



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ**

**КАТЕДРА ПО ПЕДИАТРИЯ**

**КЛИНИКА ПО РЕВМАТОЛОГИЯ, КАРДИОЛОГИЯ И  
ХЕМАТОЛОГИЯ**

**Д-р МАРГАРИТА ВЪРБАНОВА ГАНЕВА**

**БИОМАРКЕРИ ПРИ ЮВЕНИЛЕН ИДИОПАТИЧЕН  
АРТРИТ**

**ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД  
ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН  
“ДОКТОР” по научна специалност „Педиатрия“**

*Научен ръководител: доц. д-р Стефан Стефанов, д. м.*

**София, 2017**

## СЪДЪРЖАНИЕ

Използвани съкращения	4
Въведение	5
<b>1. Литературен обзор</b>	<b>8</b>
<b>2. Цел и задачи</b>	<b>54</b>
<b>2.1. Цел</b>	
<b>2.2. Задачи</b>	
<b>3. Материал и методи</b>	<b>56</b>
<b>3.1. Материал</b>	<b>56</b>
<b>3.2. Методи</b>	<b>57</b>
<b>1.2.1. Диагностични методи</b>	<b>57</b>
<b>1.2.2. Статистически методи</b>	<b>62</b>
<b>4. Резултати и обсъждане</b>	<b>64</b>
<b>4.1. Демографски характеристики на изследваните деца</b>	<b>64</b>
<b>4.2. Терапия</b>	<b>75</b>
<b>4.3. Характеристика на ставното засягане в дебюта на заболяването</b>	<b>76</b>
<b>4.4. Изработване на граници на референтната област на използвания ELISA-кит за изследване на S100 A8/A9</b>	<b>80</b>
<b>4.5. Средни стойности на изследваните биомаркери при отделните подформи на ювенилен идиопатичен артрит</b>	<b>82</b>
<b>4.6. Влияние на приема на медикаменти върху стойностите на изследваните биомаркери</b>	<b>97</b>
<b>4.7. Сравнителен анализ на средните стойности на биомаркерите в групата с дебют на ювенилен идиопатичен артрит и отговора към провежданата терапия с метотрексат</b>	<b>99</b>
<b>4.8. Сравнителен анализ на абсолютния брой положителни стойности на изследваните биомаркери при дебют на заболяването и отговора към провежданата терапия с метотрексат</b>	<b>103</b>
<b>4.9. Сравнителен анализ на брой пациенти с положителни стойности на S100 A8/A9 в цялата група с ювенилен идиопатичен артрит</b>	<b>104</b>
<b>4.10. Сравнителен анализ на средните стойности на биомаркерите, определени в група непосредствено преди започване на лечение с биологичен агент и групата с добър отговор към метотрексат</b>	<b>105</b>
<b>4.11. Корелационен анализ между активността на ЮИА, определена чрез биомаркерите и активността, определена по скалата JADAS 27</b>	<b>107</b>

<b>4.12.</b> Сравнителен анализ на взаимовръзката на носителството на полиморфизми в <i>MTHFR</i> гена при деца с ЮИА с лекарствения отговор и появата на НЛР	110
<b>4.13.</b> Антинуклеарни антитела и взаимовръзка на някои показатели с развитието на увеит	114
<b>5.</b> Изводи	119
<b>6.</b> Справка за приносите на дисертационния труд	121
<b>7.</b> Публикации, научни съобщения и научни проекти	122
<b>8.</b> Библиография	123

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ НА БЪЛГАРСКИ ЕЗИК

БА	Биологичен Агент
БМАРЛ	Болест Модифициращи Антиревмтични Лекарства
ГКС	Глюкокортикостероиди
НЛР	Нежелани Лекарствени Реакции
НСПВС	Нестероидни Противовъзпалителни Средства
РФ	Ревматоиден Фактор
СУЕ	Скорост на Утаяване на Еритроцитите
ТЗБС	Тазобедрена Става
ЮИА	Ювенилен Идиопатичен Артрит

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ НА АНГЛИЙСКИ ЕЗИК

ACR	American College of Rheumatology
anti-CCP	anti-Cyclic Citrullinated Peptide
ANA	Antinuclear Antibodies
CAPS	Childhood Arthritis Prospective Study
CHARMS	Childhood Arthritis Response to Medication Study
CRP	C-reactive Protein
DAMPs	Damage Associated Molecular Patterns
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
hsCRP	high sensitive C-reactive Protein
HLA-B27	Human Leukocyte Antigen-B27
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
JADAS	Juvenile Arthritis Disease Activity Score
JSpADA	Juvenile Spondyloarthritis Disease Activity
ILAR	International League of Associations for Rheumatology
MTX	Methotrexate
MTHFR	Methylene Tetrahydrofolate Reductase
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns
PRINTO	Paediatric Rheumatology International Trials Organisation
PRR	Pattern Recognition Receptor
RAGE	Receptor for Advanced Glycation End products
ROC	Receiver Operating Characteristic
TLR	Toll Like Receptor
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor- $\alpha$

## ВЪВЕДЕНИЕ

Детската ревматология се утвърждава като субспециалност във втората половина на XX век. Ювенилният идиопатичен артрит (ЮИА) е най-честото хронично заболяване, обект на диагностициране, лечение и проследяване от детските ревматолози. От първото му класическо описание през 1897 година от George Frederic Still до настоящия момент е наблюдаван изключителен напредък както в разкриването на патофизиологичните механизми и медиаторите на процеса на възпаление, така и в лечението и оценката на индивидуалния отговор към провежданата лекарствена терапия. Независимо от това е известно, че при проследяване около половината от пациентите имат активен артрит десет години след дебюта на заболяването, а поне една трета остават засегнати от болестта и след достигане на пълнолетие.

Ювенилният идиопатичен артрит е комплексно възпалително заболяване с мултифакторна имунологична патогенеза и хронично рецидивиращ ход. Характерна особеност е клиничната му хетерогенност - с вариабилни клиничен ход и тежест на заболяването. Съществен момент в проследяването на хода на артритата в детска възраст е периодичната оценка на активността на заболяването. Редица изследователски колективи са ангажирани със създаването на скали, определящи активността на артритата. В тези скали са включени както клинични, така и лабораторни показатели. Заедно с това не бива да се пренебрегват данните от някои клинични проучвания, показващи умерена диагностична точност на клиничния преглед на ставите при децата. Между отделните клиницисти се наблюдават различия при прегледа на едни и същи пациенти. Следователно, оценката на активността и хода на болестта не може да бъде основана само на клинични параметри.

Множество биомаркери са показали потенциал за диагностицирането и прогнозирането на хода на ювенилния идиопатичен артрит, за оценка на активността и тежестта му, за определяне на вероятността за настъпване на клинична ремисия или рецидив, отговора към терапията и риска от усложнения. Тук се включват скорост на утаяване на еритроцитите (СУЕ), С-реактивен протеин (CRP), антинуклеарни антитела (ANA), ревматоиден фактор (РФ), антитела срещу цикличния цитрулиниран пептид (анти-CCP), носителство на HLA-B27.

Въпреки наличните в момента в рутинната практика маркери на възпаление за оценка на активността на заболяването, все още не съществуват утвърдени такива, които да подпомагат избора на терапия и да предсказват риска от възникване на рецидив. В редица проучвания обаче групата на S100 протеините показва своя потенциал като биомаркер, който може да бъде прилаган за проследяване на активността на заболяването. Доказано е, че те служат като показател за активността на ювенилния идиопатичен артрит, независимо от клиничната находка. Серумните нива на S100 протеините корелират с болестната активност при пациенти с артрит. Съществуват доказателства, че повишените им стойности могат да са израз на налична субклинична болестна активност при пациенти, достигнали клинична ремисия с прием на метотрексат. Във връзка с това, друго приложение на изследването на серумните им концентрации при преустановяване на терапията е асоциацията на по-високите стойности с риска от възникване на рецидив на заболяването при проследяване. От друга страна се предполага, че серумните им нива, определени в дебюта на болестта корелират добре с вероятността за добър отговор към провежданата терапия.

Възможно е различията в отговора към терапията при пациентите с ЮИА да са генетично обусловени. Във връзка с това изследването на различни генетични полиморфизми, свързани с лекарствения отговор, е обект на редица

научни проучвания. Генетични варианти също могат да бъдат използвани като биомаркери. Редица проучвания се занимават с оценка на възможни кандидат гени, въввлечени в сложния генетично обусловен път на фармакодинамика и фармакокинетика на метотрексат (MTX) – медикамент, първа линия на избор при децата с ювенилен идиопатичен артрит.

С напредъка в терапията на ювенилния идиопатичен артрит, клиницистът изгражда т.нар. „нулев толеранс“ към ставното възпаление. Целта е постигане на пълна ранна ремисия при всяко дете. Независимо от това не съществуват голям брой параметри, върху които да се базира терапевтичният избор. Проучванията, свързани с откриване на биомаркери при най-честото хронично ревматологично заболяване в детска възраст, се увеличават все повече. Биомаркерите биха подпомогнали предвиждането на хода на болестта и тежестта ѝ, отговора към терапия и възможността за спиране на лечението след достигане на ремисия без риск от настъпване на рецидив. Несъмнено диференцирането на пациентите, които биха постигнали добър отговор с монотерапия с MTX, може да открие възможност за оптимално лечение на отделния пациент в ранна фаза на заболяването. Това от своя страна би допринесло за разработването на по-рационален и персонализиран подход в терапията на децата с ювенилен идиопатичен артрит.

Основна тенденция в ревматологичната практика е търсенето на критерии за ранна диагностика на ЮИА и на маркери с прогностична стойност за тежко протичащ артрит с цел по-агресивно лечение в ранните стадии на заболяването. Този проблем е актуален и обуславя интереса на изследователи и клиницисти не само в глобален план, но разбира се и в България. Във връзка с това си поставихме за цел да изследваме набор от едни от най-често проучваните биомаркери. Част от тези въпроси и проблеми са засегнати в настоящия дисертационен труд.

## 1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Ювенилният идиопатичен артрит е най-честото хронично възпалително ревматологично заболяване в детска възраст. В редица проучвания докладваната честота на заболяването варира от 1.6 до 150 на 100 000 деца.<sup>(1)</sup> Обобщени данни показват, че заболяемостта е в интервал от 1,6 до 23/100 000, а болестността - от 3,8 до 400/100 000 души сред населението на Европа за 2010 година.<sup>(2)</sup>

Според дефиницията на ILAR (International League of Associations for Rheumatology) ЮИА се характеризира с наличието на артрит с неизвестна етиология в една или повече стави, персистиращ най-малко 6 седмици, а дебютът на заболяването е преди 16-годишна възраст.<sup>(3)</sup>

Първото описание на полиартрит в детска възраст е публикувано от французина André-Victor Cornil през 1864 година – на 29-годишна жена, при която от 12-годишна възраст е наблюдаван хроничен възпалителен полиартрит.<sup>(4)</sup>

Близо 30 години по-късно Diamant-Berger разглежда детайлно 38 случая на хроничен артрит при деца, които самият той е проследявал или чиито случаи са били описани до момента в литературата.<sup>(5)</sup> Още тогава се обръща внимание на хетерогенността в началната изява на заболяването, по-високата му честота при момичета, въвличането на шийния отдел на гръбначния стълб и темпоромандибуларните стави, както и засягането на очите от възпалителния процес. Diamant-Berger също така формулира становището, че прогнозата на артрит в детска възраст в повечето случаи е по-добра от тази на хроничния артрит при възрастни.

Впоследствие през 1897 година англичанинът Sir George Frederick Still описва 22 случая на хроничен артрит при деца, почти всички от които са наблюдавани в Hospital for Sick Children, Лондон.<sup>(6)</sup> Still обръща внимание на факта, че заболяването почти винаги дебютира преди втората дентиция, често е сред момичета и обикновено има недоловимо начало. Той предполага,

че артритът в детска възраст има различна етиология от този при възрастните, а също така и че вероятно включва повече от едно заболяване. Сега е всеобщо признато становището, че хроничният артрит при деца се различава клинично, често и генетично, а вероятно и патогенетично от ревматоидния артрит при възрастни. Изключение прави ревматоиден фактор положителният ювенилен полиартрит, чиито ход е сходен с този на ревматоидния артрит при възрастни, както и ентезит-свързаният артрит, който със своята прогресия може да наподобява анкилозиращия спондилит.

Днес е известно, че ювенилният идиопатичен артрит включва хетерогенна група заболявания. Въз основа на клиничните симптоми и лабораторните показатели в рамките на първите шест месеца от изявата на болестта ILAR обособява следните седем подгрупи заболявания<sup>(3)</sup>: системна форма на ЮИА; РФ положителен полиартрит; РФ отрицателен полиартрит; олигоартрит; псориаатичен артрит; ентезит-свързан артрит и недиференциран артрит. Подгрупата на олигоартрита от своя страна се дели на персиситиращ (артритът остава ограничен до четири стави в хода на болестта) и разширен (артритът обхваща повече от четири стави след първите шест месеца от началото на заболяването).

Ювенилният идиопатичен артрит е комплексно заболяване с мултифакторна имунологична патогенеза и хронично рецидивиращ ход. Освен определена генетична предиспозиция, значение за отключването на заболяването имат и фактори на околната среда, които водят до хроничен възпалителен отговор, включващ неконтролируема активация както на специфичния, така и на неспецифичния имунитет.<sup>(7)</sup> Възникналият аутоимунен отговор е насочен предимно (макар и не единствено) към синовиалната тъкан, в резултат на което възниква хроничен артрит. Ходът и активността на ЮИА могат да бъдат разнообразни, тъй като това не е само по себе си самостоятелно заболяване, а включва хетерогенна група аутоимунни възпалителни заболявания.<sup>(1)</sup> Съществен момент в проследяването на хода на артритата в детска

възраст е периодичната оценка на активността на заболяването. С хода на болестта се наблюдават съществени вариации в активността на ЮИА както при отделните пациенти, така и помежду им. Следователно е необходима периодична количествена оценка на болестната активност, а посредством това и на ефективността на провежданата терапия. Във връзка с това са изработени редица скали, оценяващи активността на ЮИА.

Една от тях е създадена от Американския колеж по ревматология (ACR American College of Rheumatology). През 1997 година ACR разработва и публикува параметри, оценяващи подобрението в състоянието на пациента с ЮИА в резултат на провежданата терапия.<sup>(8)</sup> При оценяването се вземат предвид шест компонента: цялостна оценка от страна на лекаря на болестната активност; цялостна оценка от страна на родителя/пациента на състоянието му; функционален капацитет; брой стави с активен артрит; брой стави с ограничен обем на движение; лабораторни маркери на възпаление – скорост на утаяване на еритроцитите или С-реактивен протеин. При определяне на подобрението (ACR paediatric core set - Pedi 30, Pedi 50, Pedi 70, Pedi 90 и Pedi 100) при ЮИА се отбелязва промяната в стойностите на тези параметри в сравнение с предходен момент. Така например за поставяне на оценка ACR Pedi 30 се изисква минимум 30% подобрение в сравнение с първоначалните стойности на минимум три от шестте компонента, като нито един от останалите три не бива да се е влошил с повече от 30%. По същия начин ACR Pedi 50, 70, 90, и 100 изискват съответно 50 %, 70 %, 90 % и 100 % подобрение в поне три от заложените компоненти, без да е регистрирано влошаване на повече от един показател с повече от 30%. Скоро след публикуването на тази скала за оценка, тя става златният стандарт за оценка на отговора към терапия при ЮИА. Критерият ACR Pedi 30 е приет както от Американската администрация по храните и лекарствата, така и от Европейската агенция по лекарствата за всички проучвания фаза III стремящи се към регистрация на даден медикамент при ЮИА.<sup>(9)</sup>

Седем години по-късно, през 2004 година, посредством задружните усилия на международен екип специалисти, са разработени и предварителните критерии за клинична ремисия при ЮИА.<sup>(10)</sup> Те включват : липса на активен артрит; липса на белези на системно възпаление - фебрилитет, обрив, серозит, спленомегалия или генерализирана лимфаденопатия, свързани с ЮИА; липса на активен увеит; нормални стойности на СУЕ или CRP; липсваща болестна активност при цялостната оценка от страна на лекаря. Когато при пациент, приемащ антиревматични медикаменти, критериите са изпълнени за минимум шест последователни месеца, той бива класифициран като състояние на клинична ремисия при прием на медикамент. Докато като състояние на клинична ремисия без прием на медикамент се определя период от 12 последователни месеца без активност на заболяването и без прием на каквито и да е медикаменти, повлияващи артритата. Неотдавна тези критерии за постигане на ремисия бяха допълнени като се включи конкретна дефиниция за увеит<sup>(11)</sup> и се добави сред изискванията – продължителност на сутрешна скованост под 15 минути.<sup>(12)</sup>

Недостатъкът на възприетата като златен стандарт скала на Американския колеж по ревматология е необходимостта от отчитане на промяната в състоянието на пациента при два отделни прегледа. През 2009 година специалисти от Италия създават и публикуват първата точкова скала за оценка на болестната активност при ЮИА, наречена JADAS (Juvenile Arthritis Disease Activity Score).<sup>(13)</sup> Основно нейно предимство е възможността за моментна оценка на активността на заболяването при еднократен преглед. JADAS включва четири параметъра – цялостна оценка на болестната активност от страна на лекаря (използвайки точкова система от 0 до 10, където 0 е липсваща активност, а 10 е максимална активност); цялостна оценка на състоянието на детето от страна на родителя (използвайки точкова система от 0 до 10, където 0 е много добро, а 10 е много лошо); стойност на СУЕ, съотнесена отново на скала от 0 до 10; и брой засегнати стави. Разработени са три варианта

на JADAS според включения брой засегнати стави: JADAS10 (основаващ се на преброяването на която и да е засегната става до максимум 10 стави, като всяко ангажиране над 10 стави дава оценка 10 точки); JADAS 27 (включва въвличането и преброяването на конкретни стави – шиен гръбнак, лакетни, гривнени, метакарпофалангеални (от първа до трета), проксимални интерфалангеални, тазобедрени, коленни и глезенни стави) и JADAS71. Изчислява се като сбор от точките на четирите си компонента, което съответства на резултат от 0 до 40 за JADAS10, от 0 до 57 за JADAS27 и от 0 до 101 за JADAS71. Докато скалата, създадена от Американския колеж по ревматология е често използвана в клинични проучвания за анализ на относителния отговор към провежданата терапия, сравнявайки с първоначалната болестна активност, то скалата JADAS отчита абсолютната (моментната) болестна активност.

Впоследствие колектив от Скандинавските държави начело с Nordal разработва и валидира скала състояща се от същите компоненти, но СУЕ бива заменено с CRP – JADAS-CRP.<sup>(14)</sup> Установява се, че версията JADAS-CRP корелира много добре ( $r = 0.99$ ) с оригиналната JADAS-СУЕ. Следователно, за определяне на активността на ЮИА могат да бъдат използвани както стойностите на СУЕ, така и тези на CRP.

Weiss и колектив през 2014 година съобщават разработен и утвърден индекс за определяне на активността и при ювенилните спондилоартропатии (Juvenile Spondyloarthritis Disease Activity Index - JSpADA).<sup>(15)</sup> Той включва следните показатели – артрит, ентезит, оценка на болката при пациента, показатели на възпаление, сутрешна скованост, клинични данни за сакроилеит, увеит, подвижност в областта на гръбнака.

Неотдавна Horneff и колеги публикуваха дефиниция за подобрене, основана на скалата JADAS10.<sup>(16)</sup> Колективът смята, че подобрието може да бъде ефективно определено посредством спада в стойностите на сбора от JADAS10 в сравнение с изходните му стойности. В допълнение, според

проведен в проучването анализ, JADAS10 скалата дава по-добра оценка на подобрението в състоянието в сравнение с ACR критериите.

Независимо от наличните скали за оценка на активността на ЮИА, ходът и прогнозата му е трудно да бъдат предсказани. Предходни проучвания са показали, че надеждността на клиничния преглед на ставите при децата не е голяма и се наблюдават различия между отделните клиницисти в оценката на едни и същи пациенти.<sup>(17)</sup> В скорошно проучване на Magni-Manzoni и колектив се демонстрира, че в 5,5% от децата с неустановим клинично синовит се наблюдава установим с ултразвукова диагностика синовит. Оказва се, че част от пациентите, които са били диагностицирани с олигоартрит, впоследствие, след приложение на ултразвук, са уточнени като полиартритна форма на ЮИА.<sup>(18)</sup> Впоследствие, същата група изследователи обърна внимание на факта, че при проследяването на 39 деца с клинично неактивно заболяване за период от минимум 3 месеца, често се установяват нарушения в структурата на синовиата посредством ултразвук.<sup>(19)</sup> Независимо от това, се стига до заключението, че наличието на отклонения при ултразвуковото изследване не предсказва риска от ранен рецидив в засегнатите стави след двугодишен период. Следователно, приложението на ултразвук в ежедневната практика до този момент не може да замени клиничния преглед при установяване на ставно възпаление.

Въпреки че, първоначалната изява и ходът на болестта може да варират между отделните подгрупи на ЮИА, при всички групи се наблюдава хронично ставно възпаление. Моноцити, макрофаги, фибробласти и Т-лимфоцити секретират множество медиатори на възпалението, които взаимодействат със заобикалящите ги тъкани и имат провъзпалителен характер. Следователно, в процеса на оценка на активността и тежестта на заболяването значение има не само клиничната симптоматика, но и различни маркери на възпалението.

През 2001 година Работната група за дефиниции на биомаркери (Biomarkers Definition Working Group) определя понятието биомаркер като :

„характеристика, която е обективно измерима и служи като показател на нормални биологични процеси, патологични процеси или фармакологични отговори към терапевтична интервенция“.<sup>(20)</sup> Биомаркерът е съединение, чиято концентрация лесно може да бъде определена в достъпен материал от пациента (кръв, урина, слюнка, т.н.), а най-добре е ако материалът за изследване се получава чрез сравнително неинвазивен подход. В идеалния случай съединението, използвано като биомаркер, трябва с течение на времето да остава в стабилно състояние във взетата проба и трябва да може да бъде измервано чрез надежден, възпроизводим, а също така и достъпен метод.<sup>(21)</sup> Освен това, що се отнася до педиатричната популация, идеалният биомаркер не трябва да се влияе от възрастта на пациента, като по този начин се избягва необходимостта от възрастово обусловени референтни стойности.

Биомаркерите намират своето приложение в много области на медицината, но повечето проучвания се фокусират върху възрастни пациенти. Данните от тези проучвания понякога са прилагани и за детската възраст, без да се отчитат различията в патогенезата на заболяванията, растежа и развитието на децата, влиянието на онтогенезата върху еволюцията на заболяването и отговора към терапията.<sup>(22,23)</sup>

Биомаркерите могат да бъдат прилагани за поставяне на диагноза; за стадиране на дадено заболяване; за насочване към прогнозата на дадено заболяване; за проследяване на отговора към различни видове терапия. Независимо от големия им потенциал, в педиатричната популация все още не съществуват утвърдени биомаркери за ЮИА, които да подпомогнат персонализирания подход при избора на терапия. Персонализираният подход би благоприятствал за достигането на ремисия на по-ранен етап от болестта. Това от своя страна би ограничило страничните ефекти на терапията и подобрило качеството на живот на пациентите.

Редица биомаркери са показали потенциал за прогнозиране на фенотипа на ЮИА, активността и тежестта му, настъпването на клинична ремисия или

рецидив, отговора към терапията, риска от усложнения и хода на болестта в годините.

Оценката на активността на заболяването при ЮИА обикновено включва определянето на концентрациите на маркерите на възпаление – СУЕ и СРР.

Скоростта на утаяване на еритроцитите е неспецифичен показател на острофазовия отговор. Принципите на изследване на СУЕ са описани още през 1918 година.<sup>(24)</sup> Стойностите на СУЕ започват да се покачват 24-48 часа след дебюта на възпалението, а нормализирането им с обратното развитие на възпалението е бавен процес.<sup>(25)</sup> Механизмът, чрез който острофазовият отговор води до ускоряване на СУЕ, все още не е напълно изяснен. Смята се, че е резултат от образуването на позитивно заредени острофазови белтъци, сред които с най-голямо значение е фибриногенът. Тези белтъци свързват негативно заредените еритроцити и по този начин редуцират негативния им заряд. Така се стига до агрегацията на еритроцитите и се увеличава съотношението им маса към повърхност, а оттам и скоростта, с която се утаяват. Следователно, стойностите на СУЕ се покачват при всяко едно състояние, което е свързано с повишено образуване на острофазови белтъци, а именно редица инфекциозни и имунно медиранни възпалителни заболявания, злокачествени заболявания, травми.<sup>(26)</sup> Ускоряването на СУЕ може да е възрастово обусловено, да се наблюдава при анемия, бременност, затлъстяване, хронична бъбречна недостатъчност, нефротичен синдром. Ниски стойности на СУЕ се срещат при полицитемия, сърповидноклетъчна анемия, наследствена сфероцитоза, ниски стойности на фибриногена, тежко чернодробно заболяване. Точно тази липса на специфичност при промяната в стойностите на СУЕ ограничава употребата ѝ в диагностичния процес. Определянето на стойностите на СУЕ принципно е удобно, но СУЕ не е напълно надежден показател за активността на заболяването при изявата и при проследяването на дете с артрит. Понякога помага в мониторирането на ефекта от терапията, макар че стойността на СУЕ не корелира непременно със ставния отговор към терапията.

Нивото на CRP може да бъде по-достоверен показател за проследяване на възпалителния отговор; най-малкото стойности му по-рядко се покачват при дете, при което не се установяват клинични прояви на възпаление. Освен това CRP е по-чувствителен показател в сравнение със СУЕ към дискретни промени в острофазовия отговор. С-реактивният протеин е открит през 1930 година в серум на пациенти с остра пневмококова пневмония. Названието си носи от С-полизахарида на *Streptococcus pneumoniae*.<sup>(27)</sup> Плазменият CRP се произвежда само от хепатоцитите в резултат на стимулация от цитокини и предимно IL-6.<sup>(28)</sup> Синтезата му започва много бързо след първоначалния сигнал, а серумните концентрации се покачват още след 6-ия час и достигат максимум около 48-ия час. Плазменият му полуживот е около 19 часа и е константен при всякакви състояния. По този начин единственият фактор определящ серумната му концентрация е скоростта на синтеза на CRP, а тя от своя страна се променя пропорционално с интензитета на възпалителния процес.<sup>(29)</sup> При пълна ерадикация на стимула, свързан с повишена продукция на CRP, нивото му спада бързо, със скоростта на плазмения му клирънс. Стойностите му се повлияват от сравнително малко фактори – чернодробна недостатъчност и някои медикаменти.

В допълнение, група изследователи от САЩ сравняват ползата от изследване на СУЕ и CRP при 1247 пациенти с ревматоиден артрит.<sup>(30)</sup> Показателите са изследвани в началото и на 24-та седмица. Установяват, че определянето на стойностите на CRP може да бъде предпочитано за оценка на клиничната активност на болестта.

Независимо от това, както стойностите на СУЕ, така и тези на CRP отразяват предимно системната, а не локалната активност на възпалителния процес. Също така е известно, че както СУЕ, така и CRP имат ниска чувствителност и специфичност. Стойностите им могат да се повишат при състояния или заболявания, различни от ЮИА, а и при някои деца не отразяват прецизно моментната активност на заболяването.<sup>(13,31)</sup> Така например, е

установено, че стойностите им са нормални при до 30% от децата с клинично активен олигоартрит.<sup>(32)</sup> Освен това, както беше споменато, тези показатели отразяват системния отговор на възпаление, а не локалния, и имат малка прогностична стойност за бъдещия ход на заболяването.<sup>(33)</sup> Независимо от това, Американският колеж по ревматология разработва консенусни препоръки за лечението на ЮИА, които включват както СУЕ, така и CRP като биомаркери.<sup>(34,35)</sup> Продължително задържащите се високи стойности на тези маркери на възпаление се смятат като лош прогностичен фактор, а един от показателите за висока активност на заболяването е двукратно повишени над нормата стойности на СУЕ или CRP. Както лошите прогностични белези, така и високата болестна активност, са свързани с по-агресивен терапевтичен подход. Значителни усилия са насочени в откриването на други показатели на болестната активност, които са по-чувствителни и надеждни.

Други острофазови белтъци (прокалцитонин, серумен амилод А, фибриноген, феритин, алфа-1-антитрипсин, хаптоглобин, церулоплазмин, фракции на комплемента С3 и С4) не се използват рутинно в клиничната практика по редица причини – трудности в измерването на нивата, липса на стандартизация, оскъдни клинични данни.

Известна е връзката на генетичната предразположеност и вероятността за развитие на ЮИА. Особено изразена е в подгрупата на ентезит-свързания артрит – доказана е връзката с носителството на HLA-B27, което според проучване, обхващащо скандинавска подгрупа пациенти, е налично при до 85% от пациентите с ЮИА и ентезит.<sup>(36)</sup> В същото време проучване на колектив от Холандия, установява, че честотата на носителство на HLA-B27 в нидерландската популация е много по-ниска – 7,8%.<sup>(37)</sup> Установено е, че HLA-B27 има директен ефект върху патогенезата на артритата, тъй като е наблюдавано стресово въздействие върху ендоплазмения ретикулум (промени в структурата на пептидите и димеризацията) на клетки, които експресират тази молекула.<sup>(38)</sup> Молекулите B27 с променена структура не се включват във физиологичните

пътища на секреция<sup>(39)</sup> като по този начин индуцират стресово въздействие върху ендоплазмения ретикулум и последваща повишена експресия на IL-23 и патогенна диференциация на Th-17 лимфоцитите.<sup>(38)</sup> Носителството на HLA-B27 е полезен биомаркер в диагностичния процес при класифицирането на пациента в определена субгрупа, но не може да служи като динамичен прогностичен маркер. Пациентите с ентезит-свързан артрит са класифицирани в една подгрупа поради идентичността на симптомите (ентезит, артрит на долни крайници, възпалителна лумбосакрална болка, палпаторна болезненост в сакроилиачни стави и/или остър преден увеит) и хода на болестта, който може да доведе до развитие на анкилоза на гръбначния стълб в зряла възраст. До този момент все още липсват маркери, които акуратно да предсказват прогресията, прогнозата и риска за увреда при тази подгрупа пациенти. Установено е, че носителството на HLA-B27, наличието на ентезит, клинични белези на сакроилеит и артрит на тазобедрената става са прогностични фактори с негативна стойност за постигане на ремисия осем години след дебюта на заболяването.<sup>(40)</sup>

Често изследвани други биомаркери при ЮИА са ревматоидният фактор и антинуклеарните антитела. Тъй като представляват стабилни протеини и лесно могат да бъдат определяни в малък обем кръв, те биват рутинно изследвани, а стойностите им се вземат предвид в определянето на терапевтичния план.

Ревматоидният фактор е описан за първи път през 1940 година от Waaler.<sup>(41)</sup> Впоследствие през 1948 година описанието е допълнено и от Rose<sup>(42)</sup>, който наблюдава аглутинация на овнешки еритроцити при добавянето на серум от пациенти с ревматоиден артрит. Понастоящем за определянето на РФ повечето лаборатории използват ELISA-метод или нефелометрия. Ревматоидният фактор представлява автоантитяло, най-често от клас IgM, насочено към Fc-фрагмента на IgG молекулата. Съществуват автоантитела с нисък и такива с висок афинитет.<sup>(43)</sup> РФ антителата с нисък афинитет

представяват IgM молекули, играещи роля в клирънса, поемането от В-лимфоцитите и фиксацията от комплемента на имунни комплекси. Следователно те могат да бъдат установени в рамките на инфекция и при иначе здрави индивиди.<sup>(43-46)</sup> РФ антителата с висок афинитет могат да бъдат от всеки подклас имуноглобулини и често наличието им се асоциира с автоимунно заболяване. С най-голямо клинично значение е ревматоидният фактор подклас IgM. Това е доминиращият подтип РФ както при ревматоиден артрит, така и при РФ-позитивния ЮИА и единственият, който се взема предвид в настоящата класификация на тези заболявания.<sup>(3,47-49)</sup> Наличието му се асоциира с повишен риск за прогресивен ход на заболяването, ставна увреда и инвалидизация. Свързването на РФ с IgG води до образуването на имунни комплекси, играещи роля в патогенезата на болестта чрез активиране на комплемента например. Имуните комплекси могат да се свързват и с микросъдовете на синовиата, като по този начин увеличават пермеабилитета и локалното навлизане на клетки на имунната система.<sup>(50)</sup> Освен това, е доказано, че имунни комплекси извлечени от плазма на РФ позитивни пациенти стимулират продукцията на цитокини от страна на синовиоцитите.<sup>(51)</sup> Също така е известно, че при ревматоидния артрит РФ може да се установи години преди дебюта на заболяването, но все още не е ясно дали наличието на тези антитела се свързва с развитието на болестта.<sup>(50)</sup>

Установяването на РФ при дете под 7-годишна възраст не е често и рядко подпомага диагностичния процес в дебюта на заболяването. Доказването на повишен титър на РФ при дете с вероятен хроничен артрит не е от съществено диагностично значение поради честото наличие на абнормни титри както при други заболявания на съединителната тъкан в детска възраст, особено СЛЕ, така и при здрави деца. В едно проучване, анализиращо ползата от изследване на РФ, Eichenfeld и колеги показват, че повечето деца с установени позитивни стойности на РФ нямат ЮИА; както и че повечето деца с ЮИА нямат положителен РФ.<sup>(52)</sup> Установено е, че вероятността РФ да бъде положителен

при деца със заболявания, различни от хроничен артрит, е същата както при деца с хроничен артрит (специфичност 326/332 [98%]; чувствителност 5/105 [4.8%]). Въз основа на това проучване може да се допусне, че изследването на РФ в диагностичния процес не е от значителна практическа полза.

Години по-късно McGhee и колеги потвърждават това наблюдение.<sup>(53)</sup> В проведеното от тях проучване сред шестнадесетте деца, насочени във връзка с положителен титър на РФ, при 3 (19%) деца е диагностициран ЮИА. Освен това, както е докладвано и от Eichenfield, изследването на РФ не подпомага анамнезата и физикалния преглед, които биха установили диагнозата дори РФ да е негативен. Вземайки предвид факта, че McGhee и колеги са потвърдили извода на Eichenfield, има основание да се направи извода, че не съществуват обосновани доводи да се изисква изследването на РФ като диагностичен тест в детска възраст. Независимо от това, детските ревматолози продължават да използват изследването на РФ като прогностичен биомаркер докато не възникнат по-добри прогностични показатели.

