

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
КАТЕДРА ПО ВЪТРЕШНИ БОЛЕСТИ
КЛИНИКА ПО РЕВМАТОЛОГИЯ**

Д-Р ЦВЕТОСЛАВ АНТОНОВ ГЕОРГИЕВ

**КЛИНИЧНИ, СЕРОЛОГИЧНИ И ОБРАЗНИ ПРОУЧВАНИЯ
ПРИ БОЛНИ С ГОНАРТРОЗА, ЛЕКУВАНИ С РАЗЛИЧНИ
ТЕРАПЕВТИЧНИ СРЕДСТВА**

**АВТОРЕФЕРАТ
НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА
ОБРАЗОВАТЕЛНАТА И НАУЧНА СТЕПЕН “ДОКТОР”**

Научен ръководител: проф. д-р Румен Стоилов д.м.

София, 2018

Дисертационният труд е написан на 167 стандартни машинописни страници. Съдържа 24 таблици и 44 фигури. Литературната справка включва 284 заглавия – 4 на кирилица и 280 на латиница. Във връзка с дисертационния труд са направени 4 публикации и 3 участия в български научни форуми (конгреси и конференции).

Изследванията, свързани с дисертационния труд, са проведени в Клиника по ревматология, Лаборатория по клинична имунология и Отделение по образна диагностика към УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, София.

Дисертационният труд е обсъден на заседание на Катедрата по вътрешни болести към Медицински университет – София на 20.03.2018г. и насочен за представяне пред научно жури.

Предложено научно жури:

1. Професор д-р Румен Малинов Стоилов, д.м. – УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, Клиника по ревматология, КВБ, МФ на МУ – София
2. Професор д-р Златимир Господинов Коларов, д.м.н. – УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, Клиника по ревматология, КВБ, МФ на МУ – София
3. Професор д-р Мария Стоянова Панчовска-Мочева, д.м. – Медицински университет – Пловдив, Катедра „Пропедевтика на вътрешните болести“
4. Доцент д-р Мариела Генчева Генева-Попова, д.м. – Медицински университет – Пловдив, Катедра “Пропедевтика на вътрешните болести“
5. Доцент д-р Кирил Надков Яблански, д.м. – Клиника по ревматология към "МБАЛ Св. Панталеймон – Плевен"

Резервни членове:

6. Доцент д-р Доброслав Станимиров Кюркчиев, д.м.н. – Лаборатория по клинична имунология към „УМБАЛ Св. Иван Рилски“
7. Доцент д-р Антоанета Рангелова Бозукова-Тончева, д.м. – Национална многопрофилна транспортна болница – София

Съдържание

Използвани съкращения	4
Въведение	6
1. Цел и задачи	7
2.1. Цел	7
2.2. Задачи	7
2. Материали и методи	9
3. Резултати	19
4. Обсъждане	39
5. Изводи	56
6. Приноси	57
7. Публикации и научни съобщения	58

Използвани съкращения

На кирилица

АДФ – аденозиндифосфат
АТФ – аденозинтрифосфат
ГоА – гонартроза
ДНК – дезоксирибонуклеиновата киселина
ДИФ – дистални интерфалангеални стави
ЕЦМ – екстрацелуларен матрикс
ИТМ – индекс на телесна маса
КМК – карпо-метакарпална става
КС – кортикостероиди
КТ – компютърна томография
МКЗП – минимално клинично значимо подобрение
МКФ – метакарпо-фалангеални стави
МРТ – магнитно-резонансна томография
НСПВС – нестероидни противовъзпалителни средства
ОА – остеоартроза
ПИФ – проксимални интерфалангеални стави
РА – ревматоиден артрит
РНК – рибонуклеинова киселина
т.т. – телесно тегло
УМБАЛ – университетска многопрофилна болница за активно лечение
ХК – хиалуронова киселина

На латиница

ACR – American College of Rheumatology
ADAMTS – a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
ANOVA – analysis of variance
ARAMIS – Arthritis Rheumatism and Aging Medical Information System
AUC – area under the curve
BAFF – B-cell activating factor
BIPED – Burden of disease, Investigative, Prognostic, Efficacy of intervention and Diagnostic
класификационна схема
BMPs – костни морфогенетични протеини
C2C – collagen type II cleavage
CD – cluster of differentiation
COMP – cartilage oligomeric matrix protein
COX – циклооксигеназа
CRP – C-реактивен протеин
CTX – C-terminal telopeptide
EGF – epidermal growth factor
ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay

ESCEO – European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases
EULAR – European League Against Rheumatism
FGF – fibroblast growth factor
HAQ-DI – Health Assessment Quality – Disease Index
HMWHAx1 – група на пациентите, лекувани с еднократно приложение на кръстосано-свързана високомолекулна хиалуронова киселина за период от 1 година
HMWHAx2 – група на пациентите, лекувани с двукратно приложение на кръстосано-свързана високомолекулна хиалуронова киселина през 6 месеца за период от 1 година
ICAM-1 – intracellular adhesion molecule-1
IFN – interferon
IGF-1 – insulin-like growth factor 1
IL – interleukin
IL-1RA – interleukin-1 receptor antagonist
KL – Kellgren-Lawrence скала
miR – микро-рибонуклеинова киселина
MMP – matrix metalloproteinase
NF- κ B – nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NO – азитен оксид
NS – not significant
NTX – N-terminal telopeptide
OARSI – Osteoarthritis Research Society International
OMERACT – Outcome Measures in Rheumatology
OR – odds ratio
PD – proton density
PDEGF – platelet derived epidermal growth factor
PDGF – platelet growth factor
PG – простагландин
PPP – бедна на тромбоцити плазма
PRP – богата на тромбоцити плазма
PRPx2 – група на пациентите, провели 2 курса по три инжекции с богата на тромбоцити плазма за период от 1 година
RHAMM – hyaluronan-mediated motility receptor
ROC – receiver operator characteristics
SD – standard deviation
SF-36 – Short Form 36
SYSADOA – symptomatic slow acting drugs for osteoarthritis
TGF- β – transforming growth factor beta
TIINE – type II collagen neopeptide
TNF – tumor-necrosis factor
VAS – visual analogue scale
VEGF – vascular endothelial growth factor
Wnt – протеини Wnt
WOMAC – Western Ontario and McMaster Universities OA index
WORMS – Whole-Organ magnetic Resonance iMaging Score

Въведение

Остеоартрозата (ОА) е най-честата причина за болка от ставен произход, придружена в различна степен от функционален дефицит и намалено качество и продължителност на живот. Гонартрозата (ГоА), като най-честа локализация на ОА, засяга хора от различни възрастови групи, с вариращо ниво на физическа активност. Една четвърт от популацията над 55-годишна възраст страда от болка в колянната става, а половината от тях показват рентгенови белези за ОА.

