultatai rodo, kad geresnį išsilavinimą turintiems žmonėms du kartus mažesnė riziką susirgti reumatoidiniu artritu. Šiems rezultatams pritaria ir Švedijoje atliktas tyrimas, kurio rezultatai parodė, kad žmonės be universitetinio išsilavinimo 40 proc. dažniau suserga RA nei tie, kurie turi universitetinį išsilavinimą. Literatūroje nurodoma, jog prastesnį išsilavinimą turinčių žmonių darbas dažniau būna fizinis, jie dažniau rūko, vartoja alkoholį, jų prastesnė mityba. Žmonėms, kurie dirba sunkų fizinį darbą, rizika susirgti yra 20 proc. didesnė nei tiems, kurie dirba protinį darbą (25).
- Geografinė padėtis. Gimimo vieta ir dabartinė gyvenamoji vieta taip pat turi įtakos RA išsivystymui. Jungtinėse Amerikos Valstijose (JAV) buvo atliktas tyrimas geografinės padėties įtakai nustatyti. Tyrimo metu JAV suskirstyta į penkis regionus: vakarų, vidurio vakarų, vidurio Atlanto, šiaurės rytų ir pietryčių. Moterims, kurios nuo gimimo iki pilnametystės gyveno vidurio vakaruose ir šiaurės rytuose, rizika susirgti RA didesnė, nei gimusių ir gyvenusių kituose regionuose (26, 27).
- Klimatas, ultravioletinė šviesa, tarša, fizinis aktyvumas taip pat turi įtakos RA išsivystymui. Kai kurie mikroorganizmai taip pat svarbūs: Epstein-Barr ir Parvo virusai, taip pat bakterijos, tokios kaip *Streptococcus*, *Mycoplasma*, *Proteus Spp.* ir *Escherichia coli*. Maždaug 10 proc. RA pacientų praityje šie mikroorganizmai buvo sukėlę infekciją (28).

1.2.3 Žalingi įpročiai ir kiti veiksniai

- Rūkymas – tai vienas iš didžiausių įtaką turinčių veiksnių. Tabako dūmai padidina riziką susirgti seropozityviu RA pagal antikūnus prieš ciklinį citrulinizuotą peptidą (anti-CCP) (29, 30).

- Vitaminas D yra hormonas, svarbus kaulams bei mineralinių medžiagų homeostazei. Jis taip pat susijęs su įgimto ir įgyto imuniteto reguliacija, veikia per vitamino D receptorius ir slopina uždegimines reakcijas (31). Vitaminas D sumažina autoimuninių ligų, tokių kaip I tipo cukrinis diabetas, išsėtinė sklerozė, riziką, tačiau jo vaidmuo mažinant RA riziką išlieka neaiškus (32, 33). Vitamino D trūkumas žmogaus organizme neigiamai veikia kaulinio audinio metabolizmą ir struktūrą ir šiuo metu yra pripažintas labiausiai paplitusia medicinine būkle visame pasaulyje. Maždaug pusei Vakarų Europos, Šiaurės Amerikos ir apie du trečdalius viso likusio pasaulio senyvo amžiaus asmenų trūksta vitamino D (34).
- Baltymai ir mėsa. Kai kurie atlikti tyrimai rodo, kad reguliarūs badavimo periodai ir vegetarizmas gali sumažinti RA aktyvumą. Tačiau Nurses' Health Study (NHS) atliktas tyrimas rodo, kad nėra ryšio tarp vartojamos mėsos, žuvies, paukštienos produktų vartojimo ir RA išsivystymo (35).
- Geriamieji kontraceptikai. Kadangi RA labiau paplitęs moterų tarpe, ilgai buvo manoma, kad estrogenai turi didelę reikšmę RA išsivystymui. Anksčiau atliktų studijų rezultatai tai įrodo, tačiau dabar vis labiau apie tai diskutuojama ir nesutariama dėl bendros nuomonės (36).
- Naujagimio svoris. Švedijoje atlikto tyrimo rezultatai rodo, kad didelis naujagimių svoris (daugiau kaip 4 kilogramai) tris kartus padidina riziką susirgti RA (37). Nors tikslus svorio įtakos biologinis mechanizmas nėra žinomas, manoma, kad tai susiję su pogumburio-hipofizės ašies funkcijos sutrikimu (38).
- Maitinimas krūtimi. RA paūmėjimai pastebimi nėštumo ir pogimdyminiu laikotarpiu. Ilgalaikis maitinimas krūtimi (13 ir daugiau mėnesių) gali sumažinti riziką susirgti RA (36).

1.3 Patogenezė

Sergant RA, vyksta leukocitų telkimasis, imuninių ląstelių aktyvacija, uždegiminių mediatorių ir proteinazių gamyba, sukianti sąnarių pažeidimus. Daugelis imuninių ląstelių, tokių kaip CD4⁺ T limfocitai (T pagalbinkai), CD8⁺ T limfocitai (T citotoksiniai), B limfocitai, natūralieji žudikai (NK), putliosios ląstelės ir mieloidinės ląstelės, yra randamos RA pažeistuose sąnariuose. Įvairūs mediatoriai, kuriuos gamina imuninės ląstelės, yra susiję su ligos progresavimu ir/arba sunkumu, pavyzdžiui, reumatoidinis faktorius (RF), antikūnai prieš ciklinį citrulinizuotą peptidą (anti-CCP), navikų nekrozės faktorius α (TNF α), interferonas γ (IFN γ), interleukinas 1 β (IL-1 β), interleukinas 17 (IL-17) (18).

Dėl pastovios įgimto ir įgyto imuniteto aktyvacijos išsivysto imuninės tolerancijos sutrikimas, netipinis autoantigeno pateikimas ir antigenui specifinių T ir B limfocitų aktyvacija. Visi šie mechanizmai

lemia sinovijos hiperplaziją ir kaulų destrukciją, todėl atsiranda sąnarių patinimas, deformacija ir sisteminis uždegimas (39).

Monocitai/makrofagai yra labai svarbus uždegiminių citokinų, ypač TNF α , IL-6, IL-1, matrikso metaloproteinazių (MMP), šaltinis. Visi šie komponentai lemia endotelinių ląstelių aktyvaciją, ūmios fazės reakcijas ir kremzlinio audinio pažeidimą. Monocitai/makrofagai taip pat gamina didelę dalį chemokinų, kurie pritraukia leukocitus į pažeistą sąnarį. Be to, monocitai geba poliarizuoti T pagalbininkus ir diferencijuotis į osteoklastus. Dėl šių priežasčių monocitai ir makrofagai yra priskiriami kaip potencialūs taikiniai medikamentiniam gydymui (40, 41). Mieloidinės ląstelės, turinčios žymenis, būdingus monocitams/makrofagams (CD14⁺CD68⁺), taip pat gausiai randamos reumatoidinio artrito pažeistuose sąnariuose. Keletas atliktų studijų rodo, kad šios ląstelės sintetina uždegiminius citokinus ir turi aktyvuotą fenotipą su išreikšta ekspresija: HLA-DR (dalyvauja antigeno pateikime CD4⁺ ląstelėms), kostimuliacinių molekulių (CD80, CD86, CD40), adhezijos molekulių (CD54) ir kai kurių chemokinų receptorių (42). Sinoviniame skystyje esantys CD68⁺ makrofagai yra svarbūs RA patogenezėje, jų buvimas koreliuoja su ligos aktyvumo žymenimis, o sumažėjimas reiškia teigiamą biologinį atsaką į gydymą (43). Vis daugėja studijų, kurios aprašo periferinio kraujo monocitų pogrupių fenotipinę įvairovę ir dažnį sergant RA. RA pacientų periferiniame kraujyje esantys CD14⁺ monocitai rodo padidėjusią Fc γ Rs, CD54, CD11b, navikų nekrozės faktoriaus (TNF) ir/arba HLA-DR ekspresiją (39, 42). Žmonių monocitai gali būti suskirstyti į subpopuliacijas, atsižvelgiant į ekspresuojamus paviršiaus žymenis: CD14 (lipopolisacharidų koreceptorius) ir CD16 (Fc γ RIII). CD14⁺⁺CD16⁻, vadinamieji klasikiniai monocitai, yra labiausiai paplitę ir apie 90 proc. kraujo monocitų turi būtent šią žymenų ekspresiją sveikuose individuose. CD16⁺ ekspresuojančios ląstelės yra retesnės tarp cirkuliuojančių monocitų, tačiau yra būdingi esant infekcijoms ir uždegiminėms būklėms. Studijos rodo, kad tik CD14⁺⁺ ir CD16⁺ ląstelių padaugėjimas stebimas periferiniame kraujyje lėtiniu RA sergantiems pacientams (44).

Šlapimo rūgštis – tai galutinis purinų metabolizmo produktas, aptinkamas kraujyje ir intersticiniuose tarpuose, o susitelkusios sankaupos gali kristalizuotis ir sukelti autoimuninį uždegiminį atsaką (45). RA pacientams gali būti stebimi šlapimo rūgšties kristalų sukelti podagriniai priepuoliai. Šlapimo rūgšties kristalai skatina fibroblastų tipo sinovijos ląstelių (FLS) aktyvaciją. Tai sąnariuose esančios mezenchiminės ląstelės, kurios atlieka svarbų vaidmenį abipusiam sąnarių pažeidimui ir uždegiminio artrito išsivystymui. FLS gebėjimas ardyti kremzlinį audinį paremtas daugiapakopiu procesu, vienas iš jų – matrikso metaloproteinazių (MMP), tokių kaip MMP-1, sintezė. FLS taip pat sekretuoja branduolio receptorių aktyvatorius, kurie iš kraujotakos pritraukia makrofagus, skatina jų diferenciaciją į osteoklastus, aktyvina juos ant kaulų paviršiaus ir taip sukelia sąnarių paviršių eroziją, kas turi įtakos

uždegiminio RA išsivystymui. FLS gamina uždegiminius faktorius, tokius kaip interleukinas-1b (IL-1b), navikų nekrozės faktorius (TNF- α), tai lemia B ląstelių aktyvaciją, kurios skatina autoantikūnų, tokių kaip RF, gamybą (46).

1.4 Klinikiniai reumatoidinio artrito simptomai

Pagrindinis klinikinis požymis yra simetrinis uždegiminis, erozinis, destruktinis poliartritas. Artritas dažniausiai prasideda smulkiuosiuose rankų ir pėdų sąnariuose, vėliau plinta į stambiuosius sąnarius. Stambieji alkūnių, pečių, čiurnų ir kiti sąnariai pažeidžiami rečiau ir vėliau. Ypač retai pažeidžiami klubų sąnariai. Iš pažeistų sąnarių sinoviniu skysčiu uždegimas plinta į aplinkinius audinius, ardo kremzlinį ir kaulinį audinius, sukeldamas sąnarių deformaciją ir progresuojančią fizinę negalią. Liga su remisijomis ir paūmėjimais lėtai progresuoja. Progresuojantis RA sukelia perikarditą, plaučių fibrozę, periferinę neuropatiją ir amiloidozę. Tipiški reumatoidinio artrito požymiai yra panuso formavimasis ir sinovijos hiperplazija, sukelta fibroblastų proliferacijos ir imuninių ląstelių infiltracijos (47, 48).

1.5 Klasifikacija

Pagal Tarptautinės statistinės ligų ir susijusių sveikatos sutrikimų klasifikacijos, dešimtojo peržiūrėto ir pataisyto leidimo, Australijos Modifikaciją (TLK-10-AM) RA klasifikuojamas:

M05 – seropozityvus RA;

M06 – kitas RA (seronegatyvus RA);

M08 – jaunatvinis (juvenilinis) reumatoidinis artritas (49).

Reumatoidinio artrito klasifikacijos kriterijai pateikti 1 lentelėje.

1 lentelė. 2010 m. Amerikos reumatologų kolegijos (ACR, angl. American College of Rheumatology) ir Europos Lygos prieš reumatą (EULAR, angl. European League Against Rheumatism) reumatoidinio artrito klasifikacijos kriterijai

Būdingi požymiai:	
1. Mažiausiai viename sąnaryje yra aiškus kliniškai išreikštas sinovitas (sutinimas)	
2. Sinovito kilmės kita diagnoze geriau paaiškinti negalima	
A. Sąnarių pažeidimas¹:	
1 stambusis sąnarys ²	0 balų
2–10 stambieji sąnariai	1 balas
1–3 smulkieji sąnariai (su ar be stambiųjų sąnarių pažeidimu) ³	2 balai
4–10 smulkieji sąnariai (su ar be stambiųjų sąnarių pažeidimu)	3 balai
>10 sąnarių (iš jų bent vienas smulkusis) ⁴	5 balai

1 lentelės tęsinys

B. Imunologiniai tyrimai (klasifikacijai reikalingas bent 1 tyrimas):	
RF ir anti-CCP neigiami	0 balų
RF arba anti-CCP silpnai teigiami	2 balai
RF arba anti-CCP stipriai teigiami	3 balai
C. Ūmios fazės baltymai (klasifikacijai reikalingas bent 1 tyrimas):	
CRB ir ENG normos ribose	0 balų
CRB arba ENG padidėjęs	1 balas
D. Simptomų trukmė:	
<6 savaitės	0 balų
≥6 savaitės	1 balas

¹Pažeistu sąnariu laikomas bet koks sutinęs ar skausmingas sąnarys tyrimo metu, kuris gali būti patvirtintas objektyviai nustačius sinovitą. Distaliniai interfalanginiai sąnariai, pirmieji metakarpofalanginiai sąnariai ir pirmieji metatarsofalanginiai sąnariai yra nevertinami. Sąnariai skirstomi pagal lokalizaciją ir pažeistų sąnarių skaičių, priskiriant juos į daugiausiai balų atitinkančią kategoriją.

²Stambieji sąnariai: pečių, alkūnių, klubų, kelių, čiurnų.

³Smulkieji sąnariai: metakarpofalanginiai, proksimaliniai interfalanginiai, antrieji ir penktieji metatarsofalanginiai, nykščio interfalanginiai ir riešų sąnariai.

⁴Šioje kategorijoje mažiausiai vienas iš pažeistų sąnarių turi būti smulkus sąnarys, kiti – gali būti bet kokia kombinacija pažeistų stambiųjų ir smulkiųjų sąnarių (tokių, kurie nebuvo išvardinti niekur kitur (t.y. temporomandibulinis, akromioklavikulinis, steroklavikulinis ir kt.)).

A–D grupėse, nustačius bendrą balų sumą ≥ 6 iš 10, klasifikuojama, kad pacientas neabejotinai serga reumatoidiniu artritu. Pacientai, kurių balų suma mažesnė kaip 6 iš 10, neklasifikuojami kaip turintys RA; būklė gali būti vertinama pakartotinai – kriterijai gali atsirasti ateityje.