Положителен титър на РФ се установява при 5-8% от пациентите с ЮИА - най-често при деца с по-късно начало на заболяването и полиставно засягане, както и при по-големи пациенти, с по-дълга продължителност на ЮИА, имащи подкожни ревматични възли или ставни ерозии или такива в по-нисък функционален клас. При тази подгрупа ходът на заболяването наподобява този при ревматоидния артрит при възрастни с развитие на прогресивен симетричен артрит на малките стави със склонност към ставни ерозии и по-голяма вероятност за прогресия на заболяването в зряла възраст.<sup>(54)</sup> Следователно, РФ може да бъде диагностичен и прогностичен маркер поради високата му специфичност и отразяването на подгрупа пациенти с определена клинична картина и неблагоприятен ход на болестта.

Другият често изследван биомаркер са ANA, които най-често са от клас IgG. Представяват антитела, които могат да бъдат насочени към редица различни нуклеарни и други клетъчни компоненти, например хистони,

мембрани, органели. ANA могат да бъдат открити при пациенти с много автоимунни заболявания – включително олигоартритна форма на ЮИА, системен лупус еритематодес, синдром на Сьогрен.<sup>(55)</sup> Сред пациентите с ЮИА, най-често се наблюдават при тези с олигоартрит и полиартрит с отрицателен РФ. Докладваната честота сред децата с олигоартрит варира между 61 и 75%.<sup>(239)</sup> Най-често ANA се установяват при момичета с ранна възраст на изява на заболяването и особено при тези с олигоартритна форма и е най-рядко при по-големи момчета и такива със системно начало на заболяването. ANA са най-често срещани (65% до 85%) сред деца с олигоартритна форма на ЮИА и увеит. Следователно, наличието на повишени титри ANA е важно при диференцирането на деца с най-висок риск за развитие на хроничен увеит. Персистиращи високи стойности на ANA се наблюдават и при здрави деца и при малък, но значим брой деца със скелетно-мускулни оплаквания, при които не се установява автоимунно или ревматологично заболяване. В проведеното от McGhee и колектив проучване<sup>(53)</sup> сред 90-те деца с положителни ANA, само при 14 (16%) е диагностициран ЮИА. Впоследствие, отново McGhee разглежда ползата от изследването на ANA в диагностичния процес.<sup>(56)</sup> Отново се установява, че сред 110 деца, насочени заради положителни стойности на ANA, само 18 деца (16%) са диагностицирани с ЮИА. Нито наличието, нито титърът на ANA служи за разграничаване на деца с ЮИА от такива с други скелетно-мускулни проблеми. Изследователският колектив стига до заключението, че изследването на ANA няма диагностична стойност при поставянето или отхвърлянето на диагнозата ЮИА. Известно е, че до 15% от здравите деца имат положителни стойности при изследване на ANA. Съществуват редица проучвания, показващи че ANA са често положителни в 5 до 18% от здравите деца<sup>(57-66)</sup> и, че наличието на увеличен титър на ANA не е свързано с повишен риск за евентуално развитие на ревматологично заболяване.<sup>(67)</sup>

Както вече беше посочено, класификацията на ЮИА<sup>(3)</sup> се основава предимно на клинични данни и на малък брой биомаркери, използвани за

подразделянето на пациентите в сравнително хомогенни подгрупи. Например, двете форми на полиартрит при ЮИА се разграничават според наличието или липсата в серума на РФ. Резултатът трябва да е потвърден двукратно с минимален интервал между двете изследвания три месеца. Тези две клинични подгрупи се различават по отношение на генетичен терен, прогноза и възраст на изява на болестта.<sup>(68,69)</sup>

Подобно, в няколко проучвания се показва, че наличието на ANA обособява група пациенти, които се асоциират с повишен риск от развитие на хроничен преден увеит. Това е сериозно придружаващо заболяване при ЮИА, характеризиращо се с безболезнено, но потенциално много опасно възпаление на предния очен сегмент, налагащо постоянен скрининг за превенция на загуба на зрението.<sup>(70,71)</sup> Скорошно голямо кохортно изследване потвърди по-ранните данни, че наличието на ANA е рисков фактор за развитие на увеит при ЮИА.<sup>(72)</sup> В зависимост от стойностите на ANA се определя честотата на провеждане на очен скрининг.<sup>(73-77)</sup>

През 2003 година въз основа на наличните данни в литературата Alberto Martini излага хипотезата, че една вероятно хомогенна група пациенти, характеризиращи се с наличие на положителен титър на ANA, изява на заболяването в ранна възраст, подчертано превалиране при женския пол, често развитие на асиметричен артрит и висок риск за развитие на иридоциклит, бива класифицирана в три различни подгрупи ЮИА – олигоартрит, РФ-негативен полиартрит и псориаатичен артрит.<sup>(78)</sup> Оформя се също така и становището, че броят на засегнатите стави през първите шест месеца от заболяването, както и наличието на псориазис не представляват надеждни критерии за диференцирането на отделни подгрупи при ЮИА. Тази хипотеза бива подкрепена от следващо проучване,<sup>(79)</sup> което показва, че ANA – позитивните пациенти групирани в подгрупите на ЮИА – персистиращ олигоартрит, разширен олигоартрит и РФ-негативен полиартрит, са много сходни по

отношение на възраст на изява на заболяването, съотношение мъжки-женски пол и честота на асиметричен артрит и иридоциклит.

Следователно, биха могли да бъдат оформени две групи пациенти – такива с положителни стойности на ANA и по-висок риск от развитие на иридоциклит и такива с отрицателни стойности на ANA, при които по-рядко се наблюдава развитие на иридоциклит, но пък има по-голям брой на засегнатите стави в болестния процес. Ravelli и сътрудници провеждат проучване дали сред ANA-позитивните пациенти с олигоартрит, РФ-негативен олигоартрит, псориаатичен артрит и недиференциран артрит се откриват хомогенни признаци.<sup>(80)</sup> Изследвани са 971 пациента, сред които 711 са били ANA позитивни, 149 са били ANA негативни и 111 с неопределен ANA статус. Установено е, че при всички ANA позитивни пациенти се наблюдават сходни признаци – ранна възраст на изява на заболяването, превалиране на женския пол, асиметричен артрит, развитие на иридоциклит, по-малък брой на засегнатите стави в хода на заболяването и липса на засягане на тазобедрената става. Сред пациентите с отрицателен титър на ANA е наблюдавана по-голяма възраст на изява на заболяването, по-ниска честота на засягане на женския пол, по-ниска честота на развитие на иридоциклит и асиметричен артрит, по-голям брой засегнати стави в хода на болестта. Резултатите от това проучване показват, че пациентите които са ANA позитивни и са класифицирани според сегашните критерии в различни подгрупи на ЮИА (персистиращ олигоартрит, разширен олигоартрит, РФ-негативен полиартрит, псориаатичен артрит, недиференциран артрит) споделят сходни характеристики (подчертано превалиране на женския пол, изява на заболяването в ранна възраст, асиметричен артрит и висок риск за развитие на иридоциклит). Този факт потвърждава предхождаща хипотеза, че ANA-позитивните пациенти с ЮИА представляват хомогенна подгрупа, независимо от ставното засягане и наличието на псориазис. Фактът, че ANA-позитивните пациенти вероятно са

отделна група, макар и да не съществува все още патофизиологично обяснение, се потвърждава и в следващи проучвания.<sup>(81,82)</sup>

Други изследвани в практиката лабораторни показатели са анти-ССР или антителя срещу цикличния цитрулиниран пептид. Представяват група автоантитела насочени към епитопи, съдържащи аминокиселината цитрулин (аргининовите остатъци в протеините могат да бъдат модифицирани посттранскрипционно и заменени с цитрулин). Предполага се, че това са автоантитела насочени срещу цитрулинирания фибриноген.<sup>(83)</sup> Свързването на анти-ССР с цитрулинирани протеини води до образуването на имунни комплекси.<sup>(84)</sup> Данните от повечето проведени проучвания показват, че анти-ССР могат да бъдат установени предимно при деца с РФ-положителен полиартрит. При изследването на 334 деца с ЮИА и 50 здрави контроли Тебо и колектив<sup>(85)</sup> установяват анти-ССР антителя при 73% от пациентите с РФ-позитивен полиартрит, при 19% от тези с разширен олигоартрит, 13% от тези със системна форма на ЮИА, при 8% от децата с РФ-негативен полиартрит, 4% от тези с ентезит-свързан артрит или персистиращ олигоартрит и при 2% от контролите. В групата, съставляваща 23 деца с отрицателни стойности на РФ и положителни на анти-ССР, стойностите на последните са много ниски. Следователно, при пациенти с РФ-отрицателен полиартрит и тежък ход на заболяването е възможно анти-ССР-антителата да са положителни. Поради това изследването им се препоръчва при пациенти с полиартрит. Доказването на анти-ССР антителя при деца с артрит е с висока специфичност (98%) при диагностицирането на ЮИА, но тяхната чувствителност е много по-ниска – само 14%. Наличието на този тип антителя при пациентите с ЮИА се свързва от някои автори с по-лоша прогноза и развитие на тежки ерозии.<sup>(49,86)</sup> И все пак, интерпретацията на проведените до момента проучвания и получените резултат трябва да бъде внимателна поради сравнително малкия брой изследвани пациенти, а също така може и да е объркваща от едновременното наличие на РФ при повечето пациенти.<sup>(86-88)</sup> От друга страна, Brunner и Sitzmann<sup>(89)</sup>

докладват резултатите от проучване при деца с ЮИА, с други аутоимунни заболявания и здрави и показват, че честотата на анти-ССР при деца с артрит е 4.4%, а когато се установяват повишени стойности, то те са при тези с РФ-позитивен полиартрит. Следователно, не е сигурно, че изследването на анти-ССР допринася значително към диагнозата и терапията на ЮИА.

В проучване проведено от Wang и колектив и обхващащо деца с ЮИА, положителни анти-ССР са установени в 48% от пациентите с РФ позитивен полиартрит, в 6% от тези с РФ негативен полиартрит и в 2% от тези с олигоартритна форма.<sup>(90)</sup> В заключение, наличието на положителни стойности на анти-ССР при пациент с артрит подкрепя диагнозата ЮИА, но негативните стойности не я изключват.

Особено значение в патогенезата на ЮИА и развитието на синовит имат и цитокините IL-1, IL-6 и TNF- $\alpha$ . Цитокините представляват високоактивни полипептиди. Тяхната синтеза се иницира около 3 часа след активацията на съответните имунокомпетентни клетки. В свободно състояние не притежават биологична активност. Своите ефекти (активиращи или инхибиращи) проявяват след свързване със съответния рецептор на повърхността на прицелните клетки.

IL-1 представлява протеин с плеiotропни свойства, който стимулира както своята собствена транскрипция, така и тази на IL-6. Освен че е водещ цитокин в системното възпаление, IL-1 стимулира деструкцията на хрущяла и костта чрез индукция на свързания с фолиостатин протеин 1.<sup>(91)</sup> Преди малко повече от десет години Virginia Pascual и колеги показаха, че серумът на пациенти със системна форма на ЮИА индуцира транскрипцията на гени, свързани с неспецифичния имунитет, включително IL-1, в периферни мононуклеарни клетки на здрави доброволци.<sup>(92)</sup> В допълнение, след активация периферните мононуклеарни клетки освобождават големи количества IL-1 $\beta$ . В същото проучване рекомбинантен IL-1 рецепторен антагонист (Анакинра) е приложен на 9 пациенти със системна форма на ЮИА, които са били резистентни на предходна терапия. Пълна ремисия е наблюдавана при 7 от 9-те

пациента и частична ремисия на заболяването при останалите двама. Също така е показано, че IL-1 играе централна роля при рецидив на системната форма.<sup>(93)</sup> В първоначално проведените проучвания за лечение на системна форма на ЮИА с инхибитор на IL-1, при около половината от пациентите се наблюдава добър отговор, докато при останалата половина, отговорът е преходен, последван от рецидив на артрит и повишение на маркерите на възпаление, макар и фебрилитет и обрив да не се наблюдават отново.<sup>(97,98)</sup> Въпреки това, следващо ретроспективно проучване оборва тези твърдения. Колективът предполага, че ако инхибиторът на IL-1 е приложен като терапия на първи избор предпазва от рецидив в около 90% от случаите и че вероятно пациентите с незадоволителен отговор не са получили адекватна доза медикамент.<sup>(94)</sup> Най-необоримото доказателство за ролята на IL-1 в патогенезата на системната форма на ЮИА е успешното лечение с инхибитори на IL-1.<sup>(94-96)</sup> И все пак, наличието на пациенти с незадоволителен отговор към терапията с инхибитори на IL-1 насочва към вероятното съществуване на т.нар. биологични подгрупи пациенти. Незадоволителният успех на терапията с инхибитор на IL-1 при пациенти с рефрактерен на предхождащото лечение артрит навежда на мисълта, че в хода на заболяването роля играят независими от IL-1 механизми. Вероятно те възникват в хода на болестта, когато тя е лошо контролирана с провежданата терапия. Предполага се, че пътища, различни от каспаза-1-инфламазомния, вероятно допринасят към секрецията на IL-1 при възпалителните заболявания, включително при експериментални модели на артрит.<sup>(100)</sup>

Друг изследван цитокин е IL-6 - синтезира се от моноцитите, активираните Т-лимфоцити, фибробластите, ендотелните клетки под въздействието на IL-1 и TNF- $\alpha$ . IL-6 действа като индуцира хепатоцитите да синтезират острофазови белтъци, най-вече CRP и хепсидин. Също така той съдейства за активирането на остеокластите, повишава ангиогенезата и провокира покачването на температурата.<sup>(101)</sup> Първоначално е описан като

фактор, стимулиращ В-лимфоцитите и в действителност подпомага диференциацията им, но също така допринася за диференциацията и на Т-лимфоцитите и инхибира продукцията на регулаторните Т-лимфоцити.<sup>(101,102)</sup>

Известно е, че и IL-6 играе роля в патогенезата на ЮИА. За първи път през 1991 година са описани повишени нива в серум на пациенти със системна форма на ЮИА.<sup>(103)</sup> Също така е установено, че степента на ставно засягане корелира със серумните стойности на IL-6 както при пациенти с полиартрит, така и при такива със системна форма на ЮИА.<sup>(103)</sup> В допълнение, серумните му нива следват кривата на фебрилитета при системната форма на ЮИА.<sup>(104)</sup> Повишените плазмени стойности се асоциират с тромбоцитоза, микроцитна анемия, изоставане в растежа и остеопения.<sup>(103,105,106)</sup> При експериментални модели на антиген индуциран артрит, се вижда че дефицитът на IL-6 предпазва от развитието на артрит.<sup>(107)</sup>

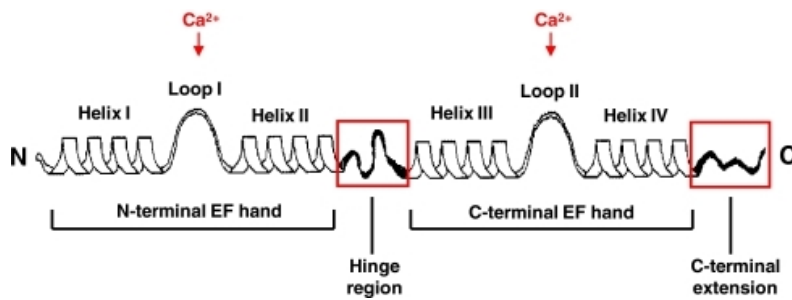
Независимо от значението на IL-1 и IL-6 в патогенезата на ЮИА, тези маркери са изключително нестабилни и поради това досега са изследвани само в рамките на клинични проучвания, а не като част от рутинната диагностика.

Въпреки наличните в момента в рутинната практика маркери на възпаление за оценка на активността на ЮИА, все още не съществуват утвърдени такива, които да подпомагат избора на терапия и да предскажат риска от възникване на рецидив. В редица проучвания обаче групата на S100 протеините показва своя потенциал като биомаркер корелиращ с болестната активност, показващ съществуваща субклинична активност, предсказващ риска от развитие на рецидив и отговора към провежданата терапия при ЮИА.

Семейството на S100 протеините съставлява най-голямата подгрупа в рамките на голямото семейство на калций-свързващите „EF-hand“ протеини (виж по-долу). За първи път S100 протеините са описани през 1965 година от Moore като една от основните фракции протеини, изолирани от говежди мозък.<sup>(108)</sup> Наименованието им произхожда от наблюдението, че са разтворими в наситен (100%) амониев сулфат. Филогенетично, семейството на S100

протеините са млада в еволюционно отношение група белтъци. Това се потвърждава от факта, че са установени само при гръбначни животни.<sup>(109)</sup> До момента са установени 21 различни вида S100 протеини, кодирани от човешкия геном.<sup>(110)</sup> Първоначално проведените генетични изследвания през 1993 година установяват, че шест от гените, кодиращи различни S100 протеини, са разположени на хромозома 1q21.<sup>(111)</sup> Впоследствие е установено, че повечето гени, свързани със синтеза на тази група калций-свързващи протеини са разположени в дългото рамо на 1-ва хромозома. Това преимуществено групиране на гените, свързани със синтеза им в една хромозома и в един локус, дава и наименованията им. Така например полипептидите, които са кодирани от гени, групирани в първа хромозома, са означавани като S100 A протеини с последващ номер от A1 до A16, отразяващ поредната позиция на съответния кодиращ ги ген.<sup>(112,113)</sup> Останалите гени, отговорни за синтеза на S100 протеините са разположени в хромозомни райони 21q22 (S100B), Xp22 (S100G), 4p16 (S100P) и 5q14 (S100Z).

Различните 21 вида S100 протеини, характерни за човека, имат сходна структура. Всички те имат еднакви ключови структурни единици.<sup>(114)</sup> Всеки мономер е с молекулно тегло между 10 и 13 kDa и е изграден от С-край или класически калций свързващ „EF-hand“ мотив, характерен за всички „EF-hand“ протеини и N-край или „псевдо EF-hand“, специфичен за S100 протеините. Важна структурна единица е „EF-hand“ мотивът, изграден от две спирали, свързани с бримка, съдържаща аминокиселинни остатъци, свързващи калциевия йон (фигура 1). Наименованието EF произлиза от E- и F- спиралите в бримката на парвалбумина. С-краят съдържа класическата калций-свързваща структура, докато N-краят е с намален афинитет към калций. По този начин, всеки мономер може да свързва два калциеви йона с различен афинитет. Това от своя страна води до активиране на S100 протеините при значително по-ниски калциеви концентрации в сравнение с другите калций-свързващи протеини.



**Фигура 1.** Схематично представяне на вторичната структура на S100 протеините. Всяка калций свързваща бримка (Loop I и II) е обградена от спирали (Helix I, II, III и IV). Свързващата част между спирали II и III е т.нар. свързващ район "hinge region". Спирала IV се последва от продължение на С-края. Именно аминокиселинната последователност на свързващия район и продължението на С-края определят различията между отделните членове на семейството на S100 протеините.

(Donato R. 2001. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 33:637–668.)

След свързването на калциевия йон S100 протеините претърпяват основни конформационни промени. Формира се хидрофобен джоб, съдържащ аминокиселинни последователности от свързващия район ("hinge region") и продължението на С-края. Смята се, че това представлява главният участък, който взаимодейства с таргетните протеини. Освен да свързват калций, S100 протеините имат способността да свързват и цинковия йон с висок афинитет.<sup>(115)</sup> Следователно, възможността за свързване на определени метални йони има съществено влияние за конформацията на протеините и във връзка с това и за функцията им.

Всеки от различните S100 протеини се синтезира в определен вид клетки. Съществуват три специфични за фагоцитите S100 протеина, съставляващи групата на т. нар. калгранулини - наименование отразяващо техните способности да свързват калций и високата експресия в гранулоцитите. Те включват S100A8 (известен още като миелоид свързан протеин, myeloid-related protein, MRP8 или калгранулин А или L1 лека верига), S100A9 (известен още като миелоид свързан протеин, myeloid-related protein, MRP14 или калгранулин В или L1 тежка верига) и S100A12 (калгранулин С).

S100A8 мономерът е изграден от 93 аминокиселинни последователности и има молекулно тегло 10.8 kDa. S100A9 мономерът е изграден от 114 аминокиселинни последователности и има молекулно тегло 13.2 kDa.<sup>(116,117)</sup>

Аминокиселинната последователност на S100A9 в голяма степен е хомоложна с

тази на другите два специфични за фагоцитите протеини – 30% с тази на S100A8 и 46% с тази на S100A12.

Отличителна черта на S100 протеините е възможността да образуват мултимерни комплекси. Повечето S100 протеини могат да бъдат открити като хомодимери, но S100A8 и S100A9 преимуществено формират хетеродимер S100A8/S100A9 (MRP-8/MRP-14). Тези хетерокомплекси се срещат в литературата и под наименованието калпротектин.<sup>(118)</sup>

Експресията на гените, свързани със синтеза на калгранулините е до голяма степен ограничена в миелоидната редица на костния мозък и по-конкретно във фагоцитите – неутрофили и моноцити. Синтезата на S100A8 и S100A9 се извършва изключително в определни клетки – така например и двата белтъка са налични в циркулиращите гранулоцити и моноцити, но не са налични в тъканните макрофаги в покой или пък в лимфоцитите.<sup>(119,120)</sup> Тъй като не е установена експресия на калгранулините в В- или Т-лимфоцити, се стига до извода, че тези протеини играят роля в неспецифичния имунен отговор и вероятно нямат отношение към специфичния такъв.<sup>(121)</sup>

Синтезата на миелоид свързаните протеини в моноцитите се извършва в ранните стадии на диференциация на клетките и рязко намалява с матурацията на клетките.<sup>(120,122)</sup> Различни медиатори на възпалението потискат транскрипцията на матричната РНК, свързана със синтеза на S100A8 и S100A9. По този начин експресията и секрецията им е осъществявана само в ранните стадии на възпалението.

S100A8 и S100A9 осигуряват в най-голяма степен калций-свързващия капацитет на фагоцитите.<sup>(123,124)</sup> Те са протеините в най-голямо количество в неутрофилите, съставляващи около 40% от протеиновото съдържание на цитозола.

Известно е, че S100A8 и S100A9 протеините изпълняват различни функции в и извън клетките.

Вътреклетъчно те модулират индуцирания от хемоатрактанти калциев сигнален път.<sup>(127)</sup> Най-добре проучени са калциево-зависимите взаимодействия на комплекса S100A8/S100A9 с цитоскелета. В допълнение е констатирано, че имат способността да се свързват специфично с микротубулите, виментина, кератиновите и актиновите филаменти. Доказано е, че взаимодействието на S100 протеините с актиновите филаменти в човешки неутрофили и това с микротубулите в човешки моноцити са решаващи за трансендотелната миграция на фагоцитите.<sup>(120,125,128-130)</sup>

Още през 1990 година е установено, че калпротектинът има антимикробната активност.<sup>(131)</sup> Известно е, че неутрофилите и моноцитите са съществени компоненти на системата на неспецифичния имунен отговор. Една от основните извънклетъчни функции на калгранулините, обект на дискусии и изследвания, е хемотаксичният им потенциал. Установено е от редица изследователски колективи, че S100A8, S100A9 и комплексът S100A8/S100A9 действат като хемоатрактанти преимуществено за неутрофилите.<sup>(132-134)</sup>

Друга изследвана извънклетъчна функция е способността за активация на ендотела. Доказано е, че секретиранияте комплекси S100A8/S100A9 се свързват специфично към ендотелните клетки и директно активират микроваскуларния ендотел. Това от своя страна води до загуба на бариерната му функция, апоптоза на ендотелните клетки, повишена секреция на тромбогенни фактори и увеличение на пермеабилитета му.<sup>(135-137)</sup>

Установено е, че калгранулините водят до повишена експресия и повишен афинитет на CD11b/CD18 рецептора (фигура 2, стр.34) на повърхността на неутрофилите.<sup>(138)</sup> По този начин изследователски колектив доказва, че подпомагат адхезията на неутрофилите към фибриногена и фибронектина и трансендотелната им миграция в тъканите, както и *in vitro* адхезията на моноцитите към ендотела. Значението на този патогенетичен механизъм и установената съществена секреция на калгранулини и

взаимодействието им с ендотела е потвърдено и при заболявания като васкулит и артрит.<sup>(139-141)</sup>

Следователно, въз основа на гореизложеното, калгранулините имат проинфламаторен ефект. Независимо от това също така е доказано, че те имат способността и да противодействат на тъканната увреда посредством инхибиция на матриксните металопротеинази.<sup>(142)</sup>

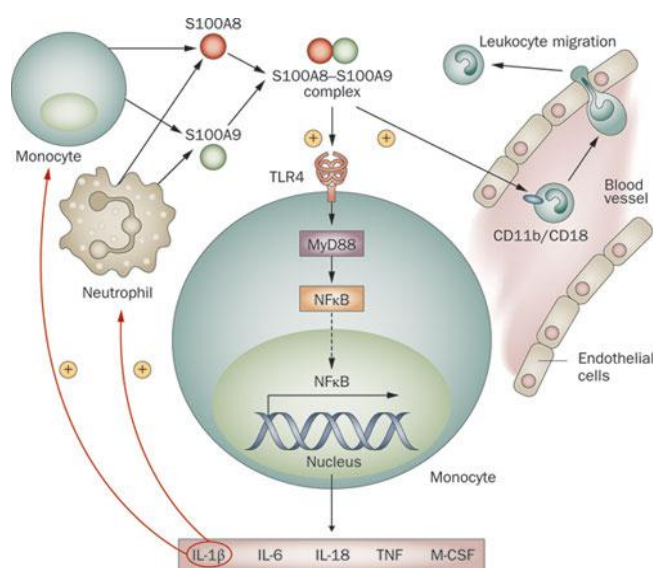
В последните 20 години се отделят изключителни усилия, време и средства за изучаване на имунните механизми при редица възпалителни заболявания и в частност при артритите. Известно е, че системата на неспецифичния имуен отговор се активира след среща с отключващи фактори. Тези отключващи фактори могат да бъдат или така наречените екзогенни асоциирани с патоген молекулни участъци (Pathogen Associated Molecular Patterns - PAMPs) или ендогенните асоциирани с увреда молекулни участъци (Damage Associated Molecular Patterns - DAMPs). Взаимодействието между тези молекулни участъци и клетките на имунната система се осъществява посредством рецептори, разпознаващи участъците (pattern recognition receptors - PRRs), разположени върху повърхността на клетките на неспецифичния имунитет. През 1997 година Ruslan Medzhitov и Charles Janeway в Йейлския Университет в САЩ откриват така наречения Toll-like рецептор (TLR).<sup>(143)</sup> Лигандът за TLR не е известен до 1998 година, когато в Далас Alexander Poltorak и Bruce Beutler установяват, че TLR е дълго търсеният рецептор за липополизахарида, активния компонент на ендотоксина на Грам отрицателните бактерии.<sup>(144)</sup> С това откритие се установява, че TLR представляват семейство рецептори, разпознаващи определени участъци (PRRs). Впоследствие, едни от тези участъци са получили наименованието асоциирани с патоген молекулни участъци (PAMPs) – разнообразен набор от молекули на патогените, притежаващи различни разпознаваеми участъци, които служат за предупреждение на организма за попадналите патогени.<sup>(145)</sup> Независимо от това, е известно, че патогените не са единствената причина за увреда на

тъканите и клетките. Друга причина е травмата. Всичко това довежда до възникването на ново схващане за възможната връзка между травмата и провокираните от патогените отговори. През 2006 година на проведената среща в Милано, Италия - EMBO Workshop on Innate Danger Signals and HMGB1, Joost Oppenheim предлага понятието „алармини“, с което да се отдиференцират ендогенни молекули, които сигнализират за тъканна или клетъчна увреда.<sup>(146)</sup> Алармините са известни и като асоциирани с увреда молекулни участъци (DAMPs). Семейството на алармините включва структурно и функционално различни молекули (неправилно огънати и гликирани протеини или достъпни хидрофобни участъци на молекули, освободени в голямо количество от увредени клетки), които биват пасивно освобождавани от некротичните клетки при инфекция или тъканна увреда или биват секретирани от стимулираните левкоцити и епител. При липса на инфекция или тъканна увреда алармините изпълняват важни вътреклетъчни функции.

Към семейството на алармините спадат и S100 протеините и по-специално- калгранулините.<sup>(147,148)</sup> Установено е, че за секрецията на S100A8 и S100A9 не са необходими структурни елементи, свързани с класическия зависим от едноплазмения ретикулум на Голджи секреторен път. Известно е, че те се секретират активно от активираните клетки, както и пасивно от некротични клетки.<sup>(125,126)</sup> Този механизъм на секреция е известен като алтернативен път и се характеризира с липсата на необходимост от сигнален пептид, необходим за класическия път на секреция. Този механизъм е характерен за т.нар. DAMP молекули, които имат значение за клетъчната хомеостаза, но се превръщат в проинфламаторни сигнали след като бъдат освободени в извънклетъчното пространство в резултат на клетъчна увреда, инфекция или възпаление.

Редица проинфламаторни стимули, включително и IL-1 $\beta$ , водят до активиране на неутрофилите и моноцитите. Активацията на тези клетки се съпровожда от повишена секреция на калгранулините S100A8, A9 и A12.

Образуваният комплекс S100A8/A9 действа като провъзпалителен медиатор и води до активиране на неспецифичния имунен отговор. Установено е, че това се осъществява посредством взаимодействие и активиране на рецепторите, разпознаващи определени участъци (PRRs), а именно - TLR-4 рецептора<sup>(148,149)</sup> и други специфични р-ри - RAGE (Receptor for Advanced Glycation End products - рецептор за крайни продукти на напреднало гликиране)<sup>(150)</sup>. Действието като ендегенен агонист за TLR-4 рецептора води до активиране на TLR-сигналните пътища, което пък активира транскрипционния фактор NFκB, свързан с повишена експресия на IL-1β. От друга страна, повишената секреция на IL-1β води до по-нататъшна секреция на S100 протеини. (фигура 2) Следователно, съществува позитивна обратна връзка между S100 протеините и IL-1β.<sup>(151)</sup> Това от своя страна допринася за поддържане на хроничното възпаление при ЮИА. Проучвания *in vitro* доказват, че прекъсването на позитивната обратна връзка намалява продукцията на IL-1β от мононуклеарните клетки.



**Фигура 2.** По Mellins, E. D. *et al.* (2011) Pathogenesis of systemic juvenile idiopathic arthritis: some answers, more questions  
*Nat. Rev. Rheumatol.*

Смята се, че в комплекса S100A8/S100A9, S100A8 е активният компонент, който се свързва специфично с TLR4 рецептора върху повърхността на моноцитите, което впоследствие води до активирането им и експресия на NFκB. В резултат на това, както беше споменато, се освобождават проинфламаторни цитокини и хемокини, като TNF-α и IL1-β, които допълнително допринасят като асоциирани с увреда молекулни уастъци (DAMPs) към вече активирания имунен отговор.<sup>(149,152)</sup>

Установено е, че S100A8, S100A9 и S100A12 се секретират в голяма степен от фагоцитите в засегнатите стави при артрит.<sup>(117,153, 154)</sup>

И така, вече е известно, че калгранулините активират ендотела и имат проинфламаторен ефект върху фагоцитите и ендотелните клетки, привличат и стимулират имунните клетки като макрофаги да синтезират проинфламаторни цитокини, включително TNF-α и IL1-β, а също така и притежават цитотоксични ефекти, което пък води до тъканна деструкция.<sup>(155-158)</sup> Доказано е в експериментален модел на антиген – индуциран артрит, че S100A8/A9 комплексите допринасят значително към процеса на ставно възпаление и левкоцитна инфилтрация.<sup>(157)</sup> В последните години се доказва, че калгранулините са важен фактор в осъществяването на остеокластната костна детрукция в модел на експериментален артрит.<sup>(159)</sup>

От друга страна, имайки предвид богатството от неутрофили в синовиалната течност при артрит, е известно че тези клетки изпълняват важна роля в патогенезата на синовита. Наличните ензими в неутрофилните гранули водят до директна увреда на структурите. Неконтролируемата активация на полиморфонуклеарните левкоцити е ключов момент във възпалителния процес при артритата.

Всичко това води до предположението, че серумните концентрации на S100 протеините корелират с локалния органно специфичен възпалителен отговор. Освен това, е известно, че за разлика от цитокините, S100 протеините образуват много стабилни комплекси в серум или ексудати.<sup>(32)</sup> Поради това те

могат да бъдат използвани в клиничната практика без особени затруднения. Комплексът S100A8/A9 е сравнително стабилен протеин, който може да бъде измерван в серум без необходимостта от специално съхранение, за разлика от цитокините, които са силно лабилни и изискват бързо определяне на стойностите в серума или съхранение на  $-80^{\circ}\text{C}$  до момента на определяне на концентрациите. Ползата от приложението на S100 протеините като биомаркер на възпалението е доказана в редица проучвания.

Известно е, че след преустановяване на терапията с метотрексат при около 30-50% от пациентите с ЮИА се наблюдава рецидив.<sup>(160-162)</sup> Този факт предполага наличието на т.нар. субклинична болестна активност. Тоест, дори при постигната клинична ремисия, все още може да персистира нискостепенна възпалителна активност, която не може да бъде установена с рутинните клинични или лабораторни методи. Именно тази субклинична болестна активност е отговорна за невъзможността при тези пациенти да се постигне стабилна ремисия след спиране на лечението. Следователно, въвеждането в практиката на биомаркер, диференциращ пациентите с повишен риск от рецидив въз основа на инфламаторния фон на заболяването, би бил от изключителна полза в детската ревматология.