Остеоартрозата се характеризира с асимптоматичен, молекулярен стадий, по време на който патогенетично лечение би било най-ефективно.

Дисбалансът между проинфламаторни (интерлевкин IL-1 α , IL-1 β и TNF- α) и антиинфламаторни цитокини (IL-4, IL-10 и IL-1 рецепторен антагонист) стои в основата на активирана каскада от протеолитични ензими, водеща до хрущялна деструкция.

Освен хиалинния хрущял, при ГоА се засягат и субхондралната кост, ставната капсула, лигаментите, менискусите, периставната мускулатура и сензорната нервна система. Въпреки че вече разполагаме с по-голяма яснота около патогенетичните механизми на развитие и прогресия на ОА, утвърдените консервативни лечебни подходи служат по-скоро за облекчаване на симптомите, отколкото за повлияване на биохимичната среда на ставата и повлияване на болестния процес.

Лъч надежда хвърлят разработените в последните години високомолекулните кръстосаносвързани хиалуронови киселини, които служат за възстановяване на реологията на ставната течност, и иновативните ортобиологични средства като богатата на тромбоцити плазма (PRP). Освен че представлява висококонцентриран „коктейл“ от растежни фактори, PRP също освобождава анти-инфламаторни цитокини и има потенциален болестопроменящ ефект.

За българската популация от болни с ГоА до момента не е осъществено комплексно проучване на аспектите на болестния процес. Не е проведено изследване на отговора към най-честите терапевтични средства с помощта на валидирани болестоспецифични въпросници, иновативни биомаркери и образни изследвания. Това бе мотив да направим обстойно и задълбочено проучване на тези ключови компоненти на заболяването и отговора към лечение.

1. Цел и задачи

1.1. Цел

Целта на дисертационния труд е да се анализира стойността на клиничните, серологичните и образните методи в оценката на гонартроза и да се оцени ефективността и безопасността на три терапевтични средства за лечението ѝ: богатата на тромбоцити плазма, високомолекулярна кръстосаносвързана хиалуронова киселина и глюкозамин сулфат.

1.2. Задачи

1. Да се измерят и сравнят серумните биомаркери С-реактивен протеин (CRP), хрущялен олигомерен матриксен протеин (COMP), Coll2-1 и матриксна металопротеиназа 3 (MMP-3) при пациенти с ГоА и здрави доброволци.
2. Да се определи диагностичния потенциал и праговите стойности на изследваните биомаркери за разграничаване на здрави от болни с гонартроза индивиди, както и на пациенти с изолирана гонартроза от пациенти с генерализирана остеоартроза.
3. Да се изследва връзката между CRP, COMP, Coll2-1, MMP-3 и клиничните показатели на болестта, качеството на живот на пациентите и структурните промени, оценени чрез рентгенография и МРТ.
4. Да се установи ролята на изходните нива на изследваните серумни биомаркери за прогресията на заболяването и отговора към терапията.
5. Да се оцени и сравни промяната в качеството на живот и инвалидизацията между лекуваните пациенти с различни терапевтични средства – различни режими на лечение с интраартикуларна хиалуронова киселина, интраартикуларна богата на тромбоцити плазма и перорален глюкозамин сулфат.
6. Да се направи сравнителен анализ на промяната в болката и функционалния дефицит между лекуваните пациенти с интраартикуларна хиалуронова киселина, интраартикуларна богата на тромбоцити плазма и перорален глюкозамин сулфат.

7. Да се анализира пропорционалната разлика в дела на пациентите, постигнали минимално клинично значимо подобрене на болката и физическата функция и отговорили на терапията според обединените критерии на OARSI и OMERACT.
8. Да се оценят и сравнят структурните промени, оценени чрез рентгенография и магнитно-резонансна томография, между пациенти, лекувани с перорален глюкозамин сулфат, интраартикуларна хиалуронова киселина и интраартикуларна богата на тромбоцити плазма.
9. Да се определят независимите фактори, асоциирани с отговора на лечение, в отделните терапевтични групи.
10. Да се оцени и сравни безопасността на различните терапевтични средства – интраартикуларното инжектиране на хиалуронова киселина и богата на тромбоцити плазма и широко използваните перорални хондропротектори (глюкозамин сулфат).

2. Материали и методи

2.1. Пациенти и контроли

В настоящото проучване бяха включени за период от 2 години и 5 месеца (от 10.2014 г. до 02.2017г.) 132 болни със симптоматична ГоА, от които 107 жени и 25 мъже (81% жени). Пациентите бяха на средна възраст (mean \pm SD) – 63,45 \pm 8,71 години (от 40 до 80 години). Средната продължителност на болката беше 13,62 \pm 9,63 години (определена като брой години от началото на болката). Пациентската група бе сравнена с 31 здрави контроли на средна възраст 51,77 \pm 6,10 години (от 40 до 60 години), съответстващи по пол и индекс на телесна маса (ИТМ) на болните с ГоА. Здрави доброволци над 60 години не бяха включени поради наличие на клинични и/или рентгенови данни за ГоА.

За да установим разликите в клиничното протичане и тежестта на ГоА при двата пола, изследвахме клиничните, лабораторните и образните особености при пациентите, взели участие в проучването.

Включващи критерии при пациентската група. За нуждите на настоящото проучване бяха подбрани и изследвани пациенти на възраст от 40 до 80 години, изпълняващи критериите на ACR за гонартроза. Те страдаха от симптоматична унилатерална или билатерална гонартроза, ангажираща медиалното фемуро-тибиално пространство, с продължителност на оплакванията над 6 месеца. Пациентите бяха разделени на групи, като бяха класифицирани според рентгенографските промени, оценени според Kellgren-Lawrence (KL) скалата от I-III.

Изключващи критерии при пациентската група. В проучването не бяха включени пациенти, които отговарят на един или повече от следните изключващи критерии:

- IV рентгенов стадий ГоА;
- коморбидност с други ревматични заболявания (в това число ревматоиден артрит, псориатичен артрит, спондилоартрит, васкулити и системни заболявания на съединителната тъкан, фибромиалгия);
- предшестваща вътреставна фрактура или документирана високоенергийна травма на долния крайник;
- декомпенсирано метаболитно или сърдечносъдово заболяване;

- лекувани със системни глюкокортикоиди (доза > 7,5 mg) в предходните 3 месеца, както и интраартикуларни хиалуронани, глюкокортикоиди или ортобиотици в предходните 6 месеца;
- лекувани с хондропротектори (глюкозамин, хондроитин, осапуняеми деривати на соя и авокадо) в предходните 6 месеца;
- анамнеза за вазовагален шок;
- бременност или кърмене;
- валгитет или варитет в коленните стави повече от 20 градуса.