Kriterijai taikomi naujai susirgusių pacientų klasifikacijai. Pacientai, kuriems yra erozinis, reumatoidiniam artritui būdingas artritas, turintys anamnezę, atitinkančią 2010 metų kriterijus, turi būti klasifikuojami, kaip sergantys RA. Seniai sergantys pacientai, įskaitant tuos, kurių liga yra neaktyvi (su ar be gydymo), ir kurie, remiantis retrospektyviai vertinamais duomenimis, anksčiau atitiko 2010 metų kriterijus, turi būti klasifikuojami kaip sergantys RA. Pacientams, turintiems kitus klinikinius požymius, ligos diferencinė diagnostika skiriasi (diferencijuojama tarp tokių būklių, kaip sisteminė raudonoji vilkligė, psoriazinis artritas, podagra ir kt.). Apžiūros metu stebimų pažeistų sąnarių simptomų trukmė nustatoma pagal paciento nupasakojamą simptomų ir sinovito trukmę (pavyzdžiui, skausmas, sutinimas ir kita) apžiūros metu nustatomuose pažeistuose sąnariuose, neatsižvelgiant į taikomą gydymą (8).

1.6 Reumatoidinio artrito diagnostika

Laboratoriniai tyrimai:

- a) bendras kraujo tyrimas (BKT);
- b) eritrocitų nusėdimo greitis (ENG) ir/arba C-reaktyvusis baltymas (CRP);
- c) reumatoidinis faktorius (RF);
- d) antikūnai prieš ciklinį citrulinizuotą peptidą (anti-CCP).

Instrumentiniai tyrimai: sąnario pažeidimą patvirtinantis radiologinis ir/arba ultragarsinis tyrimas, ir/arba magnetinio rezonanso tomografija, ir/arba kompiuterinė tomografija ir kiti (50).

Taip pat gali būti atliekami ir šie tyrimai: antikūnai prieš branduolio antigenus (ANA), antikūnai prieš dvispiralės DNR antigenus (anti-dsDNA) (51).

1.6.1 Reumatoidinis faktorius (RF)

Autoantikūnai, nukreipti prieš imunoglobulino G (IgG) Fc fragmentą, yra vadinami reumatoidiniu faktoriumi (RF). Šie baltymai yra gaminami aktyvintų B limfocitų ir juos galime aptikti kraujo serume. Tiksliai reumatoidinio faktoriaus funkcija organizme nežinoma. RF yra naudojamas kaip žymuo tiriant pacientus, kuriems įtariamas reumatoidinis artritas arba kitos autoimuninės ligos. Teigiamas RF yra nustatomas apie 75 proc. RA sergančių pacientų (52). RF koncentracija nekoreliuoja su ligos aktyvumu. Pacientams, sergantiems kliniškai pasireiškiančiu vaskulitu, sisteminę raudonąją vilklige, polimiozitu, tuberkulioze, sifiliu, virusiniu hepatitu, infekcine mononukleoze, gripu, dažniausiai RF yra teigiamas. Maži kiekiai RF gali būti randami ir sveikiems pacientams, taip pat 20 proc. vyresnio amžiaus žmonių. Reumatoidinis faktorius kraujo serume atsiranda kur kas anksčiau negu pasireiškia pirmieji ligos simptomai (51).

RF paprastai yra tiriamas šiais metodais: turbidimetriniu, nefelometriniu, agliutinacija su triušio IgG įjautrintais avių eritrocitais, radioimuniniais, fermentiniais ir agliutinacija su polistireno latekso dalelėmis, padengtomis žmogaus IgG. Nė vienas iš šių tyrimų nėra geresnis vienas už kitą, išlieka standartizacijos problema, kuri lemia rezultatų variaciją (53).

1.6.2 Antikūnai prieš ciklinį citrulinizuotą peptidą (anti-CCP)

Anti-CCP yra pagrindiniai RA autoantikūnai. Jie nukreipti prieš įvairius citrulinizuotus antigenus, tokius kaip: filagrinas, fibrinogenas, vimentinas, kolagenas. Anti-CCP buvimas kraujyje yra susijęs su sąnarių pažeidimu. Šie antikūnai sukelia navikų nekrozės augimo faktoriaus alfa (TNF- α) gamybą makrofaguose, osteoklastogenezę, komplemento aktyvaciją. Anti-CCP RA pacientams sukelia

patogeninę citokinų ekspresiją ir imuninių ląstelių oksidacinį stresą (54). Antikūnai randami beveik 80 proc. sergančiųjų RA pacientų ir gali būti nustatyti daug anksčiau, negu pasirodo pirmieji simptomai. Taip pat šių antikūnų buvimas koreliuoja su sąnarių pažeidimu (55). RA diagnozei anti-CCP jautrumas svyruoja nuo 39 proc. iki 89 proc., specifiškumas nuo 50 proc. iki 99 proc. (56) Anti-CCP yra RA diagnostinis žymuo, nustatant ELISA metodu pasižymi dideliu jautrumu ir specifiškumu RA, lyginant su kitomis autoimuninėmis ligomis (55). ELISA tyrimo metodas yra įtrauktas į 2010 metų RA klasifikavimo kriterijus (5).

1.6.3 Uždegiminiai žymenys

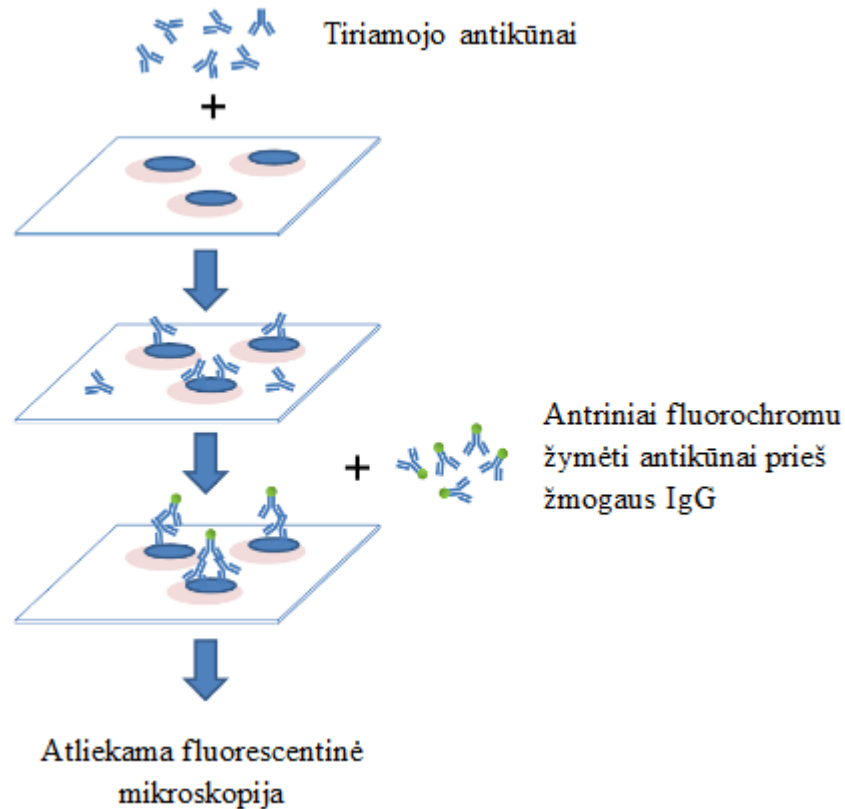
Daugelis atliktų studijų aprašo su RA susijusių autoantikūnų ir kai kurių biožymenų (citokinų/chemokinų, ENG, CRB) ryšį. ENG ir CRB tyrimų rezultatų pokyčiai atspindi ligos sunkumą, eigą, išėičių prognozę ir žalingus pokyčius žmogaus organizme. Jie tiriami kartu su autoantikūnais, norint patvirtinti RA diagnozę. CRB yra baltymas, kurio koncentracija padidėja esant uždegimui. Padidėjusi koncentracija gali būti nustatoma dar prieš pasireiškiant RA simptomams, taip pat koreliuoja su ligos aktyvumu. CRB susijungdamas su specifiniais antikūnais sudaro netirpius kompleksus, kurie gali būti aptinkami turbidimetriniu metodu. ENG yra nespecifinis uždegiminis žymuo ir naudojamas ne tik autoimuninių ligų diagnostikoje, bet ir ligos progresavimo stebėjimui. ENG ir CRB tyrimų derinys gali padidinti RA diagnostikos jautrumą ir specifiškumą (57).

1.6.4 Antikūnai prieš branduolio antigenus (ANA)

ANA – tai IgG ar IgM klasės autoantikūnų grupė, kurie jungiasi į imuninius kompleksus su ląstelės branduolio komponentais – deoksiribonukleorūgštimi (DNR), ribonukleoproteinais (RNP), histonais, nukleoplazminiais ar branduolėlių antigenais. Šie autoantikūnai dažniausiai randami autoimuninėmis ir reumatinėmis ligomis sergančių pacientų serume. ANA naudojami kaip sisteminių jungiamojo audinio ligų diagnostiniai ir prognostiniai žymenys (58). Taip pat gali būti randami ir sveikų žmonių serume nesant jokių sisteminių jungiamojo audinio ligų požymių. Maždaug 13,8 proc. sveikų žmonių populiacijos serume yra ANA, moterims randama dažniau negu vyrams (59). ANA – bendras antikūnų prieš branduolio antigenus grupės pavadinimas, branduolio antigenais gali būti ir išskiriami (ekstrahuojami) branduolio baltymai: SS-A, SS-B (La), Ro, Sm, U1RNP, Scl-70, Jo-1 ir kiti, bendrai vadinami išskiriamaisiais branduolio antigenais (ENA). ENA išdiferencijavimas leidžia nustatyti specifinį automuninį susirgimą. ENA tyrimas turėtų būti atliekamas tik tada, kai prieš tai ištirto ANA rezultatas teigiamas ir kai pasireiškia klinikiniai simptomai, būdingi autoimuninei ligai (60).

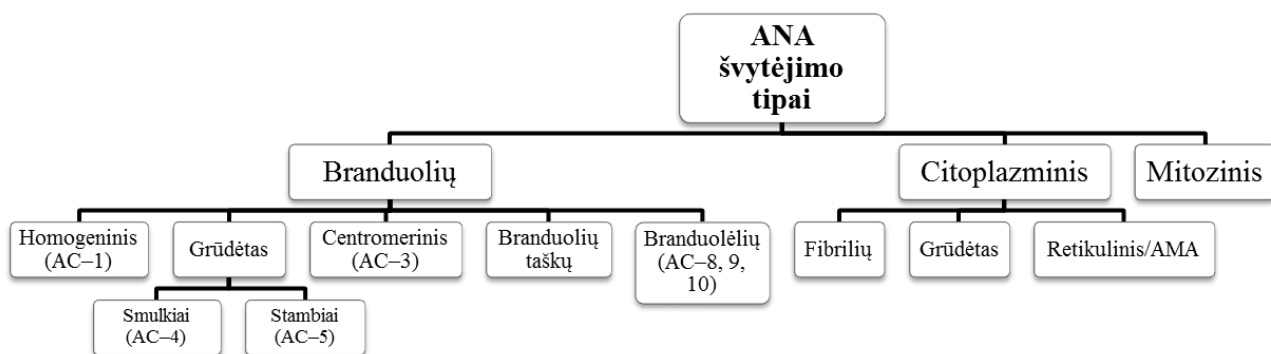
Sergant RA, ANA jautrumas yra apie 41 proc., o specifiškumas 56 proc. Būdingi antikūnai prieš histonų, SS-A, SS-B, ds-DNR antigenus. Antikūnai prieš SS-A gali būti nustatomi maždaug 5 proc. reumatoidinio artrito atvejų (61).

Tradicinis metodas, norint aptikti ANA, yra netiesioginė imunofluorescencija (NIF). Tyrimui atlikti naudojamos Hep-2 ląstelių linijos, turinčios visus pagrindinius antigenus, todėl laikomos kaip idealus substratas nustatant ANA. Netiesioginės imunofluorescencijos tyrimo metodo principas pavaizduotas 1 paveiksle.



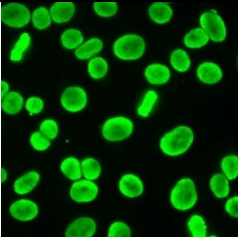
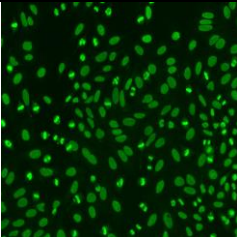
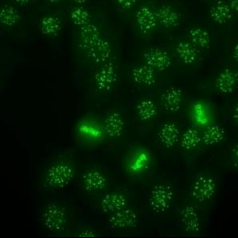
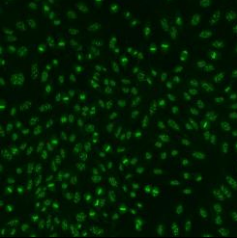
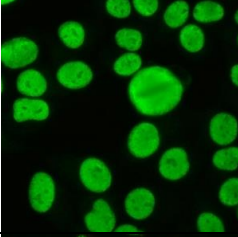
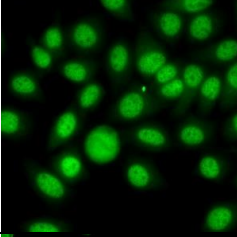
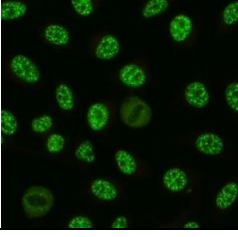
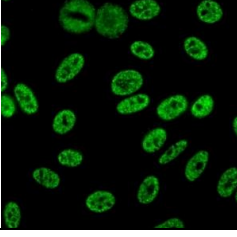
1 pav. Netiesioginės imunofluorescencijos tyrimo principas (EUROIMMUN AG, Vokietija, www.euroimmun.com)

Pagal tai, koks antigenas įeina į Ag-Ak kompleksą, netiesioginės imunofluorescencijos metodu nustatomi skirtingi švytėjimo tipai, dalis jų pavaizduoti 2 paveiksle ir detaliau aprašyti 2 lentelėje. Švytėjimo variantas priklauso nuo antigenų dėstymosi ląstelių branduoliuose ypatumų, o tuo pačiu ir nuo autoantikūnų rūšies (62).