Изследователският колектив на Frosch и колеги установяват, че S100A8 и S100A9 се освобождават на мястото на възпаление. Те предполагат, че серумните им нива могат да корелират с локалната болестна активност при пациенти с ЮИА. С тази цел екипът провежда проспективно проучване, проследяващо в рамките на четири години 35 деца с олигоартритна форма на ЮИА.<sup>(153)</sup> Определят концентрациите на S100A8/A9 в серум и в синовиална течност. Констатирани са значимо по-високи стойности на изследваните протеини в синовиалната течност (средна стойност 42,800 ng/ml) в сравнение със серума (средна стойност 2,060 ng/ml). Наблюдавана е добра корелация между концентрациите на S100A8/A9 в серума и тези в синовиалната течност ( $r = 0.78$ ,  $P \leq 0.01$ ). Изследователският екип установява също така силна корелация

между стойностите на S100A8/A9 и болестната активност ( $r = 0.62$ ). При пациентите с активно заболяване са измерени до пет пъти по-високи серумни концентрации на протеините в сравнение с концентрациите при пациентите в ремисия. При последната група стойностите са били незначително повишени над определените референтни такива. Това проучване показва, че серумните концентрации на S100A9/A8 биха могли да бъдат полезен показател за проследяване на локалното възпаление при някои форми на ЮИА.

Три години по-късно същият изследователски колектив публикува проучване, разглеждащо ролята на S100A8/A9 при системната форма на ЮИА.<sup>(163)</sup> Изследват проспективно в рамките на пет години серумните концентрации на S100A8/A9 в 88 проби от 20 пациента със системна форма на ЮИА. Като контроли използват 30 здрави деца и такива с други възпалителни заболявания – 30 пациента с клинични и лабораторни данни за бактериална инфекция, 30 пациента с активен олигоартрит и 14 пациента с ЮИА в ремисия. Установено е, че серумните концентрации на S100A8/A9 при децата с активна системна форма на ЮИА са около 120 пъти по-високи от тези при здравите контроли и около 12 пъти по-високи от тези при пациентите с активен олигоартрит. Впечатление прави голямата разлика в серумните концентрации на калций свързващите протеини между групата със системна форма на ЮИА и тази с олигоартрит. Вероятно това се обяснява с факта, че докато при олигоартрита S100A8/A9 се отделят на мястото на синовиално възпаление и служат като маркер за локалната активност, то при системната форма се наблюдава системно активиране на неспецифичния имунен отговор. Стойностите на S100A8/A9 са значително повишени при децата със системна форма в сравнение с тези при инфекция. Следователно, тази група протеини могат да бъдат обещаващ параметър при поставяне на диагнозата системна форма на ЮИА и диференцирането ѝ от системна инфекция. Лонгитудиналното проследяване на 10 пациента със системна форма на ЮИА след започване на противовъзпалителна терапия показва отчетлив спад на концентрациите на

S100A8/A9 в рамките на четири месеца, достигайки референтни граници при пациентите в дълготрайна ремисия. Това показва, че калций свързващите протеини могат да бъдат надежден маркер за проследяване на активността на заболяването и отговора към терапия при системната форма на ЮИА.

И така, вече е доказано, че калций свързващите протеини се секретират от активираните неутрофилни гранулоцити и моноцити в мястото на възпаление и изпълняват проинфламаторни ефекти посредством активиране на TLR4 рецептора. Следователно, те допринасят за инициацията, амплификацията и хронифицирането на възпалителния процес.

Приложението им като показател на съществуваща субклинична активност при ЮИА е доказано от изследователски екип от 29 държави (включително и България), провеждащ проучване за Международната Организация за Проучвания в Детската Ревматология – PRINTO.<sup>(164)</sup> Екипът на PRINTO изследва дали по-дълготрайното приложение на метотрексат, след достигане на клинична ремисия при пациенти с ЮИА, би могло да е свързано с по-нисък риск от рецидив след преустановяване на терапията. Изследователският колектив си поставя и въпроса дали съществуват специфични биомаркери, които биха диференцирали пациентите с повишен риск за рецидив след спиране на терапията. За тази цел се провежда проспективно, отворено, мултицентрично рандомизирано клинично проучване, включващо 364 пациента (средна възраст 11.0 години) с ЮИА от 61 центъра. След достигане на клинична ремисия, пациентите биват разпределени на случаен принцип в две групи – такива, които ще приемат метотрексат за период от шест месеца и такива, които ще го приемат за период от 12 месеца. И двете групи са проследени след преустановяване на терапията с метотрексат. Не е установена сигнификантна разлика в честотата на рецидив между двете групи. Въз основа на предходни публикации в литературата<sup>(165,166)</sup> относно значението на комплексът S100A8/A9 като показател на субклинична болестна активност, екипът на PRINTO определя серумното ниво на S100A8/A9 в момента на

преустановяване на терапията в двете групи. Констатираме, че при определяне на серумните концентрации на S100 A8/A9 непосредствено преди преустановяването на лечението с МТХ, при пациентите с по-висока честота на рецидив са установени по-високи стойности на протеините. По-ниски стойности на S100A8/A9 са констатирани в групата с по-ниска честота на рецидиви. Следователно, по-високите стойности на S100A8/A9 се асоциират с по-висок риск за рецидив след спиране на терапията. И така, екипът на PRINTO публикува първото проучване, което показва, че при пациенти с ЮИА, провеждащи терапия с метотрексат, при които е постигната клинична ремисия и са доказани по-високи стойности на S100A8/A9, се установява по-висок риск за рецидив на заболяването след спиране на терапията в сравнение с пациентите със стойности на S100A8/A9 в референтни граници. Това е и първото проучване, което потвърждава идеята, че серумен биомаркер може да бъде използван с цел прогнозиране на риска от възникване на рецидив след преустановяване на лечението при ЮИА. Също така се показва, че стабилността на постигнатата ремисия при ЮИА не се повлиява от продължителността на провежданата поддържаща терапия с метотрексат. Стабилността на ремисията по-скоро зависи от индивидуалния имунологичен профил на пациента. Следователно, определянето на стойностите на S100A8/A9 дава възможност за по-акуратно вземане на решение относно терапевтичния план, персонализиран за отделния пациент. Освен това, изследването на тези специфични за фагоцитите протеини предсказва риска от развитие на рецидив след спиране на терапията. Това наблюдение води до хипотезата, че увеличените серумни концентрации на S100A8/A9 могат да идентифицират болните в нестабилна ремисия, които са с повишен риск за рецидив, както и че измерването на нивата на тези протеини може да допринесе за решението дали да се прекъсва или да не се прекъсва лечението.

Друго проучване, извършено отново за PRINTO (включващо отново България) изследва също възможността за диференциране на пациентите с

ЮИА с риск от възникване на рецидив посредством биомаркери при липсващи клинични белези на активност на заболяването.<sup>(167)</sup> То включва част (188 пациента) от изследваните в гореописаното проучване на PRINTO пациенти. Всичките 188 деца покриват приложимите до този момент критерии за липса на активност на заболяването. Определени са стойностите на S100A8/A9, S100A12 и високочувствителен CRP в момента на спиране на терапията с метотрексат. Пациентите са проследени за период от една година. При 35 от наблюдаваните 188 пациента е регистриран рецидив в рамките на шест месеца. Известно е, че клиничните или стандартните лабораторни показатели не могат да диференцират пациентите с риск за рецидив от тези без такъв. Високи стойности на S100A8/A9 и на S100A12 са регистрирани при децата, при които е наблюдаван рецидив в рамките на шест месеца след спиране на терапията. Групата на пациентите с рецидив в рамките на три месеца след спиране на лечението са с по-високи средни стойности на S100A8/A9 и S100A12 в сравнение с групата с по-късен рецидив. Ролята на CRP е трудно да бъде оценена поради включващите в проучването критерии – предварително е определен праг на стойността му, определящ неактивно заболяване. Установено е, че стойностите на високочувствителния CRP (hsCRP) не се различават между пациентите с рецидив на заболяването и тези в ремисия (но това може да е резултат от използването на включващи критерии, основани на нормални нива на hsCRP, а именно болните с високи нива на hsCRP са по-склонни към рецидив на заболяването). Едновременното изследване на S100A12 и CRP подобрява предиктивната стойност за риска от рецидив. В заключение се констатира, че серумните концентрации на S100A8/A9 и S100A12 са значимо по-високи при пациентите, които впоследствие развиват рецидив в сравнение с тези, които достигат стабилна ремисия.

В допълнение, подобни наблюдения, свързани с нивото на S100A8/A9 и риска от възникване на рецидив са докладвани от Holzinger и колеги, които изследват 52 пациенти със системна форма на ЮИА.<sup>(168)</sup> Провеждайки

проучването констатира, че серумните концентрации на S100A8/A9 корелират добре с отговора към терапията и активността на заболяването при тази подгрупа пациенти. Пациентите с дебют или рецидив на системната форма на ЮИА имат по-високи стойности на S100A8/A9 в сравнение с тези, които са достигнали стабилна ремисия. При определяне на серумните концентрации на S100A8/A9 в момента на преустановяване на лечението се вижда, че те са по-високи при пациентите с рецидив при проследяване в сравнение с тези без рецидив на заболяването. Изследователският колектив установява, че прогнозирането на риска от рецидив е с висока точност, с чувствителност 92% и специфичност 88% когато се използва като референтна граница за S100A8/A9 >740 ng/ml. Следвателно S100A8/A9 протеините могат да бъдат допълнителен показател за мониториране на терпията при пациенти със системна форма на ЮИА. Освен това, значително намаляване на нивата на S100A8/A9 шест месеца след започване на метотрексат се наблюдава при болните със системна форма на ЮИА, които са постигнали поне ACRpedi70 отговор, докато тези, които не са успели да получат подобрене с повече от 30%, показват устойчиво трайно увеличаване на нивата на комплекса S100A8/A9. По подобен начин при болните със системна форма на ЮИА, които са лекувани успешно с IL-1 или TNF- $\alpha$  инхибитори, са констатирани ниски серумни концентрации на комплекса S100A8/A9. Въз основа на проведените проучвания, може да се направи изводът, че определянето на концентрацията на S100A8/A9 в момент на клинично неактивно заболяване показва евентуална субклинична активност на болестта и диференцира рисковите пациенти за развитие на рецидив.

Друг въпрос, с който се занимават напоследък научни работници и детски ревматолози е откриването на биомаркер, който би корелирал с отговора към терапията при ЮИА. Налице са значителен брой доказателства, че вероятно съществува т.нар. „ранен терапевтичен прозорец“, в който успешното лечение води до по-добри крайни резултати.<sup>(169)</sup> Също така, ранният задоволителен отговор към терапия с МТХ се асоциира с добра прогноза на заболяването в

дългосрочен план.<sup>(170)</sup> Следователно, въвеждането на надеждни биомаркери в практиката за диференцирането на пациенти с вероятен добър отговор към МТХ, е значителна крачка напред в терапията на децата с ЮИА.

Проучване на Moncrieffe и колеги разглежда именно възможността S100A8/A9 да се използва като биомаркер предсказващ вероятността за добър отговор към терапия с метотрексат.<sup>(171)</sup> Обхваната е подгрупа от 87 пациенти с ЮИА. Изследвани са лабораторни и клинични параметри преди започване на терапията с метотрексат и в хода на проследяването – шест месеца (4-8 месеца) след началото на лечението. Лабораторните показатели включват S100A8/A9, различни цитокини (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-12, IL-17, IL-18, IL-22, IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ ), СУЕ и CRP. Други изследвани променливи са: продължителността на заболяването, възрастта на изява, броя на засегнати стави, брой стави с ограничени движения, цялостната оценка на състоянието от страна на лекаря и оценката на родителя. Пациентите са подразделени на две групи – такива с добър отговор към терапията и такива с лош или незадоволителен отговор. Не са установени значими разлики между двете групи по отношение на възраст на пациентите, продължителност на заболяването, пол, доза на метотрексат или начин на приложението му между двете групи. Констатиран е значимо по-голям брой засегнати стави преди започване на лечението при групата с последващ добър отговор при проследяване в сравнение с тази с незадоволителен. Тъй като тези данни показват, че децата с висока възпалителна активност преди започване на терапията с метотрексат имат по-голям шанс за достигане на добър отговор, изследователският колектив определя зависимостта и с лабораторни параметри на възпалението. Установено е, че серумните концентрации на S100A8/A9 и на CRP преди започване на терапия са значимо по-високи при подгрупата с добър отговор в сравнение с тази с незадоволителен. Стойностите на СУЕ не са се различавали значимо между двете групи. Първоначалните стойности на някои проинфламаторни цитокини (IL-2, IL-6, IL-12, IL-18 и TNF- $\alpha$ ) са значимо по-

високи при пациентите с добър отговор при проследяване. Констатирана е добра корелация между серумните нива на S100A8/A9 и CRP и слаба корелация между стойностите на S100A8/A9 и броя на засегнатите стави. Следователно високата болестна активност (високи стойности на S100A8/A9, CRP, някои инфламаторни цитокини и по-голям брой засегнати стави) преди започване на терапия се свързва с по-добър отговор към лечението при проследяване. Изследователският колектив стига до извода, че както S100A8/A9, така и CRP, имат отлични предиктивни стойности, тъй като високите стойности на тези протеини са свързани с висока вероятност за добър отговор. И все пак, стойностите на S100A8/A9 имат по-голяма специфичност за диференциране на пациентите с потенциален добър отговор. При извършване на мултивариационен анализ се установява, че S100A8/A9 (и нито един от другите изследвани фактори) като самостоятелно използван параметър е независимо значимо свързан с отговора към терапията. Изследователският екип демонстрира, че високите първоначални стойности на S100A8/A9 имат прогностична стойност по отношение на диференциране на подгрупа пациенти, чийто артрит би се повлиял добре при терапия с метотрексат.

И така, вече е известно, че съществуват групи пациенти с липса на клинична активност и нормални стойности на CRP и/или СУЕ с леко завишени стойности на S100A8/A9, които имат повишен риск за рецидив след преустановяване на антиинфламаторната терапия.<sup>(164, 167)</sup> Известно е и, че при 35% от децата с ЮИА се наблюдава незадоволителен или липсващ отговор към лечението с MTX. При тази група пациенти към терапията се добавя биологичен агент - препарат, който е насочен към различен медиатор на възпалението. Една голяма група лекарствени средства са инхибиторите на тумор некрозис фактор алфа или анти-TNF- $\alpha$  препарати. Прибавянето на биологичен агент към терапевтичната схема при ЮИА подпомага достигането на крайната цел, а именно – ремисия на заболяването. Независимо от това, е установено, че при 30-40% от децата лекувани с биологичен агент, тази цел не е

постижима по неизвестни причини.<sup>(172-174)</sup> До този момент са изследвани няколко показателя свързани с отговора към терапия с етанерсепт – първият анти-TNF- $\alpha$  медикамент, одобрен за лечението на ЮИА.<sup>(175,176)</sup> Тук спадат възраст на пациента, пол, брой и вид на засегнати стави, продължителност на заболяването. И все пак, нито един от тези показатели не може със сигурност да диференцира пациентите с добър от тези с незадоволителен отговор към терапията. Необходим е по-индивидуализиран подход към избора на терапия, основан на утвърдени биомаркери в комбинация с клинични параметри. За тази цел изследователски екип от Холандия, Великобритания и Германия провежда проучване относно предиктивната стойност на серумните концентрации на S100A8/A9 за диференциране на пациентите с добър отговор към терапия с анти-TNF- $\alpha$  медикамент от тези с риск за развитие на рецидив след преустановяване на терапията с анти-TNF- $\alpha$  препарата.<sup>(177)</sup> Изследвани са 88 пациента с форма на ЮИА, различна от системната, при които се започва терапия с анти-TNF- $\alpha$  медикамент и 26 пациента, при които е постигната ремисия и терапията с анти-TNF- $\alpha$  медикамента се преустановява. Първата група пациенти (n=88) са подразделени на такива с добър отговор (достигнали поне ACRpedi50; n=66) и такива с незадоволителен отговор (липса на какъвто и да е отговор или достигане на ACRpedi30; n=22) на шестия месец от началото на терапията с биологичния агент. Установено е, че серумните нива на S100A8/A9, определени преди започване на терапията с биологичен агент, са сигнификантно по-високи при пациентите с добър отговор в сравнение с тези на групата с незадоволителен отговор. Следователно, активността на заболяването се повлиява и подтиска по-значимо при пациентите с високи първоначални стойности на S100A8/A9. От пациентите започнали терапия с биологичен агент, 43 са проследени в рамките на пет месеца след началото на лечението. Сред тях 14 са с незадоволителен отговор. Изследваните серумни концентрации на S100A8/A9 са сигнификантно по-ниски сред групата с добър отговор в сравнение с тази с незадоволителен (p<0.001). В групата на

пациентите, които са постигнали ремисия и са преустановили провежданата терапия, са наблюдавани 12 рецидива в рамките на шест месеца след спиране на лечението. При всички тях измерените стойности на S100A8/A9 при преустановяване на терапията са били по-високи в сравнение с тези при останалата част, при които не е наблюдаван рецидив. В заключение, високите стойности на S100A8/A9, определени преди започване на терапия с анти- TNF- $\alpha$  медикамент, са свързани с добър отговор към провежданата терапия. От друга страна, установените високи стойности на S100A8/A9 при преустановяване на терапията са свързани с по-висок риск от рецидив.

Известно е, че оценката на активността на артритите включва освен клинични и лабораторни показатели и образна диагностика. Проучване, публикувано в *Arthritis Research & Therapy* през 2015 година разглежда хипотезата дали стойностите на S100A8/A9 корелират с клиничната и най-вече определената чрез ултразвук активност при възрастни пациенти с ревматоиден артрит.<sup>(178)</sup> Изследвани са 37 пациенти, при които са определени концентрациите на S100A8/A9, CRP и СУЕ в момента на ултразвуковото изследване на ставите. Потвърждава се становището, че концентрациите на S100A8/A9 са значимо свързани с клиничната, лабораторната и образната оценка на активността на заболяването в разглежданата група. Изследователският екип стига до извода, че S100A8/A9 може да бъде по-добър показател от СУЕ и CRP за проследяване на установения чрез ултразвук синовит при пациентите с ревматоиден артрит. Друго проучване, ръководено от норвежки екип специалисти, начело с Hilde Berner Hammer оценява наблюдаваните промени в рентгенографиите на ръка сред 124 пациенти с ревматоиден артрит.<sup>(179)</sup> Рентгеновите изследвания са проведени при поставяне на диагнозата и повторно 10 години по-късно. При дебюта на заболяването са изследвани и нивата на S100A8/A9. Констатира се, че при пациентите с по-високи серумни стойности на S100A8/A9 се наблюдава по-агресивен ход на заболяването и развитие на ерозии при контролните рентгенографии.

Следователно, S100A8/A9 може да бъде използван като прогностичен маркер и за радиографски наблюдаваните промени в хода на заболяването.

Напоследък, S100A8/A9 бива широко изследван като потенциален показател с прогностична стойност за активността на заболяването не само при ЮИА, но и при други ревматологични и възпалителни заболявания. В скорошно проучване, обхващащо 170 пациента с ревматоиден артрит е показано, че базалните серумни концентрации на S100A8/A9 са обещаващ биомаркер за предвиждане на отговора към терапията с биологичен агент и могат да бъдат използвани за проследяване на лекарствения отговор.<sup>(180)</sup> Зависимост между стойностите на S100A8/A9 и активността на заболяването е установена и при 69 възрастни пациенти с ентезит-свързан артрит.<sup>(181)</sup> В литературата съществуват редица публикации за асоциации на концентрациите на комплекса S100A8/A9 с активността на други заболявания в детска възраст – възпалителни чревни заболявания като болест на Крон и хроничен улцерозен колит<sup>(182)</sup>, некротизиращ ентероколит<sup>(183)</sup>, муковисцидоза<sup>(184)</sup>, болест на Кавасаки<sup>(185)</sup>, криопирин асоциираните периодични синдроми<sup>(186)</sup>, тежки форми на гломерулонефрит<sup>(187)</sup>, невробластом<sup>(188)</sup>, а също така и при възрастни пациенти - отхвърляне на алографта при бъбречна трансплантация<sup>(189)</sup>, артрит при псориазис<sup>(190)</sup>, възпалителни чревни заболявания<sup>(191,192)</sup>, подагра<sup>(193)</sup>. Също така е показано, че увеличени серумни нива на S100A8/A9 са независими предвиждащи риска показатели за различни сърдечносъдови заболявания като остър коронарен синдром и миокарден инфаркт.

Извън ставното поражение, ЮИА често се асоциира с развитие на преден увеит, застрашаващ зрението.<sup>(71)</sup> Свързаният с ЮИА увеит обикновено има хроничен ход, с често развитие на усложнения и компроментирана прогноза за зрението.<sup>(194)</sup> И тъй като ходът на увеита е често безсимптомен<sup>(195)</sup>, клиничното му проследяване в зависимост от възпалителната активност и тъканната увреда представлява съществено предизвикателство.<sup>(11,76)</sup> Във връзка с това в скорошно проучване колектив от Германия си поставя за цел да определи значението на

S100A8/A9 и S100A12 за развитието на увеит.<sup>(196)</sup> Изследвани са серуми от 79 пациента с асоцииран с ЮИА увеит, 24 пациента с идиопатичен преден увеит, както и 24 контроли. Допълнително са изследвани проби от вътреочната течност, циркулираща в предния сегмент на окото – 17 от пациенти с асоцииран с ЮИА увеит, 12 от такива с идиопатичен преден увеит и 16 контроли. Във всички проби от серум и вътреочна течност са определени нивата на S100A8/A9 и S100A12. Колективът констатира, че серумните стойности на специфичните за фагоцитите протеини са по-високи при децата с асоцииран с ЮИА увеит и при тези с идиопатичен увеит в сравнение с контролите ( $p < 0.05$ ). Провеждането на лонгитудинален анализ сред пациентите с асоцииран с ЮИА увеит показва корелация между серумните нива на S100A8/A9 и S100A12 и активността на увеита ( $p = 0.03$ ). Също така стойностите на S100A8/A9 във вътреочната течност на пациенти с асоцииран с ЮИА увеит и идиопатичен увеит са сигнификантно повишени в сравнение с контролите. Следователно, определянето на серумните концентрации на S100A8/A9 и S100A12 може да бъде използвано за проследяване не само на активността на артритата, но и на тази на увеита.

В заключение, серумните концентрации на S100A8/A9 могат да бъдат прилагани за проследяване на активността на заболяването. Доказано е, че те служат като показател за активността на ЮИА независимо от клиничните показатели. Описаните проучвания показват, че стойностите на S100A8/A9 корелират с болестната активност при пациенти с ЮИА<sup>(153)</sup>, могат да бъдат използвани за установяване на субклинична болестна активност и са свързани с риска от възникване на рецидив след преустановяване на терапията с метотрексат.<sup>(164,167)</sup> Освен това, е доказано, че стойностите им корелират добре с отговора към терапия при пациентите със системна форма на ЮИА<sup>(168)</sup> и имат способността да предвиждат вероятността за добър отговор към метотрексат при пациенти с форма на ЮИА, различна от системната.<sup>(171)</sup> Също така е

показана ролята на определянето на серумните концентрации на S100A8/A9 като прогностичен маркер за възникване на рецидив след спиране на терапия с анти-TNF $\alpha$  медикамент.<sup>(177)</sup> Не на последно място определянето на серумните концентрации на S100A8/A9 има значение и при проследяване активността на асоциирания с ЮИА увеит.<sup>(196)</sup>

Все пак, за да може един биомаркер да бъде използван в избора на терапия, той трябва да покрива определени изисквания. Трябва да може да прогнозира конкретен ход на заболяването и прогностичната му стойност трябва да бъде утвърдена. Освен това, предиктивната му стойност трябва да е свързана и с определен отговор към терапия. Корелацията между концентрациите на S100A8/A9 и отговора към терапия е показана както в проучването при деца с ЮИА, провеждащи терапия с TNF- $\alpha$  медикамент<sup>(177)</sup>, така и в предходни проучвания. Отговорът към терапията е оценен като промяна както в относителни (ACRpedi50), така и в абсолютни (JADAS-10) показатели. Показано е, че S100A8/A9 може да служи като допълнителен фактор, прогнозиращ промяната в болестната активност. И все пак, неговата стойност като допълнителен фактор не е висока. Част от пациентите с добър и част от тези с незадоволителен отговор към терапията имат сравними стойности на калций-свързващите протеини. В допълнение, установената специфичност и чувствителност на серумните им концентрации не са оптимални за която и да е разграничаваща стойност. Последното се подкрепя и от проведеното проучване от Moncrieffe и колеги.<sup>(171)</sup> Следователно, тъй като предиктивната стойност на S100A8/A9 не е съвършена, терапевтичните решения не могат да се основават само на определяне на техните концентрации. Имайки предвид хетерогенната група пациенти с ЮИА, твърде малко вероятно е да бъде открит един единствен биомаркер, който да предсказва перфектно отговора към провежданата терапия. Преимуществото на S100A8/A9 е, че както вече беше споменато, е относително стабилен протеин, лесно измерим в серум.

Вследствие, определянето на серумните им концентрации може да подпомага съставянето на предсказващи отговора към терапия скали, включващи както клинични, така и лабораторни параметри.

Понастоящем терапията на ЮИА според препоръките на Американския колеж по ревматология започва с ниска доза и не така агресивна терапия и се преминава след период от няколко месеца към следваща по-агресивна стъпка при неуспех на предходната терапия.<sup>(34)</sup> Известно е, че лош отговор към първоначалния избор на терапия се наблюдава при около 50% от децата в рамките на първите шест месеца на лечението.<sup>(162)</sup> Метотрексатът остава най-широко използваното конвенционално болестмодифициращо средство при ЮИА поради доказаната си ефективност за контрол на болестта и приемливите странични действия.<sup>(211,212)</sup> Неговата ефикасност е потвърдена в контролирано проучване през 1992 година в доза 10 мг/м<sup>2</sup> седмично, приемана перорално.<sup>(213)</sup> По-нататъшно рандомизирано проучване показва, че МТХ проявява максималния си терапевтичен ефект в парентерална доза от 15 мг/м<sup>2</sup> седмично. Не е наблюдаван по-добър ефект при увеличаване на дозата до 30 мг/м<sup>2</sup> седмично.<sup>(214)</sup>

Възможно е различията в отговора към терапията при отделните пациенти с ЮИА да са генетично обусловени. Във връзка с това проучването на различни генетични полиморфизми, свързани с лекарствения отговор, е обект на редица международни научни проучвания. Предполага се, че генетичните варианти също могат да бъдат използвани като биомаркери.

За първи път през 2005 година изследователски колектив от Университетската болница в град Хале, Германия, публикува резултатите от проведено изследване върху връзката между генетични полиморфизми в *MTHFR* гена и токсичността и ефективността на провежданата терапия с МТХ при 58 пациента с ЮИА.<sup>(197)</sup> Екипът установява асоциация на A1298C полиморфизма с клиничната ефективност при прием на МТХ.

Следващо проучване на изследователска група от Университета в гр. Лайден, Холандия обхваща ретроспективно 128 деца с ЮИА, лекувани с МТХ.<sup>(198)</sup> Изследвани са 6 полиморфизма в 5 кандидат гена - *AMPD1* – adenosine monophosphate deaminase 1 (rs17602729), *ATIC* -5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide transformylase - (rs2372536), *ITPA* - inosine triphosphate pyrophosphatase (rs41320251), *MTHFR* - methylenetetrahydrofolate reductase (rs1801133 и rs1801131) и *MTHFD1* - methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (rs 2236225). Направено е заключението, че полиморфизми в *MTHFR* гена са асоциирани с добър лекарствен отговор сред изследваните индивиди.

В друго проучване от Великобритания, обхващащо пациенти с ЮИА, в *SLC16A7* гена са открити три единични нуклеотидни полиморфизми свързани с отговора при терапия с МТХ.<sup>(198)</sup>

Едно от големите проучвания при деца с ЮИА е CHARMS (Childhood Arthritis Response to Medication Study). Отново негова цел е намирането на отговор защо при децата с ЮИА се наблюдават различия в лекарствения отговор. Като част от това иновативно по своята формулировка проучване изследователската група на Hinks и сътрудници установяват статистически значима асоциация ( $p < 0.05$ ) на единични нуклеотидни полиморфизми с висок риск от лош отговор към терапията с МТХ - два (rs12995526; rs4673990) в *ATIC* гена и един (rs2295553) в *ITPA* гена.<sup>(199)</sup>

Също така беше показана взаимовръзка между отговора към терапия с МТХ и полиморфизми на гени, свързани с полиглутаминирането на МТХ и поемането и излъчването му от клетките. В скорошна публикация de Rotte и сътрудници съобщават, че 3 полиморфизма в 3 ключови гена, свързани с транспорта на МТХ определят отговора към провежданата терапия при пациенти с ЮИА.<sup>(200)</sup> Екипът обхваща група от 287 деца с ЮИА в рамките на първата година от лечението с МТХ. Изследвана е асоциацията на 21 полиморфизма в 13 гена, отговорни за клетъчния транспорт и полиглутаминация на МТХ. В резултат е установена асоциация на един

полиморфизъм (rs1045642) в *ABCB1* (adenosinetriphosphate- binding cassette transporter B1) гена и един (rs4793665) в *ABCC3* (adenosinetriphosphate -binding cassette subfamily C) гена с добър отговор към лечението с МТХ, както и връзка на полиморфизъм (rs1051266) в *SLC19A1* (solute carrier 19A1) гена с лош отговор към МТХ.

Едно от последните проучвания в тази област, обединяващо екипите на Childhood Arthritis Response to Medication Study (CHARMS) и Childhood Arthritis Prospective Study (CAPS) представлява най-големия генетичен анализ на отговора към МТХ до момента.<sup>(201)</sup> В него са включени 759 деца с ЮИА. Установена е силна асоциация на 14 региона, 3 от които съдържат гени от особен интерес - *ZMIZ1* (Zinc Finger MIZ-Type Containing 1), *TGIF1* (Transforming Growth factor-beta-Induced Factor) и *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator). Локусът с най-силно установена асоциация е *CACNA1I* (Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 I). Установените в това проучване гени изискват по-нататъшно потвърждаване в независими кохорти пациенти, което от своя страна би подпомогнало крайната цел – прогнозиране на отговора към МТХ при лечението на ЮИА.

Редица проучвания се занимават с оценка на възможни кандидат гени, въввлечени в сложния генетично обусловен път на фармакодинамика и фармакокинетика на МТХ. Независимо от това, резултатите са все още противоречиви и не е установен определен генетичен маркер за лекарствения отговор към МТХ при ЮИА. Наскоро при проведени геномни проучвания<sup>(201)</sup> се установяват нови потенциални биологични процеси свързани с лекарствения отговор като TGF- $\beta$  сигналния път и калциеви канали. Точното утвърждаване и интегриране на резултатите от тези проучвания би способствало за идентификацията на пациентите с добър отговор към МТХ.

Един от най-често проучваните гени, свързани с метаболизма на МТХ е метилентетрахидрофолатредуктазия – *MTHFR*. Повечето проучвания, изследващи връзката между токсичността и ефикасността на терапията с МТХ

и единични нуклеотидни полиморфизми в *MTHFR* гена са извършени при възрастни пациенти с ревматоиден артрит. Съществуват единични проучвания при деца с ЮИА и данните са противоречиви.

Докладвани са асоциации на полиморфизмите С677Т и А1298С в *MTHFR* гена с токсичността и ефикасността на провежданата терапия с МТХ.<sup>(169, 197, 215, 216)</sup> Механизмът на действие на МТХ се основава на антагонизъм на фолиевата киселина, но освен това повлиява и други метаболитни пътища – пуриновия и пирамидиновия, както и хомоцистеин-метиониновия. Ниската активност на ензима води до ниски концентрации на ензимния продукт – 5-метилентетрахидрофолат. Това от своя страна се асоциира с натрупване на хомоцистеин (редуцира се реметилирането на хомоцистеин до метионин) и намалени вътреклетъчен капацитет за трансметиране и метилиране на ДНК, протеини и липиди.<sup>(169)</sup>

И двата полиморфизма - С677Т и А1298С - са свързани с намалена активност на ензима метилентетрахидрофолатредуктаза (*MTHFR*). Полиморфизмът С677Т е свързан със заместване на аминокиселината аланин с валин в аминокиселинната последователност и структура на ензима *MTHFR*. Това от своя страна води до формирането на термолабилен вариант на ензима с намалена ензимна активност и последващи повишени плазмени нива на хомоцистеин. Носителство на хомозиготния вариант 677 Т/Т се наблюдава при около 8-10% от населението на Земята. При хомозиготните носители на дивия алел се установява около 30% активност на ензима *MTHFR*. При хетерозиготните носители 677 С/Т, които представляват около 40% от населението, се наблюдава около 60% активност на ензима.<sup>(197,216)</sup>

През 1998 година е описан друг полиморфизъм в *MTHFR* гена – А1298С водещ до замяна на аминокиселината глутамин с аланин.<sup>(222)</sup> Намалена активност на ензима *MTHFR* е наблюдавана и при носители на полиморфизма А1298С в хомозиготно или хетерозиготно състояние. Установено е, че около 10% от населението на Канада са носители на хомозиготната форма на А1298С,

свързана с около 60% активност на ензима. Носителството на този полиморфизъм не води до покачване на нивото на плазмения хомоцистеин.

Известно е, че при проследяване около половината от пациентите имат активен артрит десет години след дебюта на заболяването, а поне една трета остават засегнати от болестта и след достигане на пълнолетие.<sup>(160,202,203)</sup> С напредъка в терапията, достъпността на все по-голям брой биологични агенти, чиято ефикасност е доказана в редица клинични проучвания<sup>(97,204-206)</sup>, клиницистът изгражда т.нар. „нулев толеранс“ към ставното възпаление. Целта е постигане на пълна ранна ремисия при всяко дете.<sup>(10,207-210)</sup> И тъй като ранното започване на терапия е от изключително значение, въвеждането на биомаркери, които биха прогнозирали с висока специфичност и чувствителност дори риска от развитие на ЮИА би променило стратегията от терапия към превенция. Независимо от това, не съществуват голям брой параметри, върху които да се базира терапевтичният избор.<sup>(19)</sup> Проучванията, свързани с откриване на биомаркери при ЮИА се увеличават все повече. Биомаркерите биха подпомогнали с предвиждане хода на болестта и тежестта ѝ, отговора към терапия и възможността за спиране на терапията след достигане на ремисия без риск от рецидив. Несъмнено диференцирането на пациентите, които биха постигнали добър отговор с монотерапия с МТХ би улеснило постигането на оптимално лечение за отделния пациент в ранна фаза на заболяването, както и разработването на по-рационален и персонализиран подход в терапията на децата с ЮИА.