За постигане на адекватна оценка на болката и физическата функция, пациентите бяха помолени, в рамките на 48 часа преди всяко посещение, да не приемат лекарства, повлияващи болката (включително аналгетици и нестероидни противовъзпалителни лекарства).

2.2. Клинични методи

Оценка на болката. Интензитетът на болката в колянната става е оценен с визуална аналогова скала (VAS) - хоризонтална линия с 100 mm дължина, като от лявата страна на скалата е отбелязано "Без болка", а от дясната - "Много силна болка". Пациентите бяха помолени да отбележат вертикална черта върху скалата според възприятието им за болка. Резултатът се определя чрез измерване на отстоянието, на което пациентът е поставил вертикалната черта. Според интензитета на болката пациентите бяха разделени в четири групи: лека болка (< 40 mm), умерена (40-60 mm), тежка (60-80 mm) и много тежка (> 80 mm).

Болестна тежест (алгофункционален индекс на Lequesne). Индексът на Lequesne за оценка на тежестта на гонартрозата може да бъде използван за оценка на ефективността на терапевтичните интервенции. Секциите на индекса включват:

- болка или дискомфорт;
- максимална дистанция при ходене;
- ежедневни дейности.

Оценката според алгофункционалния индекс на Lequesne варира от 0 до 24 точки. Резултат на пациента, чиято стойност е по-висока или равна на 14, показва изключително сериозен функционален дефицит, а резултати, чиято стойност е съответно 11-14, 8-10, 5-7, и 1-4 показват респективно много тежко, тежко, средно и леко функционално увреждане.

Болестна активност (WOMAC). WOMAC представлява болест-специфичен въпросник, който се попълва самостоятелно от пациента и дава информация за неговата болестна активност, оценявайки основните болестни симптоми. Оценката според WOMAC индекса варира от 0 до 96 точки, разпределени в три основни раздела:

- болка (общо: 20 точки),
- скованост (общо: 8 точки),
- функционално увреждане (общо: 68 точки).

По-високите стойности на индекса са свързани с по-тежка симптоматика и нарушена ставна функция.

Health Assessment Questionnaire – Disability Index (HAQ-DI).

Отговорите се отбелязват от пациентите на 4-степенна Likert-тип скала, варираща от 0 (без затруднение) до 3 (невъзможно е да го направя). По-високите стойности на HAQ-DI индекса са свързани с по-висока степен на инвалидизация. Стойностите му могат да бъдат интерпретирани в следните три категории:

- от 0 до 1: леки затруднения до умерена инвалидизация;
- от 1 до 2: умерена до тежка инвалидизация;
- от 2 до 3: тежка до много тежка инвалидизация.

Минимално клинично значимо подобрене (МКЗП). Терминът МКЗП отразява най-малката промяна в клиничните показатели, която показва сигнификантно подобрене в симптомите на пациента. МКЗП се основава на пациентското мнение за промяната в състоянието на индивидуално ниво и дава възможност за изчисление на пропорцията на подобрените пациенти. МКЗП зависи от нивата на изследваните показатели (VAS и WOMAC) преди интервенцията, като при по-ниски изходни нива минималното подобрене е по-малко, изразено в абсолютна стойност, и обратно при по-високи изходни – МКЗП е по-голямо. Използваните в дисертационния труд стойности се базират на утвърдените от Tubach и неговия колектив.

OARSI-OMERACT критерии за отговор. За да се отчете отговор към терапията, се изисква относителна и абсолютна промяна от началните стойности на показателя. Критериите за отговор на OARSI и OMERACT показват сходна чувствителност, независимо от лечебните средства, пътя на приложение и локализацията на ОА.

2.3. Серологични методи

След попълване на информирано съгласие на участниците (пациенти и здрави контроли) е взета 5 ml венозна кръв в епруветка с клот активатор и полимерен гел. След престояване на температура 37 °C за 10 min, кръвта е центрофугирана на 5000 оборота/min за 10 min. Чрез микропипета серумът е отделен в епруветки тип „Епендорф“, които са съхранявани според указанията на производителя. Преди венепункцията всички пациенти са почивали за период от 30 минути. При пациентите и здравите контроли са анализирани серумните нива на следните биомаркери:

С-реактивен протеин е изследван на принципа на турбидиметричен анализ с частици. Референтните стойности за използвания кит са били <6 mg/L.

Отразяващи ставното ремоделиране биомаркери. Количественото определяне на нивата на изследваните биомаркери беше проведено чрез комерсиално налични китове за ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA):

- Хрущялен олигомерен матриксен протеин (COMP)
- Матриксна металопротеиназа 3 (MMP-3)
- Coll 2-1

Резултатите бяха отчетени на ELISA четец 450/630 nm. Концентрациите на биомаркерите в серума бяха определени чрез стандартна крива, използвайки инструкциите на производителя, в нанограми на милилитър (ng/ml) за MMP-3 и COMP и пикограми на милилитра (pg/ml) за Coll2-1.

2.4. Образни методи

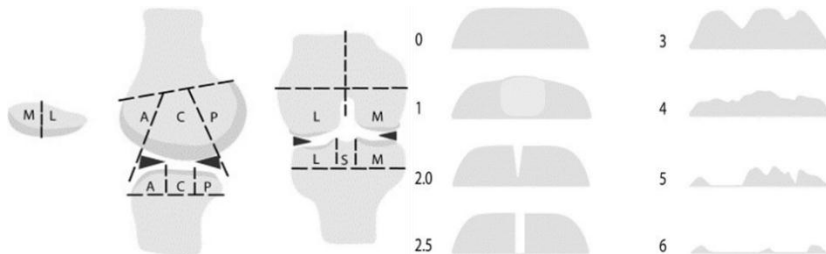
Нативна рентгенография. Лицева рентгенография на двете коленни стави в пълна екстензия е проведена в отделението по образна диагностика към Университетска болница „Св. Иван Рилски“. Използван е дигитален рентгенов апарат (DR) „GE Presicion Rxi“. По време на изследването пациентите са заемали изправено положение с цел натоварване на коленните стави. Образите са разчетени от специалист по образна диагностика и са стратифицирани според Kellgren-Lawrence скалата (Таблица 2.1).