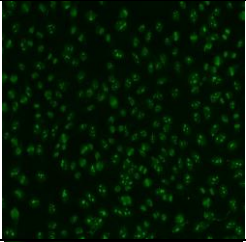
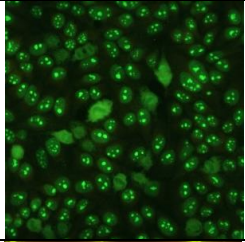
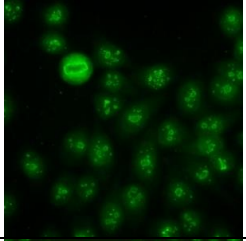
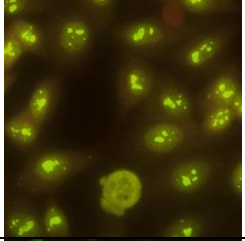
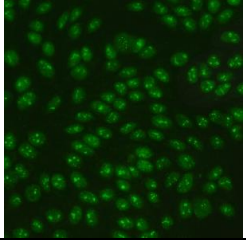
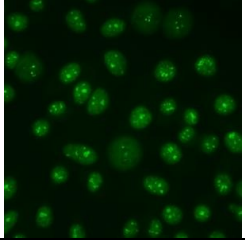


2 pav. Kai kurie ANA švytėjimo tipai

2 lentelė. Kai kurių ANA švytėjimo tipų ypatybės

ANA švytėjimo tipas	Nuotraukos		Savybės
AC-1 (homogeninis)			Susijęs su chromatino komponentų antigenais – dvispirale DNR (dsDNR), denatūruota vienspirale DNR (ssDNR), histonų šerdimi, nukleosomomis.
AC-3 (centromerinis)			Susijęs su centromerų antigenais CENP-A/B.
AC-4 (smulkiai grūdėtas)			Susijęs su SS-A/Ro, SS-B/La, Mi-2, TIF1γ, TIF1β, Ku antigenais.
AC-5 (stambiai grūdėtas)			Susijęs su hnRNP, U1RNP, Sm, RNA polymerase III antigenais.

2 lentelės tęsinys

<p>AC-8 (homogeninis branduolėlių)</p>				<p>Susijęs su PM/Scl-75, PM/Scl-100, Th/To, No55/SC65 antigenais.</p>
<p>AC-9 (klampusis branduolėlių)</p>				<p>Susijęs su U3-snoRNP/fibrilarino antigenais.</p>
<p>AC-10 (margas branduolėlių)</p>				<p>Susijęs su RNA polymerase I, hUBF/NOR-90 antigenais.</p>

1.6.5 Anti-Ro

Antikūnai prieš Ro antigenus yra dažniausiai nustatomi autoantikūnai prieš išskiriamus branduolio antigenus ir yra labiausiai susiję su sisteminė raudonąja vilklige bei Sjogreno sindromu, tačiau randami ir kitų autoimuninių ligų, pavyzdžiui reumatoidinio artrito, metu. Anti-Ro antikūnai aptinkami 3–15 proc. RA sergančių pacientų. Visiems pacientams, kuriems nustatomas anti-Ro, pasireiškia panašūs simptomai, tokie kaip akių gleivinės sausumas, jautrumas šviesai, purpuros, leukopenija, anemija, hipokomplementemija (63). Atliktos studijos rodo, kad anti-Ro antikūnai gali būti nepriklausomas faktorius, susijęs su nepakankamu navikų nekrozės faktoriaus inhibitorių atsaku RA pacientams (64). Ro antigenas gali būti sudarytas iš dviejų skirtingų baltymų – Ro52 ir Ro60 (63).

1.6.6 Naujausi RA žymenys

Šiuo metu yra atrasti ir kiti su RA susiję autoantikūnai, tačiau dauguma jų nėra kliniškai patvirtinti, todėl nenaudojami rutininėje klinikinėje praktikoje. Tam reikalingi išsamūs moksliniai tyrimai (6).

1.6.6.1 Anti-RA33

Anti-RA33 autoantikūnai, nukreipti prieš RA33 kompleksą arba heterogeninį branduolio ribonukleininį proteiną (hnRNP), randami RA pacientų serume. Šie antikūnai galėtų būti naudojami kaip RA žymenys pacientų kraujo serume, tačiau tokiam diagnostiniam metodui patvirtinti dar trūksta klinikinių įrodymų. Anti-RA33 randamas 27–45 proc. seronegatyviems RA pacientams (65). Al-Mughales aprašo anti-RA33 nustatymo metodą: rekombinantinio RA33 kovalentinė imobilizacija prie kietos fazės arba mikrotitravimo juostos, paciento serumo užnešimas ant tyrimo vietos, Ag-Ak kompleksų susidarymas, jų aptikimas naudojant peroksidaze žymėtus antrinius antikūnus, kurie veikia prieš žmogaus IgG. Antikūnai yra nudažomi ir vertinamas spalvos pokytis – spalvos intensyvumas yra tiesiogiai proporcingas ieškomo antikūno koncentracijai (56).

1.6.6.2 Anti-Savoie (anti-Sa)

Tai RA specifiniai autoantikūnai, randami kraujo serume apie 43 proc. RA sergančių pacientų, jų nerandama sergant kitomis autoimuninėmis ligomis bei sveikiems asmenims. Taip pat apie 27 proc. RF-neigiamų RA atvejų rasta anti-Sa. Anti-Sa specifiskumas yra 92–98 proc., jautrumas apie 40 proc. (65).

1.6.6.3 Anti-CarP

Naujausios studijos praneša apie atrastas naujas autoantikūnų sistemas, randamas RA seroneigiamiems pagal RF ir anti-CCP pacientams, tokias kaip autoantikūnai prieš karbamilintus baltymus (anti-CarP). Šie autoantikūnai susiję su sparčiu ligos progresavimu ir bloga išėjimi. Randami apie 45 proc. RA pacientų ir apie 30 proc. jų atvejų, kai anti-CCP nebuvo rasta (65).

1.6.6.4 Anti-CEP1

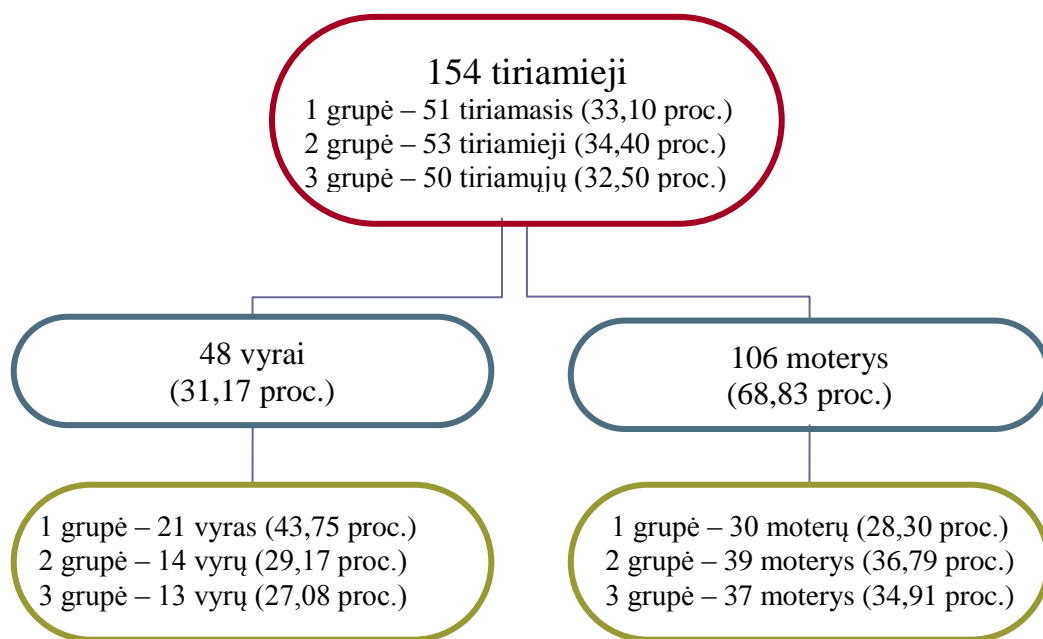
α -enolazė – daugiafunkcinis glikolitinis fermentas, kuris katalizuoja 2-fosfoglicerato virtimą į fosfoenolpiruvatą. Autoantikūnai prieš citrulinizuotą α -enolazės baltymą 1 (anti-CEP1) pirmą kartą aprašyti profesoriaus Lundberg. Jis atliko tyrimus ir nustatė, kad anti-CEP1 pasižymi dideliu specifiskumu RA ir yra randamas tik 2–3 proc. sveikų asmenų (66, 67).

2. TYRIMO METODIKA IR METODAI

Tyrimai atlikti LSMUL Kauno klinikų Laboratorinės Medicinos klinikoje bei Imunologijos ir Alergologijos klinikoje, gavus Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Bioetikos centro leidimą (leidimas atlikti biomedicinį tyrimą 2015-11-11 Nr.: BEC-LMB(M)-84).

2.1 Tiriamieji

Atlikta retrospektyvinė LSMUL Kauno klinikų pacientų, 2 metų laikotarpiu gydytų Reumatologijos klinikoje dėl RA įtarimo (diagnozės pagal TLK kodus: M05, M06, M08, M10, M15 ir kitos), duomenų analizė. Toliau analizuoti tik tų pacientų duomenys, kuriems buvo atlikti RF, anti-CCP, CRB, ENG, anti-dsDNR ir ANA tyrimai. Ne visiems tiriamiesiems buvo atlikti anti-dsDNR ir ANA tyrimai. Dėl reumatoidinio artrito diferenciacijos su kitomis reumatologinėmis ligomis anti-dsDNR tyrimas atliktas 29 tiriamiesiems, o ANA – 41 tiriamajam. Iš pacientų ligos istorijų paimti kai kurie klinikiniai duomenys (rizikos veiksniai, persirgtos infekcijos, kitos autoimuninės ligos). Analizuoti 154 pacientų tyrimų rezultatai. Tiriamųjų amžius buvo nuo 20-ies iki 90-ies metų. Tiriamieji suskirstyti į amžiaus grupes: I grupė – iki 50-ies metų; II grupė – nuo 50-ies iki 70-ies metų; III grupė – 70-ies ir daugiau metų. Tiriamųjų pasiskirstymas pavaizduotas 3 paveiksle.



3 pav. Tiriamųjų pasiskirstymas pagal amžių ir lytį

1 grupė – iki 50-ies metų amžiaus pacientai; 2 grupė – nuo 50-ies iki 70-ies metų amžiaus pacientai, 3 grupė – nuo 70-ies ir daugiau metų amžiaus pacientai

Tiriamieji pagal nustatytas diagnozes ir TLK kodus buvo suskirstyti į grupes:

1. Seropozityvus reumatoidinis artritas (M05);
2. Seronegatyvus reumatoidinis artritas (M06);
3. Kitos artropatijos – reaktyviosios artropatijos, jaunatvinis artritas, podagra, poliartrrozės ir kitos (M02, M07–M25);
4. Sisteminės jungiamojo audinio ligos – mazginis poliarteritas, sisteminė raudonoji vilkligė, sisteminė sklerozė ir kitos (M30–M36).

2.2 Mėginių paruošimas tyrimams

Kraujas tyrimams buvo imtas iš venos, laikantis kraujo paėmimo technikos reikalavimų, naudojant vakuuminės sistemos (*Vacutainer*®, *BD*, *JAV*):

- ANA, anti-CCP, CRB, RF, anti-dsDNR nustatymo tyrimams be antikoagulianto;
- ENG su buferiniu natrio citratu.

Per 1,5 val. nuo paėmimo pristatyta į laboratoriją, esant +18–+25°C temperatūrai. Mėginiai koduoti laikantis vidinės tvarkos taisyklių. Vėliau serumas buvo atskirtas nuo kraujo ląstelių per 2 valandas nuo ėminio paėmimo centrifuguojant 1300–2000 g. 10 min. ENG tyrimas atliktas iš viso kraujo.

Mėginių laikymo sąlygos iki ištyrimo:

- Anti-CCP analizei mėginiai iki tyrimo pradžios laikyti +4–+8°C temperatūroje 48 valandas arba -20°C temperatūroje – ilgesnį laiką.
- RF tyrimui atskirtas serumas laikytas kambario temperatūroje (+18–+25°C) ne ilgiau kaip 8 valandas, iki 7 dienų – nuo +2°C iki +8°C temperatūroje. Mėginių šaldyti nerekomenduojama.
- CRB tyrimui atskirtas serumas iki 8 valandų laikytas kambario temperatūroje (+18–+25°C), iki 48 valandų +2–+8°C temperatūroje.
- ENG tyrimas atliktas iš karto, kai kraujas atgabentas į laboratoriją.
- Jei anti-dsDNR tyrimo nebuvo galima atlikti per 8 valandas, serumo mėginiai laikyti šaldytuve (+2–+8°C temperatūroje) iki 48 valandų, ilgesniam laikui – -20°C temperatūroje.
- ANA analizei mėginiai iki tyrimo pradžios laikyti +2–+8°C temperatūroje, bet ne ilgiau kaip 14 dienų.

Imunologiniams tyrimams nenaudoti ryškiai hemolizuoti, lipeminiai, su padidėjusiu bilirubino kiekiu mėginiai. Su paciento mėginiais, kontroliniais mėginiais, stikleliais, visomis kitomis naudojamomis priemonėmis ir reagentais elgtasi kaip su potencialiai infekuotomis medžiagomis, laikantis higienos

reikalavimų. Visi mėginiai, reagentai ir panaudotos priemonės išmesti ir tvarkyti laikantis vidinių laboratorijos reikalavimų.

2.3 Tyrimo metodai

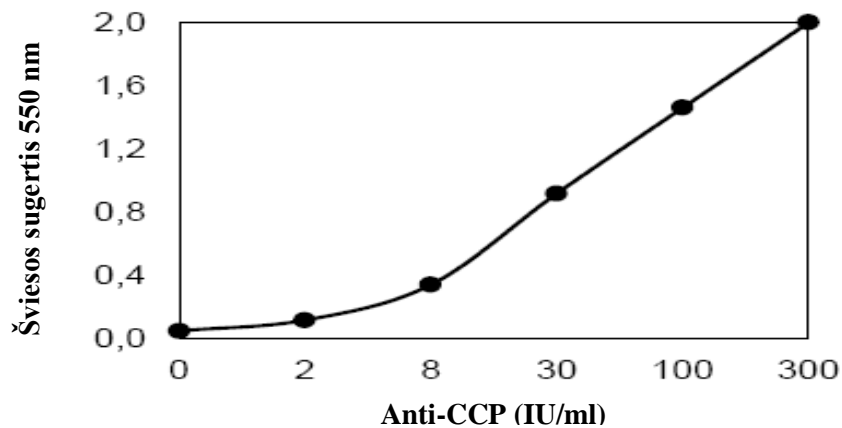
2.3.1 Anti-CCP kraujo serume nustatymas

Anti-CCP tyrimo metodas paremtas imunofermentine (ELISA) reakcija ir yra skirtas kokybiniam ir pusiau kiekybiniam IgG tipo antikūnų prieš ciklinį citrulinizuotą peptidą (CCP) nustatymui žmogaus serume. Tyrimas atliktas naudojant Gemini (*Stratec Biomedical Systems*, Vokietija) analizatorių, remtasi EDIA Anti-CCP (*EURO DIAGNOSTICA*, Švedija) metodika.