## **2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**

### **2.1. ЦЕЛ**

Целта на настоящия дисертационен труд е да се изследва взаимовръзката между стойностите на **биомаркерите S100 A8/A9 и IL-6** и **активността на болестта и отговора към провежданата терапия** при пациенти с ювенилен идиопатичен артрит; да се установи съществува ли корелация между S100 A8/A9 и вече утвърдени биомаркери, характеризиращи активността на артритата като СУЕ и CRP. Да се изследва взаимовръзката между носителството на **полиморфизми (с.677 С>Т и с.1298 А>С) в *MTHFR* гена** и **отговора към провежданата терапия**, както и вероятността за поява на **нежелани лекарствени реакции (НЛР)**.

### **2.2. ЗАДАЧИ**

За постигането на посочената цел си поставихме следните задачи:

#### **Задача 1:**

Да се изследват и анализират пациенти с ЮИА по следните параметри - пол, подформа на ЮИА, възраст при началото на заболяването, давност на заболяването, възраст при започване на терапия, вид провеждана терапия, брой и вид засегнати стави, развитие на увеит. Да се сравнят част от тези параметри при разглежданата от нас група пациенти спрямо международни регистри.

#### **Задача 2:**

Да се изследват, анализират и да се установят взаимовръзките на стойностите на биомаркерите в дебюта на заболяването и при рецидив на артритата.

### **Задача 3:**

Да се установят зависимостите на биомаркерите с броя на засегнатите стави в дебюта на заболяването и при деца със засягане на нови стави при рецидив на заболяването.

### **Задача 4:**

Да се изследва и установи взаимосвръзката на стойностите на биомаркерите с отговора към терапията с метотрексат.

### **Задача 5:**

Да се установи взаимосвръзката на активността на заболяването, определена чрез биомаркерите преди започване на лечението с биологичен агент спрямо активността, определена по скалата „Juvenile Arthritis Disease Activity Score 27” (JADAS 27).

### **Задача 6:**

Да се изследва, анализира и установи връзката на носителството на някои полиморфизми в *MTHFR* гена при деца с ЮИА с лекарствения отговор и развитието на нежелани лекарствени реакции.

### **Задача 7:**

Да се установи взаимосвръзка на някои показатели с развитието на увеит.

### 3. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ:

#### 3.1. МАТЕРИАЛ

В настоящия дисертационен труд са включени **99 пациента** с ювенилен идиопатичен артрит и контролна група с **29 здрави лица** (таблица 1). Всички изследвани в дисертационния труд деца са пациенти на Клиниката по ревматология, кардиология и хематология към СБАЛДБ „Професор Иван Митев“ ЕАД, Медицински университет, София. Децата са хоспитализирани и проследявани в периода **март 2014 – октомври 2016 година**. От общата група пациенти с ЮИА (n=99), при 29 деца показателите са проследени в динамика в рамките на две години след първото им изследване.

**Табл 1. Демографска характеристика на изследваните пациенти с ЮИА и контролната група със здрави лица**

Характеристика	ЮИА	Здрави лица
Брой индивиди	99	29
Пол момчета/момичета	38/61	13/16
Средна възраст, години (граници)	8,65 ± 4,45 (1,58-17,92)	9,53 ± 4,67 (4,08 – 17)

## **3.2. МЕТОДИ**

Към методите на изследване се включват диагностични и статистически методи.

### **3.2.1 ДИАГНОСТИЧНИ МЕТОДИ**

#### **КЛИНИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ**

Клиничните изследвания включват анамнеза и физикален статус с акцент върху подробния локален ставен статус.

Ювенилният идиопатичен артрит се определя като наличие на артрит в една или повече стави, характеризиращ се с изразен оток или ставен излив, или наличие на два или повече от следните симптоми: ограничени движения и/или болка при движение, и/или повишена локална температура в съответната става. Артритът е с неизвестна етиология, с продължителност над шест седмици, а дебютът му е при лица под 16-годишна възраст. Диагнозата ЮИА е поставена според критериите на ILAR.

Въз основа на наблюдаваните в рамките на първите шест месеца клинични и лабораторни показатели е основана и класификацията на ILAR за подразделяне на ЮИА в отделни подформи (таблица 2).

Контролната група от **29 здрави деца** е подбрана на базата на следните критерии:

- възраст под 17-години
- липса на клинични и лабораторни данни за възпаление - стойностите на СУЕ и CRP да бъдат в референтни граници

**Табл. 2 Класификация на ILAR за отделните подформи на ЮИА**

Системна форма	Артрит в една или повече стави, придружен с фебрилитет с характерна температурна крива и продължителност поне две седмици плюс един или повече от следните клинични белези: характерен обрив, генерализирана лимфаденопатия, хепато- или спленомегалия, серозит
Олигоартрит	Артрит в четири или по-малко от четири стави. В зависимост от броя на засегнатите стави на шестия месец от дебюта се подразделя на: <ul style="list-style-type: none"> <li>• персистиращ – броят на засегнатите стави не надхвърля четири след шестия месец</li> <li>• разширен - броят на засегнатите стави надхвърля четири след шестия месец</li> </ul>
Полиартрит с положителен РФ	Артрит в пет или повече от пет стави, придружен с наличие на РФ, доказан двукратно в разстояние на три месеца
Полиартрит с негативен РФ	Артрит в пет или повече от пет стави и липса на РФ
Псориатичен артрит	Наличие на артрит и псориазис или наличие на артрит плюс поне два от следните критерии: <ul style="list-style-type: none"> <li>• дактилит</li> <li>• промени по ноктите – вдлъбвания или онихолиза</li> <li>• фамилна обремененост за псориазис при роднина от първа линия</li> </ul>
Ентезит-свързан артрит	Наличие на артрит и ентезит или наличие на артрит или ентезит плюс два или повече от следните критерии: <ul style="list-style-type: none"> <li>• болезненост в сакроилиачните стави и/или болка с възпалителен произход в лумбосакралния отдел</li> <li>• носителство на HLA-B27</li> <li>• фамилна обремененост за HLA-B27 - асоциирани заболявания (анкилозиращ спондилит, ентезит-свързан артрит, сакроилеит при възпалителни чревни заболявания, реактивен артрит, остър преден увеит) при роднина по първа линия</li> <li>• остър преден увеит</li> <li>• дебют на заболяването при момче над шест годишна възраст</li> </ul>
Недиференциран артрит	<ul style="list-style-type: none"> <li>• не попада в нито една категория</li> <li>• попада в повече от една категория</li> </ul>

## ЛАБОРАТОРНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

С оглед на целта и задачите на дисертационния труд са изследвани следните биомаркери: S100 A8/A9, IL-6, СУЕ и CRP. Резултатите са отчетени в мерни единици по системата SI. Изследвани са също полиморфизми в *MTHFR* гена - с.677 C>T (rs1801133: C>T; р.А222V) и с.1298 A>C (rs1801131: A>C; р.Е429А).

Използвани са следните лабораторни методи и анализи:

- за определяне на стойностите на стандартни показатели на възпаление - **С-реактивен протеин** е използван автоматичен анализатор, а за определяне на **скоростта на утаяване на еритроцитите** е приложен мануалният метод на Панченков. Изследванията са извършени в Клинична лаборатория на СБАЛДБ-ЕАД „Професор Иван Митев“. За горна граница на CRP е приета 5 mg/l, а на СУЕ - 12 мм/ч.
- изследването на стойностите на **S100 A8/A9** в серум е извършено в Централна клинична лаборатория към УМБАЛ ”Александровска” ЕАД, Направление „Клинична химия и имунохимия” посредством ELISA-методика при използване на MRP8/14 (Calprotectin) ELISA кит (BioLegend, Сан Диего, Калифорния).

Като горна референтна граница на серумните концентрации на S100 A8/A9 за използвания кит приехме стойности 2186 ng/ml. Тази горна референтна граница е изработена на базата на изследване на контролна група от 29 здрави деца.

- изследване на интерлевкин-6 (**IL-6**) в серум – извършено в Клинична лаборатория, МБАЛ Национална кардиологична болница с Access 2 Immunoassay System - Access IL-6 Reagent Pack (Beckman Coulter, CA).

Като горна референтна граница на серумните концентрации на IL-6 са приети стойности  $\leq 6,4$  pg/ml.

- определяне стойностите на **антинуклеарните антитела** чрез индиректна имунофлуоресцентна техника върху HEp-2 клетъчна линия в Клиника по Клинична имунология към УМБАЛ "Александровска" ЕАД. Като положителен титър на ANA приехме стойности  $\geq 1:160$ .
- изследване на серума за наличие и титър на **ревматоиден фактор**

Титърът на РФ е определен полуколичествено в серум чрез латекс – аглутинационен тест (RA Latex Test Kit, BIOTEC, UK), като за положителни се приемат стойности над 8 U/ml. Положителните за РФ серуми (стойности над 8 U/ml) се титрират допълнително.

- При **40** от децата са изследвани и определени **полиморфизми** в *MTHFR* гена - с.677 C>T (rs1801133: C>T; p.A222V) и с.1298 A>C (rs1801131: A>C; p.E429A). Посочените полиморфизми бяха избрани на базата на съществуващи в литературата данни за асоциацията им с ефективността и появата на НЛР към провежданото лечение с МТХ.

Кръвните проби за изолиране на геномна ДНК бяха взимани след подписване от страна на родителя/настойник на информирано съгласие.

Определянето на полиморфизмите **с.677 C>T** (rs1801133: C>T; p.A222V) и **с.1298 A>C** (rs1801131: A>C; p.E429A) в *MTHFR* гена бе извършено в СБАЛАГ „Майчин дом“, Център по молекулярна медицина. За целта ДНК беше изолирана от венозна кръв посредством полуавтоматизирана апаратура за изолиране с магнитни частици (Chemagic Magnetic Separation Module I, Chemagen) и с използване на китове за изолиране на ДНК от венозна кръв (Chemagic DNA Blood kits). За генотипизирането на събраните ДНК проби за подобрите полиморфни варианти в гена

*MTHFR* беше приложен метода High resolution melting. Методът включва размножаване на интересуващия ни участък в геномната ДНК (полимеразна верижна реакция) посредством използване на ензим и последваща дисоциация на ДНК (топене на двойноверижната структура на ДНК) при постепенно повишаване на температурата през равни интервали от време.

## **ИНСТРУМЕНТАЛНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ**

При всички деца е осъществена директна или индиректна офталмоскопия - както при пациентите в дебюта на заболяването, така и в динамика при проследяване.

## **ДРУГИ ИЗПОЛЗВАНИ МЕТОДИ**

Към други използвани методи сме изследвали някои общоприети критерии за оценка на активността на заболяването. Такива са JADAS 27 (скала за оценка на болестната активност на ювенилния артрит).

**Juvenile Arthritis Disease Activity Score (JADAS 27)** – скала, използвана в Европа и въведена от Consolaro през 2009 година.<sup>(13)</sup> Тази скала се определя на базата на изследване на 27 стави. Включват се следните стави: шиен гръбнак, лакетни, гривнени, метакарпофалангеални (от първа до трета), проксимални интерфалангеални, тазобедрени, коленни и глезенни стави. Тази скала е избрана за оценка, защото дава добра информативност, за разлика от JADAS 10 (основаваща се на преброяването на която и да е засегната става до максимум 10 стави).

JADAS 27 се формира на базата на четири показателя: цялостна оценка на болестната активност от страна на лекаря (използвайки точкова система от 0 до 10, където 0 е липсваща активност, а 10 е максимална активност); цялостна оценка на състоянието на детето от страна на родителя (използвайки точкова

система от 0 до 10, където 0 е много добро, а 10 е много лошо); стойност на СУЕ, съотнесена отново на скала от 0 до 10; и брой засегнати стави (таблица 3).

**Табл. 3 Скала JADAS 27 за оценка на болестната активност.**

	<b>JADAS 27</b>
Цялостна оценка на болестната активност от страна на лекаря	0-10
Цялостна оценка на състоянието на детето от страна на родителя	0-10
Стойност на СУЕ	0-10
Брой засегнати стави	0-27 стави
Резултат	0-57

### **3.2.2. СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ**

За обработка на данните от дисертационния труд са използвани специализиран статистически пакет SPSS версия 22.0.

Използваното критично ниво на значимост е  $\alpha=0,05$ . Съответната нулева хипотеза се отхвърля, когато Р стойността е по-малка от  $\alpha$ .

Използваните статистически методи и анализи включват:

- описателен анализ
  - вариационен анализ (количествени променливи) – средна аритметична стойност или медиана, стандартно отклонение, минимална и максимална стойност;

- честотен анализ (номинални и рангови променливи) – абсолютни и относителни честоти;
  - графично представяне на резултатите - линейни, стълбовидни и секторни диаграми;
- методи за проверка на хипотези
- параметрични;
  - непараметрични;
    - тестове на Колмогоров-Смирнов (Kolmogorov-Smirnov) и Шапиро-Уилк (Shapiro-Wilk) – посредством които количествените променливи бяха изследвани за нормалност;
    - Т-тест при две независими извадки (Independent Samples T-Test) – проверка за равенство на средните величини на две независими групи при нормално разпределение;
    - тест на Ман-Уйтни (Mann-Witney) – сравнение на две независими групи, когато разпределението не е нормално;
    - знаково-рангов тест на Уилкоксон (Wilcoxon Signed Ranks Test) – сравнение на две зависимы групи, когато разпределението не е нормално;
    - хи-квадрат на Пийърсън (Chi-square test) или точен тест на Фишер (Fisher's exact test) – за сравнение на категориите променливи между две отделни групи;
    - корелационен коефициент на Спирмън (Spearman's Correlation) – изследване на връзката между две количествени променливи.

## 4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

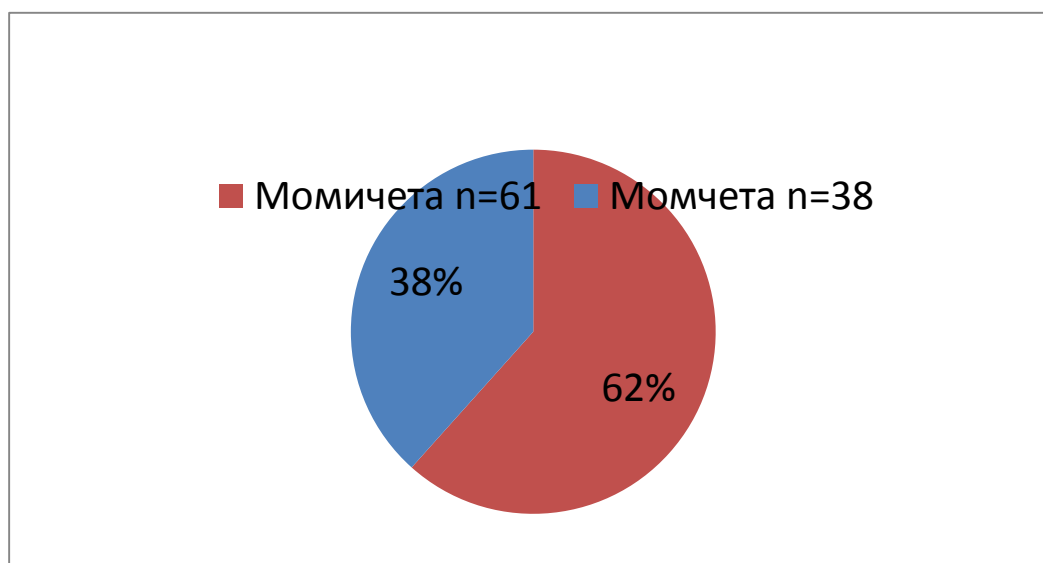
### 4.1. ДЕМОГРАФСКИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ ДЕЦА

В дисертационния труд са изследвани 128 деца, от които **99** са с **ювенилен идиопатичен артрит**, а **29** са контролна група от здрави лица.

Сред децата с ЮИА преобладава женският пол - **61 момичета (62%)**, като **момчетата са 38 (38%)** (графика 1).

Пациентите са с различна активност и давност на заболяването.

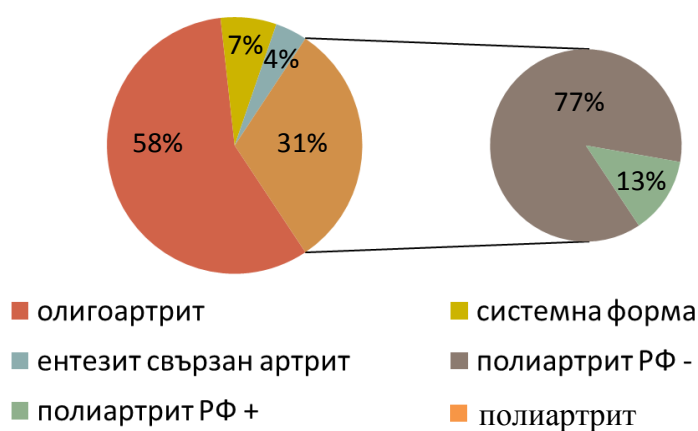
**Графика 1. Разпределение по пол на пациентите с ЮИА**



Направено е разпределение на децата според подформата на ЮИА. Всички деца са проследени проспективно и ретроспективно в зависимост от стадия на заболяването. Най-голям процент от случаите са с олигоартрит (n=57, 58%), следвани от групата на деца с полиартрит (n=31, 31%). При децата с

полиартрит тези, които са с отрицателен ревматоиден фактор са 24 (n=24/31, 77%), а тези с положителен ревматоиден фактор са 4 (n=4/31, 13%). За останалите 3 липсват данни за титъра на РФ. Най-рядко са регистрирани деца със системна форма на ЮИА (n=7, 7% от случаите) и ентезит-свързан артрит (n=4, 4% от случаите) (графика 2).

**Графика 2. Разпределение на пациентите по подформа на ЮИА**



Четиредесет и три от децата (43 %) са с дебют на заболяването, а останалите 56 деца (57%) са с различна по давност еволюция на артритата. Разпределението на подформите на ЮИА е сходно с това в страните от западна Европа като най-често срещаната форма е тази на олигоартрит.

Възрастта на децата с ювенилен идиопатичен артрит към момента на хоспитализация е от 1.58 до 17.92 години (средна възраст  $8.65 \pm 4.45$  години). При групата деца с дебют на ЮИА (n=43) се установи, че те са на възраст от 1.58 до 17.33 години (средна възраст  $6.85 \pm 4.27$  години). Възрастта на пациентите от мъжки и женски пол към момента на хоспитализацията в групата с дебют на заболяването е сравнима: при момичетата (n=23) варира от 1.83 до 17.33 (средна възраст  $6.99 \pm 4.80$  години), а при момчетата (n=20) е от 1.58 до

14.5 години (средна възраст  $6.69 \pm 3.69$  години). Средната възраст на дебют на заболяването за цялата група пациенти ( $n=99$ ) е  $6.12 \pm 4.29$  години (от 0.66 до 15.83 години). При цялата група деца с олигоартрит ( $n=57$ ) регистрирахме най-ниска средна възраст в дебюта на заболяването –  $5.41 \pm 4.20$  години, а най-висока – при децата с ентезит-свързан артрит –  $12.79 \pm 4.53$  години. Децата с полиартрит с отрицателен ревматоиден фактор ( $n=24$ ) са на средна възраст в дебюта на болестта -  $6.18 \pm 4.20$  години, а тези със системна форма на ЮИА ( $n=7$ ) -  $6.53 \pm 4.16$  години. Средната възраст в дебюта на заболяването при полиартрита с положителен ревматоиден фактор е  $10.02 \pm 4.27$  години.

Демографските характеристики на отделните подгрупи на ЮИА са представени в таблица 4.

**Табл. 4 Демографски данни на децата с ЮИА**

ПОКАЗАТЕЛИ						
Подформа на ЮИА, брой пациенти, n (%)	Пол		Възраст при дебют на ЮИА, години		Давност на артрита, месеци	
	Момичета, n (%)	Момчета, n (%)	Средна, SD	от - до	Средна, SD	от - до
Олигоартрит, 57 (57%)	38 (67%)	19 (33%)	$5.41 \pm 4.20$	0.83-15	$27.6 \pm 35.8$	0-156
Полиартрит с (-) РФ, 24 (24%)	16 (67%)	8 (33%)	$6.18 \pm 4.20$	0.66- 15.83	$38.25 \pm 41.3$	1-144
Полиартрит с (+) РФ, 4 (4%)	3 (75%)	1 (25%)	$10.02 \pm 4.27$	7.08- 12.83	$23 \pm 28.11$	6-65
Системна форма, 7 (7%)	2 (28%)	4 (72%)	$6.53 \pm 4.16$	1.08- 12.66	$38.85 \pm 34.77$	1-84
Ентезит-свързан артрит, 4 (4%)	1 (25%)	3 (75%)	$12.79 \pm 4.53$	11-14.33	$28.5 \pm 17.14$	6-45

Демографските характеристики на контролната група от 29 здрави деца са сравними с тези на групата с деца с ЮИА – както по полово разпределение (с преобладаване на женския пол), така и по възрастово (таблица 5). Разпределението по пол в контролната група здрави деца е приблизително еднакво - 16 момичета (55%) и 13 момчета (45%). Те са на възраст от 1 до 17 години, със средна възраст  $8.13 \pm 4.75$  години.

**Табл. 5 Демографска характеристика на изследваните пациенти с ЮИА и контролната група със здрави лица**

Характеристика	ЮИА	Здрави лица
Брой индивиди	99	29
Пол момичета/момчета	61/38	16/13
Средна възраст (границы)	$8,65 \pm 4,45$ (1,58-17,92)	$8,13 \pm 4,75$ (1 – 17)

В световен мащаб с цел анализ на характеристиките на ЮИА, проследяване на хода на болестта и диференцирането на прогностични фактори свързани с болестната активност и отговора към провежданата терапия, пациентите с новодиагностициран ЮИА са включвани и проследявани проспективно в следните регистри:

- този на Скандинавските държави, стартирал 1997 година;<sup>(202,224)</sup>
- регистърът на Великобритания, основан през 2001 година – Childhood Arthritis Prospective Study, CAPS;<sup>(225)</sup>
- този на Канада, основан през 2005 година - Research on Arthritis in Canadian Children Emphasising Outcomes study, ReACCh Out;<sup>(226,227)</sup>

- регистърът на Германия, основан 2010 година - Inception Cohort of Newly diagnosed patients with juvenile idiopathic arthritis, ICON.<sup>(228)</sup>

В България не е изграден все още такъв регистър. Поставихме си за цел да анализираме и сравним някои от параметрите на децата с ЮИА, включени в посочените регистри спрямо тези на изследваната от нас група пациенти.

Извън зададените цели и задачи, констатирахме, че в групата с дебют на болестта (n=43) средната възраст на диагностициране е  $6.85 \pm 4.27$  години. Възрастта на изява на първите симптоми в тази подгрупа е  $6.55 \pm 4.17$  години. В настоящия дисертационен труд интерес представляваше определянето на периода от появата на първия симптом до поставяне на диагнозата ювенилен идиопатичен артрит. За тази цел изследвахме децата с дебют на заболяването (n=43) и установихме следното: средният период от изява на първите симптоми до поставяне на диагнозата е  $3.6 \pm 4.02$  месеца, при олигоартритите той е  $3.58 \pm 3.47$  месеца, а при полиартритите е  $3.92 \pm 5.28$  месеца. Следователно, при изследваните от нас деца с дебют на ЮИА срокът между изява на първия симптом и поставянето на диагноза ЮИА е приблизително 4 месеца. Това е и резултат, който е единствен и докладван за първи път в България. Направихме сравнение на част от получените от нас резултати с тези на чуждестранните регистри (таблица 6).

Анализирайки резултатите констатирахме, че по период от изява на първите симптоми до поставяне на диагноза се нареждаме на трето място след Скандинавия (1.9 месеца) и Германия (3.0 месеца, ICON регистъра). Известно е, че по-дългият период на достъп до специализирана ревматологична помощ е свързан с по-лоша крайна прогноза на ЮИА. Изследователският колектив от Германия установява<sup>(228)</sup> положителна асоциация на някои клиничко-лабораторни параметри с достигане на неактивно заболяване в края на първата година от дебюта на ЮИА. Един от тези параметри (заедно с по-малката

възраст при първоначална изява на болестта и положителния титър на ANA при дебют на заболяването) е по-краткият период между първоначалната изява на симптомите и диагностицирането на ЮИА. Това наблюдение се потвърждава и в проведеното проучване от Wallace и колектив – по-кратката давност на симптоматиката при диагностицирането на ЮИА се асоциира с по-висока вероятност за постигане и персистиране на клинично неактивно заболяване.<sup>(241)</sup>

Както беше споменато, в обхванатата от нас група пациенти периодът от изява на симптоматиката до поставяне на диагноза е сравнително кратък – 3,6 месеца (имайки предвид факта, че по дефиниция ЮИА се характеризира с наличието на артрит, персистиращ повече от 6 седмици). Известно е, че срокът до поставянето на диагноза е свързан с прогнозата на заболяването. Това се потвърждава и от проспективно проучване, проведено сред 683 деца в Италия, проследени в рамките на 10 години. Установено е, че вероятността за ремисия на заболяването намалява пропорционално с увеличаването на срока от дебюта на ЮИА до диагностицирането му.<sup>(243)</sup> Сред децата, при които диагнозата е поставена в рамките на 1 година от дебюта на заболяването е констатирана статистически значима разлика в честотата на ремисия в сравнение с децата, при които диагнозата е поставена в рамките на 1-5 години или над 5 години (процентна честота на ремисия съответно 35.7, 32.4, 22.8;  $P = 0.0124$ ).

При анализ на резултатите от международните регистри, се установява, че при децата със системна форма на ЮИА се наблюдава най-краткият интервал между първоначалната изява на симптомите и прегледа от детски ревматолог. Това е и очаквано, тъй като децата с тази подформа често имат системна симптоматика и обикновено търсят по-рано специализирана помощ. Интересен е фактът, че при децата с олигоартрит и полиартрит периодът между дебюта на ЮИА и диагностицирането му е съпоставим ( $3,58 \pm 3,47$  месеца за олигоартрита и  $3,92 \pm 5,28$  месеца за полиартрита,  $p > 0,05$ ).

**Табл. 6 Сравнение по възраст на дебют и на диагностициране между международните регистри и резултатите от дисертационния труд**

	Скандинавия n=440	CAPS n=740	ReACCh Out n=354	ICON n=695	Дисертацио нен труд n=43
Възраст на изява на първи симптоми, години	5.5 (2.5-9.7)	6.6 (2.8-10.7)	7.9 (0.2–16.3)		6.55 (1.42-15.83)
Възраст на диагностициране на ЮИА, години			9.0 (0.2–16.7)	6.5 (3.0–11.3)	6.85 (1.58-17.33)
Време от изява на първи симптоми до диагноза, месеци	1.9 (0.4-3.2)	4.6 (2.3-9.5)	4.5 (0.1-139)	3.0 (1.0–6.0)	3.6 (0-18)

Не трябва да се забравя, че дебютът на ЮИА може да е трудно забележим, с по-изразена сутрешна скованост в сравнение с болезненост. Обемът на движение на ставите също често може да е задоволителен. Също така съществуват данни, че децата с по-голяма давност на симптоматиката са по-големи и имат по-голям среден брой засегнати стави, но по-ниски стойности на СУЕ. Фактът, че сред децата със ставна болка/скованост и нормални стойности на СУЕ се наблюдава по-късно поставяне на диагнозата демонстрира, че когато лабораторните параметри не показват възпаление, диагнозата ЮИА може да бъде пропусната.

Изследователски колектив от Великобритания отново обръща внимание на асоциацията на нормалните стойности на СУЕ с по-голяма давност на симптоматиката при поставяне на диагнозата ЮИА.<sup>(242)</sup> В разгледаната от тях група пациенти (включваща 507 деца) средната продължителност на симптоматиката до поставяне на диагнозата е 4.6 месеца. Сред децата с давност на симптоматиката над 4 месеца, са установени по-голям брой засегнати стави и по-ниски стойности на СУЕ и CRP в сравнение с децата с давност на симптомите под 4 месеца. Сред децата с по-дълга давност на симптоматиката (над 4 месеца) нормални стойности на СУЕ са установени в 46% от случаите,

докато сред тези по-кратка давност на симптоматикта (под 4 месеца) – в 22% от случаите. И този резултат е статистически значим.

Оценявайки активността на ЮИА на базата на лабораторни показатели и конкретно скоростта на утаяване на еритроцитите, разделихме групата с дебют на ЮИА на две подгрупи – с ускорена и с нормална СУЕ. При 35 деца констатирахме СУЕ > 12 мм/ч, а при 8 деца СУЕ бе < 12 мм/ч. Не установихме статистически значима разлика в периода между изявата на заболяването и диагнозата (таблица 7). При анализа на средния период между изявата на първите симптоми и диагнозата в групите с повишени и нормални стойности на S100 A8/A9 и CRP при дебют установихме статистически значима разлика. Диагнозата при децата с повишени стойности на S100 A8/A9 и CRP се поставя приблизително двукратно по-рано в сравнение с тези с нормални стойности на показателите. Това е и очакван резултат, тъй като високите стойности на биомаркерите се асоциират и с по-висока клинична активност на заболяването, а това от своя страна води до по-скорошна консултация със специалист и по-бързо поставяне на диагноза.

**Табл. 7 Сравнение на групите с повишени и нормални стойности на СУЕ, S100 A8/A9 и CRP при дебют**

	<b>СУЕ &gt; 12 мм/ч</b>	<b>СУЕ &lt; 12 мм/ч</b>	
Период от изява на заболяването до диагноза, месеци	3,11±3,28	5,87±6,15	p>0.05
	<b>S100 A8/A9 &gt; 2186 ng/ml</b>	<b>S100 A8/A9 &lt; 2186 ng/ml</b>	
Период от изява на заболяването до диагноза, месеци	3,01±3,64	5,92±4,79	<b>p&lt;0.05</b>
	<b>CRP &gt; 5 mg/l</b>	<b>CRP &lt; 5 mg/l</b>	
Период от изява на заболяването до диагноза, месеци	2,49±2,62	5,19±5,08	<b>p&lt;0.05</b>

Разгледахме и сравнихме параметрите пол, подформа на ЮИА, възраст на дебют и диагностициране на ЮИА, средна възраст в дебют при отделните подформи между изследваната от нас група деца и международните регистри. Резултатите са изложени в таблици 8, 9, 10.

Разпределението по пол е сравнимо с това в останалите анализирани регистри. Не установихме статистически значима разлика в разпределението по пол на пациентите с ЮИА в настоящия дисертационен труд с това в регистриите на Скандинавия, Великобритания (CAPS), Канада (ReACCh Out) и Германия (ICON) (таблица 8). В световен мащаб при ЮИА се засяга по-често женският пол, което се наблюдава и при нашата група. В изследваната от нас група деца честотата на засягане на женския пол е 1,6 пъти по-висока от тази на мъжкия пол. Тези данни съответстват на литературните данни за почти двойно по-често засягане на момичетата в страните от Европа и Канада.

При сравнение на честотата на наблюдаваните подформи на ЮИА, определени според класификацията на ILAR, установихме статистически значима разлика в честотата на олигоартритната форма (таблица 9). И при петте анализирани групи пациенти с ЮИА най-често наблюдаваната подформа е олигоартитът.

**Табл. 8 Сравнение по пол на международните регистри с резултатите от дисертационния труд**

Пол	Скандинавия <sup>(1)</sup> n=440	CAPS <sup>(2)</sup> n=740	ReACCh <sup>(3)</sup> Out n=354	ICON <sup>(4)</sup> n=695	Дисертационен труд n=99
момчета, n(%)	291 (66%)	476 (64%)	234 (66%)	457 (66%)	61 (62%)
момчета, n(%)	149 (34%)	264 (36%)	120 (34%)	238 (34%)	38 (38%)

Легенда: <sup>(1)</sup>  $\chi^2 = 0,73$ ,  $df = 1$ ,  $p > 0.05$ ; <sup>(2)</sup>  $\chi^2 = 0,28$ ,  $df = 1$ ,  $p > 0.05$ ; <sup>(3)</sup>  $\chi^2 = 0,69$ ,  $df = 1$ ,  $p > 0.05$ ; <sup>(4)</sup>  $\chi^2 = 0,65$ ,  $df = 1$ ,  $p > 0.05$

В обхванатата от нас група пациенти олигоартритът се наблюдава по-често в сравнение с групата деца, включени в регистъра на Германия – ICON ( $\chi^2 = 5,48$ ;  $df = 1$ ;  $p < 0.05$ ) и този на Канада – ReACCh Out ( $\chi^2 = 8,64$ ;  $df = 1$ ;  $p < 0.05$ ). Не установихме статистически значима разлика при сравнение на честотата на олигоартрит в изследваната от нас група деца и тези на Великобритания ( $\chi^2 = 1,08$ ;  $df = 1$ ;  $p < 0.05$ ) и Скандинавия ( $\chi^2 = 1,34$ ;  $df = 1$ ;  $p < 0.05$ ).

Не се регистрира статистически значима разлика в честотата на разпределение на полиартритната форма с отрицателен РФ между анализирани групи пациенти.

Най-рядко регистрираната подформа на ЮИА сред отделните регистри е полиартритът с положителен ревматоиден фактор. Установихме по-висока честота на тази подгрупа в изследваните от нас деца в сравнение с честотата ѝ сред пациентите, включени в регистъра на Германия – ICON ( $\chi^2 = 6,10$ ;  $df = 1$ ;  $p < 0.05$ ) и тези в регистъра на Скандинавия ( $\chi^2 = 8,44$ ;  $df = 1$ ;  $p < 0.05$ ).

Не установихме статистически значима разлика в честотата на разпределение на системната форма на ЮИА между анализирани групи.

При анализ на разпределението на честотата на ентезит-свързания артрит в отделните групи пациенти, установихме статистически значима разлика между изследваната от нас група и регистъра на Германия – ICON ( $\chi^2 = 4,27$ ;  $df = 1$ ;  $p < 0.05$ ).

При сравнение на средната възраст в дебюта на заболяването с данните от регистрите на другите държави се установи, че при всички най-ранна възраст на изява е наблюдавана при олигоартритната форма. Най-голяма възраст на изява е регистрирана при полиартритните форми с положителен ревматоиден фактор и ентезит-свързания артрит (таблица 10).