Табл. 2.1. Полуколичествена система за оценка на Kellgren-Lawrence

Стадий	Рентгенографска находка
0	Нормална рентгенография
I	Предполагаемо стеснение на ставната междина и възможни остеофити
II	Несъмнена остеофитоза и възможно стеснение на ставната междина
III	Множество умерени остеофити, несъмнено стеснение на ставната междина, остеосклероза и възможен деформитет на костния контур
IV	Големи остеофити, изразено намаляване на ставната междина, тежка склероза и несъмнен деформитет на костния контур

Магнитно-резонансна томография. Магнитно-резонансните образи са получени в отделението по образна диагностика към Университетска болница „Св. Иван Рилски“ с магнитен резонанс "GE Signa HDxt" с 1,5 T интензитет на полето. МРТ е направена на симптоматичното коляно при едностранна гонартроза, а в случай на двустранно ангажиране – на коляното, което е показало по-напреднало структурно увреждане според Kellgren-Lawrence скалата, наречена още индексна става.

Образите са оценени чрез Whole-Organ magnetic Resonance iMaging Score (WORMS) от най-малко един независим специалист по образна диагностика. WORMS е система за полуколичествена оценка на магнитно-резонансните характеристики при гонартроза, а именно: загуба на хиалинен хрущял (*Фигура 2.1*), субхондрални костно-мозъчни лезии, субхондрални кисти, остеофитоза, костно изтриване, състояние на менискусите и наличие на синовит или ставен излив, както и увреди на кръстни връзки. WORMS използва комплексно подрегионално разделение на зоните на коляното. Методът WORMS предоставя мултифункционална цялостна оценка на коляното при ОА, използвайки конвенционална МРТ и показва висока степен на съгласие между оценителите.



Фиг. 2.1 Оценка на промените в хиалинния хрущял в различните региони на колянната става според Whole-Organ magnetic Resonance iMaging Score (WORMS)

Използвани бяха следните магнитно-резонансни секвенции:

- T1 – мастно-чувствителна секвенция, добра разделителна способност (“truth” sequence);
- Proton Density (PD) FatSat – висока чувствителност по отношение на течности, тъкани с ниско съдържание на вода са тъмни, секвенция на патологията;
- PD Cube – предлага висока разделителна способност и предоставя възможност за продължителни, тънкосрезови образи на комплексни анатомични структури.

В съответствие с WORMS, по-долу представените дефиниции са използвани при разчитане на магнитно-резонансните изображения за установяване на структурна промяна. Хрущялна увреда е налице, ако при разчитането на образите е била установена фокална загуба на хрущял по-малка от 1 cm в най-големия си размер или са налице зони на дифузна частична или пълна загуба на хрущял (WORMS оценка ≥ 2). При увеличаване на WORMS оценката (Δ WORMS ≥ 1), отразяваща хрущялната увреда в определения регион на коляното на дванадесетия месец, е налице прогресия на хрущялната увреда.

Лезии на менискуси (WORMS оценка ≥ 1) се наблюдават тогава, когато се изобразява руптура (дислоцирана или не) на менискус, или доказателства за предходна хирургична намеса, или пълно разкъсване или деструкция (загуба на контура и хомогенността или пълна резекция) в структурата на предния и задния рог и тялото на медиалния или латералния менискус. Osteofитоза е налице, когато се установят костни израстъци, които излизат извън нормалните костни контури на тибеофеморалната става на коляното (WORMS оценка ≥ 2). Лигаментни нарушения бяха дефинирани като наличие на разкъсана предна или задна кръстна връзка или разкъсан или задебелен медиален или латерален колатерален лигамент (WORMS оценка ≥ 1). Костно-мозъчните лезии са некистични субхондрални зони на висок сигнален интензитет на PD FatSat магнитно-резонансни изображения (WORMS оценка ≥ 1). Субхондралните кисти се дефинират като зони на значимо повишен сигнален интензитет в субартикуларната кост с гладко очертани заоблени граници, които не съдържат костен мозък или трабекуларна кост (WORMS оценка ≥ 1). Синовит е налице в случаите, когато синовиалната кухина е разширена и/или изпълнена с течност, представляваща синовиална хипертрофия

и/или ставен излив (WORMS оценка ≥ 1). Костно износване се дефинира като изравняване или депресия на артикуларните повърхности на тибията или фемура (WORMS оценка ≥ 1).

2.5. Дизайн на проучването

Крос-секционно обсервационно проучване. Изследваната група се състоеше от 132 пациенти ($62,59 \pm 10,11$ години, обхват 40-80 години) с първична гонартроза и 31 здрави доброволци ($51,77 \pm 10,10$ години, възрастов обхват 40-60 години). След подписване на информирано съгласие за участие в проучването всички пациенти бяха разпитани и прегледани, попълниха въпросниците за самооценка, беше им взета кръв за CRP и бяха проведени нативна рентгенография на двете коленни стави и магнитно-резонансна томография. При 56 от изследваните пациенти ($62,59 \pm 10,11$ години, обхват 40-80 години) и всички контроли бе проведено изследване на серумните нива на СОМР, MMP-3 и Coll 2-1. Включващите и изключващите критерии на пациентите са описани по-подробно в т. 2.1.

Всички участници подписаха формуляри за информирано съгласие. Проучването бе одобрено от Етичната комисия (Протокол № 1721 / 06.04.2015 г.) на Медицински университет - София.

Пациентите допълнително се разделиха на две групи: с генерализирана ОА ($n=32$) и с изолирана ГоА ($n=24$). Пациентите, класифицирани с генерализирана ОА, са страдали от симптоматична ОА на две или повече зони (ръце [вкл. проксимални и дистални интерфалангеални стави, и първа КМК], тазобедрени стави, коленни стави, гръбначен стълб, ходила), доказани впоследствие чрез рентгенография на засегнатите стави. Пациенти с изолирана ГоА не са имали признаци на ОА в който и да е друг регион или, ако са имали, не са били потвърдени рентгенографски.

Едногодишно, проспективно, лонгитудинално, отворено проучване. Проследиха се четири групи пациенти със симптоматична гонартроза, които отговаряха на включващите и изключващите критерии по точка 2.1.

За период от една година бяха проследени група (първа) пациенти ($n=24$; $63,96 \pm 7,77$ години), които приемаха перорален глюкозамин сулфат в доза 1500 mg дневно (Дона®). В крайния анализ са включени

единствено болните с ГоА, които са приемали глюкозамин сулфат 1500 mg/дн. най-малко 36 пълни седмици (9 месеца) през периода на проследяване (12 месеца).

Втората (n=25; 63,56 ± 10,4 години) и третата група пациенти (n=25; 61,18 ± 8,4 години) бяха лекувани за период от 1 година съответно с еднократно (1 инжекция) или двукратно (2 инжекции през 6 месеца) вътреставно аплицирана високомолекулна кръстосаносвързана хиалуронова киселина - Flexus® fluid One 3,0 ml (Valentis AG Via Lugano 13, CH-6982 Agno - Lugano, Switzerland) с pH 6,8-7,8, осмоларитет 0,9 – 1,3 ms/cm и концентрация 2,2%.