Tyrimo naudojami mikrošulinėliai padengti cikliniu citrulinizuotu peptidu (antigenu). Paciento serumas lašinamas į šulinėlį ir inkubuojamas. Jei tiriamajame mėginyje yra specifinių antikūnų, jie surišami su šulinėlyje esančiu antigenu, susidarant antigeno-antikūno kompleksui. Nesusirišę elementai nuplaunami ir pridedama šarminė fosfatazė žymėtų antikūnų prieš žmogaus imunoglobuliną G. Toliau vykdomas plovimas ir inkubacija su chromogeniniu substratu. Matoma spalvinė reakcija, spalvos intensyvumas yra tiesiogiai proporcingas antikūnų kiekiui.

Iki tyrimo atlikimo visi reagentai laikyti nuo +2°C iki +8°C temperatūroje. Prieš tyrimo atlikimą, visi reagentai sušildyti iki kambario temperatūros (+18–+25°C), sumaišyti švelniai vartant. Atskiestas reikiamas kiekis plovimo buferio ir mėginio skiediklio bei į specialų rėmelį sudėti mikrošulinėliai. Į reikiamas analizatoriaus stovų vietas įdėti kalibratoriai, kontrolės, reagentai, paruoštos reakcijų plokštelės (mikrošulinėliai). Atliktas programavimas ir užsakytas reikiamas tyrimas (anti-CCP). Analizatorius atliko reikiamus pilstymus, plovimus, inkubacijas, įpylė konjugato, substrato, „stop“ reagento. Matuota šviesos sugertis 540–565 nm bangos ilgiuose.

Kiekybinis rezultatų vertinimas atliktas naudojant standartinę kalibracinę kreivę (4 paveikslas), kuri sudaryta pagal išmatuotas kalibratorių optinio tankio vertes. Rezultatai vertinti pagal gamintojo nurodytas normas ribas: neigiama reikšmė ≤ 5 IU/ml, teigiama reikšmė > 5 IU/ml.



4 pav. Anti-CCP tyrimo kalibracinė kreivė (EURO DIAGNOSTICA, Švedija)

2.3.2 C-reaktyvaus baltymo (CRB) ir reumatoidinio faktoriaus (RF) kraujo serume nustatymas

Tyrimai skirti kiekybiškai nustatyti C-reaktyvaus baltymo (CRB) ir reumatoidinio faktoriaus (RF) kieki kraujo serume. Šiame darbe remtasi SYNCHRON System(s) Chemistry Information Sheet (CRP 2014 ir RF 2010, *Beckman Coulter*, JAV) metodikomis. Kiekybiniam CRB ir RF nustatymui naudotas Beckman Coulter (*Beckman Coulter, Inc., 250 S. Kraemer Blvd., Brea, JAV*) SYNCHRON UniCel® DxC 800 biocheminis analizatorius.

CRB ir RF koncentracijos nustatytos turbidimetriniu metodu naudojant C-reaktyvaus baltymo reagentą SYNCHRON® Systems C-Reactive Protein Reagent ir reumatoidinio faktoriaus reagentą SYNCHRON® Systems Rheumatoid Factor Reagent. Šio metodo esmė yra netirpių agregatų, sukeliančių drumstumą, susidarymas prisijungiant antigenams ir antikūnams. Analizatorius matuoja absorbcijos kitimus esant 600 nm (CRB) ir 380 nm (RF) bangos ilgiams. Absorbcijos kitimai proporcingi CRB ir RF koncentracijoms mėginiuose. Rezultatai pateikiami skaitine reikšme mg/l (CRB) ir IU/l (RF) pagal nustatytas kalibracines kreives.

Reagentai stabilūs 60 dienų nuo atidarymo pradžios, laikant juos +2°C–+8°C temperatūroje. Gamintojas rekomenduoja naudoti šviežius serumo mėginius, o ne šviežius plazmos mėginius. Mėginiai, kurių koncentracijos viršija viršutines analizinio diapazono ribas, turi būti skiedžiami fiziologiniu tirpalu ir ištirti pakartotinai, rezultata dauginant iš praskiedimo santykio, tačiau tokių atvejų mūsų tyrime nebuvo.

Siekiant užtikrinti tyrimų teisingumą ir tikslumą, buvo atlikta kalibravimo procedūra. Įprastai SYNCHRON UniCel® DxC 800 biocheminio analizatoriaus kalibracija vykdoma kas 30 dienų arba pasikeitus reagentų pagaminimo partijos (LOT) numeriui, kontrolės reikšmėms neatitikus numatytų reikšmių. Naudotas SYNCHRON® Systems CAL 5 Plus kalibratorius. Kalibracija patvirtinta atliekant dviejų lygių kontroles, o kalibracijos duomenų protokolai susegti į bylą.

Rezultatai vertinti pagal gamintojo nurodytas normos ribas kraujo serume: CRB $\leq 7,5$ mg/l; RF ≤ 14 IU/ml.

2.3.3 Eritrocitų nusėdimo greičio (ENG) nustatymas

Eritrocitų nusėdimo greitis – nespecifinis uždegiminis žymuo. Mėgintuvėlius su krauju laikant vertikaliai, eritrocitai veikiami gravitacijos atsiskiria nuo plazmos ir leidžiasi žemyn. ENG metodo esmė yra nustatyti, kiek milimetrų per valandą eritrocitai nusės žemyn.

ENG nustatymo mechanizmas susideda iš trijų etapų:

- Agregacija. Tai pradinis etapas, kuriame vyksta eritrocitų kaupimasis. Šis reiškinys vadinamas cilindru (*angl. rouleaux*) formavimusi;
- Antrajame etape vyksta eritrocitų leidimasis žemyn. Tai trunka 30–40 minučių;
- Susipakavimo etapas, dar kitaip vadinamas stabili fazė, kurioje eritrocitai nustoja leistis žemyn.

Tyrimai atlikti BD Sedi-15 (*BD Diagnostics*, Jungtiniai Arabų Emyratai) analizatoriumi. Analizatorius pilnai automatizuotas, naudoja Westergren metodą, rezultatus pateikia per pusvalandį, vienu metu galima tirti 15 mėginių. Rezultatai vertinti pagal gamintojo nurodytas normos ribas: vyrams iki 50-ies metų 1–15 mm/val., moterims iki 50-ies metų 2–20 mm/val., vyrams virš 50-ies metų 1–20 mm/val., moterims virš 50-ies metų 2–30 mm/val.

2.3.4 Antikūnų prieš ląstelių branduolių antigenus (ANA) serume nustatymas

Tyrimas skirtas kokybiškai arba pusiau kiekybiškai nustatyti žmogaus imunoglobulinų G, M, A (IgG, IgM, IgA) klasės antikūnus ir antikūnų titrą prieš ląstelių branduolių antigenus pacientų mėginiuose *in vitro*, tinkamas daugelio autoimuninių ligų, ypač reumatinių, diagnostikai. Šiame darbe atliktas tik kokybinis vertinimas, remiantis metodika: „NIFT Mozaika: HEp-2/kepenų (beždžionės) Netiesioginės imunofluorescencijos tyrimo instrukcija“ (*EUROIMMUN AG, kat. nr. FA 1510-1010-1*, Vokietija).

Antikūnus prieš ląstelių branduolių antigenus pavyksta nustatyti daugelyje įvairių substratų. Naudojant BIOCHIP technologiją, skirtingus substratus galima apjungti į vieną tyrimo laukelį (sudėtinis tyrimas) ir inkubuoti su vienu paciento serumu. Substratų kombinacija iš HEp-2 ląstelių ir su primatų kepenimis leidžia patvirtinti rezultatus ir juos diferencijuoti jau ANA skrinimo stadijoje. HEp-2 ląstelės optimizuotos taip, kad suformuotų daugiau mitozės stadijos ląstelių. Dėl to palengvėja ANA švytėjimų, kuriuos reikia vertinti mitozės stadijoje, analizė.

Prieš atliekant tyrimą, mėginiai skiesti PBS-Tween tirpalu santykiu 1:100 (10,1 µl mėginio praskiesta 1000 µl PBS-Tween) ir 4 sekundes gerai išmaišyti su Vortex tipo kratykle. Praskiesti mėginiai inkubuoti tą pačią dieną. Inkubacijos metu vyksta komplekso susidarymo reakcija tarp Hep-2 ląstelėse esančių antigenų ir tiriamojo paciento kraujo serume esančių antigenų specifinių antikūnų. Ag-Ak komplekso susidarymo reakcija vykdyta ant specialių tyrimui naudojamų objektinių stiklelių. Nespecifiniai antigenai antikūnams pašalinti švelniai nuskalaujant plovimo buferiu objektinį stiklėlį. Plovimas atliktas atsargiai, kad neįvyktų užteršimas tarp reakcijų laukelių. Ant kiekvieno reakcijos laukelio užnešta po lašą fluorescenciškai žymėtų monokloninių antikūnų prieš žmogaus imunoglobulinus. Reakcija stebėta ir vertinta tamsioje patalpoje fluorescenciniu mikroskopu naudojant specialų FITC filtrą. Ag-Ak komplekso susidarymo vietoje stebėtas žalios spalvos švytėjimas.

Naudotas reagentų rinkinys „IIFT Mosaic: HEp-2/Liver (Monkey)“ (*EUROIMMUN AG, kat. nr. FA 1510-1010-1, Vokietija*). Iki tyrimo pradžios reagentai laikyti nuo +2°C iki +8°C temperatūroje. Objektiniai stikleliai, fluoresceinu žymėti konjuguoti antikūnai (FITC), teigiami ir neigiami kontroliniai mėginiai paruošti naudoti. Konjugatas jautrus šviesai, todėl saugota nuo saulės spindulių. Kontrolinis mėginys skiestas PBS-Tween tirpalu. Dengiamoji terpė – glicerolis paruoštas naudoti. Laboratorinės plokštelės duobutės hidrofiliškos, o aplinkinis plotas hidrofobiškas.

Tyrimo atlikimo eiga:

- 1) Po 30 µl praskiesto serumo mėginio pipete lašinta ant BIOCHIP stiklelių reakcijos laukelių.
- 2) Inkubuota 30 min kambario temperatūroje (nuo +18°C iki +25°C).
- 3) BIOCHIP stikleliai paeiliui plauti PBS-Tween tirpalo srovele ir tuoj pat pamerkti į kiuvetę su PBS-Tween tirpalu (trukmė 5 min).
- 4) Pipete į kiekvieną reakcijos laukelį įlašinta po 25 µl fluoresceinu žymėtų antikūnų prieš žmogaus globulinus.
- 5) Inkubuota 30 min kambario temperatūroje (nuo +18°C iki +25°C). Plokštelės saugotos nuo tiesioginių saulės spindulių.
- 6) BIOCHIP stikleliai paeiliui plauti PBS-Tween tirpalo srovele ir tuoj pat pamerkti į kiuvetę su PBS-Tween tirpalu (trukmė 5 min).
- 7) Dengiamasis skystis užlašintas ant dengiamojo stiklelio – ne daugiau kaip 10 µl į vieną reakcijos duobutę. BIOCHIP stiklelis išimtas iš kiuvetės, sugeriamuoju popieriumi nusausinta nugarinė plokštelės pusė ir visi kraštai. BIOCHIP stikleliai su žemyn nukreiptais reakcijos laukeliais padėti ant paruoštų dengiamųjų stiklelių.

- 8) Fluorescencija vertinta mikroskopu. Bendrosios nuostatos: 40x didinantis objektyvas (ląstelių substratams); sužadavimo filtras: 450–490 nm; spalvos atskyrimas: 510 nm; blokuojamasis filtras: 515 nm; šviesos šaltinis: gyvsidabrio lempa (100 W, EUROIMMUN LED, EUROStar Bluelight, Vokietija).

Kiekviename laukelyje vertintos HEP-2 interfazinės ir mitotinės ląstelės. Vertintas švytėjimo tipas (homogeninis, smulkiai grūdėtas, stambiai grūdėtas, centromerinis, branduolėlių) ir švytėjimo intensyvumas (plusais). Jei specifinio branduolio švytėjimo nėra arba jis labai silpnas, mėginys vertintas kaip neigiamas.

Jeigu teigiamas kontrolinis mėginys neturi tipinio fluorescencijos vaizdo arba neigiamas kontrolinis mėginys ryškiai fluorescuoja, tokių rezultatų negalima vertinti ir tyrimą reikia atlikti iš naujo. Rekomenduojamas kokybinis vertinimas pateiktas 3 lentelėje.

3 lentelė. Rekomenduojamas kokybinis ANA tyrimo vertinimas

ANA reakcija (IgG)	Rezultatas
Nėra reakcijos esant 1:100	Neigiamas, paciento mėginyje nenustatyta antikūnų prieš ląstelių branduolius.
Teigiama reakcija esant 1:100	Pėdsakai. Jei imunofluorescencinis švytėjimas yra homogeninis, švyti centromeros, taškinės branduolio struktūros, Jo-1 arba matomas būdingas SS-A/SS-B, Sm/RNP švytėjimo vaizdas, tai gali būti įvairių reumatinių arba kitų ligų požymis
Teigiama reakcija esant 1:320	Teigiamas. Rodo autoimunines reumatines arba kitas ligas.

Teigiama reakcija esant 1:100 vertinta 1+, 1:320 – 2+, 1:1000 – 3+. Švytėjimo intensyvumui esant $\geq 2+$, rekomenduotinas tolesnis ištyrimas ieškant specifinių autoantikūnų.

2.3.5 Antikūnų prieš dvispiralę DNR (anti-dsDNR) nustatymas kraujo serume

Tyrimo metodas skirtas kiekybiškai nustatyti antikūnus prieš dvigrandės dezoksiribonukleorūgšties (dsDNR) antigenus pacientų kraujo serume. Antikūnų prieš dsDNR antigenus nustatymas paremtas kietos fazės fermentine imunine reakcija, naudojant žmogaus rekombinantinę dvigrandę DNR kokybiniam ir kiekybiniam IgG klasės antikūnų prieš dsDNR antigenus (anti-dsDNR) nustatymui paciento serume. Anti-dsDNR dažniausiai atpažįsta fosfatinę DNR dalį, todėl šie autoantikūnai taip pat gali jungtis ir prie viengrandės DNR (ssDNR). Norint teisingai atlikti kiekybinį anti-dsDNR nustatymą, reikia saugotis nuo ssDNR kontaminacijos.