**Табл. 9 Сравнение по подформа на ЮИА на международните регистри с резултатите от дисертационния труд**

Подформа на ЮИА	Скандинавия n=440	CAPS n=740	ReACCh Out n=354	ICON n=695	Дисерта ционен труд n=99
Олигоартрит	225 (51%)	385 (52%)	145* (41%)	313* (45%)	57 (58%)
Полиартрит с (-) РФ	94 (21%)	148 (20%)	71 (20%)	195 (28.1%)	26 (27%)
Полиартрит с (+) РФ	4* (1%)	23 (3%)	12 (3%)	10* (1.4%)	5 (4%)
Системна форма	17 (4%)	42 (6%)	26 (7%)	25 (3.6%)	7 (7%)
Ентезит-свързан артрит	34 (8%)	51 (7%)	36 (10%)	74* (10.7%)	4 (4%)
Псориатичен артрит	6 (1%)	61 (8%)	23 (7%)	28 (4%)	0
Недиференциран артрит	60 (14%)	30 (4%)	41 (12%)	50 (7.2%)	0

\*p<0.05

**Табл. 10 Сравнение по средна възраст на дебют на ЮИА на международните регистри с резултатите от дисертационния труд:**

	Дисертационен труд n=99	CAPS n=740	ReACCh Out n=354	Скандинавия n=440
Средна възраст на дебют, години	6.12 ± 4.29 (0.66-15.83)	6.6 (2.8-10.7)	7.9 (3.0-11.9)	5.5 (2.5-9.7)
олигоартрит	5.41 ± 4.20 (0.83-15)	5.0 (2.4-9.7)	4.6 (2.2-9.7)	4.9 (2.2-8.5)
полиартрит с (-) РФ	6.18 ± 4.20 (0.66-15.83)	5.8 (2.2-9.4)	8.2 (2.5-12.6)	4.8 (2.3-8.5)
полиартрит с (+) РФ	10.02 ± 4.27 (7.08-12.83)	11.4 (9.1-13.4)	11.5 (8.9-14.6)	11.7 (9.5-13.2)
системна форма	6.53 ± 4.16 (1.08-12.06)	6.4 (3.4-10)	5.9 (3.3-11.8)	4.7 (2.2-6.4)
ентезит-свързан артрит	12.79 ± 4.53 (11-14.33)	11.8 (10.1-13.1)	11.6 (9.4-13.8)	10.5 (8.6-12.3)

## 4.2. ТЕРАПИЯ

Използваните терапевтични средства са изследвани и анализирани както преди хоспитализацията на децата, така и при еволютивното им проследяване.

Ретроспективно на базата на медицинската документация и от анамнестичните данни установихме, че 29 (67%) от децата с дебют (n=43) на заболяването са приемали медикаменти преди първата им хоспитализация в Клиниката. Нестероидни противовъзпалителни средства (НСПВС) са приемали всичките 29 деца. Глюкокортикостероиди са назначени при 4 от тези приемачи НСПВС, а при едно дете като монотерапия.

По отношение на провежданата терапия в групата с дебют на ЮИА (n=43) след постъпването при около половината (n=22/43, 51%) са назначени НСПВС. При 28 (n=28/43, 65%) от децата е започнато лечение с болест-модифициращи антиревматични лекарства (БМАРЛ) – метотрексат. Средната доза на МТХ е  $8.14 \pm 1.96$  мг/м<sup>2</sup>. Средната възраст на начало на терапията с МТХ в тази подгрупа е  $6.38 \pm 4.28$  години, а средната възраст на изява на първите симптоми е  $5.99 \pm 4.10$  години. Анализът показва, че лечението с МТХ е започнато средно 4.7 месеца след изявата на първите симптоми на заболяването. Периодът от изявата на първите симптоми до хоспитализацията в Клиниката е  $4.26 \pm 4.18$  месеца.

Други БМАРЛ - резохин и сулфасалазин са назначени при съответно 6 (14%, всички с олигоартрит) и 4 (9%, всички с олигоартрит) от пациентите с дебют на ЮИА.

При 69 (70%) от всички включени в дисертационния труд деца е провеждана терапия с метотрексат. Установи се, че средната възраст на започване на лечение с метотрексат при всички деца провеждащи терапия с този медикамент е  $6.42 \pm 4.45$  години. От друга страна, средната възраст при изява на първите симптоми на заболяването за цялата група е  $5.85 \pm 4.16$

години. Анализът показва, че лечението с МТХ започва средно 6.8 месеца по-късно от изявата на първите симптоми на заболяването.

Лечение с глюкокортикостероиди (ГКС) е провеждано при 38 (88%) от децата с дебют на ЮИА (n=43). Средната доза на ГКС е  $0,41 \pm 0,25$  мг/кг. При 19 (44%) от тях е проведено лечение с интраартикуларно приложение на глюкокортикостероид (триамцинолон хексацетонид) – 16 деца с олигоартрит и 3 с полиартрит.

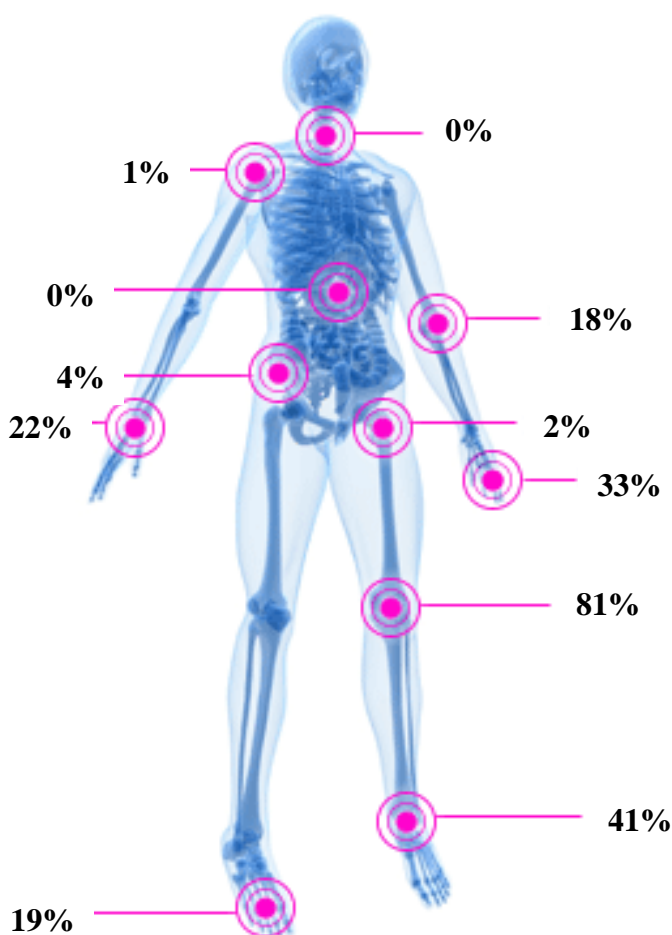
При 5 (11.6%) от децата с дебют на заболяването (n=43) се установи, че при проследяване е започнато лечение с биологичен агент. Средно срокът на започване на това лечение е  $10 \pm 8.16$  месеца от началото на заболяването. В цялата група броят на децата провеждащи терапия с биологичен агент е 47 (47%) като при 16 (34%) от тях е включен втори и трети подред биологичен агент. Периодът на започване на биологично лечение след дебюта на заболяването за цялата група, провеждащи терапия с биологичен агент, е  $36.19 \pm 36.09$  месеца. Етанерсепт е прилаган при 21 пациента, адалимумаб при 10 и тоцилизумаб при 13 деца.

### **4.3. ХАРАКТЕРИСТИКА НА СТАВНОТО ЗАСЯГАНЕ В ДЕБЮТА НА ЗАБОЛЯВАНЕТО**

Установихме, че най-често ангажираната става при дебют на ЮИА е колянната става - в над осемдесет процента (81%) от случаите, последвана от глезенната (41%) и малките стави на ръцете (33%). Гривнената става е ангажирана при дебют в 22% от децата с ЮИА, а малките стави на краката – в 19%. Засягане на лакетната става при началната изява на заболяването се установи в 18% от пациентите, а на сакроилиачните – в 4%. Най-рядко в изследваната група се засягат тазобедрената (ТЗБС) и раменната стави, съответно в 2% и 1% от случаите (фигура 3). В  $\frac{1}{4}$  (n=25) от случаите артритът

дебютира като моноартрит – в 22 от случаите с ангажиране на колянна става, в 3 със засягане на глезенна става.

При 24 (24%) от пациентите с ЮИА при рецидив на заболяването се ангажират и нови стави. При децата с олигоартрит (която е и най-честата подформа на ЮИА, n=57), ангажиране на нови стави при рецидив се установява при 13 (22.8%) пациента. При 8 от децата с полиартрит и при 3 от тези с ентезит-свързан артрит е установено ангажиране на нови стави при рецидив. Следователно, най-често засягане на нови стави при рецидив се наблюдава при групата на олигоартрит.



**Фиг. 3 Честота на ангажираните стави при дебюта на ЮИА**

Установено е, че не само броят на засегнатите стави, но и вида (например глезенна, тазобедренна стави) и рентгенологичната еволюция на заболяването са критерии за лоша прогноза на ЮИА (таблица 11).<sup>(169)</sup> В нашето проучване сме обърнали внимание и анализираме случаите, при които имаме включване на нови стави при рецидив, като се взема предвид вида на ангажираните стави. Не сме разглеждали рентгенологичния образ на засегнатите стави като показател за неблагоприятна прогноза на заболяването.

**Табл. 11 Показатели за оценка на прогнозата на заболяването.**

Артрит $\leq 4$ стави	Артрит $\geq 5$ стави	Системна форма
Неблагоприятна прогноза – необходимо е изпълнението на един критерий		
засягане на ТЗБС или шиен отдел на гръбначен стълб	засягане на ТЗБС или шиен отдел на гръбначен стълб	6-месечна продължителност на фебрилитет, повишени маркери на възпаление или необходимост от терапия със системни ГКС
артрит на глезенна или гривнена става ПЛЮС изразено или дълготрайно покачване на маркерите на възпаление	наличие на ревматоиден фактор ИЛИ на антитела срещу антицикличния цитрулиниран пептид	засягане на ТЗБС
рентгенологични данни за увреда – ерозии или стеснение на ставната междина	рентгенологични данни за увреда – ерозии или стеснение на ставната междина	рентгенологични данни за увреда – ерозии или стеснение на ставната междина

Ангажиране на ТЗБС в дебюта на заболяването установихме при 4 (4%) от децата ( 2 пациента с полиартрит, 1 със системна форма и 1 с ентезит-свързан

артрит). При две от тях има включване на нови стави при рецидива на заболяването. При проследяването на всичките четири пациента се е наложило включване към терапията на биологичен агент. Това наблюдение подкрепя становището, че ангажирането на ТЗБС е неблагоприятен прогностичен белег.

Засягане на глезенната става в дебюта на заболяването има при 41 (41%) от всички включени в дисертационния труд деца – 18 са с олигоартрит (от които само две деца са с моноартрит), 22 са с полиартрит и едно с ентезит-свързан артрит. При 9 (21.9%) от тях има ангажиране на нови стави при рецидив (при 16 – няма ангажиране на нови стави, а при останалите 16 липсват данни). Проследявайки децата с ангажиране на глезенната става в дебюта на ЮИА установихме, че при 24 (58.5%) от тях се налага добавяне на биологичен агент към терапевтичния план. С дебют на заболяването при включването в дисертационния труд са 19 от децата със засягане на глезенната става. При 15 от тях (79%) установихме повече от двукратно покачване на СУЕ. А при 11 от описаните 15 наблюдавахме повече от двукратно покачване и на CRP. При проспективно проследяване биологичен агент е добавен към терапията при 4 (27%) от децата с повече от двукратно повишени стойности на маркерите на възпаление и ангажиране на глезенна става. Процентът на включване на биологичен агент при проследяването на тази подгрупа не е фиксирана величина и може да се увеличи с времето. Шест от пациентите в тази подгрупа са включени в дисертационния труд към крайния му етап на събиране на проби и тяхното проследяване до момента е само в рамките на половин година.

В дебюта на заболяването гривнената става е засегната при 22 (22.2%) от пациентите – 4 с олигоартрит, а останалите 18 с полиартрит. При 6 ( $n=6/22$ , 27.3%) от тях има ангажиране на нови стави при рецидив (при 6 – няма ангажиране на нови стави, а при останалите 6 липсват данни). Добавяне на биологичен агент при пациентите с ангажиране на гривнената става в дебют е установено при 12 ( $n=12/22$ , 54.5%) деца. Сред децата с ангажиране на

гривнена става в дебюта на болестта, 11 са с начална изява на ЮИА. При 9 от тях са регистрирани стойности на СУЕ увеличени повече от 2 пъти.

Не установихме статистически значима разлика в честотата на включване на биологичен агент между цялата група и подгрупите с ангажиране на глезенна ( $\chi^2 = 0,45$ ;  $df = 1$ ;  $p > 0.05$ ) и гривнена ( $\chi^2 = 0,12$ ;  $df = 1$ ;  $p > 0.05$ ) стави при дебюта на болестта. Анализирайки групата с ангажиране на ТЗБС ( $n=4$ ) в дебюта на заболяването констатирахме статистически значима разлика и по-често включване на БА при проследяване на тази подгрупа в сравнение с останалите пациенти ( $n=95$ ) -  $\chi^2 = 5,00$ ;  $df = 1$ ;  $p < 0.05$ .

Честотата на вида на засегнатите стави в цялата група е сравнима с тези на другите държави с регистри и не дава значими отклонения. Сравними резултати между отделните регистри и настоящия дисертационен труд се установиха и за броя на засегнатите стави при дебют (таблица 12).

**Табл. 12 Среден брой засегнати стави при дебют на ЮИА**

	Олигоартрит	Полиартрит с (-) РФ	Полиартрит с (+) РФ	Системна форма	Ентезит-свързан артрит
ReAcch Out	1 (1-2)	9 (5-18)	16 (9-30)	2 (1-5)	3 (1-7)
CAPS	1 (1-2)	8 (4-14)	7 (5-22)	3 (1-6)	2 (1-5)
Скандинавия	2 (1-3)	7 (6-14)	11 (8-21)	2 (1-5)	3 (2-6)
Дисертационен труд	2 (1-4)	9 (4-28)	11 (5-24)	1 (0-4)	2 (1-3)

#### **4.4. ИЗРАБОТВАНЕ НА ГРАНИЦИ НА РЕФЕРЕНТНАТА ОБЛАСТ НА ИЗПОЛЗВАНИЯ ELISA-КИТ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА S100 A8/A9**

Изследването на хетеродимера S100 A8/A9 (фекален калпротектин) се използва в практиката като неинвазивен маркер за диагностика и оценка на чревното възпаление. За първи път в България изследването на фекален калпротектин е въведено от В. Наков.<sup>(229)</sup> С настоящия дисертационен труд за

първи път в България се въвежда методът за изследване на серумен S100 A8/A9 при деца.

През 2014 година съвместен екип (включващ изследователи и клиницисти от Австралия, Германия, Холандия, Италия, Франция, Англия, Израел, Бразилия и Аржентина) показва, че готовите търговски ELISA S100 A8/A9-ките могат да бъдат използвани като предиктивен показател при неактивен ЮИА. При сравнение със стандартизираните и използвани в експериментални условия ELISA-ките, търговските показват сходна корелация между високите нива на S100-протеините и индивидуалния риск от рецидив на ЮИА.<sup>(231)</sup>

С цел тълкуване на резултатите, получени от нововъведения и използван от нас ELISA-кит (MRP8/14 (Calprotectin), BioLegend, САЩ) за изследване на серумен S100 A8/A9, предприехме определяне на собствени лабораторни референтни стойности за изследвания контингент. При 29 клинично здрави деца с липса на клинични и лабораторни данни за възпаление - стойностите на СУЕ и CRP са в референтни граници – бяха изследвани серумните нива на S100 A8/A9 с диагностичния MRP8/14 (Calprotectin) ELISA кит (BioLegend, Сан Диего, Калифорния). Средната стойност на S100 A8/A9 на изследваната група здрави деца бе 620.19 ng/ml със стандартно отклонение 520.64 ng/ml. Интервалът минимални и максимални стойности бе 31-2186 ng/ml. На базата на тези резултати като повишени стойности на S100 A8/A9 в групата с ЮИА се приеха тези над  $X \pm 3SD$  или 2186 ng/ml.

Групата на здравите лица беше така подбрана, че да е сравнима с тази на пациентите (таблица 13). В разпределението по пол между двете групи не съществува статистически значима разлика -  $\chi^2=0,02$ ,  $df=1$ ,  $p>0,05$ .

При изследваните от нас деца в дебюта на заболяването установихме изключително високи стойности на S100 A8/A9 хетеродимера. Тези резултати са почти 10 пъти по-високи от тези, установени при групата деца - здрави

контроли. Резултатът може да се тълкува еднозначно, а именно - S100 A8/A9 хетеродимерът е силен индикатор за наличието на възпаление (таблица 14).

**Табл. 13 Демографска характеристика на изследваните пациенти с дебют на ЮИА и контролната група със здрави лица**

Характеристика	ЮИА-дебют	Здрави лица
Брой индивиди	43	29
Пол момичета/момчета	23/20	16/13
Средна възраст (граници)	6,99 ± 4,80 (1,83-17,33)	8,13 ± 4,75 (1 – 17)

**Табл. 14 Сравнение на средните стойности на S100 A8/A9 хетеродимера между децата с дебют на ЮИА и здравите контроли**

<b>S100 A8/A9, ng/ml (норма &lt; 2186 ng/ml)</b>		
<b>Група дебют ЮИА - n=43</b>	<b>5497 ± 5261.03</b>	<b>p=0.000</b>
<b>Здрави контроли - n=29</b>	<b>620.19 ± 520.64</b>	

#### **4.5. СРЕДНИ СТОЙНОСТИ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ БИОМАРКЕРИ ПРИ ОТДЕЛНИТЕ ПОДФОРМИ НА ЮИА**

##### **4.5.1. ИЗСЛЕДВАНЕ НА S100 A8/A9 ХЕТЕРОДИМЕР**

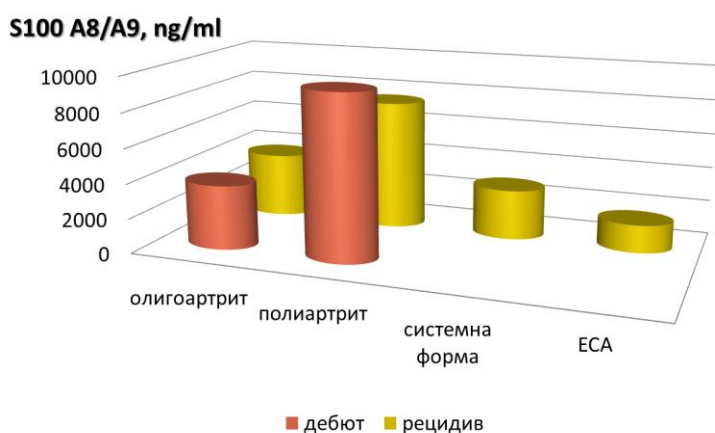
В групата с полиартрит (n=31) установихме най-високите средни стойности на S100 A8/A9 протеините (8097±5181 ng/ml) (графика 3). В същата тази група стойностите са по-високи при дебюта на заболяването (n=13; 9491±4696 ng/ml) и по-ниски при рецидив на полиартрита (n=18; 7091±5181 ng/ml). Разликата в стойностите между двете подгрупи с дебют и рецидив на

полиартрит е статистически значима ( $p < 0.05$ ). По-ниският резултат в групата с рецидив може да се обясни с влиянието на вече провежданата терапия върху активността на заболяването. Регистрираните най-високи стойности на S100 A8/A9 в групата с полиартрит могат да бъдат аргументирани с броя на засегнатите стави и по-изразената активност на заболяването в тази подгрупа.

При групата с олигоартрит ( $n=57$ ) регистрирахме средно два пъти по-ниски стойности на маркера ( $3723 \pm 4876$  ng/ml) в сравнение с тези при полиартритите. Тази разлика в стойностите между групата с олигоартрит и тази с полиартрит е статистически достоверна ( $p < 0.0005$ ). Не се установиха статистически значими разлики в средните стойности в дебюта ( $3706 \pm 4876$  ng/ml) и при рецидив ( $3741 \pm 5241$  ng/ml) на олигоартрита.

Най-ниски стойности на S100A8/A9 се регистрираха в подгрупата с ентезит-свързан артрит ( $n=4$ ;  $1604 \pm 2103$  ng/ml).

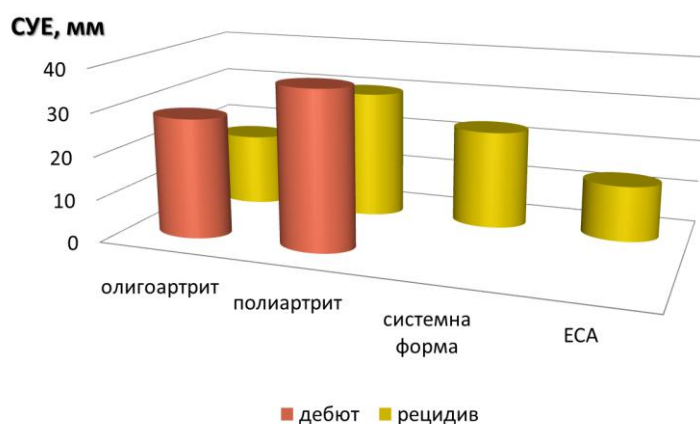
**Графика 3 Средни стойности на S100 A8/A9 при отделните подформи ЮИА**



#### 4.5.2. СУЕ

Идентична тенденция наблюдавахме и при изследване на СУЕ в отделните подгрупи на ЮИА (графика 4). Най-високи средни стойности на СУЕ установихме в групата с полиартрит ( $33 \pm 17$  мм/ч) и по-специално тази с дебют на полиартрит ( $37 \pm 16$  мм/ч). При подгрупата с рецидив на полиартрита се установиха по-ниски стойности -  $30 \pm 15$  мм/ч. Статистически значима ( $p < 0.05$ ) е разликата между средните стойности на СУЕ в групите с дебют на олигоартрит ( $27 \pm 18$ ) и дебют на полиартрит ( $37 \pm 16$  мм/ч). Отново най-ниски средни стойности наблюдавахме в подгрупата с ентезит-свързан артрит ( $13 \pm 10$  мм/ч).

**Графика 4 Средни стойности на СУЕ при отделните подформи ЮИА**



Средната стойност на СУЕ за цялата група с дебют ( $n=43$ ) на ЮИА е  $31 \pm 18$  мм/ч (таблица 15). При сравнение - средните стойности на СУЕ при дебют в регистъра на Германия – ICON са двукратно по-ниски  $15$  мм/ч ( $8.0-31.0$ ). По-ниските средни стойности на СУЕ при дебют в ICON-регистъра може да бъдат обяснени с по-краткия период от изява на симптомите до поставяне на

диагнозата между двете групи (3.0 месеца за ICON срещу 3.6 месеца за децата, включени в дисертационния труд). В изследваната от нас група деца стойности на СУЕ под 20 мм/ч са наблюдавани при 14/43 (32%) пациента от тези с дебют на ЮИА. В групата включена в регистъра на Германия ICON, стойности на СУЕ под 20 мм/ч са установени при 363/695 (62%) от пациентите. Разликата в стойностите на СУЕ под 20 мм/ч между двете групи е статистически достоверна ( $\chi^2 = 6,27$ ;  $p < 0.05$ ).

**Табл. 15 Сравнение на средните стойности на СУЕ при пациенти с дебют на ЮИА**

	ICON	CAPS	Скандинавия	Дисертационен труд
Средна стойност на СУЕ при дебют на ЮИА	15 (8.0-31.0)	20 (6-45)	35 (16-56)	31 (4-63)

**Табл. 16 Сравнение на средните стойности на СУЕ при дебют на ЮИА между пациентите включени в дисертационния труд и тази на международни регистри**

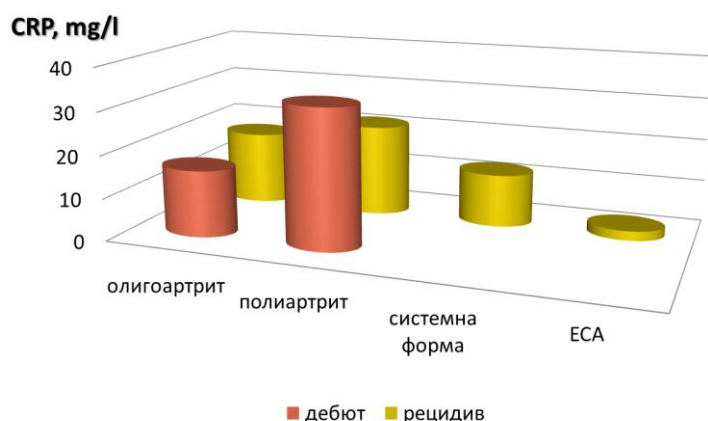
Подформа на ЮИА	ReACCh Out n=354	CAPS n=740	Скандинавия n=440	Дисертационен труд n=43
Олигоартрит	21 (10-38)	17 (6-35)	30 (15-50)	28 (4-60)
Полиартрит (-) РФ	20 (7-44)	28 (8-56)	42 (20-60)	39 (6-63)
Полиартрит (+) РФ	52 (30-81)	18 (10-46)	28 (8-47)	25
Системна форма	45 (19-86)	85 (55-102)	101 (84-110)	62
Ентезит-свързан артрит	16 (5-30)	16 (7-32)	41 (12-70)	•

• всички пациенти в изследваната от нас група с ентезит-свързан артрит са с рецидив на заболяването

### 4.5.3 CRP

Тенденцията, установена при анализа на средните стойности на СУЕ и S100 A8/A9 се запазва и при средните стойности на CRP (графика 5). Средната стойност на CRP е най-висока в подгрупата с дебют на полиартрит ( $32.74 \pm 30.08$  mg/l), следвана от подгрупата с рецидив на полиартрит ( $21.62 \pm 25.36$  mg/l). Отново най-ниски стойности наблюдавахме в подгрупата с ентезит-свързан артрит ( $2.25 \pm 2.07$ ).

**Графика 5 Средни стойности на CRP при отделните подформи ЮИА**



В изследваната от нас група деца с дебют на заболяването стойности на CRP под 5 mg/l наблюдавахме при 18/43 (42%) пациенти. В групата включена в регистъра на Германия ICON, стойности на CRP под 5 mg/l са установени при 417/695 (60%) от пациентите.

**Табл. 17 Сравнение на средните стойности на CRP при пациенти с дебют на ЮИА**

	ICON	CAPS	Скандинавия	Дисертационен труд
Средна стойност на CRP при дебют на ЮИА	2.5 (0.4-8.5)	9 (0-33)	14 (0-35)	21 (0.3-149)

**Табл. 18 Сравнение на средните стойности на CRP при дебют на ЮИА между пациентите включени в дисертационния труд и ReACCh Out регистъра на Канада, CAPS регистъра на Великобритания и този на Скандинавия**

Подформа на ЮИА	ReACCh Out n=354	CAPS n=740	Скандинавия n=440	Дисертационен труд n=43
Олигоартрит	3 (0-7)	7 (0-16)	11 (0-24)	16 (0,3-149,09)
Полиартрит с (-) РФ	6 (1-14)	14 (4-52)	24 (0-47)	35 (0,4-82,95)
Полиартрит с (+) РФ	25 (3-33)	12 (5-33)	27 (10-44)	6
Системна форма	33 (5-62)	98 (36-246)	146 (83-184)	28
Ентезит-свързан артрит	5 (1-16)	3 (0-21)	23 (10-53)	•

• всички пациенти в изследваната от нас група с ентезит-свързан артрит са с рецидив на заболяването

Общата възпалителна активност на деца с ЮИА е подробно изследвана още през 1976 година в дисертационния труд на Е. Маджарова.<sup>(232)</sup> Направен е опит за пълна характеристика на активността на артрит в детска възраст. Основният и единствен показател на възпаление, който е анализиран е СУЕ. Други изследвани лабораторни показатели са ПКК, общ белтък, албумин, алфа – и гама-глобулини. Близо 20 години по-късно Д. Михайлова изследва друг показател на възпаление (CRP) при 70 деца с ЮИА, разделени в две групи – с моноолигоартритна и с полиартритна форма на ЮИА.<sup>(233)</sup> Установяват се достоверно по-високи стойности на CRP при полиартритната форма. Колективът потвърждава изводът, че CRP отразява активността на възпалителния процес – стойностите му са значително по-високи в групата с висока активност в сравнение с групата с минимална активност на заболяването. Установените от нас резултати потвърждават и тези, описани в дисертационния труд на Б. Върбанова.<sup>(234)</sup> При изследване на биологичната активност при деца с ЮИА, се регистрират статистически значимо по-високи стойности на СУЕ и CRP в групата с полиартрит в сравнение с олигоартрит. Пациентите с активна форма на полиартрита са с по-високи стойности от тези с неактивна.

#### **4.5.4 ИЗСЛЕДВАНЕ НА ИНТЕРЛЕВКИН-6 (IL-6)**

Анализът на средните стойности на IL-6 в отделните подгрупи ЮИА показва най-високи стойности в подгрупата на деца със системно начало на ЮИА ( $237.07 \pm 451.82$  pg/ml), следвани от подгрупата на полиартрит в дебют на болестта ( $52.99 \pm 47.88$  pg/ml) (графика 6). Установената значимо по-високата концентрация на IL-6 при пациентите със системна форма на ЮИА може да се обясни с по-високата обща възпалителна активност при тази подформа на болестта. Известна е и ролята на IL-6 в патогенезата на системната форма.

**Графика 6 Средни стойности на IL-6 при отделните подформи ЮИА**



В дисертационния си труд З. Коларов установява, че серумната концентрация на IL-6 корелира с общата активност на пациентите с ревматоиден артрит.<sup>(230)</sup> Не е регистрирана връзка между серумната му концентрация и клиничните показатели, които характеризират локална активност при пациентите с ревматоиден артрит. Установено е също, че стойностите на IL-6 корелират с някои острофазови лабораторни показатели, характеризиращи активността на артритата, като СУЕ и фибриноген. Констатирана е сигнификантна разлика в серумните концентрации на IL-6 при пациентите с ниска и висока болестна активност.

Д. Михайлова и колектив определят нивото на серумен интерлевкин-6 при 34 деца с активен ЮИА.<sup>(235)</sup> Установяват отново най-висока концентрация при системната форма в сравнение с олигоартритната и полиартритната. Установяват корелация между IL-6 и клиничната активност на заболяването – сигнификантно по-високи стойности в активна фаза в сравнение с неактивна фаза на заболяването. Регистрират корелация между стойностите на IL-6, СУЕ и CRP при олигоартрита и системната форма на ЮИА. De Benedetti и

сътрудници <sup>(103)</sup> също установяват повишени серумни концентрации на ИЛ-6 при активната фаза на олигоартрит и полиартрит в сравнение с неактивната такава.

#### 4.5.5 СРАВНИТЕЛНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА БИОМАРКЕРИТЕ ПРИ ГРУПАТА ДЕЦА С ДЕБЮТ НА ЮИА

Групата от деца с дебют на заболяването (n=43) включва 29 деца с олигоартритна форма, 13 с полиартритна форма и един пациент със системна форма. При сравнително изследване на средните стойности на биомаркерите при децата с олигоартрит и с полиартрит установихме, че средните стойности на S100 A8/A9, CRP и ИЛ-6 са сигнификантно по-високи в подгрупата с полиартрит в сравнение с олигоартритната подгрупа(таблица 19). Този резултат може да се обясни с по-големия брой засегнати стави. Такава статистически значима разлика не е наблюдавана за стойностите на СУЕ.

**Табл. 19 Сравнение на средните стойности на биомаркерите в дебют на ЮИА**

Биомаркер	Олигоартрит дебют - n=29	Полиартрит дебют n=13	
S100 A8/A9, ng/ml	3706,51 ± 2662,85	9490,85 ± 7434,91	p<0.05
СУЕ, мм/ч	28±17	37 ± 16	p>0.05
CRP, mg/l	15,72±30,19	32,74 ± 30,08	p<0.05
ИЛ-6, pg/ml	14,37 ± 18,18	52,99 ± 47,88	p<0.05

#### 4.5.6 СРАВНИТЕЛЕН АНАЛИЗ НА СРЕДНИТЕ СТОЙНОСТИ НА БИОМАРКЕРИТЕ В ГРУПАТА С РЕЦИДИВ НА ЮИА

При провеждане на идентичен анализ в подгрупите с рецидив на олиго- и полиартрит се наблюдаваха сигнификантни разлики в средните стойности на същите биомаркери (S100A8/A9, CRP, IL-6) между двете подгрупи (таблица 20).

Табл. 20 Сравнение на средните стойности на биомаркерите при рецидив на ЮИА

Биомаркер	Олигоартрит рецидив - n=28	Полиартрит рецидив n=18	
S100 A8/A9, ng/ml	3740,00±3076,00	7507,88±7514,00	p<0.05
СУЕ, мм/ч	17 ± 12	30 ± 15	p<0.05
CRP, mg/l	17,33 ± 47,69	21,62 ± 25,07	p>0.05
IL-6, pg/ml	9,67 ± 13,26	33,57 ± 37,72	p<0.05

#### 4.5.7 КОРЕЛАЦИОНЕН АНАЛИЗ МЕЖДУ СТОЙНОСТИТЕ НА БИОМАРКЕРИТЕ

При провеждане на корелационен анализ между стойностите на изследваните биомаркери в цялата група (n=99), в групата с дебют на ЮИА (n=43) и в тази с рецидив (n=46) – таблици 20, 21, 22 – установихме умерена корелация за цялата група между СУЕ и S100 A8/A9 (r=0,45). В групата с дебют на ЮИА констатирахме умерена корелация между S100 A8/A9 и IL-6 (r=0,53),

S100 A8/A9 и CRP ( $r=0,48$ ), S100 A8/A9 и CYE ( $r=0,46$ ). В проучването, проведено от Moncrieffe и колектив<sup>(171)</sup>, е регистрирана позитивна умерена корелация между стойностите на S100 A8/A9 и CRP ( $r=0,64$ ), между S100 A8/A9 и CYE - ( $r=0,47$ ), между CYE и CRP - ( $r=0,58$ ).