При четвъртата група пациенти (n=26; 60,38 ± 7,4 години) се проведеха два курса на лечение с автоложна плазма богата на тромбоцити (PRP) през 6 месеца. Всеки курс се състоеше от трикратно интраартикуларно инжектиране на PRP (4 ml) в три последователни седмици, съответно на 0,7 и 14 ден.

Независимо дали е приложена богата на тромбоцити плазма или хиалуронова киселина, се спазиха следните процедури преди, по време и след въвеждане на лекарственото средство:

- Преди провеждане на манипулацията надлежащата кожа щателно бе почистена и дезинфекцирана.
- При наличие на ставен излив, преди да се пристъпи към интраартикуларно инжектиране се аспирира абнормната ставна течност чрез пункция с игла с размер 20G.
- Терапевтичното средство (PRP или ХК) се инжектира при стерилни условия, чрез класически подход за интраартикуларно инжектиране на колянна става (медиален среднопателарен достъп при разгънато коляно).
- След 10-15 минути почивка пациентите бяха помолени активно да сгънат и разгънат коляното си с цел по-добро разпределение на инжектираната субстанция в ставното пространство.
- На пациентите се осигури още 10-15 минути физическа почивка в центъра и им бе препоръчано да почиват през следващите 48 часа. В случай на поява на болка и/или оток в коляното, пациентите са инструктирани да приемат 1 таблетка парацетамол през устата и да се свържат с отговорното лице по телефона.

Всички участници подписаха формуляри за информирано съгласие. Проучването бе одобрено от Етичната комисия (Протокол № 8 / 22.04.2016 г.) на Медицинския университет - София.

Преди започване на лечението пациентите попълниха въпросниците HAQ-DI, WOMAC, алгофункционален индекс на Lequesne, оценена бе болката чрез VAS. Снети бяха пълна анамнеза и физикален статус, включително ставен статус. Взета бе кръв за CRP и бяха проведени рентгенография и MPT на индексната колянна става. Всички пациенти бяха проследени на 12, 24 и 52 седмица след инициране на лечението с въпросници. На 52 седмица бяха измерени серумните нива на CRP и проведена рентгенография и MPT на индексната колянна става (*Таблица 2.2*).

Табл. 2.2. Извършени клинични, серологични и образни изследвания при пациентите с гонартроза

Изследвания	Начало	12 седмица	24 седмица	52 седмица
Анамнеза	✓	✓	✓	✓
Обективно състояние	✓	✓	✓	✓
Оценка на болката (VAS)	✓	✓	✓	✓
Болестна активност (WOMAC индекс)	✓	✓	✓	✓
Болестна тежест (индекс на Lequesne)	✓	✓	✓	✓
Качество на живот (HAQ-DI)	✓	✓	✓	✓
C-реактивен протеин	✓			✓
Серумни нива на COMP, MMP-3 и COLL2-1 (n = 50)	✓			
Рентгенография (KL)	✓			✓
Магнитно-резонансна томография (WORMS)	✓			✓

2.6. Статистически анализ

Статистическият анализ е проведен с помощта на софтуерния продукт SPSS 21. Използвани са дескриптивна статистика, параметрични и непараметрични тестове, линеен регресионен и бинарен логистичен, и ROC анализ. Разпределението на данните е изчислено чрез теста на Shapiro–Wilk. Екзактният тест на Fisher е използван за анализиране на

наличието на линейна връзка между категорични величини. Данните с ненормално разпределение са трансформирани чрез натурален логаритъм. Параметрични тестове (корелация на Pearson, Student T-тест, T-тестът за сдвоени разлики, дисперсионен анализ ANOVA с post-hoc анализ на Tukey) са използвани в случаите на нормално разпределение на данните. При сравнение на непрекъснати величини в групите, изложените хипотези отразяват разликата в средните стойности (mean) \pm стандартната девиация (SD).

Ако след логаритмичното преобразуване данните останат с ненормално разпределение, непараметричните U-тест на Mann-Whitney, H-тестът на Kruskal-Wallis и тестът на Willcoxon за сдвоени разлики са използвани за сравнение на вариациите. Хомогенността на вариациите е измерена чрез теста на Levene за равнопоставеността на вариациите. Когато кривите на разпределение са били идентични за изследваните групи, изложените хипотези отразяват разликата между медианите (минимум; максимум). Ранговият анализ на Spearman е използван с цел изследване на корелациите при ненормална дистрибуция на данните.

Многофакторен линеарен регресионен анализ бе проведен, за да предскаже нивата на COMP и HAQ-DI, въз основа на независими предиктори, като условието за нормалитет на остатъците бе спазено. Независимите предиктори за отговора към терапията, постигнатото минимално клинично значимо подобрене и прогресията за хрущялната увреда са изследвани чрез бинарен логистичен анализ. Корекция е направена за потенциални допринасящи фактори, в това число възраст и пол. Mantel-Haenszel тестът бе използван за изследване на асоциацията между бинарни предиктори (възможни допринасящи фактори) и бинарна зависима. Нивото на значимост е заложено да бъде 0,05.

Проведен бе Receiver operating characteristic (ROC) анализ, чрез който бе оценен диагностичният потенциал на MMP-3 и COMP за ГоА. С помощта на ROC анализ също бяха определени праговите стойности на MMP-3 за сепариране на ГоА в контекста на генерализирана ОА от изолирана ГоА. Площта под кривата (AUC) бе също калкулирана, като диагностични тестове, които доближават 1, показват перфектна дискриминация. Бяха изчислени чувствителността и специфичността на предложените прагови стойности за биомаркерите.

3. Резултати

3.1. Крос-секционно проучване

Демографски и клинични параметри на пациенти и контроли.

В крос-секционната част на проучването взеха участие 132 пациенти ($63,45 \pm 8,71$; обхват 40-80 години) и 31 контроли ($51,77 \pm 6,10$ години; обхват 40-60 години). В резултат на проведеня анализ на данните бе констатирана значима разлика във възрастовото разпределение между пациентите и контролите ($t(161) = 7,07$; $p < 0,001$). Двете групи показаха сходно полово разпределение ($\chi^2(1) = 0,211$; $p = 0,406$), като броят жени беше съответно 81% и 77%. Болните с ГоА и здравите доброволци не се различаваха значимо по своя индекс на телесна маса (ИТМ) ($29,93 \pm 3,88$ и $27,48 \pm 4,53$; $t(161) = 1,81$; $p = 0,072$).