Serumo mėginiai, praskiesti santykiu 1:101, inkubuoti mikroplokštelėse, padengtose specifiniu antigenu. Jei tiriamajame mėginyje buvo specifinių antikūnų, jie prisijungė prie antigenų, susidarant Ag-Ak kompleksams. Nesusijungę komponentai išplauti. Antikūnai prieš žmogaus imunoglobulinus, žymėti krienų peroksidaze, inkubuoti kartu su kompleksais ir prie jų prisijungė. Nesusijungęs konjugatas išplautas. Pridėtas TMB substratas sukėlė fermentinę spalvinę (mėlyną) reakciją, kuri stabdyta specialiu rūgštiniu reagentu („stop“ reagentu) ir reakcijos spalva iš mėlynos tapo geltona. Spalvos intensyvumas tiesiogiai proporcingas specifinių antikūnų kiekiui paciento serume.

Naudotas reagentų rinkinys „Aeskulisa dsDNAG“ (*Aesku Diagnostics*, Vokietija). Visi reagentai ir mikroplokštelės laikyti šaldytuve (+2–+8°C temperatūroje). TMB substratas saugotas nuo šviesos. Prieš naudojimą, visi reagentai sušildyti iki kambario temperatūros. Inkubacijai naudota +30°C temperatūra. Tyrimas atliktas naudojant Gemini (*Stratec Biomedical Systems*, Vokietija) analizatorių. Prieš pradėdant atlikti tyrimą, koncentruoti reagentai (mėginio buferis, plovimo buferis) ir mėginiai buvo praskiesti, paruoštas reikiamas kiekis šulinėlių. Rekomenduojama gamintojo pipetavimo schema pateikta 4 lentelėje.

4 lentelė. CalA – kalibratorius A, CalB – kalibratorius B ir t.t., PC – teigiama kontrolė, NC – neigiama kontrolė, P1 – 1 pacientas, P2 – 2 pacientas ir t.t.

	1	2	3	4...
A	Cal A	Cal E	P1	
B	Cal A	Cal E	P1	
C	Cal B	Cal F	P2	
D	Cal B	Cal F	P2	
E	Cal C	PC	P3	
F	Cal C	PC	P3	
G	Cal D	NC	...	
H	Cal D	NC	...	

Į atitinkamus analizatoriaus stovus sudėti reikiami reagentai, kontrolinės medžiagos, kalibratoriai, reakcijų plokštelės (mikrošulinėliai). Analizatorius atliko supilstymus, inkubacijas, plovimus, įpiltas konjugatas, substratas, „stop“ reagentas. Matuota šviesos sugertis 450 nm bangos ilgyje.

Kiekybinis rezultatų vertinimas atliktas naudojant standartinę kalibracinę kreivę, kuri sudaryta pagal išmatuotas kalibratorių optinio tankio vertes. Rezultatai vertinti pagal gamintojo nurodytas normos ribas: neigiama reikšmė ≤ 12 IU/ml, teigiama reikšmė > 12 IU/ml.

2.3.6 Statistinė analizė

Darbo statistinė duomenų analizė buvo atlikta naudojant statistinį duomenų analizės paketą SPSS (angl. *Statistical Package for Social Science*) 20.0 versiją.

Kiekybinių kintamųjų aprašomoji statistika pateikiama vidurkiu ir standartiniu nuokrypiu arba standartine paklaida (vidurkis \pm SD arba vidurkis \pm SE); kokybinių – absoliučiuoju skaičiumi (n) ir procentine dalimi (proc.). Statistinės duomenų analizės rezultatai pateikiami lentelėse. Pateikiant rezultatus, nurodomas statistinių hipotezių patikimumas.

Priklausomybės tarp ranginių kintamųjų analizei naudotos požymių dažnių lentelės (*Crosstab*). Statistinių ryšių įvertinimui naudotas susijusių požymių *Chi* kvadrato (χ^2) kriterijus ir Fišerio tikslusis testas (mažoms imtims). Kiekybinių dydžių pasiskirstymų pagal normalųjį skirstinį nustatymui taikytas *Kolmogorov–Smirnov*'o testas. Jei skirstinys nebuvo pasiskirstęs pagal normalųjį skirstinį, imčių vidurkiams lyginti naudotas *Mann–Whitney U* testas. Jei skirstinys normalus, imčių vidurkiams (vidurkis ir standartinis nuokrypis) palyginti naudotas *Student*'o t-testas. Dispersinė analizė (*ANOVA*) naudota stebėti kraujo žymenų koncentracijų vidurkių pasiskirstymui tarp pacientų grupių. Siekiant įvertinti statistinį ryšį tarp kintamųjų, taikyti *Pearson*'o ir *Spearman*'o koreliacijos koeficientai. Koreliacija laikyta labai stipria, kai koreliacijos koeficientas $r > \pm 0,9$, stipria, kai $r = \pm 0,7 - \pm 0,9$, vidutine, kai $r = \pm 0,5 - \pm 0,7$, silpna, kai $r = \pm 0,3 - \pm 0,5$.

Rezultatai laikyti statistiškai reikšmingi, kai statistinio patikimumo lygmuo $p < 0,05$.

3. REZULTATAI

3.1 Tiriamųjų, sergančių reumatologinėmis ligomis, pasiskirstymas pagal lytį ir amžių

Tiriamųjų, kuriems, įtariant reumatoidinį artritą, atlikti RF, anti-CCP, CRB, ENG, ANA, anti-dsDNR tyrimai, amžius buvo nuo 20-ies iki 90-ies metų (vidurkis 58,2±17,8 metai).

Iš 154 tiriamųjų 65 (42,2 proc.) sirgo seropozityviu reumatoidiniu artritu, 44 (28,6 proc.) – seronegatyviu RA, 22 tiriamieji (14,3 proc.) sirgo kitomis artropatijomis, o 23 tiriamieji (14,9 proc.) – sisteminėmis jungiamojo audinio ligomis (SJAL). Tiriamųjų pasiskirstymas pagal lytį pateiktas 5 lentelėje.

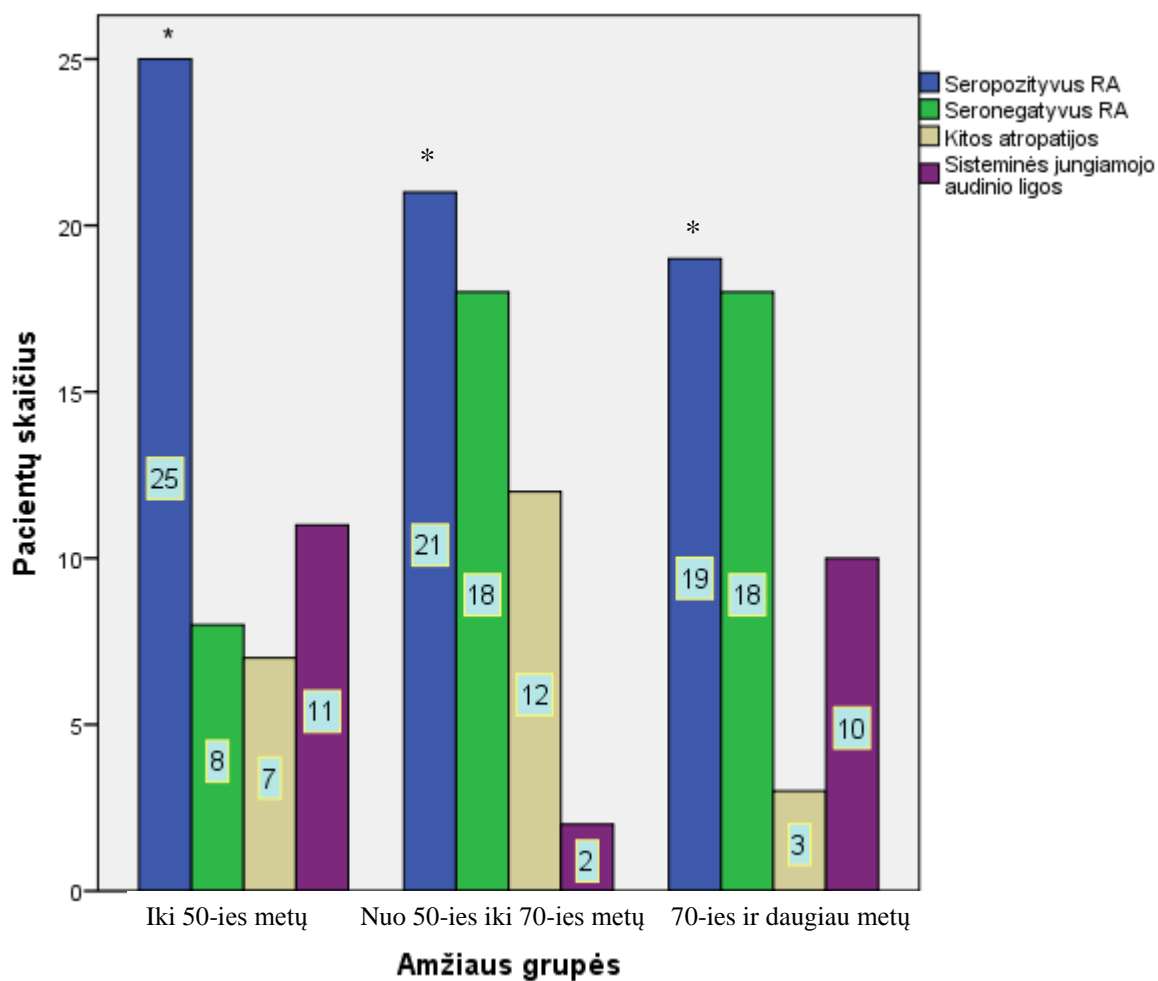
5 lentelė. Tiriamųjų pasiskirstymas pagal lytį ir ligą

Ligų grupės	Tiriamieji N=154	
	Vyrai, n (proc.)	Moterys, n (proc.)
Seropozityvus RA	21 (13,6)	44 (28,6)
Seronegatyvus RA	11 (7,1)	33 (21,4)
Kitos artropatijos	8 (5,2)	14 (9,1)
SJAL	8 (5,2)	15 (9,7)

N – visų tiriamųjų skaičius, n – tiriamųjų skaičius grupėje, RA – reumatoidinis artritas, SJAL – sisteminė jungiamojo audinio liga

Vyrai ir moterys dažniausiai sirgo seropozityviu reumatoidiniu artritu (43,8 proc. ir 41,5 proc., atitinkamai), šiek tiek mažiau buvo sergančiųjų seronegatyviu RA (22,9 proc. ir 21,4 proc., atitinkamai). Kitų artropatijų ir SJAL atvejų skaičius beveik vienodas. Moterų ir vyrų skaičius kiekvienoje grupėje apytiksliai pasiskirstė santykiu 2:1, o moterų, sergančių seronegatyviu RA, buvo tris kartus daugiau nei vyrų.

Visi tiriamieji buvo suskirstyti ir į amžiaus grupes: I-oje amžiaus grupėje – iki 50-ies metų, nuo 50-ies iki 70-ies metų tiriamieji priskirti II-ai amžiaus grupei, III-ioje amžiaus grupėje – 70-ies ir daugiau metų tiriamieji. Pacientų pasiskirstymas amžiaus grupėse pagal ligas pavaizduotas 5 paveiksle.



5 pav. Pacientų pasiskirstymas amžiaus grupėse pagal ligas

RA – reumatoidinis artritas

* $p < 0,05$

Statistiškai reikšmingai ($p=0,009$) dažniau seropozityviu RA sirgo jauniausi pacientai (38,5 proc.) lyginant su vyresniais (32,3 proc. ir 29,2 proc.), o seronegatyviu RA jauniausi pacientai sirgo rečiau (18,2 proc.) nei vyresni (40,9 proc. ir 40,9 proc.). Kitomis artropatijomis rečiausiai sirgo – I-os ir III-ios amžiaus grupių tiriamieji (31,8 proc. ir 13,6 proc., atitinkamai), o SJAL – II-os amžiaus grupės tiriamieji (8,7 proc.).

Nagrinėjant tiriamųjų pasiskirstymą amžiaus grupėse pagal lytį ir ligą (6 lentelė) rasta, kad seropozityviu RA dažniausiai sirgo jauniausi vyrai ir vyriausios moterys, o seronegatyviu RA – vyriausi vyrai ir II-os amžiaus grupės moterys. Šios grupės moterys dažniau sirgo ir kitomis artropatijomis.

6 lentelė. Tiriamųjų pasiskirstymas amžiaus grupėse pagal lytį ir ligą

Tiriamųjų grupės		Tiriamieji, n (proc.)			
		Seropozityvus RA	Seronegatyvus RA	Kitos artropatijos	SJAL
I-oji amžiaus grupė	Vyrai	11 (22,9)	1 (2,1)	5 (10,4)	4 (8,3)
	Moterys	14 (13,2)	7 (6,6)	2 (1,9)	7 (6,6)
II-oji amžiaus grupė	Vyrai	7 (14,6)	4 (8,3)	2 (4,2)	1 (2,1)
	Moterys	14 (13,2)	14 (13,2)	10 (9,4)	1 (0,9)
III-ioji amžiaus grupė	Vyrai	3 (6,2)	6 (12,5)	1 (2,1)	3 (6,2)
	Moterys	16 (15,1)	12 (11,3)	2 (1,9)	7 (6,6)

n – tiriamųjų skaičius grupėje, RA – reumatoidinis artritas, SJAL – sisteminė jungiamojo audinio liga. I-oji amžiaus grupė – iki 50-ies metų tiriamieji; II-oji amžiaus grupė – nuo 50-ies iki 70-ies metų tiriamieji; III-ioji amžiaus grupė – 70-ies metų ir vyresni tiriamieji.

3.2 Laboratorinių kraujo tyrimų rezultatų sąsajos su sergančiųjų reumatologinėmis ligomis lytimi ir amžiumi

Atliktų laboratorinių kraujo tyrimų rezultatų vidutinės reikšmės visiems tiriamiesiems viršijo nustatytas normos ribas: anti-CCP 64,93±10,23 IU/ml, RF 90,51±12,43 IU/ml, CRB 48,45±4,24 mg/l, ENG 48,56±3,04 mm/val, anti-dsDNR 16,97±5,92 IU/ml. 7 lentelėje pateiktos tyrimų rezultatų vidutinės reikšmės tiriamųjų amžiaus grupėse vyrams ir moterims.