**Табл. 21 Корелационен анализ между биомаркерите в цялата група**

	<b>S100A8/A9</b>	<b>CYE</b>	<b>CRP</b>	<b>IL-6</b>
<b>S100A8/A9</b>	-	<b>0,45</b>	<b>0,36</b>	<b>0,07</b>
<b>CYE</b>	<b>0,45</b>	-	<b>0,30</b>	<b>0,18</b>
<b>CRP</b>	<b>0,36</b>	<b>0,30</b>	-	<b>0,13</b>
<b>IL-6</b>	<b>0,07</b>	<b>0,13</b>	<b>0,13</b>	-

**Табл. 22 Корелационен анализ между биомаркерите в групата с дебют**

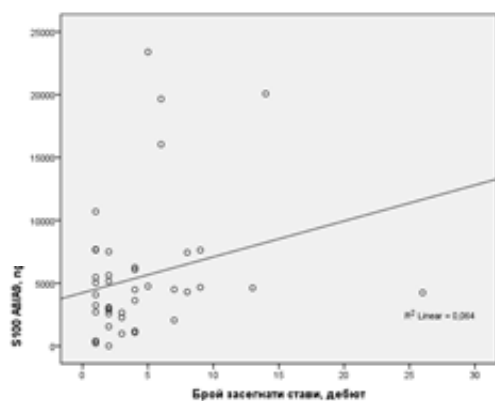
	<b>S100A8/A9</b>	<b>CYE</b>	<b>CRP</b>	<b>IL-6</b>
<b>S100A8/A9</b>	-	<b>0,46</b>	<b>0,48</b>	<b>0,53</b>
<b>CYE</b>	<b>0,46</b>	-	<b>0,47</b>	<b>0,29</b>
<b>CRP</b>	<b>0,48</b>	<b>0,47</b>	-	<b>0,41</b>
<b>IL-6</b>	<b>0,53</b>	<b>0,29</b>	<b>0,41</b>	-

**Табл. 23 Корелационен анализ между биомаркерите в групата с рецидив**

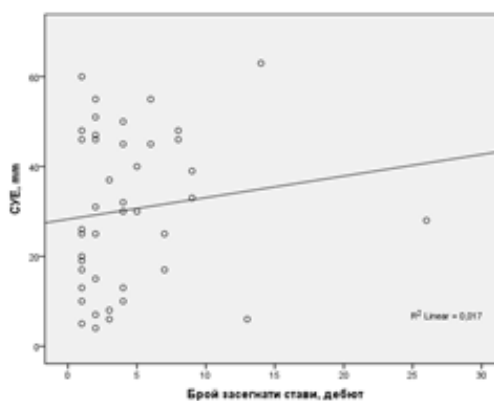
	<b>S100A8/A9</b>	<b>CYE</b>	<b>CRP</b>	<b>IL-6</b>
<b>S100A8/A9</b>	-	<b>0,47</b>	<b>0,28</b>	<b>0,03</b>
<b>CYE</b>	<b>0,47</b>	-	<b>0,18</b>	<b>0,20</b>
<b>CRP</b>	<b>0,28</b>	<b>0,18</b>	-	<b>0,12</b>
<b>IL-6</b>	<b>0,03</b>	<b>0,20</b>	<b>0,12</b>	-

#### **4.5.8 КОРЕЛАЦИОНЕН АНАЛИЗ МЕЖДУ СТОЙНОСТИТЕ НА БИОМАРКЕРИТЕ И БРОЯ ЗАСЕГНАТИ СТАВИ**

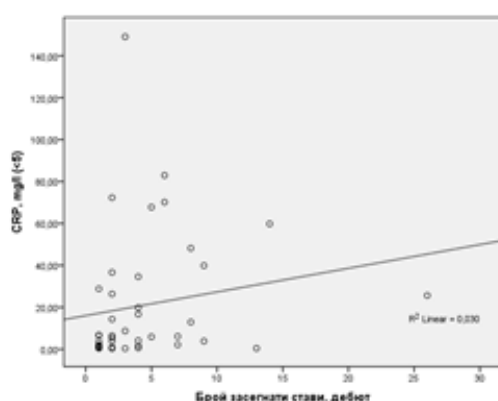
Проведохме корелационен анализ между стойностите на изследваните биомаркери в групата с дебют на ЮИА (n=43) и броя на засегнатите стави (фигура 4). Установихме макар и умерена статистически значима корелация за стойностите на CRP ( $r=0,370$ ) и IL-6 ( $r=0,382$ ) и броя на засегнатите стави при дебют. Слаба корелация се установи между стойностите на S100 A8/A9 ( $r=0,267$ ) и тези на CYE ( $r=0,191$ ) и броя на засегнатите стави. В проучването на Frosch и колектив<sup>(153)</sup> е констатирана умерена корелация между броя на засегнатите стави и на стойностите на S100 A8/A9 –  $r=0,61$ , CRP -  $r=0,43$ , CYE -  $r=0,22$ .



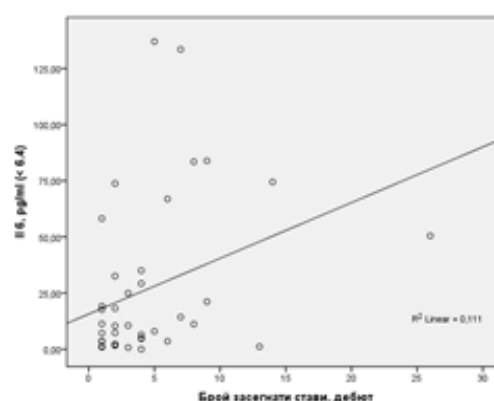
**S100 A8/A9**  
**r=0,267, p=0.087**



**CUE**  
**r=0,191, p=0.225**



**CRP**  
**r=0,370, p<0.05**



**IL-6**  
**r=0,382, p<0.05**

**Фигура 4. Корелационен анализ между стойностите на биомаркерите при дебют на ЮИА и броя на засегнатите стави**

#### **4.5.9 ЗАВИСИМОСТ НА ИЗМЕРЕНИТЕ ПРИ ДЕБЮТ СТОЙНОСТИ НА S100 A8/A9 С ЕВОЛЮЦИЯТА НА БОЛЕСТТА**

- С АНГАЖИРАНЕ НА НОВИ СТАВИ ПРИ РЕЦИДИВ

Изследвахме дали съществува взаимовръзка между стойностите на S100 A8/A9, измерени при дебют с ангажирането на нови стави при рецидив на болестта. Анализирахме дали повишените стойности на S100 A8/A9 биха ни

дали отговор на въпроса дали ще има включване на нови стави при рецидива на ЮИА.

В изследваната група деца с ЮИА установихме включване на нови стави при рецидив на артритата при 24 пациента. При 33 пациента не се наблюдава ангажиране на нови стави, а при 42 деца липсват данни.

При сравняване на средните стойности на биомаркерите в групата с включване на нови стави и тази без, не се установиха статистически значими разлики – ( $p=0.13$  за S100 A8/A9;  $p=0.73$  за СУЕ;  $p=0.58$  за CRP;  $p=0.81$  за IL-6).

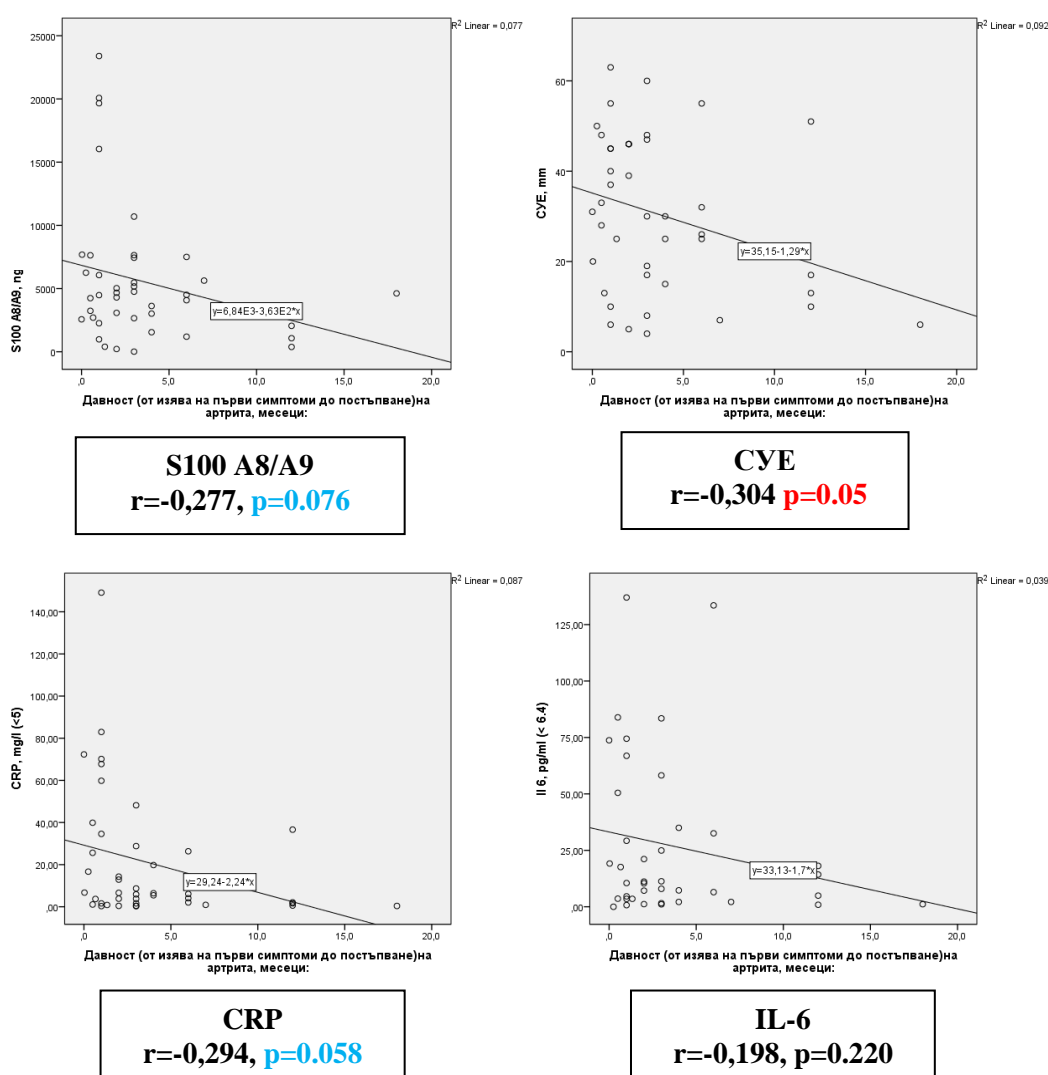
**Табл. 24 Сравнение на средните стойности на биомаркерите в групата с и тази без включване на нови стави при рецидив**

Биомаркер	Включване на нови стави		
	(+)	(-)	
<b>S100 A8/A9, ng/ml</b>	6185,46	4539,36	$p>0.05$
<b>СУЕ, мм</b>	24,08	20,62	$p>0.05$
<b>CRP, mg/l</b>	13,19	21,64	$p>0.05$
<b>IL-6,pg/ml</b>	26,20	20,20	$p>0.05$

От двадесет и четирите пациента с ангажиране на нови стави при рецидив на болестта, 6 са с дебют на заболяването и са проследени проспективно. От 33-те пациента без включване на нови стави при проследяване – 11 са с дебют на ЮИА. Не се установи статистически значима разлика между двете подгрупи с дебют на заболяването (с и без включване на нови стави при проследяване) по отношение на честотата на разпределение на положителните стойности на S100 A8/A9 при изявата на заболяването ( $\chi^2 = 1.41$ ,  $df=1$ ,  $p>0.05$ ).

- С ДАВНОСТТА НА БОЛЕСТТА

В процеса на обработка на данните относно корелацията между стойностите на биомаркерите и давността на заболяването, се получи интересен резултат. Установихме обратна корелационна зависимост, т.е. с увеличаване давността на заболяването спадат стойностите на биомаркерите (фигура 5). Резултат, който би могъл да се интерпретира с предположението, че ЮИА е самоограничващ се процес и при самия дебют на заболяването не се увеличава броят на засегнатите стави.



**Фигура 5. Корелационен анализ между стойностите на биомаркерите при дебют на ЮИА и давността на ЮИА**

#### 4.6. ВЛИЯНИЕ НА ПРИЕМА НА МЕДИКАМЕНТИ ВЪРХУ СТОЙНОСТИТЕ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ БИОМАРКЕРИ

В групата с дебют на заболяването (n=43) констатирахме, че 29 от децата са приемали медикаменти преди първата им хоспитализация в Клиниката. Най-голям е процентът (29%) на децата, които са приемали нестероидни противовъзпалителни средства. Четири от тях са приемали в комбинация глюкокортикостероид и НСПВС, а при един пациент е било назначено лечение само с кортикостероид. Не установихме сигнификантна разлика в средните стойности на биомаркерите между децата приемали медикаменти преди хоспитализацията и тези които не са (таблица 25). Следователно, приемът на лекарства преди първата хоспитализация не оказва влияние върху средните стойности на изследваните биомаркери.

**Табл. 25 Сравнение на средните стойности на биомаркерите между групите деца, които са приемали медикаменти и тези, които не са приемали**

Биомаркер	n=29 приемали медикаменти	n=14 не са приемали медикаменти	
S100 A8/A9, ng/ml	5419,96 ± 5207,15	5668,61 ± 5791,11	p>0.05
СУЕ, мм/ч	30 ± 18	32 ± 17	p>0.05
CRP,mg/l	20,48 ± 33,29	22,12 ± 25,67	p>0.05
IL-6,pg/ml	24,36 ± 32,79	32,25 ± 41,53	p>0.05

Независимо от малката бройка деца приемали глюкокортикостероиди преди първата хоспитализация, решихме да анализираме дали приемът им има

влияние върху средните стойности на изследваните биомаркери. Децата, приемали ГКС са 5, а останалите 24 от групата не са приемали ГКС. Отново не установихме статистически значима разлика между средните стойности на маркерите на възпаление между двете групи (таблица 26).

Средните стойности на биомаркерите в групата деца, които са приемали глюкокортикостероиди преди хоспитализацията са по-високи в сравнение с тези при децата, които не са приемали ГКС. Тази разлика обаче не е статистически значима. По-високите стойности могат да бъдат обяснени с по-високата активност на заболяването, което вероятно е наложило и включване на ГКС.

**Табл. 26 Сравнение на средните стойности на биомаркерите между групите деца, които са приемали ГКС и тези, които не са приемали**

<b>Биомаркер</b>	<b>n=24 (-) ГКС</b>	<b>n=5 (+) ГКС</b>	
<b>S100 A8/A9, ng/ml</b>	4662,91± 3470,39	9053,8± 10030,24	p>0.05
<b>СУЕ, мм</b>	28 ± 17	35 ± 20	p>0.05
<b>CRP,mg/l</b>	19,52 ± 32,67	30,22 ± 38,50	p>0.05
<b>IL-6,pg/ml</b>	22,91 ± 32,61	30,74 ± 36,63	p>0.05

#### **4.7. СРАВНИТЕЛЕН АНАЛИЗ НА СРЕДНИТЕ СТОЙНОСТИ НА БИОМАРКЕРИТЕ В ГРУПАТА С ДЕБЮТ НА ЮИА И ОТГОВОРА КЪМ ПРОВЕЖДАНАТА ТЕРАПИЯ С МТХ**

В проучване, проведено сред деца с ЮИА от Великобритания (CHARMS – Childhood Arthritis Response to Medication Study)<sup>(171)</sup> се изказва становището, че сред децата с по-висока възпалителна активност преди започване на терапия с МТХ, се очаква по-добър лекарствен отговор. Във връзка с това сравнихме средните стойности на S100 A8/A9, СУЕ, CRP и IL-6, определени преди започване на терапия с МТХ.

От децата с дебют на ЮИА (n=43), при 28 е назначена терапия с МТХ, а при останалите 15 не е назначена такава, а с друг болестмодифициращ медикамент. За да анализираме връзката между биомаркерите и отговора към терапията с МТХ, подразделихме децата с дебют на заболяването и приемащи МТХ (n=28) на две подгрупи:

- Подгрупа с добър отговор към МТХ – n=23, при която при проследяването не се е наложило включване на биологичен агент и е наблюдаван добър лекарствен отговор към провежданата терапия с МТХ на базата на клиничните и параклиничните показатели.
- Подгрупа с лош отговор към МТХ - n=5, при която при проследяване се е наложило включване на биологичен агент поради липса на ефект от провежданата терапия с МТХ.

При сравнителен анализ на изследваните в дебюта на заболяването стойности на S100 A8/A9 в тези две подгрупи установихме, че стойността на S100A8/A9 при началната изява на болестта е статистически значимо по-висока в подгрупата, при която впоследствие при проследяване е включен биологичен агент (таблица 27). Следователно, на базата на тези резултати може да се

предположи, че по-високите стойности на S100 A8/A9 могат да служат за диференциране на пациентите с потенциален очакван лош от тези с добър лекарствен отговор. Също така статистически значима разлика между двете подгрупи констатирахме и за стойностите на СУЕ, CRP и IL-6.

Получените от нас резултати не подкрепят тези от проучването CHARMS. Разбира се, не трябва да се пренебрегва фактът, че настоящият дисертационен труд включва значително по-малка група пациенти. В проучването CHARMS Moncrieffe и колектив<sup>(171)</sup> определят средни стойности на S100 A8/A9 в дебюта на ЮИА преди започване на терапия с MTX. Установени са средни стойности - 2300 ng/ml (интервал 965-3460 ng/ml) в групата с по-добър лекарствен отговор при проследяване, в сравнение със средни стойности от 1495 ng/ml (интервал 923-1890 ng/ml) в групата с незадоволителен лекарствен отговор. Авторите регистрират статистическа значимост на разликата в средните стойности между двете групи. Стигат до извода, че при пациентите със стойности на S100 A8/A9 над 3000 ng/ml е по-голяма вероятността за добър лекарствен отговор при проследяване (OR 16.07 (95% CI 2.00, 129.3)). Изследователският колектив констатира, че както концентрациите на S100 A8/A9, така и тези на CRP имат отлични позитивни предиктивни стойности, тъй като високите им концентрации се асоциират с висока вероятност за добър лекарствен отговор.

**Табл. 27 Сравнение на средните стойности на биомаркерите в дебют между групите деца, които в последствие са провеждали терапия с БА и тези, които не са**

Биомаркер	Отговор към МТХ		
	ДОБЪР, без БА - n=23	ЛОШ, включен БА - n=5	
<b>S100 A8/A9, ng/ml</b>	4315,91±1818,09	14 306,20±9361,18	<b>p&lt;0.05</b>
<b>СУЕ, мм</b>	34 ± 17	49 ± 9	<b>p&lt;0.05</b>
<b>CRP, mg/l</b>	13,56 ± 13,80	43,08 ± 38,03	<b>p&lt;0.05</b>
<b>IL-6,pg/ml</b>	22,34 ± 32,22	70,48 ± 54,56	<b>p&lt;0.05</b>

#### **4.7.1. СРАВНИТЕЛЕН АНАЛИЗ НА ВЪЗРАСТТА НА ИЗЯВА НА ЮИА И БРОЯТ НА ЗАСЕГНАТИТЕ СТАВИ ПРИ ДЕБЮТ СПРЯМО ОТГОВОРА КЪМ ПРОВЕЖДАНАТА ТЕРАПИЯ С МТХ**

Идентичен анализ в двете подгрупи с добър (n=23) и лош (n=5) лекарствен отговор показва статистически значима разлика за възрастта на изява на ЮИА. Констатирахме асоциация на по-малката възраст на дебют на заболяването с по-лоша прогноза на артритата и необходимост от включване на биологичен агент при проследяване (таблица 28). Полученият от нас резултат не потвърждава този от проучването ICON<sup>(228)</sup>, проведено от немски изследователи и включващо голяма група деца (n=695). Изследователският колектив от Германия намира зависимост на по-малката възраст на изява на болестта с по-голяма вероятност за достигане на състояние на липсваща активност на заболяването. Нашето проучване върху значително по-малка група пациенти не потвърждава тези резултати. Нещо повече, ние установихме статистически значима разлика в обратна посока, което заслужава потвърждаване или

отхвърляне на находката с разширени проучвания при нашите болни. Би било много рано да се правят окончателни изводи на базата на тези данни, но наблюдаваната разлика в получените резултати, наред с множество причини, може да се дължи на индивидуални особености на българските деца с ЮИА. Това всъщност би могло да бъде причина и за наблюдаваните различия в лекарствения отговор на нашите болни и регистрираната асоциация на високите стойности на част от изследваните биомаркери с лош лекарствен отговор.

В настоящия дисертационен труд не констатирахме статистически значима разлика по отношение на броя на засегнати стави в дебюта на заболяването между групите с добър и лош лекарствен отговор при проследяване. В проучването на Moncrieffe и колектив<sup>(171)</sup> броят на засегнатите стави в дебюта на заболяването преди започване на терапия с МТХ е сигнификантно по-голям сред пациентите, при които се наблюдава по-добър лекарствен отговор впоследствие.

**Табл. 28 Сравнение на възрастта на изява на заболяването и броя засегнати стави между децата, които в последствие са приемали БА и тези, които не са**

Показател	Отговор към МТХ		
	ДОБЪР, без БА n=23	ЛОШ, включен БА n=5	
<b>Възраст на изява</b>	7,24 ± 4,33	2,76 ± 1,64	<b>p&lt;0.05</b>
<b>Брой стави</b>	4 (1-13)	6 (1-14)	p>0.05

#### 4.8. СРАВНИТЕЛЕН АНАЛИЗ НА АБСОЛЮТНИЯ БРОЙ ПОЛОЖИТЕЛНИ СТОЙНОСТИ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ БИОМАРКЕРИ ПРИ ДЕБЮТ НА ЗАБОЛЯВАНЕТО И ОТГОВОРА КЪМ ПРОВЕЖДАНАТА ТЕРАПИЯ С МТХ

Анализирахме и абсолютния брой на пациенти с положителни стойности на биомаркерите при дебют на ЮИА в двете подгрупи - с добър (n=23) и лош (n=5) лекарствен отговор (таблица 29). Не установихме статистически значима разлика в броя на пациентите с положителни стойности на биомаркерите при дебют между двете подгрупи (S100 A8/A9 –  $\chi^2 = 1,01$ ;  $p > 0.05$ ; СУЕ –  $\chi^2 = 0,73$ ;  $p > 0.05$ ; CRP -  $\chi^2 = 0,41$ ;  $p > 0.05$ ; IL-6 –  $\chi^2 = 0,15$ ;  $p > 0.05$ ).

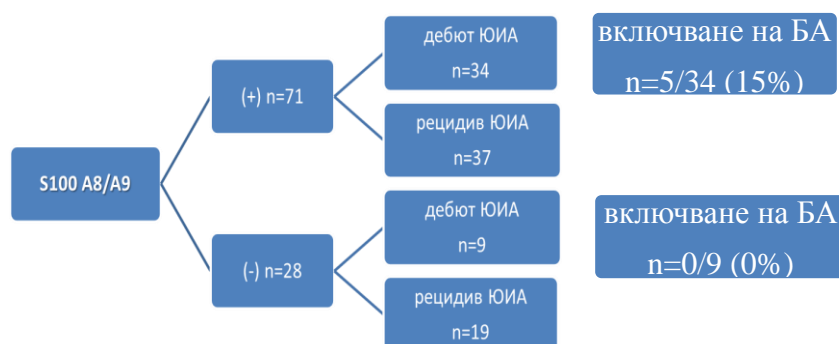
**Табл. 29** Сравнение на абсолютния брой пациенти с положителни стойности на биомаркерите в дебют между групите с добър и лош лекарствен отговор

БИОМАРКЕР	Добър отговор към МТХ	Лош отговор към МТХ
S100 A8/A9	82,6% (19/23)	100%(5/5)
СУЕ	86,9% (20/23)	100%(5/5)
CRP	65,2%(15/23)	80%(4/5)
IL-6	65,2%(15/23)	60%(3/4)

#### 4.9. СРАВНИТЕЛЕН АНАЛИЗ НА АБСОЛЮТНИЯ БРОЙ ПАЦИЕНТИ С ПОЛОЖИТЕЛНИ СТОЙНОСТИ НА S100 A8/A9 В ЦЯЛАТА ГРУПА С ЮИА

В цялата група пациенти положителни стойности на S100 A8/A9 протеините са установени при 71 деца (71.7%), като 34 от тях са с дебют на ЮИА (фигура 6). От тези 34 деца при проследяване при 5 е включен впоследствие биологичен агент или това са 15% от пациентите с положителни стойности на S100 A8/A9 при дебют.

При 28 деца (28.3%) са регистрирани отрицателни стойности на S100 протеините. От тях 9 деца са с дебют на заболяването и при нито едно дете не е включен биологичен агент впоследствие. Следователно, в заключение установяваме, че по-често се включва биологичен агент към терапията при пациентите с положителни стойности на S100 A8/A9 в дебюта на болестта в сравнение с пациентите с отрицателни стойности на S100 A8/A9. При провеждане на хи-квадрат анализ не се установи статистически значима разлика в разпределението на честотата на включване на БА между двете групи с положителни и отрицателни стойности на изследвания биомаркер ( $\chi^2 = 1,50$ ,  $p > 0.05$ ).



**Фигура 6. Абсолютен брой пациенти с положителни/отрицателни стойности на S100 A8/A9 в цялата група с ЮИА и абсолютен брой пациенти с включен БА**

#### 4.10 СРАВНИТЕЛЕН АНАЛИЗ НА СРЕДНИТЕ СТОЙНОСТИ НА БИОМАРКЕРИТЕ, ОПРЕДЕЛЕНИ В ГРУПА НЕПОСРЕДСТВЕНО ПРЕДИ ЗАПОЧВАНЕ НА ЛЕЧЕНИЕ С БИОЛОГИЧЕН АГЕНТ И ГРУПАТА С ДОБЪР ОТГОВОР КЪМ МТХ

В група от 22 пациента стойностите на изследваните биомаркери бяха определени непосредствено преди започване на лечение с биологичен агент. Сравнихме средните стойности с тези на подгрупата с дебют на артрит, при която наблюдавахме при проследяване добър отговор към МТХ (n=23). Констатирахме статистическа значима разлика в стойностите на изследваните биомаркери между двете групи. Получените резултати подкрепят твърдението, че S100 A8/A9 може да служи като маркер за активността на заболяването. По-високите стойности в групата с неповлияване от провежданата терапия и необходимост от включване на БА могат да бъдат обяснени с по-високата моментна активност на заболяването при тази група пациенти (таблица 30).

**Табл. 30 Сравнение на средните стойности на биомаркерите, изследвани непосредствено преди започване на терапия с БА спрямо тези в група с добър лекарствен отговор**

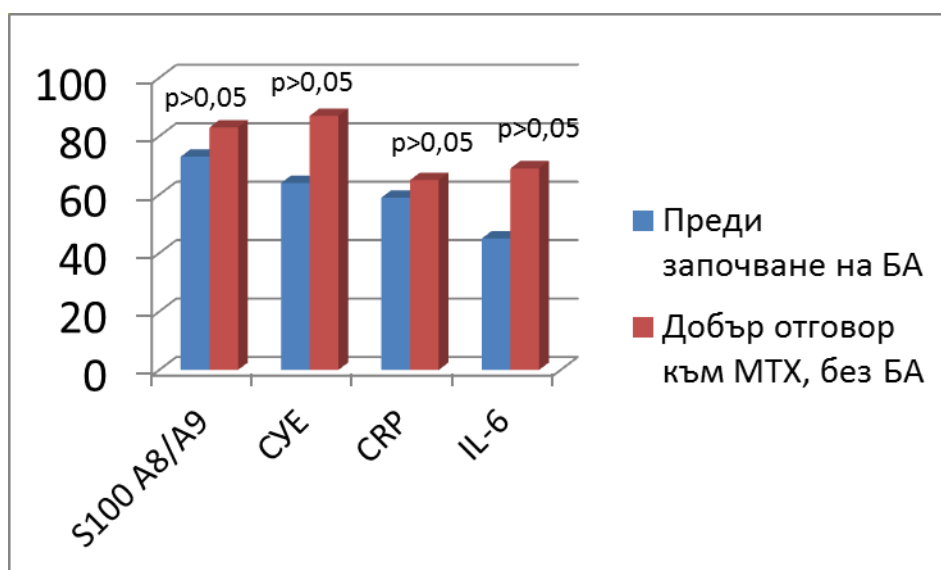
Биомаркер	Преди започване на БА - n=22	Добър отговор към МТХ, без БА - n=23	
<b>S100 A8/A9, ng/ml</b>	7085,5 ± 7203,53	4315,91±1818,09	<b>p&lt;0.05</b>
<b>СУЕ, мм/ч</b>	22 ± 15	34 ± 17	<b>p&lt;0.05</b>
<b>CRP, mg/l</b>	12,18 ± 16,64	43,08 ± 38,03	<b>p&lt;0.05</b>
<b>IL-6, pg/ml</b>	26,94 ± 39,92	70,48 ± 54,56	<b>p&lt;0.05</b>

Тези две подгрупи бяха сравнени и по абсолютен брой пациенти с положителни стойности на биомаркерите (таблица 31, графика 7). Не

установихме статистически значима разлика в броя на положителните стойности между двете подгрупи – S100 A8/A9 ( $\chi^2 = 0,64$ ,  $df=1$ ,  $p>0.05$ ); СУЕ ( $\chi^2 = 3,31$ ,  $df=1$ ,  $p>0.05$ ); CRP ( $\chi^2 = 0,18$ ,  $df=1$ ,  $p>0.05$ ); IL-6 ( $\chi^2 = 2,68$ ,  $df=1$ ,  $p>0.05$ ).

**Табл. 31 Абсолютен брой пациенти с положителни стойности на биомаркерите в групите преди започване на терапия с БА и тази с добър отговор към МТХ**

БИОМАРКЕР	Преди започване на БА	Добър отговор към МТХ, без БА
S100 A8/A9	73 % (16/22)	83 % (19/23)
СУЕ	64 % (14/22)	87 % (20/23)
CRP	59 % (13/22)	65 % (15/23)
IL-6	45 % (10/22)	69 % (16/23)



**Графика 7. Абсолютен брой пациенти с положителни стойности на биомаркерите в групите преди започване на терапия с БА и тази с добър отговор към МТХ**

#### 4.11 КОРРЕЛАЦИОНЕН АНАЛИЗ МЕЖДУ АКТИВНОСТТА НА ЮИА, ОПРЕДЕЛЕНА ЧРЕЗ БИОМАРКЕРИТЕ И АКТИВНОСТТА, ОПРЕДЕЛЕНА ПО СКАЛАТА JADAS 27

В групата от 22 пациента, при които стойностите на биомаркерите бяха изследвани непосредствено преди започване на лечение с биологичен агент, бяха определени стойностите на JADAS 27. Скалата JADAS 27 е показател за активността на ЮИА. В скорошна публикация Bulatovic и сътрудници са предложени cut-off стойности, определящи активността – на 75<sup>ти</sup> перцентил за ниска болестна активност (JADAS-27  $\leq$ 2.7) и на 25<sup>ти</sup> перцентил за висока болестна активност (JADAS-27  $\geq$ 6.0).<sup>(236)</sup> Сред пациентите, при които JADAS 27 е изчислен преди започване на биологично лечение, имаме данни за стойностите му при 19 пациента. При 17 от тях той е със стойност над 6, т.е. това са деца с висока болестна активност според споменатата публикация. Проведеният корелационен анализ не показва статистически значима корелация между стойностите на S100 A8/A9, CRP и IL-6, определени преди започване на биологично лечение и изчисления JADAS-27 (таблица 32). Установихме статистически значима умерена корелация единствено между СУЕ и JADAS27, което е и очаквано, тъй като скоростта на утаяване на еритроцитите е включена в съставянето на JADAS27.

**Табл. 32 Корелация между стойностите на биомаркерите, определени преди започване на терапия с БА спрямо стойността на JADAS-27**

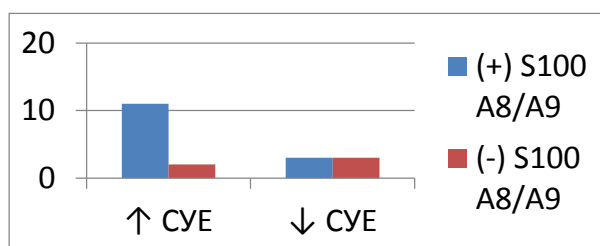
Биомаркер	Преди започване на БА – n = 19	
S100A8/A9, ng/ml	6201,47 ± 6455,39	p=0.681, r= -0,10
СУЕ, мм/ч	21 ± 15	p<0.05, r= 0,44
CRP, mg/l	9,97 ± 11,88	p=0.304, r= 0,07
IL-6, pg/ml	23,42 ± 33,48	p=0.266, r= 0,22

При провеждането на корелационен анализ между стойностите на биомаркерите, определени преди започване на лечение с БА, установихме силна корелация ( $r=0,85$ ) между S100 A8/A9 и CRP (таблица 33).

**Табл. 33 Корелационен анализ между биомаркерите, определени в група непосредствено преди започване на лечение с биологичен агент**

	S100A8/A9	CYE	CRP	IL-6
S100A8/A9	-	0,49	0,85	0,55
CYE	0,49	-	0,67	0,43
CRP	0,85	0,67	-	0,75
IL-6	0,55	0,43	0,75	-

Сред групата на пациентите, при които биомаркерите са изследвани непосредствено преди започване на лечение с биологичен агент, при 19 имаме данни за активността на заболяването, определена чрез JADAS 27. При анализа на тази група се установи, че при тринадесетте деца, при които е ускорено утаяването, по-често се установяват положителни стойности на S100A8/A9. А при децата с нормално утаяване е еднакво разпределението между пациентите с положителни и отрицателни стойности на S100 A8/A9 (графика 8).



**Графика 8.**

**Сравнение на абсолютния брой пациенти с положителни и отрицателни стойности на S100 A8/A9 в групите с нормални и ускорени стойности на CYE**

При провеждане на  $\chi^2$ -анализ не установихме статистически значима разлика в честотата на разпределение на абсолютните стойности на S100 A8/A9 между групата с ускорена и тази с нормална СУЕ -  $\chi^2 = 2,54$ ,  $df=1$ ,  $p>0.05$ .

При 10 от децата в групата с изследвани биомаркери преди започване на лечение с биологичен агент (n=22) проведохме повторно изследване на част от биомаркерите (S100 A8/A9, CRP, IL-6) в еволюцията на заболяването - в рамките на две години от началото на лечението. Сравнихме средните стойности между двете изследвания и отчетохме статистически значима разлика между тях (таблица 34). Това показва, че проследяването на стойностите на изследваните биомаркери може да служи като допълнителен показател към клиничната оценка и да се използва за проследяване на ефекта от провежданото лечение.