По анамнестични данни, болката в коленните стави бе с давност от 1/2 до 17 години ($Mdn = 3$) в групата на болните с ГоА. При всички пациенти оценихме болестната активност чрез въпросника WOMAC, интензитета на болката чрез VAS, тежестта на заболяването чрез алгофункционалния индекс на Lequesne, инвалидизацията и качеството на живот чрез HAQ-DI.

Връзка между демографските характеристики и клиничните параметри. Медианата на болката, оценена чрез визуалната аналогова скала, се равнява на 52 mm (обхват: 22-95 mm). Тя корелираше с възрастта и продължителността на оплакванията ($r_s=0,173$; $p=0,047$ и $r_s=0,395$; $p < 0,001$, респективно), но не и с ИТМ. Колкото по-възрастни са пациентите и по-голяма е давността на болката, толкова по-високо е нивото ѝ според VAS. Същите корелации бяха установени и за болката, измерена чрез Likert скала и включена във въпросника WOMAC. Въпреки това нивото на болка не се различаваше значимо между групите на пациентите под ($n=49$) и над 60 ($n=83$) годишна възраст (Mann-Whitney U = 1904; $p = 0,543$). Жените и мъжете имаха сигнификантно различни стойности на болката, оценена чрез VAS: 57 (22; 95) mm и 45 (26; 87) mm, респективно, Mann-Whitney U= 882,5; $p=0,008$.

Медианата на оценката на болестната активност според WOMAC при изследваните пациенти бе 37,5 (обхват: 22-92). Стойностите на WOMAC корелираха с възрастта ($r_s=0,257$; $p = 0,003$), но не и с давността

на болката ($r_s=0,102$; $p=0,242$) и ИТМ ($r_s=0,158$; $p=0,070$). Въпреки това нивото на болестната активност не се различаваше значимо между групите на пациентите под и над 60 годишна възраст (Mann-Whitney $U=1841,5$; $p=0,221$). Жените и мъжете имаха сигнификантно различни стойности на болестната активност: 45 (6; 92) и 33 (7; 64), респективно, Mann-Whitney $U=742,5$; $p=0,001$.

Медианата на алгофункционалния индекс на Lequesne при изследваните пациенти се равнява на 11 (обхват: 4 - 23). Стойностите на индекса на Lequesne корелираха с възрастта ($r_s=0,250$; $p=0,004$), с давността на болката ($r_s=0,191$; $p=0,029$) и ИТМ ($r_s=0,199$; $p=0,022$). Жените и мъжете имаха сигнификантно различни стойности на болестната тежест според индекса на Lequesne: 12,5 (4; 23) и 9 (5; 15), респективно, Mann-Whitney $U=719,5$; $p<0,001$.

Медианата на оценката на свързаното със здравето качество на живот според HAQ-DI при изследваните пациенти се равнява на 0,88 (обхват: 0 – 2,25). Стойностите на HAQ-DI корелираха с давността на болката ($r_s=0,187$; $p=0,032$), но не и с възрастта ($r_s=0,128$; $p=0,143$) и ИТМ ($r_s=0,068$; $p=0,441$). Жените и мъжете имаха сигнификантно различни стойности на качеството на живот, оценено чрез HAQ-DI: 1 (0; 2,25) и 0,5 (0; 2,25), респективно, Mann-Whitney $U=786,5$; $p=0,001$. Всички клинични параметри, включително VAS, WOMAC, Lequesne и HAQ-DI, корелираха помежду си със значителен или висок афинитет ($r_s>0,5$).

С цел определяне на независимите предиктори на качеството на живот при пациентите с ГоА бе проведен стъпаловиден многофакторен регресионен анализ. Установено бе сигнификантно регресионно уравнение ($F(2,130)=110,70$; $p<0,001$), с $R^2=0,626$. В случая предиктивните стойности на HAQ-DI са определени с помощта на следната аналитична зависимост:

$$0,23 + 0,014x(\text{WOMAC}) + 0,045x(\text{LEQ}),$$

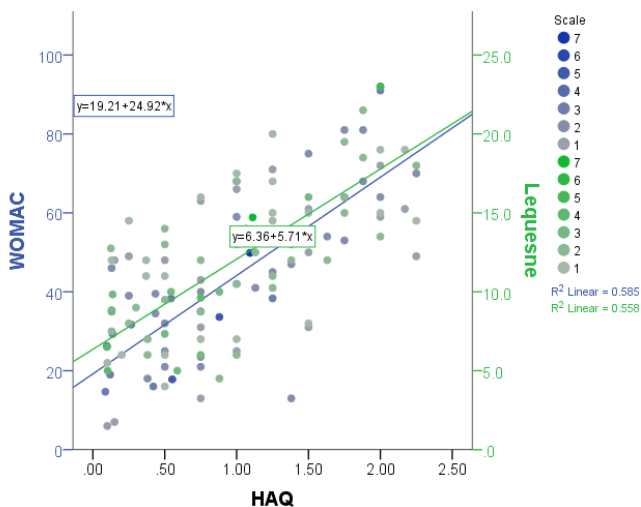
където WOMAC и LEQ са съответно оценките според WOMAC и Lequesne индексите. HAQ-DI се увеличава съответно с 0,014 и 0,045 за всяка измерена единица от WOMAC и Lequesne индексите. В Таблица 3.1 са представени нива на клиничните параметри при категоризиране на пациентите според нивото на болка (VAS) и тежестта на заболяването (Lequesne), а Фигура 3.1 илюстрира констатираното разсейване,

характеризиращо зависимостта между HAQ-DI (X) и болест-специфичните индекси на Lequesne (Y) и WOMAC (Y).

Табл. 3.1. Корелации между клиничните параметри

Параметър		HAQ-DI	VAS	WOMAC	Lequesne
Качество на живот (HAQ-DI)	Корелационен коефициент	1,000	,692**	,674**	,625**
	Sig. (2-tailed)	.	,000 [‡]	,000 [‡]	,000 [‡]
	N	132	132	132	132
Интезитет на болката (VAS)	Корелационен коефициент	,692	1,000	,815*	,748*
	Sig. (2-tailed)	,000 [‡]	.	,000 [‡]	,000 [‡]
	N	132	132	132	132
Болестна активност (WOMAC)	Корелационен коефициент	,674**	,815*	1,000	,724*
	Sig. (2-tailed)	,000 [‡]	,000 [‡]	.	,000 [‡]
	N	132	132	132	132
Алгофункционален индекс на Lequesne	Корелационен коефициент	,625**	,748*	,724*	1,000
	Sig. (2-tailed)	,000 [‡]	,000 [‡]	,000 [‡]	.
	N	132	132	132	132

* 0,7 < r_s < 0,9 – висока корелация; ** 0,5 < r_s < 0,7 – значителна корелация; ‡ p < 0.001