Vyrų anti-CCP tyrimo rezultatai statistiškai reikšmingai didesni nei moterų ($p=0,042$), o analizuojant atskirose amžiaus grupėse, vyrams statistiškai reikšmingai didesni rezultatai išlieka I-oje ir II-oje amžiaus grupėse ($p<0,01$ ir $p=0,029$, atitinkamai). Vyriausiems abiejų lyčių pacientams anti-CCP tyrimo rezultatai panašūs. Patys didžiausi tarp visų grupių anti-CCP tyrimo rezultatai nustatyti II-os amžiaus grupės vyrams (vidutinė reikšmė 127,54 IU/ml), o pats didžiausias RF rezultatas nustatytas jauniausiems vyrams (vidutinė reikšmė 146,91 IU/ml). II-oje amžiaus grupėje RF tyrimo rezultatai statistiškai reikšmingai didesni vyrams nei moterims ($p<0,01$). Kuo vyresni vyrai, tuo mažesni RF tyrimo rezultatai. Jauniausiems vyrams nustatyta statistiškai reikšmingai ($p<0,01$) didesnė ENG reikšmė, lyginant su tokio paties amžiaus moterimis. Didžiausi CRB ir anti-dsDNR tyrimų rezultatai nustatyti III-ios amžiaus grupės moterims (vidutinės reikšmės 58,83 mg/l ir 39,98 IU/ml), o anti-dsDNR tyrimo reikšmė šioje amžiaus grupėje moterims statistiškai reikšmingai didesnė nei vyrams ($p<0,01$).

7 lentelė. Laboratorinių kraujo tyrimų rezultatų vidutinės reikšmės amžiaus grupėse pagal lytį

Tiriamųjų grupės		Tyrimas, rezultatų vidutinė reikšmė±SE				
		Anti-CCP (IU/ml)	RF (IU/ml)	CRB (mg/l)	ENG (mm/val.)	Anti-dsDNR (IU/ml)
Visi tiriamieji	Vyrai	97,09±22,21*	103,70±23,98	39,52±6,12	55,49±5,65	6,29±1,70
	Moterys	51,56±10,90*	84,06±14,37	52,70±5,50	45,38±3,57	21,05±8,02
I-oji amžiaus grupė	Vyrai	94,66±31,33*	146,91±45,97	47,70±10,18	67,67±7,75*	†
	Moterys	43,83±18,48*	109,44±28,13	44,00±9,55	39,14±6,21*	†
II-oji amžiaus grupė	Vyrai	127,54±47,01*	97,16±34,02*	29,11±8,89	44,08±10,11	†
	Moterys	51,11±18,47*	42,93±11,61*	52,45±8,66	46,59±5,30	10,29±3,72
III-ioji amžiaus grupė	Vyrai	58,30±39,09	50,93±36,72	37,53±12,32	51,67±11,41	5,01±1,29*
	Moterys	58,59±19,95	105,19±30,54	58,83±10,13	48,25±6,80	39,98±22,65*
Normų ribos	Vyrai	<5 IU/ml	<14 IU/ml	<7,5 mg/l	<20 mm/val.	<12 IU/ml
	Moterys				<30 mm/val.	

*p<0,05

SE – standartinė paklaida, † – tyrimas atliktas mažiau nei 5 tiriamiesiems;

I-oji amžiaus grupė – iki 50-ies metų tiriamieji; II-oji amžiaus grupė – nuo 50-ies iki 70-ies metų tiriamieji; III-ioji amžiaus grupė – 70-ies metų ir vyresni tiriamieji.

Viršijantys normą anti-CCP, RF, CRB ir ENG tyrimų rezultatai nustatyti tiriamiesiems, sergantiems seropozityviu RA (8 lentelė). Visiems tiriamiesiems, sergantiems seropozityviu reumatoidiniu artritu, nustatyti didesni anti-CCP, RF, CRB ir ENG tyrimų rezultatai, lyginant su kitomis ligomis sergančiais tiriamaisiais. Sergančiųjų seronegatyviu reumatoidiniu artritu grupėje moterims nustatyti statistiškai reikšmingai (p=0,048) didesni anti-dsDNR tyrimo rezultatai nei vyrams. Tiriamųjų, sergančių SJAL, grupėje statistiškai reikšmingai didesni anti-CCP, RF ir ENG tyrimų rezultatai nustatyti vyrams lyginant su moterimis (p<0,01, p=0,044, p=0,048, atitinkamai).

8 lentelė. Tyrimų rezultatai priklausomai nuo ligos ir lyties

Ligų grupės	Lytis	Tyrimas, rezultatų vidutinė reikšmė±SE				
		Anti-CCP (IU/ml)	RF (IU/ml)	CRB (mg/l)	ENG (mm/val.)	Anti-dsDNR (IU/ml)
Seropozityvus RA	Bendras	147,35±17,62	204,32±20,55	57,68±7,38	58,47±5,26	7,12±1,29
	Vyrai	191,51±29,16	242,14±38,51	43,95±9,54	63,69±9,51	†
	Moterys	124,56±21,23	186,80±24,04	64,72±9,94	56,22±6,36	6,84±1,72

8 lentelės tęsinys

Seronegatyvus RA	Bendras	2,50±0,13	1,58±0,27	53,62±8,46	43,54±5,18	21,68±8,42
	Vyrai	2,45±0,28	1,09±0,38	44,63±15,91	50,22±13,07	5,74±2,25*
	Moterys	2,51±0,15	1,78±0,34	56,81±10,07	41,23±5,43	28,45±11,63*
Kitos artropatijos	Bendras	2,18±0,26	1,53±0,31	46,08±7,98	53,70±5,32	†
	Vyrai	2,04±0,60	1,51±0,51	43,25±14,24	65,13±10,17	†
	Moterys	2,24±0,28	1,55±0,39	47,70±9,94	46,08±4,94	†
SJAL	Bendras	2,60±0,45	2,48±1,21	16,40±3,66	20,25±3,37	†
	Vyrai	3,58±1,43*	5,99±3,58*	17,14±6,46	28,67±6,05*	†
	Moterys	2,15±0,09*	0,85±0,18*	16,00±4,60	15,20±3,23*	†
Normų ribos	Vyrai	<5 IU/ml	<14 IU/ml	<7,5 mg/l	<20 mm/val.	<12 IU/ml
	Moterys				<30 mm/val.	

*p<0,05

SE – standartinė paklaida, RA – reumatoidinis artritas, SJAL – sisteminė jungiamojo audinio liga;

† – tyrimas atliktas mažiau nei 5 tiriamiesiems

3.3 Laboratorinių kraujo tyrimų rezultatų tarpusavio ryšiai, sergantiesiems reumatologinėmis ligomis, priklausomai nuo lyties ir amžiaus

Uždegiminis komponentas stebėtas sergantiesiems seropozityviu ir seronegatyviu RA – vidutinio stiprumo ryšys rastas tarp CRB ir ENG rezultatų (atitinkamai $r=0,452$, $r=0,577$; $p<0,01$). II-os amžiaus grupės tiriamiesiems, sergantiems seropozityviu RA, ryšys dar stipresnis ($r=0,527$, $p=0,025$), o I-os amžiaus grupės tiriamiesiems, sergantiems seronegatyviu RA, šis ryšys pats stipriausias ($r=0,879$, $p=0,049$). Išanalizavus tiriamuosius atsižvelgiant į lytį, tarp šių tyrimų rezultatų išlieka vidutinio stiprumo ryšys, tačiau tiek seropozityvaus RA, tiek seronegatyvaus RA atveju, vyrams šis ryšys stipresnis (atitinkamai $r=0,628$, $r=0,837$; $p<0,01$) lyginant su moterimis (atitinkamai $r=0,413$, $r=0,495$; $p=0,014$). Nustatytas vidutiniškai stiprus neigiamas ryšys tarp šių tiriamųjų amžiaus ir ENG – kuo jaunesnis tiriamasis, tuo didesnis ENG rezultatas ($r=-0,620$, $p=0,010$).

Šio tyrimo metu vidutiniškai stiprus ryšys nustatytas tarp anti-CCP ir RF tyrimų rezultatų: didesnė anti-CCP koncentracija susijusi su didesne RF rezultato reikšme kraujyje vyrams $r=0,596$ bei moterims $r=0,550$, ($p<0,01$), ypač I-os amžiaus grupės (atitinkamai $r=0,758$, $r=0,782$; $p<0,01$), taip pat jauniausiems tiriamiesiems, sergantiems seropozityviu RA ($r=0,559$, $p=0,030$). Moterims taip pat didesnis RF rezultatas susijęs su didesniu ENG ($r=0,340$, $p=0,003$), ypač vyriausioje amžiaus grupėje ($r=0,432$,

p=0,019). Pagal reumatoidinio artrito diagnostikos kriterijus, sergant seropozityviu RA, didesni anti-CCP ir RF tyrimų rezultatai turėtų būti tiesiogiai susiję su uždegiminių komponentų koncentracijų padidėjimu kraujyje, tačiau mūsų atliktoje studijoje ryšiai tarp šių tyrimų rezultatų stebimi sergantiejiems seronegatyviu RA – išryškėjo sąsajos tarp didesnių anti-CCP ir didesnių CRB koncentracijų ($r=0,446$, $p=0,015$), ypač moterims ($r=0,419$, $p=0,046$). Vyrams, sergantiems seronegatyviu RA, didesnis RF rezultatas siejosi su didesniu CRB rezultatu ($r=0,663$, $p=0,026$).

Sergant SJAL, labai stiprūs teigiami ryšiai nustatyti tarp anti-CCP ir RF koncentracijų ($r=0,976$, $p<0,01$), ypač vyrams ($r=0,997$, $p<0,01$) ir jauniausiems tiriamiesiems ($r=0,998$, $p<0,01$). Vidutiniškai stiprus ryšys rastas tarp anti-CCP ir ENG ($r=0,628$, $p=0,039$), o RF ir ENG rezultatai tarpusavyje susiję labiau moterims ($r=0,666$, $p=0,036$) ir vyriausiems tiriamiesiems ($r=0,828$, $p<0,01$). Vyrams, sergantiems SJAL, netiesioginis ryšys išlieka tarp didesnio ENG rezultato ir jaunesnio amžiaus ($r=-0,999$, $p<0,01$), o moterims didesnė anti-CCP koncentracija siejasi su vyresniu amžiumi ($r=0,622$, $p=0,041$). Sergantiems kitomis artropatijomis tiriamiesiems nustatytas labai stiprus teigiamas ryšys tarp anti-CCP tyrimo rezultatų bei tiriamųjų amžiaus ($r=0,914$, $p<0,01$).

3.4 Kitų kliniškai reikšmingų veiksnių vertinimas sergantiejiems reumatologinėmis ligomis

Analizuotas ir antikūnų prieš branduolio antigenus (ANA) švytėjimas tiriamiesiems amžiaus grupėse ir pagal lytį, sergantiems seropozityviu ir seronegatyviu RA (9 lentelė). Nustatyti 38/109 (34,86 proc.) teigiami ANA švytėjimo atvejai.

9 lentelė. Teigiamų ANA švytėjimų pasiskirstymas sergantiems seropozityviu RA ir seronegatyviu RA

Amžiaus grupė	Teigiamas ANA švytėjimas, n/N			
	Seropozityvus RA		Seronegatyvus RA	
	Vyrai	Moterys	Vyrai	Moterys
I-oji amžiaus grupė	2/10	5/10	0/10	3/10
II-oji amžiaus grupė	0/8	5/8	1/8	2/8
III-ioji amžiaus grupė	3/20	5/20	2/20	10/20

N – bendras teigiamų ANA skaičius amžiaus grupėje, n – tiriamųjų skaičius grupėje
 I-oji amžiaus grupė – iki 50-ies metų tiriamieji; II-oji amžiaus grupė – nuo 50-ies iki 70-ies metų tiriamieji; III-ioji amžiaus grupė – 70-ies metų ir vyresni tiriamieji.

Teigiamų ANA švytėjimo atvejų skaičius panašus sergant tiek seropozityviu, tiek seronegatyviu reumatoidiniu artritu (20 ir 18 atitinkamai). Daugiausiai teigiamų ANA švytėjimo atvejų (20/38) nustatyta

III-ios amžiaus grupės tiriamiesiems, o I-oje ir II-oje amžiaus grupėse teigiamų ANA švytėjimų dažnis pasiskirstė beveik vienodai (10/38 ir 8/38 atitinkamai).

Kita autoimunine liga – autoimuniniu tiroiditu sirgo 3 (1,9 proc.) tiriamieji, iš jų 1 vyras ir 2 moterys. Rizikos veiksnius, tokius kaip nutukimas ir rūkymas, nurodė 7 (4,5 proc.) tiriamieji, iš jų 4 vyrai iki 50 metų amžiaus (2 sirgo seropozityviu RA, 2 kitomis artropatijomis) ir 3 II-os amžiaus grupės moterys, sirgusios kitomis artropatijomis. Rizikos veiksniai dažnesni jaunesniems vyrams (iki 50 metų amžiaus). 21 (13,6 proc.) tiriamasis persirgo infekcine streptokokine liga. Infekcijos buvo labiau būdingos jauniausiems vyrams (iki 50-ies metų amžiaus) ir vyriausioms moterims (70-ies ir daugiau metų amžiaus). Laboratorinių tyrimų rezultatų analizė atsižvelgiant į praeityje persirgtas infekcijas ir radiologinius sąnarių pakitimus, pateikta 10 lentelėje.

10 lentelė. Laboratorinių tyrimų rezultatų analizė atsižvelgiant į praeityje persirgtas infekcijas ir radiologinius sąnarių pakitimus

Požymis	Tiriamųjų skaičius, n	Tyrimas, rezultatų vidutinė reikšmė±SE				
		Anti-CCP (IU/ml)	RF (IU/ml)	CRB (mg/l)	ENG (mm/val.)	Anti-dsDNR (IU/ml)
Buvo infekcija	21	101,43±33,32	159,48±52,13*	68,69±13,44	66,39±9,92*	†
Nebuvo infekcijos	133	59,10±10,57	80,08±11,78*	45,49±4,40	45,53±3,06*	17,76±6,34
Yra radiologinių sąnarių pakitimų	125	73,50±11,63	96,18±13,91	46,83±4,68	49,26±3,29	14,75±5,67
Nėra radiologinių sąnarių pakitimų	29	21,60±16,51	62,41±26,86	55,78±10,03	45,27±7,98	23,97±17,67

*p<0,05

n – tiriamųjų skaičius, SE – standartinė paklaida, † – tyrimas atliktas mažiau nei 5 tiriamiesiems

Nustatyta, kad RF ir ENG tyrimų rezultatai statistiškai reikšmingai didesni (p=0,030) tiriamiesiems, persirgusiems streptokokine infekcija, taip pat žymiai didesni ir anti-CCP bei CRB tyrimų rezultatai.