**Табл. 34 Средни стойности на биомаркерите, определени преди започване на лечение с БА и при повторно контролно изследване**

<b>Биомаркер</b>	<b>Преди започване на БА - n=10</b>	<b>Повторно изследване в еволюция - n=10</b>	
<b>S100 A8/A9, ng/ml</b>	10 611,5 ± 8997,18	951,5 ± 1705,17	<b>p&lt;0.05</b>
<b>CRP, mg/l</b>	17,57 ± 22,19	4,81 ± 11,71	<b>p&lt;0.05</b>
<b>IL-6, pg/ml</b>	42,25 ± 53,53	14,45 ± 20,89	<b>p&lt;0.05</b>

Сравнихме и абсолютните честоти по отношение на положителните и отрицателните стойности на биомаркерите между двете групи. Статистически значима разлика констатирахме за S100 A8/A9 ( $\chi^2 = 12,80$ ;  $df= 1$ ;  $p<0.05$ ) и CRP ( $\chi^2 = 5,49$ ;  $df = 1$ ;  $p<0.05$ ).

<u>Изследване преди започване на БА:</u>	<u>Повторно изследване:</u>	
• (+) <b>S100 A8/A9 – 90%</b> (9/10)	(+) <b>S100 A8/A9 – 10%</b> (1/10)	<b>p&lt;0.05</b>
• (+) <b>CRP – 60%</b> (6/10)	(+) <b>CRP – 10%</b> (1/10)	<b>p&lt;0.05</b>
• (+) <b>IL-6 – 50%</b> (5/10)	(+) <b>IL-6 – 40%</b> (4/10)	<b>p&gt;0.05</b>

#### **4.12. СРАВНИТЕЛЕН АНАЛИЗ НА ВЗАИМОВРЪЗКАТА НА НОСИТЕЛСТВОТО НА ПОЛИМОРФИЗМИ В *MTHFR* ГЕНА ПРИ ДЕЦА С ЮИА С ЛЕКАРСТВЕНИЯ ОТГОВОР И ПОЯВАТА НА НЛР**

При 40 деца бяха изследвани полиморфизмите с.677 C>T (rs1801133: C>T; p.A222V) и с.1298 A>C (rs1801131: A>C; p.E429A) в *MTHFR* гена. Тази група подразделихме на такава с добър лекарствен отговор (n=14) и такава с лош лекарствен отговор (n=26) на базата на липсата или наличие на лечение с биологичен агент съответно. Изследването на полиморфизма с.1298 A>C не е проведено при двама пациенти по технически причини. Не установихме сигнификантна разлика в разпределението на алелните честоти на двата полиморфизма в групата с добър и тази с лош лекарствен отговор (с.677 C>T  $\chi^2 = 0,40$ ; df = 2; p>0.05; с.1298 A>C  $\chi^2 = 0,23$ ; df = 2; p>0.05; TT ) (таблици 35,36).

При 4 от децата, при които са изследвани полиморфизми регистрирахме НЛР към МТХ – при две хепатотоксичност, при едно гадене и при едно главоболие и изтръпване на крайниците. Всички деца, при които наблюдавахме НЛР са носители на редкия алел с.677 C>T – двама от тях са хомозиготни носители (ТТ) и двама са хетерозиготни носители (СТ) (таблица 37). Сред всички останали пациенти (n=36), при които не са констатирани НЛР към провежданата терапия с МТХ, има двама хомозиготни (ТТ) носители на редкия алел. Възможно е хомозиготното носителство на този алел да се асоциира с развитието на НЛР, тъй като изглежда значително по-често сред лицата с развитие на странични реакции. Тази находка следва да бъде проверена (потвърдена или отхвърлена) при разширено проучване върху значително по-

големи групи индивиди. При провеждане на хи-квадрат метод за сравнение на разпределението на алелните честоти между децата с поява на НЛР и тези без НЛР – установихме статистически значима разлика в разпределението на редкия алел в групата с поява на старнични реакции (с.677 C>T  $\chi^2 = 9,12$ ;  $df = 2$ ;  $p < 0.05$ ).

**Табл. 35 Разпределение на алелите в групата с добър лекарствен отговор**

с.677 C>T		с.1298 A>C	
CC	5	AA	7
CT	8	AC	4
TT	1	CC	2

**Табл. 36 Разпределение на алелите в групата с лош лекарствен отговор**

с.677 C>T		с.1298 A>C	
CC	14	AA	13
CT	9	AC	10
TT	3	CC	2

**Табл. 37 Разпределение на алелите сред групата пациенти с НЛР**

с.677 C>T		с.1298 A>C	
CC	0	AA	4
CT	2	AC	0
TT	2	CC	0

Известно е, че терапията с МТХ може да бъде без ефект при част от пациентите с ЮИА<sup>(164, 215)</sup>. Лош или незадоволителен отговор към МТХ може да се наблюдава в 30-50% от пациентите с ЮИА<sup>(217)</sup>. Междувременно, терапията с МТХ може да доведе до непоносимост и поява на странични реакции (най-често от страна на гастроинтестиналния тракт, супресия на костния мозък и хепатотоксичност) при част от пациентите с ЮИА<sup>(218-221)</sup>.

Schmeling и колектив провеждат първото проучване, касаещо влиянието на полиморфизми в *MTHFR* гена върху ефикасността и токсичността на МТХ при ЮИА.<sup>(197)</sup> Изследователският колектив докладва асоциация на полиморфизма 677 C/C с по-добра поносимост към МТХ. Тази находка се наблюдава и сред нашата група пациенти, при които изследвахме полиморфизмите в *MTHFR* гена. Сред децата без проява на НЛР наблюдавахме само двама носители на дивия алел на полиморфизма с.677 C>T, докато сред четримата с проява на НЛР – всички са носители. Странични реакции към МТХ регистрирахме при 4 (10%) от пациентите. Schmeling и колеги докладват странични реакции при 34% от изследваните пациенти – най-често симптоми от страна на гастроинтестиналния тракт, следвани от повишение на серумните нива на чернодробните ензими и косопад. Странични реакции са регистрирани по-често при пациенти с хетерозиготен генотип 677 C/T в сравнение с хомозиготния 677 C/C (65% срещу 31%;  $p < 0.05$ ). В проведеното от тях проучване са включени 58 деца с ЮИА, приемащи перорално МТХ за период от поне 3 месеца в доза  $12.8 \pm 2.6$  мг/м<sup>2</sup> (от 8.4 до 20.5 мг/м<sup>2</sup>). Използваната средна доза МТХ в групата деца с изследвани полиморфизми, обект на настоящия дисертационен труд, е  $8.79 \pm 2.2$  мг/м<sup>2</sup> (от 5.0 до 17.8 мг/м<sup>2</sup>). Средната доза на МТХ сред децата с проява на НЛР е 6.76 мг/м<sup>2</sup>. Вероятно по-малката честота на наблюдавани странични реакции сред изследваните от нас деца може да се обясни с по-ниската използвана доза МТХ в сравнение с използваната от Schmeling и колеги. Същият екип докладва асоциация на

хомозиготното носителство на 1298 A/A с по-ниска клинична ефективност на терапията с МТХ. Сред пациентите, носители на дивия С алел на полиморфизма A1298C, е наблюдавано по-често подобрене в броя на оточните стави, броя на болезнените стави и спад в стойностите на СУЕ и CRP в сравнение с хомозиготните носители 1298 A/A. Ние не установихме асоциация на полиморфизма A1298C с лекарствения отговор към МТХ. Факт, който се потвърждава и от проучване проведено от изследователски колективи в Япония.<sup>(217)</sup> В това проучване не се установява асоциация между носителството на полиморфизми в *MTHFR* гена и ефективността и токсичността на провежданата терапия с МТХ.<sup>(217)</sup>

Друго проучване, потвърждаващо асоциацията на носителство на полиморфизми в *MTHFR* гена с токсичността при терапия с МТХ, е проведено от изследователски екип от Чешката република.<sup>(216)</sup> Включени са 69 пациента с ЮИА. Установено е отново, че честотата на носителство на дивия алел 677T е по-висока сред пациентите с проява на НЛР (52.4% срещу 20.9%; OR 3.88, 95% CI 1.8–8.6,  $p < 0.002$ ). Вероятността за изява на странични лекарствени реакции е значително по-висока сред пациентите с носителство на 677 T/T генотип в сравнение с тези носители на 677 C/C генотип (OR 55.5, 95% CI 2.9–1080,  $p < 0.001$ ). Изследователският колектив от Чехия докладва 30% НЛР сред изследваните пациенти при средна използвана доза на МТХ – 14.9 мг/м<sup>2</sup> седмично. Отново използваната средна доза на МТХ е по-висока от прилаганата при изследваната от нас група деца – 1.7 пъти по-висока.

От друга страна едно от последните проучвания, касаещо токсичността на терапията с МТХ, е на екип от Холандия и Италия.<sup>(223)</sup> Това е проспективно проучване, обхващащо 142 деца с ЮИА. Резултатите от него не посочват статистически значима асоциация между носителството на полиморфизми в *MTHFR* гена и вероятността за поява на странични реакции към МТХ.

До този момент, резултатите от изследването на различни нуклеотидни полиморфизми, свързани с терапията с МТХ, са противоречиви. Взимайки предвид това, и резултатите от проведените изследвания при нашата група пациенти, може да се изведе заключението, че все още е трудно да бъдат надеждно предсказани ефикасността и токсичността на терапията с МТХ. Все още не съществува утвърден генетичен маркер асоцииран с отговора към провежданата терапия с МТХ. Валидирането на маркер, който би диференцирал пациентите, които биха постигнали добър отговор към монотерапията с МТХ би подпомогнало разработването на рационален и персонализиран подход в лечението на децата с ЮИА.

#### **4.13. АНТИНУКЛЕАРНИ АНТИТЕЛА И ВЗАИМОВРЪЗКА НА НЯКОИ ПОКАЗАТЕЛИ С РАЗВИТИЕТО НА УВЕИТ**

Данни за стойностите на ANA в дебюта на заболяването имахме при 67 от децата. При 25 от тях (37%) е регистриран отрицателен титър на антинуклеарните антитела. При останалите 42 деца (63%) е налице положителен титър. Наблюдавахме инверсия в разпределението по пол между двете групи. Женският пол (29 момичета (69%) сред 42 деца) преобладава в групата с положителни стойности на ANA. В групата с отрицателни стойности на ANA преобладава мъжкият пол – 16 момчета (64%) сред 25 деца. При сравнение на двете групи чрез  $\chi^2$ -тест установихме статистическа достоверност на наблюдението, че положителни стойности на антинуклеарни антитела се срещат по-често сред момичета с дебют на ЮИА ( $\chi^2=6,97$ ;  $df=1$ ;  $p<0,05$ ). Този резултат съответства с данните в литературата, че сред пациентите с положителни титри на ANA се наблюдава преваляване на женския пол.<sup>(80)</sup>

Най-често положителен титър на антинуклеарни антитела в дебюта на болестта установихме при олигоартритната форма на ЮИА (n=26, 62%), следвани от подгрупата на деца с полиартрит с отрицателен РФ (n=12, 29%). Резултат, корелиращ с литературните данни в световен мащаб, както и с тези описани в дисертационния труд на Б. Върбанова<sup>(234)</sup> – установени са положителни титри на ANA в 34% от пациентите, по-често при момичета, при над половината от болните с дебют на артрит преди 6-годишна възраст и предимно при олигоартритната форма.

Напоследък се предлага становището, че ANA позитивните пациенти биха оформили нова подгрупа ЮИА в класификацията на ILAR.<sup>(80)</sup> Това становище се основава на наблюдението, че сред ANA-позитивните пациенти има по-ранна възраст на изява на заболяването, превалиране на женския пол, преимуществено асиметричен артрит, по-висок риск от развитие на увеит и липса на ангажиране на тазобедрената става.

Не установихме статистически значима разлика във възрастта на изява на болестта между двете групи с положителни и отрицателни стойности на ANA (6.07±4.36 години срещу 7.11±3.96 години, таблица 38). Не се наблюдава статистически значима разлика и в наличието на положителни или отрицателни титри при децата под и над 6-годишна възраст. И все пак, прави впечатление, че сред децата с положителни титри на антинуклеарните антитела над половината (59%) са на възраст под 6 години. Докато при пациентите с негативни титри малко повече от половината (56%) са на възраст над 6 години.

Не регистрирахме статистически значима корелация между наличието на положителни или отрицателни стойности на ANA, както и титърът им, и активността на артритите, определена чрез брой засегнати стави при дебюта на ЮИА. Резултат, който е докладван и от Glerup и колектив.<sup>(239)</sup> При провеждане на ретроспективно проучване, обхващащо 625 деца с ЮИА, изследователският

екип не установява статистически значима разлика между групата с положителни титри на ANA и тази с негативни и броя активни стави както при дебюта на болестта, така и при проследяването. Същевременно, Guzman и колектив при провеждане на по-голямо проучване (включени са 1146 деца с ЮИА) докладват асоциация на повишен риск от рецидив при пациенти с положителни титри на ANA.<sup>(240)</sup>

**Табл. 38 Характеристики на групите с (+) и (-) титри на ANA**

	ANA (+), n=42	ANA (-), n=25
Възраст на изява, години	6.07±4.36	7.11±3.96
Пол, момичета/момчета	29/13	9/16
Олигоартрит	26 (62%)	15 (60%)
Полиартрит с (+) РФ	2 (5%)	2 (8%)
Полиартрит с (-) РФ	13 (31%)	3 (12%)
Системна форма	1 (2%)	2 (8%)
ЕСА	0	3 (12%)

В изследваната от нас група пациенти не установихме статистическа достоверност по отношение на титъра на ANA в дебюта на заболяването и включването на нови стави при проследяване на пациентите. При две от децата с негативни титри на антинуклеарните антитела установихме ангажиране на тазобедрената става. При нито едно от децата с положителни титри на ANA не се установи ангажиране на ТЗБС.

Данни за развитие на увеит имахме при седем (7%) от децата - шест момичета и едно момче. При пет от описаните пациенти е установен двустранен иридоциклит. Всички деца са с олигоартритна форма на ЮИА. Средната възраст на изява на артритта е  $3.82 \pm 2.67$  години. Средната възраст за

изява на артритата сред останалите деца ( $n=92$ ) без увеит е  $6.30\pm 4.35$  години. Наблюдавахме статистически значима по-ранна възраст на изява на ЮИА в групата с увеит в сравнение с тази без увеит. Средната възраст на изява на увеита е  $4.72 \pm 2.35$  години, т.е. средно около 11 месеца след дебюта на артритата. При едно от децата увеитът предшества с два месеца ставната симптоматика, а при четири от тях се установява съвременно със ставния синдром. При останалите двама от пациентите увеитът възниква на фона на лечение с биологичен агент (етанерсепт), съответно на девети и седемнадесети месец от началото на биологичното лечение и на 49-ти и 34-ти месец след дебюта на ЮИА.

Данни за титъра на антинуклеарните антитела при дебюта на артритата имаме при три от седемте деца с увеит – и при трите е повишен, съответно 1:320, 1:640 и 1:1280.

В момента на хоспитализацията се установи активен увеит при 4/7 деца. Средните стойности на показателите на възпаление сред пациентите с активен увеит в момента на хоспитализацията са в референтни граници или незначително повишени по отношение на СУЕ, CRP и IL-6. (СУЕ 21 мм/ч; CRP 4.39 mg/l; IL-6 4.29 mg/l). Този резултат може да се интерпретира в рамките на наличието на локален възпалителен процес при иридоциклита, независещ от степента на системното възпаление. Независимо от останалите биомаркери стойностите на S100 A8/A9 при децата с активен увеит са повишени  $-3727\pm 1693$  ng/ml.

Сред 406 (12%) от 3271 пациенти с ЮИА, включени в проучване на изследователски колектив от Германия, е наблюдаван увеит.<sup>(76)</sup> Най-честата подформа на ЮИА, при която се установява увеит е олигоартритата – в 41% от пациентите. При пациентите с увеит е установена значителна по-ранна възраст на изява на артритата в сравнение с тези без установен увеит (3.8 срещу 7.0

години), както и по-висок процент на положителен титър на антинуклеарни антитела (86% срещу 42%). Средният период за настъпване на увеит след дебюта на ЮИА е бил 5.5 месеца. Броят на децата с увеит, в групата от 507 деца, изследвана от колектив от Великобритания е много малък (3%) – 7 с остър и 10 с хроничен такъв. Не установяват статистически значима разлика в честотата на развитие на увеит между групата с по-кратка и по-голяма давност на артритата (под и над 4 месеца).<sup>(242)</sup>

В България значението на ANA при различните подформи на ЮИА са описани от Д. Михайлова.<sup>(237)</sup> В дисертационния труд на Б. Върбанова<sup>(234)</sup> е разгледана асоциацията между давността на ЮИА, наличието на положителни антитела и рискът от развитие на увеит. Установено е, че при болни с наличие на положителен титър на антитела и давност на артритата до една година, рискът за развитие на увеит е висок. Този риск нараства при пациенти с давност на ЮИА повече от 5 години и персистиращи повишени титри на антинуклеарните антитела.

Св. Балев и сътрудници изследват антинуклеарните антитела при 92 деца с олиго- и полиартрит с различна давност.<sup>(238)</sup> Установяват позитивни титри на ANA при 34% от пациентите – предимно момичета, и предимно при олигоартритната подформа на ЮИА. Регистрират корелация на ANA с активността и давността на болестта. Потвърждават твърдението, че ANA са рисков фактор за развитие на увеит, особено при момичета, с ранна възраст на изява на ЮИА.

## 5. ИЗВОДИ

1. В изследваната група деца ювенилният идиопатичен артрит се наблюдава по-често при момичета в сравнение с момчета, най-често наблюдаваната подформа е тази на олигоартрит (58%), а най-често засегнатата става е колянната. В близо  $\frac{1}{4}$  от случаите се регистрира разширяване на ставния синдром при рецидив.
2. Сравняването на средните стойности на S100 A8/A9 при дебют и при здрави контроли потвърди убедително, че този биомаркер може да е силен индикатор за възпаление.
3. Стойностите на някои от изследваните биомаркери (S100 A8/A9, CRP и IL-6) са сигнификантно по-високи в подгрупата с полиартрит в сравнение с тази с олигоартрит.
4. Не се установи значима разлика в стойностите на биомаркерите при деца с включване на нови стави и при деца без включване на нови стави, изследвани при рецидив на заболяването
5. Приемът на медикаменти преди хоспитализацията не повлиява сигнификантно стойностите на биомаркерите.
6. Изследването на S100 A8/A9 може да служи за диференциране на пациентите с лош от тези с добър лекарствен отговор.
7. По-ранната възраст на дебют на заболяването се асоциира с по-лоша прогноза на артрит и необходимост от включване на биологичен агент при проследяване.
8. Проследяването на стойностите на изследваните биомаркери може да служи като допълнителен показател към клиничната оценка и да се използва за проследяване на ефекта от провежданото лечение.

9. Не се установи сигнификантна разлика в разпределението на алелните честоти на изследваните полиморфизми в *MTHFR* гена в групата с добър и тази с лош лекарствен отговор.
10. Носителството на редкия алел с.677 С>Т се асоциира с поява на НЛР към провежданата терапия с МТХ.

## **6. ПРИНОСИ**

### **ПРИНОСИ С ОРИГИНАЛЕН ХАРАКТЕР**

- За първи път в България е извършено изследване на серумен S100 A8/A9 (серумен калпротектин).
- За първи път в България са изработени референтни граници за деца на използвания от нас ELISA-кит за определяне на стойността на S100 A8/A9.
- За първи път е проведено генетично проучване за очакван терапевтичен ефект или развитие на НЛР при деца с ЮИА.
- За първи път в България се провежда такова задълбочено проучване на съвременни биомаркери (S100 A8/A9 и IL-6) при деца с ЮИА.
- За първи път в България са сравнени демографските характеристики в изследваната от нас група пациенти с ЮИА спрямо тези на международни регистри.

### **ПРИНОСИ С ПОТВЪРДИТЕЛЕН ХАРАКТЕР**

- Резултатите от дисертационния труд потвърждават съобщенията в литературата, че стойностите на S100 A8/A9 хетеродимера отразяват локалната активност на ЮИА.
- Потвърди се резултатите от съобщенията в литературата за по-голяма честота на ЮИА при момичета.
- Доказа се асоциацията на стойностите на S100 A8/A9, определени при дебют на заболяването с лекарствения отговор при проследяване.
- Потвърди се, че изследваните биомаркери могат да служат като показател за ефекта от провежданата терапия.
- Резултатите от дисертационния труд потвърждават съобщенията в литературата, че съществува асоциация между носителството на редкия алел с.677 C>T и развитието на НЛР при терапия с метотрексат.

## 7. ПУБЛИКАЦИИ, НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ И НАУЧНИ ПРОЕКТИ

- Ganeva M., St. Stefanov, A. Telcharova, A. Tsakova. Serum levels of biomarkers in patients with juvenile idiopathic arthritis. C. R. Acad. Bulg. Sci. 2017, под печат
- Ганева М., Ст. Стефанов. Биомаркери при ювенилен идиопатичен артрит. Педиатрия. 2016, 4; 7-12.
- Ganeva M., St Stefanov, A. Telcharova, D. Mihaylova, R. Saraeva, R. Tzveova, R. Kaneva, A. Tsakova, T. Temelkova. Assessment of disease activity and prognosis in a group of JIA patients. 23<sup>rd</sup> PReS Congress, Sept. 2016, Genoa, Italy.
- Ганева М., Ст. Стефанов. Генетични маркери за оценка на ефективността от терапията при ювенилен идиопатичен артрит. Практическа Педиатрия. 2016, 1; 4-5.
- Ganeva M. Serum MRP8/14 levels in patients with juvenile idiopathic arthritis. Young Investigator Meeting, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, June 2015, Rome, Italy.
- Изследователски проект конкурс „ГРАНТ-2015” на тема: Анализ на полиморфни варианти в кандидат гени асоциирани с отговора към терапия с метотрексат при деца с юношески идиопатичен артрит. Договор 68/2015 г.

## 8. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Ravelli A, Martini A. Juvenile idiopathic arthritis. *Lancet*. 2007;369(9563):767–78.
2. Thierry S, Fautrel B, Lemelle I, Guillemin F. Prevalence and incidence of juvenile idiopathic arthritis: A systematic review. *Jt. Bone Spine*. 2014; 81:112–117.
3. Petty RE, Southwood TR, Manners P, et al. International League of Associations for Rheumatology Classification of Juvenile Idiopathic Arthritis: Second Revision, Edmonton, 2001. *J Rheumatol*. 2004;31(2):390–2.
4. M.V. Cornil. Mémoire sur des coïncidences pathologiques du rhumatisme articulaire chronique. *C.R. Soc. Biol*. 1864;4(3):3-25.
5. M.S. Diamant-Berger. *Du Rhumatisme Nouveau (Polyarthrite Déformante), Chez Les Enfants*, Paris, 1891, Lecrosnier et Babe (Reprinted by Editions Louis Parente, Paris, 1988).
6. G.F. Still, On a form of chronic joint disease in children, *Med Chir Trans* 80 (1897) 47, Reprinted in *Am. J. Dis. Child*. 1978;132(12):195–200.
7. Prakken B, Albani S, Martini A. Juvenile idiopathic arthritis. *Lancet*. 2011; 377:2138–2149.
8. Giannini EH, Ruperto N, Ravelli A, et al. Preliminary definition of improvement in juvenile arthritis. *Arthritis Rheum*. 1997;40:1202–9.
9. Lovell DJ, Ruperto N, Giannini EH, et al. Advances from clinical trials in juvenile idiopathic arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2013;9:557–63.
10. Wallace CA, Ruperto N, Giannini E. Preliminary criteria for clinical remission for select categories of juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol* 2004;31:2290–4.
11. Jabs DA, Nussenblatt RB, Rosenbaum JT. Standardization of uveitis nomenclature for reporting clinical data: results of the First International Workshop. *Am J Ophthalmol* 2005;140:509 –16.

12. Wallace CA, Giannini EH, Huang B, et al. American College of Rheumatology provisional criteria for defining clinical inactive disease in select categories of juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2011;63:929–36.
13. Consolaro A, Ruperto N, Bazso A, et al. Development and validation of a composite disease activity score for juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum*. 2009;61:658–66.
14. Nordal EB, Zak M, Aalto K, et al. Validity and predictive ability of the juvenile arthritis disease activity score based on CRP versus ESR in a Nordic population-based setting. *Ann Rheum Dis*. 2012;71:1122–7.
15. Weiss PF, Colbert RA, Xiao R, et al. Development and retrospective validation of the juvenile spondyloarthritis disease activity index. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2014;66:1775–82.
16. Horneff G, Becker I. Definition of improvement in juvenile idiopathic arthritis using the Juvenile Arthritis Disease Activity Score. *Rheumatology (Oxford)*. 2014;53:1229–34.
17. Guzman J, Burgos-Vargas R, Duarte-Salazar C, et al. Reliability of the articular examination in children with juvenile rheumatoid arthritis: interobserver agreement and sources of disagreement. *J Rheumatol* 1995;22:2331–6.
18. Magni-Manzoni S, Epis O, Ravelli A, et al. Comparison of clinical versus ultrasound-determined synovitis in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum*. 2009;61:1497–504.
19. Magni-Manzoni S, Scirè CA, Ravelli A, et al. Ultrasound-detected synovial abnormalities are frequent in clinically inactive juvenile idiopathic arthritis, but do not predict a flare of synovitis. *Ann. Rheum. Dis*. 2013; 72:223–8.
20. Biomarkers Definition Working Group Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Therapeutics*. 2001;69:89–95.
21. Consolaro A, Varnier GC, Martini A, et al. Advances in biomarkers for paediatric rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2015;11(5):265-75.

22. Klassen TP, Hartling L, Craig JC, et al. Children are not just small adults: the urgent need for high-quality trial evidence in children. *PLoS Med.* 2008;5(8):e172.
23. Goldman J, Becker ML, Jones B, et al. Development of biomarkers to optimize pediatric patient management: what makes children different? *Biomark Med.* 2011;5(6):781–94.
24. S.E. Bedell, B.T. Bush. Erythrocyte sedimentation rate. From folklore to facts. *Am. J. Med.* 1985;78(6 Pt 1):1001-1009.
25. Shusterman N, Kimmel PL, Kiechle FL, et al. Factors influencing erythrocyte sedimentation in patients with chronic renal failure. *Arch Intern Med.* 1985; 145(10):1796-9.
26. Dowton SB, Colten HR. Acute phase reactants in inflammation and infection. *Semin Hematol.* 1988; 25(2):84-90.
27. Tillett WS, Francis T. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *J Exp Med.* 1930; 52(4):561-71.
28. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest.* 2003;111(12):1805-12.
29. Vigushin DM, Pepys MB, Hawkins PN. Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in health and disease. *J Clin Invest.* 1993; 91(4):1351-7.
30. Crowson CS, Rahman MU, Matteson EL. Which measure of inflammation to use? A comparison of erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein measurements from randomized clinical trials of golimumab in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2009;36:1606–10.
31. Giannini EH, Ruperto N, Ravelli A, et al. Preliminary definition of improvement in juvenile arthritis. *Arthritis Rheum.* 1997;40(7):1202–9.
32. Holzinger D, Föll D. Biomarker für chronisch-entzündliche Erkrankungen. *Monatsschr Kinderheilkd.* 2015;63:381-391.

33. Holzinger D, Kessel C, Omenetti A, et al. From bench to bedside and back again: translational research in autoinflammation. *Nat Rev Rheumatol*. 2015; 11(10):573-85.
34. Beukelman T, Patkar NM, Saag KG, et al. 2011 American College of Rheumatology recommendations for the treatment of juvenile idiopathic arthritis: initiation and safety monitoring of therapeutic agents for the treatment of arthritis and systemic features. *Arthritis Care Res. (Hoboken)*. 2011;63:465–82.
35. Ringold S, Weiss PF, Beukelman T, et al. 2013 update of the 2011 American College of Rheumatology recommendations for the treatment of juvenile idiopathic arthritis: recommendations for the medical therapy of children with systemic juvenile idiopathic arthritis and tuberculosis screening among children receiving biologic medications. *Arthritis Rheum*. 2013; 65(10):2499-512.
36. Flato B, Hoffmann-Vold AM, Reiff A, et al. Long-term outcome and prognostic factors in enthesitis-related arthritis: a case-control study. *Arthritis Rheum*. 2006;54:3573–82.
37. Van der Linden SM, Valkenburg H a, de Jongh BM, et al. The risk of developing ankylosing spondylitis in HLA-B27 positive individuals. A comparison of relatives of spondylitis patients with the general population. *Arthritis Rheum*. 1984;27:241–9.
38. Colbert RA, DeLay ML, Klenk EI, et al. From HLA-B27 to spondyloarthritis: a journey through the ER. *Immunol. Rev*. 2010; 233:181–202.
39. Bird L a., Peh CA, Kollnbeger S, et al. Lymphoblastoid cells express HLA-B27 homodimers both intracellularly and at the cell surface following endosomal recycling. *Eur. J. Immunol*. 2003;33:748–59.
40. Berntson L, Nordal E, Aalto K, et al. HLA-B27 predicts a more chronic disease course in an 8-year followup cohort of patients with juvenile idiopathic arthritis. *J. Rheumatol*. 2013;40:725–31.

41. Waaler, Erik. On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*. 1940;17(2):172–88.
42. Rose, HM, Ragan, C. Differential agglutination of normal and sensitized sheep erythrocytes by sera of patients with rheumatoid arthritis. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1948;68(1):1–6.
43. D.N. Posnett, J. Edinger. When do microbes stimulate rheumatoid factor? *J. Exp. Med*. 1997;185(10):1721-3.
44. F. Ingegnoli, R. Castelli, R. Gualtierotti. Rheumatoid factors: clinical applications. *Dis. Markers*. 2013;35(6):727-34.
45. Y. Renaudineau, C. Jamin, A. Saraux, et al. Rheumatoid factor on a daily basis. *Autoimmunity*. 2005;38(1):11-16.
46. Y.W. Song, E.H. Kang. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: rheumatoid factors and anticitrullinated protein antibodies. *QJM*. 2010;103(3):139-46.
47. D. Aletaha, T. Neogi, A.J. Silman, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*. 2010;62(9):2569-81.
48. M. Gioud-Paquet, M. Auvinet, T. Raffin, et al. IgM rheumatoid factor (RF), IgA RF, IgE RF, and IgG RF detected by ELISA in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis*. 1987;46(1):65-71.
49. R.H. Syed, B.E. Gilliam, T.L. Moore. Rheumatoid factors and anticyclic citrullinated peptide antibodies in pediatric rheumatology. *Curr. Rheumatol. Rep*. 2008;10 (2):156-63.
50. Arend WP, Firestein GS. Pre-rheumatoid arthritis: predisposition and transition to clinical synovitis. *Nat. Rev. Rheumatol*. 2012;8:573–86.
51. Khalkhali-Ellis Z, Bulla G a, Schlesinger LS, et al. C1q-containing immune complexes purified from sera of juvenile rheumatoid arthritis patients mediate IL-8 production by human synoviocytes: role of C1q receptors. *J. Immunol*. 1999;163:4612–20.

52. Eichenfield AH, Athreya BH, Doughty RA, et al. Utility of rheumatoid factor in the diagnosis of juvenile rheumatoid arthritis. *Pediatrics*. 1986;78:480–4.
53. McGhee JL, Burks F, Sheckels J, et al. Identifying children with chronic arthritis based on chief complaints: absence of predictive value for musculoskeletal pain as an indicator of rheumatic disease in children. *Pediatrics*. 2002;110:354-9.
54. Flato B, Lien G, Smerdel A et al. Prognostic factors in juvenile rheumatoid arthritis: a case-control study revealing early predictors and outcome after 14.9 years. *J Rheumatol*. 2003;30:386–93.
55. Agmon-Levin N, Damoiseaux J, Kallenberg C, et al. International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *Ann Rheum Dis*. 2014;73:17–23.
56. McGhee JL, Kickingbird L, Jarvis JN. Clinical utility of antinuclear antibody tests in children. *BMC Pediatrics* 2004;4:13.
57. Cabral DA, Petty RE, Fung M, et al. Persistent antinuclear antibodies in children without identifiable rheumatic or autoimmune disease. *Pediatrics*. 1992;89:441-4.
58. Malleson PN, Sailer M, Mackinnon MJ. Usefulness of antinuclear antibody testing to screen for rheumatic diseases. *Arch Dis Child*. 1997;77:299-304.
59. W.Y. Craig, T.B. Ledue, A.M. Johnson, et al. The distribution of antinuclear antibody titers in “normal” children and adults. *J. Rheumatol*. 1999;26(4):914-9.
60. Q.Z. Li, D.R. Karp, J. Quan, et al. Risk factors for ANA positivity in healthy persons. *Arthritis Res. Ther*. 2011;13(2):R38.
61. C. Mohan, F. Liu, C. Xie, et al. Anti-subnucleosome reactivities in systemic lupus erythematosus (SLE) patients and their first-degree relatives. *Clin. Exp. Immunol*. 2001;123(1):119-26.