Фиг.3.1. Диаграма на разсейване, показваща зависимостта на HAQ-DI (X) от болест-специфичните индекси на Lequesne (Y) и WOMAC (Y)

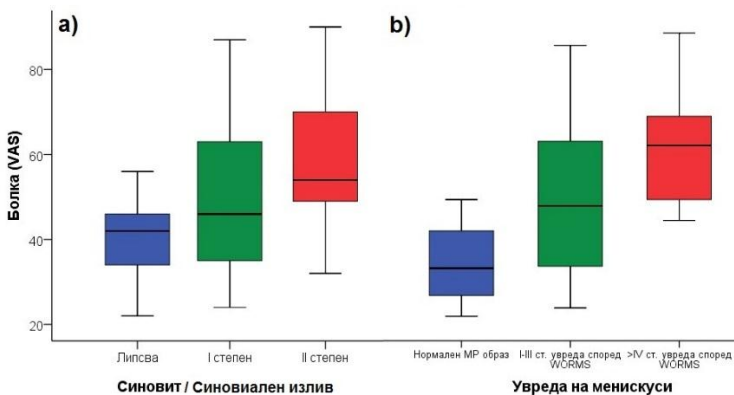
Връзка между клинични и образни параметри. Рентгеновият стадий според KL корелираше с възрастта на пациентите ($r_s = 0,279$; $p = 0,001$) и давността на болката ($r_s = 0,290$; $p = 0,001$). Наблюдава се и връзка между KL оценката и HAQ-DI ($r_s = 0,287$; $p = 0,001$), VAS ($r_s = 0,325$; $p < 0,001$), WOMAC ($r_s = 0,288$; $p < 0,001$) и Lequesne индекса ($r_s = 0,374$; $p < 0,001$). Връзката се запазваше след корекция за потенциални допринасящи фактори като възраст и пол. Разпределението на болните според тежестта на заболяването и интензитета на болката е представено на Таблица 3.2.

Табл. 3.2. Разпределение на рентгенографския стадий според тежестта на заболяването и болката

Рентгенов стадий	Тежест на заболяването (Lequesne)				P	Болка (VAS, mm)				P
	лека и умерена (n=24)	тежка (n=38)	много тежка (n=25)	изключително тежка (n=45)		< 40 (n=24)	≥ 40 < 60 (n=53)	≥ 60 < 80 (n=36)	≥ 80 (n=19)	
	KL I (39)	10	15	8		6	0,022	15	13	
KL II (65)	8	20	13	24	6	35	15	9		
KL III (28)	6	3	4	15	3	5	14	6		

Магнитно-резонансната оценка на структурните промени на цялото коляно WORMS корелираше с HAQ-DI ($r_s = 0,276$, $p = 0,007$), VAS ($r_s = 0,276$, $p < 0,001$), WOMAC ($r_s = 0,350$, $p = 0,001$) и Lequesne индекса ($r_s = 0,287$, $p < 0,007$). Възрастта на пациентите ($r_s = 0,378$, $p < 0,001$), давността на болката ($r_s = 0,235$, $p = 0,007$) и ИТМ ($r_s = 0,187$, $p < 0,032$) също показва връзка с WORMS. Костно-мозъчните лезии, остеофитозата и увредата на менискуси в най-добра степен корелираха с болката, болестната активност и сковаността.

Нивата на болка се различават сигнификантно в следните три групи: пациенти без магнитно-резонански данни за синовит, със синовит първа степен и със синовит втора степен ($p = 0,05$) (Фигура 3.2.а). По отношение на увредите на медиалния менискус, разделихме пациентите също в три групи: пациенти без увреда, пациенти с увреда I-III степен според WORMS скалата и пациенти с увреда на медиалния менискус над IV степен. Съпоставяйки нивата на болката, открихме сигнификантна разлика между групите ($p = 0,036$) (Фигура 3.2.б).



Фиг. 3.2. Нива на болката (VAS) при пациенти, групирани според степента на синовиална хипертрофия и/или излив (a) и според степента на увреда на медиалния менискус (b), оценени чрез WOMAC

Серумните нива на COMP, MMP-3 и Coll2-1 бяха изследвани при 56 пациенти ($62,59 \pm 10,11$ години, обхват 40-80 години) с ГоА и 31 здрави контроли. Серумните нива на COMP и MMP-3 корелираха значимо с възрастта ($r_s=0,431$; $p<0,001$ и $r_s=0,299$; $p=0,005$, респективно). Констатирана бе също корелация между серумните нива на COMP и давността на болката ($r_s=0,338$; $p=0,011$) при болните с ГоА. Не се установи сигнификантна връзка между концентрациите на циркулиращите Coll2-1, COMP и MMP-3 в серума от една страна и клиничните параметри, включително самооценката на пациентите за болка (VAS и WOMAC индекс), физическа функция (WOMAC индекс) и качеството на живот (HAQ-DI), сковаността и тежестта на заболяването (Lequesne индекс). CRP корелираше положително с VAS ($r_s=0,354$; $p=0,007$) и WOMAC индекса ($r_s=0,338$; $p=0,011$). С помощта на Mann-Whitney U тест се съпоставиха нивата на серумните MMP-3, sCOMP, sColl2-1 и CRP между пациенти ($n=56$) с ГоА (включително пациенти с изолирана ГоА и ГоА в контекста на генерализирана ОА) и здрави контроли ($n=31$). Пациентите с гонартроза имаха сигнификантно по-високи нива на серумните MMP-3 ($36,85$ (9,9; 128,2) vs. $22,10$ (3,8; 63,5) ng/ml; $U=538$; $p=0,003$), COMP (985 (285; 3290) vs. 625 (400; 1175) ng/ml; $U=421$; $p<0,001$) и CRP ($3,08$ (0,55; 14,30) vs. $1,27$ (0,22; 4,22) mg/l; $U=367$; $p<0,001$), където медианата на серумните нива на CRP при пациентите беше в рамките на референтните

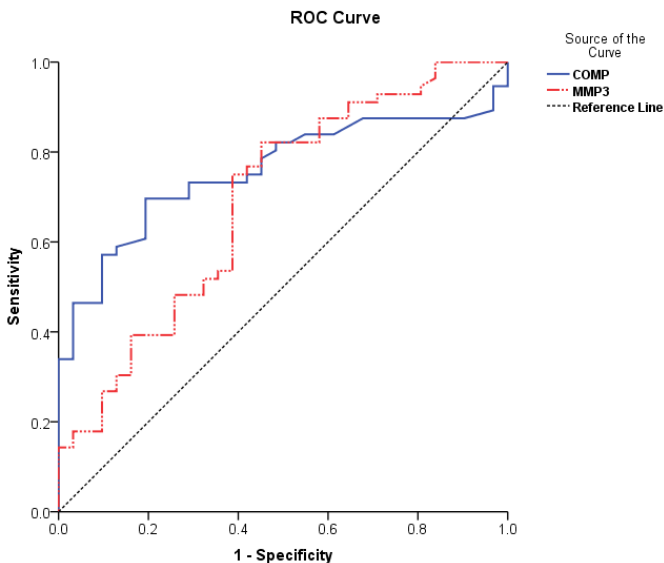
граница за лаборатория (<6 mg/l). Не се наблюдава статически значима разлика в нивата на Coll2-1 между пациенти и контроли (18670 (10230; 22680) и 19545 (9597; 22290) pg/ml; U=526,50; p=0,693).