Sąnarių skausmu skundėsi 153 (99,4 proc.) pacientai ir tik vienas (0,6 proc.) iš tiriamųjų sąnarių skausmo nenurodė. Mūsų atliktame tyrime 125 pacientams (81,2 proc.) taip pat nustatyti ir radiologiniai sąnarių pakitimai, iš jų 41 vyrui (32,8 proc.) ir 84 moterims (67,2 proc.), laboratorinių kraujo tyrimų

rezultatų sąsajos su radiologiniais sąnarių pakitimais pateikti 10 lentelėje. Dažniausiai, 56 tiriamiesiems (44,8 proc.), radiologiniai sąnarių pakitimai nustatyti sergantiesiems seropozityviu RA. Sergant kitomis ligomis radiologiniai sąnarių pakitimai nustatomi rečiau: seronegatyvaus RA atveju – 27 tiriamiesiems (21,6 proc.), sergant kitomis artropatijomis 19 tiriamųjų (15,2 proc.), SJAL – 23 tiriamiesiems (18,4 proc.).

Nustatyta, kad anti-CCP tyrimo rezultatai tiriamiesiems su radiologiniais sąnarių pakitimais ir be pakitimų apytiksliai pasiskirstė santykiu 3:1, atitinkamai. RF ir ENG tyrimų rezultatai taip pat didesni tiems pacientams, kuriems nustatyti radiologiniai sąnarių pakitimai.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Mūsų tyrime analizuota nedidelė grupė tiriamųjų, palyginus su kitų pasaulio mokslininkų atliktais tyrimais ir studijomis, tačiau stebėtos įvairios svarbios tendencijos ir gauti statistiškai reikšmingi skirtumai.

Gaddy JR, Vista ES, Julie M ir bendraautoriai tyrė įvairių reumatologinių ligų pasiskirstymą Oklahomos (JAV) populiacijoje. Atsižvelgiant į Amerikos reumatologų kolegijos (ACR) klasifikaciją ir atrinkus tiriamuosius pagal diagnostinius kriterijus, daugiausiai (50,63 proc.) buvo sergančiųjų reumatoidiniu artritu (įskaitant seropozityvų ir seronegatyvų), 29,12 proc. sirgo kitomis artropatijomis ir 20,25 proc. – kitomis sisteminėmis jungiamojo audinio ligomis (68). Mūsų studijoje tiriamųjų pasiskirstymo tendencija panaši, tačiau reumatoidiniu artritu (seropozityviu ir seronegatyviu) sirgo daugiau pacientų nei minėtoje užsienio autorių studijoje, o kitomis ligomis mažiau: 70,8 proc. tiriamųjų sirgo RA, 14,3 proc. kitomis artropatijomis ir 14,9 proc. tiriamųjų – kitomis sisteminėmis jungiamojo audinio ligomis.

Mūsų tyrime didžiąją dalį tiriamųjų sudarė moterys – 106/154 (68,83 proc.). Pasaulio mokslininkų ir tyrėjų, tokių kaip Myasoedova Elena, Crowson Cynthia (69), Matteson Eric (70) ir kitų, atliktose studijose ši tendencija tokia pati, moterys dažniau serga įvairiomis reumatologinėmis ligomis (seropozityviu ir seronegatyviu RA, kitomis artropatijomis bei sisteminėmis jungiamojo audinio ligomis). Išanalizavus daugelį publikacijų galima galvoti, kad toks ligų pasiskirstymas tarp lyčių gali būti dėl hormoninių ypatumų, kontraceptinių priemonių, nėštumų bei maitinimo krūtimi įtakos moterims, tačiau šių faktų patvirtinimui dar nėra atlikta pakankamai mokslinių tyrimų. Savo studijoje visus tiriamuosius suskirstėme į tris amžiaus grupes: iki 50-ies metų, nuo 50-ies iki 70-ies metų, 70-ies ir daugiau metų, atsižvelgdami į darbingiausią žmogaus gyvenimo periodą, kuomet didžiausia traumų rizika bei dažnesni rizikos faktoriai, tokie kaip rūkymas ir nutukimas, taip pat į moterų menopauzės pradžios laikotarpį bei gretutines galimas būkles, tokias kaip osteoporozė. Panašus skirstymas į amžiaus grupes stebimas ir kitų autorių studijose – Matthijssen X ir kiti (iki 40-ies metų, nuo 40-ies iki 55-ųjų metų, 55-eri ir daugiau metų) (71). Mūsų tiriamųjų, tiek moterų, tiek vyrų, sergančių reumatinėmis ligomis, amžiaus vidurkis buvo 58,2 metai, panaši tendencija stebima ir kitų autorių straipsniuose, pavyzdžiui Eriksson J 60,4 metai (72), Pytel A, Wrzosek Z – 56,9 metai (73).

Horiuchi A, Pereira L ir keletas kitų mokslininkų 2016 metais Brazilijoje atliko tyrimą, kuriame lygino reumatoidinio artrito pasireiškimo skirtumus tarp pacientų amžiaus grupių ir lyties. Tiriamuosius suskirstė į dvi amžiaus grupes: I-oji – nuo 32-ųjų iki 58-ųjų metų, II-oji – nuo 60-ies iki 83-ųjų metų. Savo

studijos metu jie nustatė, kad dažniau teigiamas antikūnų prieš branduolio antigenus (ANA) švytėjimas nustatomas jaunesniems pacientams (39,0 proc.) nei vyresniems (27,5 proc.), o mūsų atliktame tyrime dažniausiai ANA teigiamas švytėjimas nustatomas vyresniems, tai yra III-ios amžiaus grupės tiriamiesiems (52,63 proc.). Remiantis analizuota literatūra galime manyti, kad tokia tendencija gali būti dėl vyresniems tiriamiesiems nustatytų gretutinių ligų, vaistų vartojimo. Brazilijos mokslininkų tyrimo duomenys rodo, kad seropozityvus RA labiau būdingas vyresniems vyrams (14/62, 22,58 proc.) ir jaunesnėms moterims (100/111, 90,09 proc.) (74). Aletaha ir bendraautorai teigia, kad tiek seropozityviu, tiek seronegatyviu RA sergančių tiriamųjų vidutinis amžius yra 51 metai (75), tačiau mūsų atliktame tyrime stebėta, kad seronegatyvus RA dažniausiai pasireiškia vyresniame nei 50 metų amžiuje (II-oje ir III-ioje amžiaus grupėse), o seropozityvus RA – jauniausio amžiaus vyrams (iki 50-ies metų amžiaus) ir vyriausio amžiaus moterims (nuo 70-ies ir daugiau metų amžiaus). Remiantis daugeliu analizuotų straipsnių galime manyti, kad reumatoidinio artrito atsiradimas jauname amžiuje vyrams gali būti susijęs su didesniu fiziniu krūviu, blogesnėmis darbo sąlygomis (šaltis, drėgmė, kurie lemia dažnesnius infekcinius, uždegiminius susirgimus), stresinėmis situacijomis (nervinis, oksidacinis stresas), dažnesniu rizikos faktorių, tokių kaip rūkymas ir nutukimas, buvimu, didesne traumų rizika. Moterims RA dažniau pasireiškia vyresniame amžiuje dėl osteoporozės po menopauzės, hormoninės pusiausvyros svyravimo. Lietuvos klimato sąlygos visiems žmonėms, ypač moterims vyresniame amžiuje, lemia vitamino D kiekio sumažėjimą kraujyje, tai neigiamai veikia kaulinio audinio metabolizmą ir struktūrą, o taip pat siejama su vis didėjančiu ligų skaičiumi, tarp kurių yra autoimuninės bei infekcinės ligos, uždegiminės artrozės ar reumatoidinis artritas (76).

Analizuojant laboratorinių tyrimų rezultatų tarpusavio ryšius pastebėjome, kad anti-CCP ir RF tyrimų rezultatai susiję visose tiriamųjų amžiaus grupėse – didėjant anti-CCP koncentracijai, didėja ir RF koncentracija kraujyje. Taip pat tarpusavyje susiję ir CRB bei ENG tyrimų rezultatai. Tokias pačias sąsajas aprašo ir kiti pasaulio mokslininkai, tokie kaip Shah B, Quershi H, Dogan M ir kiti (77, 78). Šiame tyrime analizuojant laboratorinių tyrimų rezultatų sąsajas atsižvelgiant į lytį ir amžių pastebėjome, kad jauniems vyrams (iki 50-ies metų amžiaus) reumatoidinio artrito specifinių žymenų anti-CCP ir RF tyrimų rezultatų padidėjimas nesusijęs su CRB ir ENG tyrimų rezultatų padidėjimu, jei imunologiniai rodikliai padidėja, uždegiminiai rodikliai gali nesikeisti. Analizuojant ryšius moterų grupėje, stebėta, kad ryšiai tarp imunologinių tyrimų ir uždegiminių rodiklių rezultatų atsiranda vyresniame amžiuje. Mūsų rasti duomenys vyrams neatitiko seropozityvaus RA diagnostinių kriterijų.

Mūsų tyrime išryškėjo tendencija tarp ENG tyrimo rezultatų ir tiriamųjų amžiaus – kuo jaunesnis tiriamasis, tuo nustatomas didesnis ENG rezultatas, o Matthijssen X ir kitų bendraautorių (71) atliktame

tyrime didžiausi ENG tyrimo rezultatai buvo nustatyti vyriausioje tiriamųjų, sergančių reumatologinėmis ligomis, grupėje (≥ 55 metai). Siemons ir kiti bendraautoriai taip pat nustatė, kad, didėjant amžiui, tiek moterims, tiek vyrams, sergantiems RA, nustatomi didesni CRB ir ENG tyrimų rezultatai (79), mūsų tyrimo metu tendencija, kad kuo vyresnis tiriamasis, tuo didesnis CRB tyrimo rezultatas, stebima tik moterims. Norvegijos mokslininkai Haugbro K, Nossent JC tyrė antikūnų prieš dsDNR kiekio padidėjimo kraujyje ryšį su įvairiomis ligomis. Jie nustatė, kad 29 proc. sergančiųjų reumatoidiniu artritu randamas padidėjęs anti-dsDNR kiekis kraujyje (80). Mes savo atliktame tyrime nustatėme, kad anti-dsDNR padidėjimas sergant reumatoidiniu artritu stebimas tik 8,3 proc. tiriamųjų.

Norint tiksliau diagnozuoti reumatoidinį artritą ir diferencijuoti tarp kitų autoimuninių ar infekcinių ligų, ypač svarbu atlikti visus reikiamus laboratorinius tyrimus bei tinkamai interpretuoti, atsižvelgti į jų tarpusavio sąsajas.

5. IŠVADOS

1. Jaunesni nei 50-ies metų vyrai bei vyresnės nei 70-ies metų moterys dažniausiai sirgo seropozityviu reumatoidiniu artritu, seronegatyviu – vyresni nei 70-ies metų vyrai ir moterys nuo 50-ies iki 70-ies metų, o tiriamųjų sergamumas kitomis artropatijomis ir sisteminėmis jungiamojo audinio ligomis tarp lyties ir amžiaus nesiskyrė.
2. Viršijantys normą RF ir anti-CCP tyrimų rezultatai nustatyti sergantiesiems seropozityviu reumatoidiniu artritu, ypač jaunesniems nei 70-ies metų vyrams, o CRB ir ENG padidėjimas būdingas visiems tiriamiesiems sergantiems reumatologinėmis ligomis.
3. Stipriausias ryšys nustatytas tarp RF ir anti-CCP tyrimų rezultatų iki 50-ies metų tiriamiesiems, sergantiems seropozityviu reumatoidiniu artritu, o tarp CRB ir ENG – seronegatyviu reumatoidiniu artritu, ypač vyrams. Imunologiniai ir uždegiminiai žymenys tarpusavyje nesusiję tik sergantiesiems seropozityviu reumatoidiniu artritu.
4. Tiriamiesiems su nustatytais radiologiniais sąnarių pakitimais ar persirgtomis streptokokinėmis infekcijomis nustatyti aukštesni visų analizuotų imunologinių ir uždegiminių žymenų rezultatai.

6. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

Atsižvelgiant į mūsų tyrimo rezultatus, galime rekomenduoti, kad diagnozuojant RA neturėtų būti pasikliaujama tik diagnostikos kriterijais, labai svarbu atsižvelgti tiriamųjų amžių bei lytį, taip pat vertinti atliktų laboratorinių kraujo tyrimų rezultatų tarpusavio sąsajas. Šiame tyrime išryškėjusi nauja tendencija, kad reumatoidiniu artritu dažniau serga jaunesnio amžiaus vyrai ir vyresnio amžiaus moterys, leidžia suprasti, kad svarbu įvertinti ir kitus galimus veiksnius, tokius kaip praeityje persirgtos infekcijos, įvairios kitos autoimuninės ligos. Remiantis literatūros duomenimis, klimato sąlygos, vitamino D kiekis kraujyje, hormoninė pusiausvyra, rūkymas taip pat gali turėti įtakos reumatoidinio artrito išsivystymui. Šie radiniai reikalauja tolesnių studijų, įtraukiant didesnę tiriamųjų kiekį bei sudarant tikslesnes jų grupes, papildomai analizuojant susijusius veiksnius bei kitus laboratorinius tyrimus.

7. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Egerer K, Feist E, Burmester G. The Serological Diagnosis of Rheumatoid Arthritis. *Dtsch Arztebl Int* 2009;106(10):159–63.
2. Lietuvos reumatologų asociacija. Kai kurių reumatinių ligų diagnostikos ir gydymo aprašai 2016:3–29.
3. Higienos instituto Sveikatos informacijos centras „Mirusių asmenų skaičius pagal diagnozių grupes (ilgasis diagnozių sąrašas) 2015“. [elektroninis išteklius] [žiūrėta 2017 m. sausio 18 d.]. Prieiga per internetą: <http://www.hi.lt/>
4. Higienos instituto Sveikatos informacijos centras „Sergančių asmenų skaičius pagal diagnozių grupes 2015“. [elektroninis išteklius] [žiūrėta 2017 m. sausio 18 d.]. Prieiga per internetą: <http://www.hi.lt/>
5. Watad A, Amital MH. ACPAs Are Much More Than Diagnostic Autoantibodies. *Rambam Maimonides Med J* 2016;7.
6. Nikiphorou E, Sjöwall C, Hannonen P, Rannio T, Sokka T. Long-term outcomes of destructive seronegative (rheumatoid) arthritis – description of four clinical cases. *BMC Musculoskelet Disord* 2016;17:246.
7. Balsa A, Cabezón A, Orozco G, et al. Influence of HLA DRB1 alleles in the susceptibility of rheumatoid arthritis and the regulation of antibodies against citrullinated proteins and rheumatoid factor. *Arthritis Res Ther* 2010;12(2).
8. Aletaha D, Neogi T, Silman A, Funovits J, Felson D, Bingham C et al. 2010 Rheumatoid Arthritis Classification Criteria. *Arthritis Rheum* 2010;62(9):2569–2581.
9. Wasserman A. Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis. *Am Fam Physician* 2011;84(11):1245-1252.
10. Yang J, Kim M, Lee W, Kang S. Relevance of Indirect Immunofluorescence Patterns and Autoantibodies Identified Via Line Immunoassay in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Lab Medicine* 2014;45(1).
11. Singh J, Kenneth G, Bridges L. 2015 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 2016;68(1):1–26.
12. Kalpokaitė Z, Kazėnaitė E, Kalibatienė D, Ožeraitienė V, Vaičekonis V. Ūmios fazės žymenys reumatoidiniu artritu sergančiųjų kraujo serume. *Medicinos teorija ir praktika* 2007;13(2).