62. M. Satoh, E.K. Chan, L.A. Ho, et al. Prevalence and sociodemographic correlates of antinuclear antibodies in the United States. *Arthritis Rheum.* 2012;64(7):2319-27.
63. R.C. Allen, P. Dewez, L. Stuart, et al. Antinuclear antibodies using HEp-2 cells in normal children and in children with common infections. *J. Paediatr. Child Health.* 1991;27(1):39-42.
64. J. Forslid, Z. Heigl, J. Jonsson, et al. The prevalence of antinuclear antibodies in healthy young persons and adults, comparing rat liver tissue sections with HEp-2 cells as antigen substrate. *Clin. Exp. Rheumatol.* 1994;12(2):137-41.
65. M.O. Hilário, C.A. Len, S.C. Roja, et al. Frequency of antinuclear antibodies in healthy children and adolescents. *Clin. Pediatr. (Phila).* 2004;43 (7):637-42.
66. Wananukul, W. Voramethkul, Y. Kaewopas, et al. Prevalence of positive antinuclear antibodies in healthy children. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 2005;23(2-3):153-7.
67. Deane PMG, Liard G, Siegel DM, et al. The outcome of children referred to a pediatric rheumatology clinic with a positive antinuclear antibody test but without an autoimmune disease. *Pediatrics.* 1995;95:892-5.
68. Thomson W, Barrett JH, Donn R, et al. Juvenile idiopathic arthritis classified by the ILAR criteria: HLA associations in UK patients. *Rheumatology (Oxford).* 2002;41:1183-9.
69. Ringold S, Seidel KD, Koepsell TD, et al. Inactive disease in polyarticular juvenile idiopathic arthritis: current patterns and associations. *Rheumatology (Oxford).* 2009;48(8):972-7.
70. Kotaniemi K, Arkela-Kautiainen M, Haapasaari J, et al. Uveitis in young adults with juvenile idiopathic arthritis: a clinical evaluation of 123 patients. *Ann Rheum Dis.* 2005;64(6):871-4.
71. Heiligenhaus A, Heinz C, Edelsten C, et al. Review for disease of the year: epidemiology of juvenile idiopathic arthritis and its associated uveitis: the probable risk factors. *Ocul Immunol Inflamm.* 2013;21(3):180-91.

72. Angeles-Han ST, Pelajo CF, Vogler LB, et al. Risk Markers of Juvenile Idiopathic Arthritis-associated Uveitis in the Childhood Arthritis and Rheumatology Research Alliance (CARRA) Registry. *J Rheumatol.* 2013;40(12):2088–96.
73. Southwood, T. R. & Ryder, C. A. Ophthalmological screening in juvenile arthritis: should the frequency of screening be based on the risk of developing chronic iridocyclitis? *Br. J. Rheumatol.* 1992;31:633–4.
74. American Academy of Pediatrics Section on Rheumatology and Section on Ophthalmology: Guidelines for ophthalmologic examinations in children with juvenile rheumatoid arthritis. *Pediatrics.* 1992;92:295–6.
75. Cassidy, J., Kivlin, J., Lindsley, C. & Nocton, J. Ophthalmologic examinations in children with juvenile rheumatoid arthritis. *Pediatrics.* 2006;117:1843–5.
76. Heiligenhaus, A., Niewerth, M., Ganser, G., et al. Prevalence and complications of uveitis in juvenile idiopathic arthritis in a population-based nation-wide study in Germany: suggested modification of the current screening guidelines. *Rheumatology (Oxford).* 2007;46:1015–9.
77. Calandra, S. et al. Female sex and oligoarthritis category are not risk factors for uveitis in Italian children with juvenile idiopathic arthritis. *J. Rheumatol.* 2014;41:1416–25.
78. Martini A. Are the number of joints involved or the presence of psoriasis still useful tools to identify homogeneous entities in juvenile idiopathic arthritis? *J Rheumatol.* 2003;30:1900–3.
79. Ravelli A, Felici E, Magni-Manzoni S, et al. Patients with antinuclear antibody-positive juvenile idiopathic arthritis constitute a homogeneous subgroup irrespective of the course of joint disease. *Arthritis Rheum.* 2005;52:826–32.
80. Ravelli A, Varnier GC, Oliveira S et al. Antinuclear antibody-positive patients should be grouped as a separate category in the classification of juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* 2011;63:267–75.
81. Van den Broek T, Hoppenreijs E, Meerding J, et al. Cytokine profiling at disease onset: support for classification of young antinuclear antibody-positive patients as a separate category of juvenile idiopathic arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2014;74:470–2.

82. Ma X, Xin L, Sun J, Liu Z. Antinuclear antibody-positive cohort constitutes homogeneous entity in juvenile idiopathic arthritis. *Mod. Rheumatol.* 2015; 7595:1–5.
83. B.E. Gilliam, M.R. Reed, A.K. Chauhan, et al. Evidence of fibrinogen as a target of citrullination in IgM rheumatoid factor positive polyarticular juvenile idiopathic arthritis. *Pediatr Rheumatol.* 2011;9:8.
84. Vossenaar ER, van Venrooij WJ. Citrullinated proteins: sparks that may ignite the fire in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 2004;6:107–11.
85. A.E. Tebo, T. Jaskowski, K.W. Davis, et al.: Profiling citrullinated peptide antibodies in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Pediatr Rheumatol.* 2012;10:29.
86. H.M. Habib, Y.M. Mosaad, H.M. Youssef. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Immunol. Invest.* 2008; 37(8):849-57.
87. O. Kasapçopur, S. Altun, M. Aslan, et al.: Diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in juvenile idiopathic arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2004; 63(12):1687-9.
88. A. Omar, I. Abo-Elyoun, H. Hussein, et al. Anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) antibody in juvenile idiopathic arthritis (JIA): correlations with disease activity and severity of joint damage (a multicenter trial). *Joint Bone Spine.* 2013;80(1):38-43.
89. J Brunner, FC Sitzmann. The diagnostic value of anti-cyclic citrullinated peptide (CCP) antibodies in children with Juvenile Idiopathic Arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2006;24(4):449-51.
90. Wang Y, Pei F, Wang X, et al. Meta-analysis: Diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody for juvenile idiopathic arthritis. *J. Immunol. Res.* 2015:915276.
91. Wilson, D. et al. Follistatin-like protein 1 is a mesenchyme-derived inflammatory protein and may represent a biomarker for systemic-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2010;62:2510–6.

92. Pascual V, Allantaz F, Arce E, et al. Role of interleukin-1 (IL-1) in the pathogenesis of systemic onset juvenile idiopathic arthritis and clinical response to IL-1 blockade. *J. Exp. Med.* 2005 201:1479–86.
93. Ling X. et al. Plasma profiles in active systemic juvenile idiopathic arthritis: biomarkers and biological implications. *Proteomics.* 2010;10:4415–30.
94. Verbsky J., White A. Effective use of the recombinant interleukin 1 receptor antagonist anakinra in therapy resistant systemic onset juvenile rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 2004;31:2071–5.
95. Irigoyen P. I., Olson J., Hom C. et al. Treatment of systemic onset juvenile rheumatoid arthritis with anakinra. *Arthritis Rheum.* 2004;50:S437.
96. Henrickson M. Efficacy of anakinra in refractory systemic arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004;50,S438.
97. Quartier P, Allantaz F, Cimaz R, et al. A multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial with the interleukin-1 receptor antagonist anakinra in patients with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis (ANAJIS trial). *Ann Rheum Dis.* 2011;70(5):747-54.
98. Gattorno M, Piccini A, Lasigliè D, et al. The pattern of response to anti-interleukin-1 treatment distinguishes two subsets of patients with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008;58(5):1505-15.
99. Nigrovic PA, Mannion M, Prince FH, et al. Anakinra as first-line disease-modifying therapy in systemic juvenile idiopathic arthritis: report of forty-six patients from an international multicenter series. *Arthritis Rheum.* 2011; 63(2):545-55.
100. Guma M, et al. Caspase 1-independent activation of interleukin-1 $\beta$  in neutrophil-predominant inflammation. *Arthritis Rheum.* 2009;60:3642–50.
101. Tanaka T, Kishimoto T. The biology and medical implications of interleukin-6. *Cancer Immunol Res.* 2014;2:288-94.
102. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Therapeutic targeting of the interleukin-6 receptor. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2012;52:199-219.
103. de Benedetti F, Massa M, Robbioni P, et al. Correlation of serum interleukin-6 levels with joint involvement and thrombocytosis in systemic juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1991;34:1158-63.

104. Rooney M, David J, Symons J, Di Giovine F, Varsani H, Woo P: Inflammatory cytokine responses in juvenile chronic arthritis. *Br J Rheumatol*. 1995;34:454-60.
105. de Benedetti, F. et al. Effect of IL-6 on IGF binding protein-3: a study in IL-6 transgenic mice and in patients with systemic juvenile idiopathic arthritis. *Endocrinology*. 2001;142:4818–26.
106. Cazzola, M. et al. Defective iron supply for erythropoiesis and adequate endogenous erythropoietin production in the anemia associated with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *Blood*. 1996;87:4824–30.
107. Boe A, Baiocchi M, Carbonatto M, et al. Interleukin 6 knock-out mice are resistant to antigen-induced experimental arthritis. *Cytokine*. 1999;11:1057-64.
108. Moore BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun*. 1965;19:739–44.
109. X. Shang, H. Cheng, R. Zhou, Chromosomal mapping, differential origin and evolution of the S100 gene family, *Genet. Sel. Evol*. 2008;40:449–64.
110. Zimmer DB, Eubanks JO, Ramakrishnan D, et al. Evolution of the S100 family of calcium sensor proteins. *Cell Calcium*. 2012;53:170–9.
111. Engelkamp D, Schafer BW, Mattei MG, et al. Six S100 genes are clustered on human chromosome 1q21: identification of two genes coding for the two previously unreported calcium-binding proteins S100D and S100E. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:6547–51.
112. I. Marenholz, R.C. Lovering, C.W. Heizmann. An update of the S100 nomenclature, *Biochim. Biophys. Acta* 2006;1763:1282–3.
113. B.W. Schafer, R. Wicki, D. Engelkamp, et al. Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family. *Genomics*. 1995;10;25(3):638-43.
114. B.W. Schafer, C.W. Heizmann. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology, *Trends Biochem. Sci*. 1996;21:134–40.

115. O.V. Moroz, A.A. Antson, S.J. Grist, et al. Structure of the human S100A12–copper complex: implications for host– parasite defence. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2003;59:859–67.
116. Lagasse E, Clerc RG. Cloning and expression of two human genes encoding calcium-binding proteins that are regulated during myeloid differentiation. *Mol Cell Biol* 1988;8:2402–10.
117. Odink K, Cerletti N, Bruggen J, et al. Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis. *Nature.* 1987;330:80–2.
118. M. Steinbakk, C.F. Naess-Andresen, E. Lingaas, et al. Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin. *Lancet.* 1990;336:763–5.
119. Zwadlo G, Bruggen J, Gerhards G, et al. Two calcium-binding proteins associated with specific stages of myeloid cell differentiation are expressed by subsets of macrophages in inflammatory tissues. *Clin Exp Immunol.* 1988;72:510–5.
120. Roth J, Burwinkel F, van den Bos C, et al. MRP8 and MRP14, S-100-like proteins associated with myeloid differentiation, are translocated to plasma membrane and intermediate filaments in a calcium-dependent manner. *Blood.* 1993;82:1875–83.
121. W. Nacken, J. Roth, C. Sorg, C. Kerkhoff. S100A9/S100A8: myeloid representatives of the S100 protein family as prominent players in innate immunity, *Microsc. Res. Tech.* 2003;60:569–80.
122. Roth J, Goebeler M, van den Bos C, Sorg C. Expression of calcium-binding proteins MRP8 and MRP14 is associated with distinct monocytic differentiation pathways in HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;191:565–70.
123. Van den Bos C, Roth J, Koch HG, Hartmann M, Sorg C. Phosphorylation of MRP14, an S100 protein expressed during monocytic differentiation, modulates Ca(2<sub>+</sub>)-dependent translocation from cytoplasm to membranes and cytoskeleton. *J Immunol* 1996;156:1247–54.
124. I. Niki, H. Yokokura, T. Sudo, M. Kato, H. Hidaka, Ca<sup>2+</sup> signaling and intracellular Ca<sup>2+</sup> binding proteins, *J. Biochem.* 1996;120:685–98.

125. T. Vogl, S. Ludwig, M. Goebeler, et al. MRP8 and MRP14 control microtubule reorganization during transendothelial migration of phagocytes, *Blood*. 2004; 104:4260–8.
126. A. Rammes, J. Roth, M. Goebeler, et al. Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway, *J. Biol. Chem.* 1997;272:9496–502.
127. E. McNeill, S.J. Conway, H.L. Roderick, et al. Defective chemoattractant-induced calcium signalling in S100A9 null neutrophils. *Cell Calcium*. 2007; 41:107–21.
128. M.J. Raftery, C.A. Harrison, P. Alewood, et al. Isolation of the murine S100 protein MRP14 (14 kDa migration-inhibitory-factor-related protein) from activated spleen cells: characterization of post-translational modifications and zinc binding. *Biochem. J.* 1996;316(Pt 1):285–93.
129. G. Lominadze, M.J. Rane, M. Merchant, et al. Myeloid-related protein-14 is a p38 MAPK substrate in human neutrophils, *J. Immunol.* 2005;174:7257–67.
130. N. Anceriz, K. Vandal, P.A. Tessier, et al. S100A9 mediates neutrophil adhesion to fibronectin through activation of beta2 integrins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007;354:84–9.
131. M. Steinbakk, C.F. Naess-Andresen, E. Lingaas, et al. Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin. *Lancet*. 1990;336:763–5.
132. J. Goyette, C.L. Geczy. Inflammation-associated S100 proteins: new mechanisms that regulate function, *Amino Acids*. 2011;41:821–42.
133. C. Ryckman, S.R. McColl, K. Vandal, et al. Role of S100A8 and S100A9 in neutrophil recruitment in response to monosodium urate monohydrate crystals in the air-pouch model of acute gouty arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48: 2310–20.
134. C. Ryckman, K. Vandal, P. Rouleau, et al. Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J. Immunol.* 2003;170:3233–42.
135. W.X. Yan, C. Armishaw, J. Goyette, et al. Mast cell and monocyte recruitment by S100A12 and its hinge domain. *J. Biol. Chem.* 2008;283:13035–43.

136. D. Viemann, K. Barczyk, T. Vogl, et al. MRP8/MRP14 impairs endothelial integrity and induces a caspase-dependent and -independent cell death program. *Blood*. 2007;109:2453–60.
137. D. Viemann, A. Strey, A. Janning, et al. Myeloid-related proteins 8 and 14 induce a specific inflammatory response in human microvascular endothelial cells. *Blood*. 2005;105:2955–62.
138. R.A. Newton, N. Hogg. The human S100 protein MRP-14 is a novel activator of the beta 2 integrin Mac-1 on neutrophils. *J. Immunol*. 1998;160:1427–35.
139. D. Foell, J. Hernandez-Rodriguez, M. Sanchez, et al. Early recruitment of phagocytes contributes to the vascular inflammation of giant cell arteritis. *J. Pathol*. 2004;204:311–16.
140. D. Foell, F. Ichida, T. Vogl, et al. S100A12 (EN-RAGE) in monitoring Kawasaki disease. *Lancet*. 2003;361:1270–2.
141. D. Kane, J. Roth, M. Frosch, et al. Increased perivascular synovial membrane expression of myeloid-related proteins in psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum*. 2003;48:1676–85.
142. B. Isaksen, M.K. Fagerhol. Calprotectin inhibits matrix metalloproteinases by sequestration of zinc, *Mol. Pathol*. 2001;54:289–92.
143. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997;388:394–7.
144. Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science*. 1998;282:2085–8.
145. Janeway, C. A., Jr., Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol*. 2002;20:197–216.
146. Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol*. 2005;17(4):359–65.
147. D. Foell, H. Wittkowski, J. Roth, Mechanisms of disease: a ‘DAMP’ view of inflammatory arthritis, *Nat. Clin. Pract. Rheumatol*. 2007;3:382–90.
148. M.T. Lotze, K.J. Tracey. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat. Rev. Immunol*. 2005;5:331–342.

149. M.A. van Zoelen, T. Vogl, D. Foell, et al. Expression and role of myeloid-related protein-14 in clinical and experimental sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2009;180:1098–106.
150. J. Li, A.M. Schmidt. Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J. Biol. Chem.* 1997;272:16498–506.
151. Frosch, M. et al. The myeloid-related proteins 8 and 14 complex, a novel ligand of Toll-like receptor 4, and interleukin-1 $\beta$  form a positive feedback mechanism in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009;60:883–91.
152. T. Vogl, K. Tenbrock, S. Ludwig, et al. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock, *Nat. Med.* 2007;13:1042–9.
153. Frosch M, Strey A, Vogl T, et al. Myeloid-related proteins 8 and 14 are specifically secreted during interaction of phagocytes and activated endothelium and are useful markers for monitoring disease activity in pauciarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000;43(3):628–37.
154. Frosch M, Roth J. New insights in systemic juvenile idiopathic arthritis — from pathophysiology to treatment. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47(2):121–5.
155. Kessel C, Holzinger D, Foell D. Phagocyte-derived S100 proteins in autoinflammation: putative role in pathogenesis and usefulness as biomarkers. *Clin Immunol.* 2013;147:229–41.
156. Foell D, Roth J. Proinflammatory S100 proteins in arthritis and autoimmune disease. *Arthritis Rheum.* 2004;50(12):3762–71.
157. van Lent PL, et al. Myeloid-related proteins S100A8/ S100A9 regulate joint inflammation and cartilage destruction during antigen-induced arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(12):1750–8.
158. van Lent PL, et al. Stimulation of chondrocyte-mediated cartilage destruction by S100A8 in experimental murine arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008;58(12):3776–87.

159. Grevers LC, de Vries TJ, Vogl T, et al. S100A8 enhances osteoclastic bone resorption in vitro through activation of Toll-like receptor 4: implications for bone destruction in murine antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2011;63:1365–75.
160. Foster HE, Marshall N, Myers A, et al. Outcome in adults with juvenile idiopathic arthritis: a quality of life study. *Arthritis Rheum.* 2003;48(3):767–75.
161. Duffy CM. Measurement of health status, functional status, and quality of life in children with juvenile idiopathic arthritis: clinical science for the pediatrician. *Rheum Dis Clin N Am.* 2007;33(3):389–402.
162. Klein A, Kaul I, Foeldvari I, et al. Efficacy and safety of oral and parenteral methotrexate therapy in children with juvenile idiopathic arthritis: an observational study with patients from the German Methotrexate Registry. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2012;64(9):1349–56.
163. Frosch M, Vogl T, Seeliger S, et al. Expression of myeloid-related proteins 8 and 14 in systemic-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48:2622–6.
164. Foell D, Wulffraat N, Wedderburn LR, et al. Methotrexate withdrawal at 6 vs 12 months in juvenile idiopathic arthritis in remission: a randomized clinical trial. *JAMA.* 2010;303:1266–73.
165. Foell D, Frosch M, Schulze zur Wiesch A et al. Methotrexate treatment in juvenile idiopathic arthritis: when is the right time to stop? *Ann Rheum Dis.* 2004;63(2):206–8.
166. Schulze zur Wiesch A, Foell D, Frosch M, et al. Myeloid related proteins MRP8/14 may predict disease flares in juvenile idiopathic arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2004;22:368–73.
167. Gerss J, Roth J, Holzinger D, et al. Phagocyte-specific S100 proteins and high-sensitivity C reactive protein as biomarkers for a risk-adapted treatment to maintain remission in juvenile idiopathic arthritis: a comparative study. *Ann Rheum Dis.* 2012;71:1991–7.
168. Holzinger D, Frosch M, Kastrup A et al. The Toll-like receptor 4 agonist MRP8/14 protein complex is a sensitive indicator for disease activity and predicts relapses in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2012;71:974–80.

169. Albers HM, Wessels JA, van der Straaten RJ et al. Time to treatment as an important factor for the response to methotrexate in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009;61:46-51.
170. Bartoli M, Taro M, Magni-Manzoni S et al. The magnitude of early response to methotrexate therapy predicts long-term outcome of patients with juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008;67:370-4.
171. Moncrieffe H, Ursu S, Holzinger D, et al. A subgroup of juvenile idiopathic arthritis patients who respond well to methotrexate are identified by the serum biomarker MRP8/14 protein. *Rheumatology (Oxford).* 2013;52:1467–76.
172. Horneff G, Schmeling H, Biedermann T, et al. The German etanercept registry for treatment of juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2004;63:1638–44.
173. Lovell DJ, Reiff A, Ilowite NT, et al. Pediatric Rheumatology Collaborative Study G: Safety and efficacy of up to eight years of continuous etanercept therapy in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008;58:1496–504.
174. Prince FH, Twilt M, ten Cate R, et al. Long-term follow-up on effectiveness and safety of etanercept in juvenile idiopathic arthritis: the Dutch national register. *Ann Rheum Dis.* 2009;68:635–41.
175. Otten MH, Prince FH, Armbrust W, et al. Factors associated with treatment response to etanercept in juvenile idiopathic arthritis. *JAMA.* 2011;306:2340–7.
176. Solari N, Palmisani E, Consolaro A, et al. Factors associated with achievement of inactive disease in children with juvenile idiopathic arthritis treated with etanercept. *J Rheumatol.* 2013;40:192–200.
177. Anink J, Van Suijlekom-Smit LW, Otten MH, et al. MRP8/14 serum levels as a predictor of response to starting and stopping anti-TNF treatment in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2015;17:200.
178. Hurnakova J, Zavada J, Hanova P, et al. Serum calprotectin (S100A8/9): an independent predictor of ultrasound synovitis in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2015;17:252.

179. Hammer HB, Ødegård S, Syversen SW et al. Calprotectin (a major S100 leucocyte protein) predicts 10-year radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(1):150–4.
180. Choi IY, Gerlag DM, Herenius MJ, et al. MRP8/14 serum levels as a strong predictor of response to biological treatments in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2015;74:499–505.
181. Rahman MT, Myles A, Gaur P, et al. TLR4 endogenous ligand MRP8/14 level in enthesitis-related arthritis and its association with disease activity and TLR4 expression. *Rheumatology (Oxford).* 2014;53:270–4.
182. Leach ST, Yang Z, Messina I, et al. Serum and mucosal S100 proteins, calprotectin (S100A8/S100A9) and S100A12, are elevated at diagnosis in children with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol.* 2007; 42(11):1321-31.
183. Terrin G, Passariello A, De Curtis M, et al.. S100 A8/A9 protein as a marker for early diagnosis of necrotising enterocolitis in neonates. *Arch Dis Child.* 2012;97(12):1102.
184. Ertekin V, Selimoğlu MA, Turgut A, et al. Fecal calprotectin concentration in celiac disease. *J Clin Gastroenterol.* 2010;44(8):544-6.
185. Hirono K, Foell D, Xing Y, et al. Expression of myeloid-related protein-8 and -14 in patients with acute Kawasaki disease. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 48(6):1257-64.
186. Wittkowski H, Kuemmerle-Deschner JB, Austermann J, et al. MRP8 and MRP14, phagocyte-specific danger signals, are sensitive biomarkers of disease activity in cryopyrin-associated periodic syndromes. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(12):2075-81.
187. Frosch M, Vogl T, Waldherr R, et al. Expression of MRP8 and MRP14 by macrophages is a marker for severe forms of glomerulonephritis. *J Leukoc Biol.* 2004;75(2):198-206.
188. Morandi F, Scaruffi P, Gallo F, et al. Bone marrow-infiltrating human neuroblastoma cells express high levels of calprotectin and HLA-G proteins. *PLoS One.* 2012; 7(1):e29922.

189. Goebeler M, Roth J, Burwinkel F, et al. Expression and complex formation of S100-like proteins MRP8 and MRP14 by macrophages during renal allograft rejection. *Transplantation*. 1994;58:355–61.
190. Kane D, Roth J, Frosch M, et al. Increased perivascular synovial membrane expression of myeloid-related proteins in psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum*. 2003;48:1676–85.
191. Luger N, Stoll R, Schmid KW, et al. The myeloid related protein MRP8/14 (27E10 antigen)—usefulness as a potential marker for disease activity in ulcerative colitis and putative biological function. *Eur J Clin Invest*. 1995;25:659–64.
192. Luger N, Stoll R, Kucharzik T, et al. Immunohistochemical distribution and serum levels of the Ca(2+)-binding proteins MRP8, MRP14 and their heterodimeric form MRP8/14 in Crohn's disease. *Digestion*. 1995;56:406–14.
193. Holzinger D, Nippe N, Vogl T, et al. Myeloid-related proteins 8 and 14 contribute to monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation in gout. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66(5):1327–39.
194. Heinz C, Mingels A, Goebel C, et al. Chronic uveitis in children with and without juvenile idiopathic arthritis: differences in patient characteristics and clinical course. *J Rheumatol*. 2008;35:1403–7.
195. Kotaniemi K, Kautiainen H, Karma A, Aho K. Occurrence of uveitis in recently diagnosed juvenile chronic arthritis: a prospective study. *Ophthalmology*. 2001;108:2071–5.
196. Walscheid K, Heiligenhaus A, Holzinger D, et al. Elevated S100A8/A9 and S100A12 Serum Levels Reflect Intraocular Inflammation in Juvenile Idiopathic Arthritis-Associated Uveitis: Results From a Pilot Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56(13):7653–60.
197. Schmeling H, Biber D, Heins S, et al. Influence of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms on efficacy and toxicity of methotrexate in patients with juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol*. 2005;32:1832–6.
198. Moncrieffe H, Hinks A, Ursu S, et al. Generation of novel pharmacogenomic candidates in response to methotrexate in juvenile idiopathic arthritis: correlation between gene expression and genotype. *Pharmacogenet Genomics*. 2010;20(11):665–76.

199. Hinks A, Moncrieffe H, Martin P, et al. Association of the 5- aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide transformylase gene with response to methotrexate in juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(8):1395–400.
200. de Rotte MC, Bulatovic M, Heijstek MW, et al. ABCB1 and ABCC3 gene polymorphisms are associated with first-year response to methotrexate in juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol.* 2012;39(10):2032–40.
201. Cobb J, Cule E, Moncrieffe H et al. Genome-wide data reveal novel genes for methotrexate response in a large cohort of juvenile idiopathic arthritis cases. *Pharmacogenomics J.* 2014;14(4):356-64.
202. Nordal E, Zak M, Aalto K et al. Ongoing disease activity and changing categories in a long-term nordic cohort study of juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* 2011;63:2809-18.
203. Minden K, Niewerth M, Zink A et al. Long-term outcome of patients with JIA treated with etanercept, results of the biologic register JuMBO. *Rheumatology.* 2012;51:1407-15.
204. Giannini EH, Ilowite NT, Lovell DJ et al. Long-term safety and effectiveness of etanercept in children with selected categories of juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009;60:2794-804.
205. Ruperto N, Lovell DJ, Li T et al. Abatacept improves health-related quality of life, pain, sleep quality, and daily participation in subjects with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Care Res.* 2010;62:1542-51.
206. Lovell DJ, Ruperto N, Goodman S et al. Adalimumab with or without methotrexate in juvenile rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2008;359:810-20.
207. DeWitt EM, Kimura Y, Beukelman T et al. Consensus treatment plans for new-onset systemic juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Care Res.* 2012;64:1001-10.
208. Wallace CA, Giannini EH, Spalding SJ et al. Trial of early aggressive therapy in polyarticular juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* 2012;64:2012-21.
209. Tynjälä P, Vähäsalo P, Tarkiainen M, et al. Aggressive Combination Drug Therapy in Very Early Polyarticular Juvenile Idiopathic Arthritis (ACUTE-

- JIA): a multicentre randomised open-label clinical trial. *Ann. Rheum. Dis.* 2011;70:1605–12.
210. Consolaro A, Negro G, Lanni S, et al. Toward a treat-to-target approach in the management of juvenile idiopathic arthritis. *Clin.Exp.Rheumatol.* 2012; 30:157–62.
211. Ravelli A, Martini A. Methotrexate in juvenile idiopathic arthritis: answers and questions. *J Rheumatol.* 2000;27(8):1830-3.
212. Gutiérrez-Suárez R, Burgos-Vargas R. The use of methotrexate in children with rheumatic diseases. *Clin Exp Rheumatol.* 2010;28(5 Suppl 61):S122-7.
213. Giannini EH, Brewer EJ, Kuzmina N, et al. Methotrexate in resistant juvenile rheumatoid arthritis. Results of the U.S.A.-U.S.S.R. double-blind, placebo-controlled trial. The Pediatric Rheumatology Collaborative Study Group and The Cooperative Children's Study Group. *N Engl J Med.* 1992; 326(16):1043-9.
214. Ruperto N, Murray KJ, Gerloni V, et al. A randomized trial of parenteral methotrexate comparing an intermediate dose with a higher dose in children with juvenile idiopathic arthritis who failed to respond to standard doses of methotrexate. *Arthritis Rheum.* 2004;50(7):2191-201.
215. Tukova J, Chladek J, Hroch M, et al. 677TT genotype is associated with elevated risk of methotrexate (MTX) toxicity in juvenile idiopathic arthritis: treatment outcome, erythrocyte concentrations of MTX and folates, and MTHFR polymorphisms. *J Rheumatol.* 2010;37:2180-6.
216. Yanagimachi M, Naruto T, Hara T, et al. Influence of polymorphisms within the methotrexate pathway genes on the toxicity and efficacy of methotrexate in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Br J Clin Pharmacol.* 2011; 71:237-43.
217. Durland CL, Wedderburn LR. Current developments in the use of biomarkers for juvenile idiopathic arthritis. *Curr Rheumatol Rep.* 2014;16(3):406.
218. Bulatovic M, Heijstek MW, Verkaaik M, et al. High prevalence of methotrexate intolerance in juvenile idiopathic arthritis: development and

- validation of a methotrexate intolerance severity score. *Arthritis Rheum.* 2011;63(7):2007-13.
219. Brunner HI, Johnson AL, Barron AC, et al. Gastrointestinal symptoms and their association with health-related quality of life of children with juvenile rheumatoid arthritis: validation of a gastrointestinal symptom questionnaire. *J Clin Rheumatol.* 2005;11(4):194-204.
220. van der MA, Wulffraat NM, Prakken BJ, et al. Psychological side effects of MTX treatment in juvenile idiopathic arthritis:a pilot study. *Clin Exp Rheumatol.* 2007; 25(3):480-5.
221. Mulligan K, Kassoumeri L, Etheridge A, et al. Mothers' reports of the difficulties that their children experience in taking methotrexate for juvenile idiopathic arthritis and how these impact on quality of life. *Pediatr Rheumatol Online J.* 2013;11(1):23.
222. Van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet.* 1998;62:1044-51.
223. van Dijkhuizen EH, Bulatović Čalasan M, Pluijm SM, et al Prediction of methotrexate intolerance in juvenile idiopathic arthritis: a prospective, observational cohort study. *Pediatr Rheumatol Online J.* 2015;13:5.
224. Berntson L, Nordal E, Aalto K, et al. HLA-B7 predicts a more chronic disease course in an 8-year followup cohort of patients with juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol.* 2013;40(5):725-31.
225. McErlane F, Foster HE, Carrasco R, et al. Trends in paediatric rheumatology referral times and disease activity indices over a ten-year period among children and young people with Juvenile Idiopathic Arthritis: results from the childhood arthritis prospective Study. *Rheumatology (Oxford).* 2016;55(7):1225-34.
226. Oen K, Tucker L, Huber AM, et al. Predictors of early inactive disease in a juvenile idiopathic arthritis cohort: results of a Canadian multicenter, prospective inception cohort study. *Arthritis Rheum.* 2009;61(8):1077-86.

227. Guzman J, Oen K, Tucker LB, et al. The outcomes of juvenile idiopathic arthritis in children managed with contemporary treatments: results from the ReACCh-Out cohort. *Ann Rheum Dis.* 2015;74(10):1854-60.
228. Sengler C, Klotsche J, Niewerth M, et al. The majority of newly diagnosed patients with juvenile idiopathic arthritis reach an inactive disease state within the first year of specialised care: data from a German inception cohort. *RMD Open.* 2015;1(1):e000074.
229. В. Наков. Фекален калпротектин – неинвазивен маркер за оценка на чревното възпаление. Дисертация. МУ-София, 2011.
230. Зл. Коларов. Клинико-генетични и имунологични проучвания при ревматоидния артрит. Дисертация. МУ-София, 2000.
231. Rothmund F, Gerss J, Ruperto N, et al. Validation of relapse risk biomarkers for routine use in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2014;66(6):949-55.
232. Е. Маджарова. Значение на някои клинично-лабораторни показатели за оценка активността на ревматоидния артрит в детската възраст. Дисертация. Медицинска Академия, 1976.
233. Д. Михайлова, Стайкова Й, Манева А. Определяне на С-реактивен протеин при деца с ювенилен хроничен артрит. *Педиатрия*, 1992, 31,36-8.
234. Б. Върбанова. Нарушения в хуморалния и клетъчен имунен отговор при болни с олигоартритна и полиартритна форма на ювенилен хроничен артрит. Дисертация, МУ-Варна, 1998.
235. Д. Михайлова, Николова Д., Иванова Н., Маринова Е., Лисички К., Стефанов Ст., Генова В., Цанчева В. Определяне на интерлевкин-6 в серума при деца с ювенилен хроничен артрит. *Ревматология*, 7,1999,36-9.

236. Bulatović Calasan M, de Vries LD, Vastert SJ, et al. NM. Interpretation of the Juvenile Arthritis Disease Activity Score: responsiveness, clinically important differences and levels of disease activity in prospective cohorts of patients with juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2014;53(2):307-12.
237. Д. Михайлова. Характеристика на имунологичните отклонения при ювенилен хроничен артрит и системен лупус еритематодес у деца. Дисертация, МУ-София, 1990.
238. Св. Балеv, Върбанова В., Николов Кр. Антинуклеарни антитела при болни с олиго- и полиартритна форма на ювенилен хроничен артрит. *Ревматология*, 2003,11,48-52.
239. Glerup M, Herlin T, Twilt M. Remission rate is not dependent on the presence of antinuclear antibodies in juvenile idiopathic arthritis. *Clin Rheumatol*. 2017;36(3):671-6.
240. Guzman J, Oen K, Huber AM, Watanabe Duffy K, Boire G, Shiff N et al. The risk and nature of flares in juvenile idiopathic arthritis: results from the ReACCh-Out cohort. *Ann Rheum Dis*. 2016. 75(6):1092–8.
241. Wallace CA, Giannini EH, Spalding SJ. et al. Clinically inactive disease in a cohort of children with new-onset polyarticular juvenile idiopathic arthritis treated with early aggressive therapy: time to achievement, total duration, and predictors. *J Rheumatol*. 2014;41:1163–70.
242. Adib N, Hyrich K, Thornton J. et al. Association between duration of symptoms and severity of disease at first presentation to paediatric rheumatology: results from the Childhood Arthritis Prospective Study. *Rheumatology* 2008;47:991–5.
243. Fantini F, Gerloni V, Gattinara M, Cimaz R, Arnoldi C, Lupi E. Remission in juvenile chronic arthritis: a cohort study of 683 consecutive cases with a mean 10 year followup. *J Rheumatol*. 2003;30:579–84.