13. Kondratavičienė V, Jancevičiūtė A. Socialinių paslaugų naudingumas reumatoidiniu artritu sergantiems asmenims. *Sveikatos mokslai/health sciences* 2013;23(4):108–113.
14. Longmore M, Wilkinson I, Baldwin A, Wallin E. *Oxford Handbook of Clinical Medicine* 2014;9.
15. Visuomenės sveikatos stebėsenos duomenų fondas (Privalomojo sveikatos draudimo informacinės sistemos SVEIDRA duomenys) 2014. [elektroninis išteklius] [žiūrėta 2017 m. sausio 17 d.]. Prieiga per internetą: <http://sic.hi.lt/html/fondas.htm>
16. Biesen R, Burmester GR, Hiepe F. Rheumatoid factor or antinuclear antibodies as incidental finding. *Internist (Berl)* 2014;55(10):1157–64.
17. Malaise O, Halleux S, Frenckell C, Lutteri L, Chapelle JP, Malaise MG. Rhupus: when rheumatoid arthritis meets lupus. *Rev Med Liege* 2012;67(9):475–84.
18. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *New Engl J Med* 2011;365:2205–19.
19. Hemminki K, Li X, Sundquist J, Sundquist K. Familial associations of rheumatoid arthritis with autoimmune diseases and related conditions. *Arthritis Rheum* 2009;60:661–668.
20. Luckey D, Medina K, Taneja V. B cells as effectors and regulators of sex-biased arthritis. *Autoimmunity* 2012;45:364–376.
21. Eyre S, et al. High-density genetic mapping identifies new susceptibility loci for rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 2012;44:1336–1340.
22. Viatte S, Plant D, Raychaudhuri S. Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2013;9:141–53.
23. Kurkó J, Besenye T, Laki J, Glant T, Mikecz K, Szekanecz Z. Genetics of Rheumatoid Arthritis — A Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol* 2013;45(2):170–179.
24. Orozco G, Barton A. Update on the genetic risk factors for rheumatoid arthritis. *Expert Rev Clin Immunol* 2010;6(1):61–75.
25. Bengtsson C, Nordmark B, Klareskog L, et al. Socioeconomic status and the risk of developing rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA study. *Ann Rheum Dis* 2005;64:1588–1594.
26. Costenbader KH, Chang SC, Laden F, et al. Geographic variation in rheumatoid arthritis incidence among women in the United States. *Arch Intern Med* 2008;168:1664–1670.
27. Katherine P, Liaoa, Alfredssonb L, Elizabeth W. Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2010;21(3):279–283.
28. A. N. Colebatch, C. J. Edwards. The influence of early life factors on the risk of developing rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2011;163(1):11–16.

29. Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, et al. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum* 2006;54:38–46.
30. Kallberg H, Jacobsen S, Bengtsson C, et al. Alcohol consumption is associated with decreased risk of rheumatoid arthritis; results from two Scandinavian case-control studies. *Ann Rheum Dis* 2009;68:222–227.
31. Mathieu C, Van Etten E, Gysemans C, et al. In vitro and in vivo analysis of the immune system of vitamin D receptor knockout mice. *J Bone Miner Res* 2001;16:2057–2065.
32. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007;357:266–281.
33. Merlino LA, Curtis J, Mikuls TR, et al. Vitamin D intake is inversely associated with rheumatoid arthritis: results from the Iowa Women's Health Study. *Arthritis Rheum* 2004;50:72–77.
34. Bouillon AWR, Norman JC, Gallagher P, et al. 14th Vitamin D Workshop consensus on vitamin D nutritional guidelines. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010;121:4–6.
35. Muller H, de Toledo FW, Resch KL. Fasting followed by vegetarian diet in patients with rheumatoid arthritis: a systematic review. *Scand J Rheumatol* 2001;30:1–10.
36. Pikwer M, Bergstrom U, Nilsson JA, et al. Breast-feeding, but not oral contraceptives, is associated with a reduced risk of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2009;68(4):526–30.
37. Jacobsson LT, Jacobsson ME, Askling J, Knowler WC. Perinatal characteristics and risk of rheumatoid arthritis. *BMJ* 2003;326:1068–1069.
38. Wahle M, Krause A, Pierer M, et al. Immunopathogenesis of rheumatic diseases in the context of neuroendocrine interactions. *Ann N Y Acad Sci* 2002;966:355–364.
39. Rossol M, Kraus S, Pierer M, Baerwald C, Wagner U. The CD14 bright CD16+ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis Rheum* 2012;64:671–7.
40. Davignon J-L, Hayder M, Baron M, Boyer J-F, Constantin A, Apparailly F, et al. Targeting monocytes/macrophages in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2013;52:590–8.
41. Li J, Hsu H-C, Mountz JD. Managing macrophages in rheumatoid arthritis by reform or removal. *Curr Rheumatol Rep* 2012;14:445–54.
42. Walter GJ, Evans HG, Menon B, Gullick NJ, Kirkham BW, Cope AP, et al. Interaction with activated monocytes enhances cytokine expression and suppressive activity of human CD4+CD45RO+CD25+CD127 low regulatory T cells. *Arthritis Rheum* 2013;65:627–38.

43. Bresnihan B, Gerlag DM, Rooney T, Smeets TJM, Wijbrandts CA, Boyle D, et al. Synovial macrophages as a biomarker of response to therapeutic intervention in rheumatoid arthritis: standardization and consistency across centers. *J Rheumatol* 2007;34:620–2.
44. Yoon BR, Yoo S-J, Choi Yh, Chung Y-H, Kim J, Yoo IS, et al. Functional phenotype of synovial monocytes modulating inflammatory T-cell responses in rheumatoid arthritis (RA). *PLoS One* 2014;9.
45. Behrens MD, Wagner WM, Krco CJ, Erskine CL, Kalli KR, Krempsi J et al. The endogenous danger signal, crystalline uric acid, signals for enhanced antibody immunity. *Blood* 2008;111:1472–1479.
46. Chen D, Wong C, Tam L, Li E, Lam C. Activation of human fibroblast-like synoviocytes by uric acid crystals in rheumatoid arthritis. *Cell Mol Immunol* 2011;8:469–478.
47. Symmons D, Mathers C, Pflieger B. The global burden of rheumatoid arthritis in the year 2000. 2015. [elektroninis išteklius] [žiūrėta 2016 m. gruodžio 14 d.]. Prieiga per internetą: www.who.int/healthinfo/statistics
48. Misiūnienė N, Baranauskaitė A. Reumatoidinio artrito diagnozavimas ir gydymas. *Medicina* 2002;38(1).
49. Tarptautinės statistinės ligų ir sveikatos sutrikimų klasifikacijos dešimtas pataisytas ir papildytas leidimas Australijos modifikacija. [elektroninis išteklius] [žiūrėta 2016 m. lapkričio 29 d.]. Prieiga per internetą: <http://ebook.vlk.lt/e.vadovas/index.jsp>
50. Lietuvos reumatologų asociacija. Venalis A, Baranauskaitė A, Butrimienė I, Pileckytė M, Arštikytė I. Reumatoidinio artrito diagnostikos ir gydymo aprašas 2015. [elektroninis išteklius] [žiūrėta 2016 m. lapkričio 29 d.]. Prieiga per internetą: www.reumatologuasociacija.lt/
51. Street T, Schmidt S, Staros B. Rheumatoid Factor. *Medscape* 2014;3(16).
52. Aletaha D, Alasti F, Smolen JS. Rheumatoid factor determines structural progression of rheumatoid arthritis dependent and independent of disease activity. *Ann Rheum Dis* 2013;72(6):875-80.
53. Nielsen S, Bojesen S, Schnohr P, Nordestgaard B. Elevated rheumatoid factor and long term risk of rheumatoid arthritis: a prospective cohort study. *BMJ* 2012;345.
54. Amital H. Anti-citrullinated peptide antibodies is more than an accurate tool for diagnosis of rheumatoid arthritis. *Isr Med Assoc J* 2013;15:516–19.
55. Van Venrooij WJ, van Beers JJBC, Pruijn GJM. AntiCCP antibodies: the past, the present and the future. *Nat Rev Rheumatol* 2011;7:391–8.

56. Al-Mughales J. Immunodiagnostic Significance of Anti-RA33 Autoantibodies in Saudi Patients with Rheumatoid Arthritis. *J Imm Res* 2015. [elektroninis išteklius] [žiūrėta 2017 m. vasario 7 d.]. Prieiga per internetą: <https://www.hindawi.com/journals/jir/2015/604305/cta/>
57. Niu X, Chen G. Clinical Biomarkers and Pathogenic-Related Cytokines in Rheumatoid Arthritis. *J Imm Res* 2014; 698192.
58. Pisetsky D. Antinuclear Antibodies in Rheumatic Disease: A Proposal for a Function-Based Classification. *Scand J Immunol* 2012;76:223–228.
59. Satoh M, Chan EK, Ho LA et al. Prevalence and sociodemographic correlates of antinuclear antibodies in the United States. *Arthritis Rheum* 2012; 64(7):2319–27.
60. Bentow C, Swart A, Wu J, Seaman A, Manfredi M, Infantino M, et al. Clinical performance evaluation of a novel rapid response chemiluminescent immunoassay for the detection of autoantibodies to extractable nuclear antigens. *Clinica Chimica Acta* 2013;424:141–147.
61. Nishimura K, Sugiyama D, Kogata Y, Tsuji G, Nakazawa T, Kawano S, et al. Meta-analysis: Diagnostic Accuracy of Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Antibody and Rheumatoid Factor for Rheumatoid Arthritis. *Ann Intern Med* 2007;146(11):797-808.
62. Chan E, Damoiseaux J, Carballo O, Conrad K, Cruvinel W, Francescantonio P et al. Report of the first international consensus on standardized nomenclature of antinuclear antibody HEp-2 cell patterns 2014–2015. *Front Immunol* 2015;6:412.
63. Peene I, Meheus L, Keyser S, Humbel R, Veys E, Keyser F. Anti-Ro52 reactivity is an independent and additional serum marker in connective tissue disease. *Ann Rheum Dis* 2002;61:929–933.
64. Matsudaira R, Tamura N, Sekiya F, Ogasawara M, Yamanaka K, Takasaki Y. Anti-Ro/SSA antibodies are an independent factor associated with an insufficient response to tumor necrosis factor inhibitors in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2011;38:2346–2354.
65. Šenolt L, Grassi W, Szodoray P. Laboratory biomarkers or imaging in the diagnostics of rheumatoid arthritis? *BMC Medicine* 2014;12:49.
66. Kinloch A, Tatzler V, Wait R, Peston D, Lundberg K, Donatien P, Moyes D et al. Identification of citrullinated alpha-enolase as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005;7(6):1421-9.
67. Montes A, Gonzalez R, Pampin E, Calaza M, Varela A, Reino J et al. Particular Association of Clinical and Genetic Features With Autoimmunity to Citrullinated α -Enolase in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 2011;63(3):654–661.

68. Gaddy JR, Vista ES, Robertson JM, Dedeker AB, Roberts V, Klein W, et al. Rheumatic Disease among Oklahoma Tribal Populations: A Cross-Sectional Study. *J Rheumatol* 2012;39(10):1934–1941.
69. Myasoedova E, Crowson C, Kremers H, Therneau T, Gabriel SE. Is the incidence of rheumatoid arthritis rising? *Arthritis Rheum* 2010;62(6):1576–1582.
70. Crowson CS, Matteson E, Myasoedova E, Michet CJ, Ernste F, Warrington K, et al. The Lifetime Risk of Adult-Onset Rheumatoid Arthritis and Other Inflammatory Autoimmune Rheumatic Diseases. *Arthritis Rheum* 2011;63(3):633–639.
71. Matthijssen X, Akdemir G, Markusse IM, et al. Age affects joint space narrowing in patients with early active rheumatoid arthritis. *RMD Open* 2016;2.
72. Eriksson JK, Neovius M, Ernestam S, Lindblad S, Simard JF, Askling J. Incidence of Rheumatoid Arthritis in Sweden: A Nationwide Population-Based Assessment of Incidence, Its Determinants, and Treatment Penetration. *Arthrit Care Res* 2013;65(6):870–878.
73. Pytel A, Wrzosek Z. Estimation of Patient Knowledge on Rheumatoid Arthritis in the Range of Their Own Disease – Preliminary Study. *Adv Clin Exp Med* 2012;21(3):343–351.
74. Horiuchi AC, Pereira LH, Kahlow B, Silva M, Thelma L. Rheumatoid arthritis in elderly and young patients. *Rev Bras Reumatol* 2016.
75. Aletaha D, Alasti F, Smolen JS. Rheumatoid factor, not antibodies against citrullinated proteins, is associated with baseline disease activity in rheumatoid arthritis clinical trials. *Arthritis Res Ther* 2015;17:229.
76. Strazdienė V, Tamulaitienė M, Alekna V. Vitaminas D: apykaita, fiziologinis vaidmuo ir klinikinė reikšmė. *Gerontologija* 2011;12(1):49–57.
77. Shah BG, Quershi H, Zafar U. Serum Anti-CCP Antibody and its Correlation with Disease Activity in Local Pakistani Rheumatoid Arthritis Patients. *PJMHS* 2014;8(4).
78. Deveci K, Deveci H, Bayram KB, Koçyiğit H. The Relationship Between Serum Levels of Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Antibodies and Disease Activity in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Turk J Phys Med Rehab* 2012;58:267–271.
79. Siemons L, Klooster PM, Vonkeman H, Riel P. How age and sex affect the erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in early rheumatoid arthritis. *BMC Musculoskelet Disord* 2014;15:368.

80. Haugbro K, Nossent JC, Winkler T, Figenschau Y, Rekvig OP. Anti-dsDNA antibodies and disease classification in antinuclear antibody positive patients: the role of analytical diversity. *Ann Rheum Dis* 2004;63:386–394.