Тъй като рентгенографската ГоА се дефинира като втора или по-висока степен съобразно скалата на Kellgren-Lawrence, с присъствие на дефинитивна остеофитоза и възможно стеснение на ставната междина при лицева рентгенография с натоварване, серумните нива на MMP-3, COMP, Coll2-1 и CRP бяха също сравнени в следните две групи: първата група (n=48) бе съставена от здрави индивиди и пациенти без дефинитивни данни за ГоА (KLI пациенти), а втората група (n=39) – съставена от пациенти с рентгенови данни за гонартроза KL II/III. Установи се, че пациентите с KL II/III имаха по-високи серумни нива на MMP-3 (36,2 (9,9; 128,2) и 28,55 (3,8; 85,4) ng/ml; U = 654,5; p = 0,016), COMP (1095,00 (315; 3290) и 640 (285; 1255) ng/ml; U = 344, p < 0,001) и CRP (3,51 (0,55; 14,30) и 1,62 (0,22; 9,99) mg/l; U = 507,5; p = 0,001).

С цел определяне на стойностите на изследваните биомаркери за разграничаване на здрави от болни с гонартроза индивиди, бе проведен анализ на receiver operating characteristic (ROC) крива. Площта под кривата (AUC) за серумните нива на COMP бе 0,757, с 95% доверителен интервал от 0,657 до 0,858. ROC анализът определи гранични нива от 717,5 ng/ml с чувствителност 73,2 и специфичност 71% за диференциация между контроли и пациенти с гонартроза. За MMP-3 AUC беше равна на 0,690, с 95% доверителен интервал от 0,571 до 0,809. ROC анализът на серумните нива на MMP-3 определи граница за диференциране 26,65 ng/ml с чувствителност 75% и специфичност 61,3% за отграничаване между контроли и пациенти с ГоА. В Таблица 3.3 са представени данните за серумните нива на COMP и MMP-3, дискриминиращи пациенти с гонартроза от здрави индивиди, а на Фигура 3.3 са илюстрирани ROC кривите.

Табл. 3.3. Серумните нива на COMP и MMP-3, дискриминиращи пациенти с гонартроза от здрави индивиди

Биомаркер	AUC	Стойност (ng/ml)	Чувствителност	Специфичност	CI	
					Горна граница	Долна граница
COMP	0,757	717,50	0,732	0,710	0,657	0,858
MMP3	0,690	26,65	0,750	0,613	0,571	0,809



Фиг. 3.3. ROC крива на серумните нива на COMP и MMP-3, дискриминиращи пациенти с гонартроза от здрави индивиди

Сигнификантна разлика се наблюдаваше и в серумните нива на MMP-3 между групата на болни с изолирана гонартроза и болни с ГоА в контекста на генерализирана ОА ($30,40 \pm 11,84$ и $55,13 \pm 27,51$ ng/ml; $t(54) = -4,47$; $p < 0,001$).

С цел сепарирание на болни с изолирана ГоА от болни с генерализирана ОА бе проведен ROC анализ за определяне на праговите стойности на MMP-3. AUC беше равна на 0,822, с 95% интервал на доверителност от 0,715 до 0,928. ROC анализът на серумните нива на MMP-3 определи гранични стойности от 41,35 ng/ml с чувствителност 73,1% и специфичност 86,9% за отграничаване на пациенти с изолираната ГоА от пациенти с ГоА в контекста на генерализирана ОА. Данни за серумните нива на MMP-3, дискриминиращи пациенти с изолирана гонартроза от пациенти с гонартроза в контекста на генерализирана ОА са нанесени в *Таблица 3.4.*

Табл. 3.4. Серумните нива на MMP-3, дискриминиращи пациенти с изолирана гонартроза от пациенти с гонартроза в контекста на генерализирана ОА

Биомаркер	AUC	Нива (ng/ml)	Чувствителност	Специфичност	CI	
					Горна граница	Долна граница
MMP-3	0,822	41,35	0,731	0,869	0,715	0,928

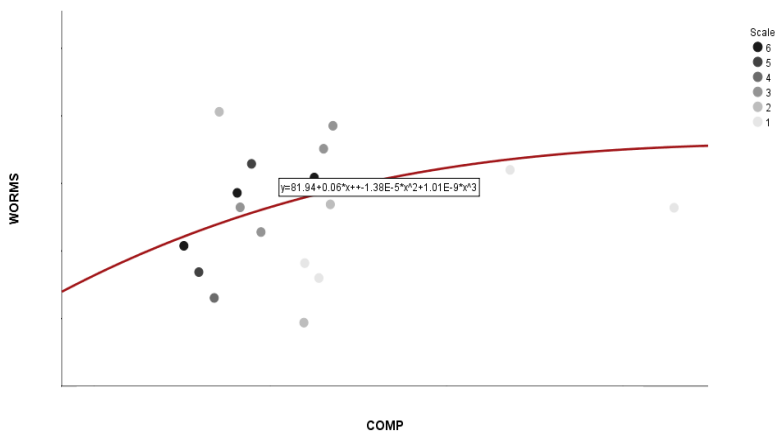
Корелации между отделните биомаркери. Получените експериментални резултати разкриха сигнификантна връзка между нивата на COMP и MMP-3 в серума ($r_s=0,337$; $p=0,003$). Други значими корелации между изследваните биомаркери не бяха наблюдавани.

Изследване на връзката между биомаркерите и структурните промени, оценени чрез рентгенография и МРТ. Пациентите с рентгенографски данни за по-напреднало заболяване (KLII/KLIII) имаха значимо по-високи серумни нива на COMP от тези с по-ранна гонартроза (KL stage I) (1095 (315; 3290) и 720 (285; 1255) ng/ml; $U=147$; $p=0,001$). Здравите контроли и KLI пациентите имаха сравними стойности на COMP (605 (400; 1175) и 720 (285; 1255) ng/ml; $U=224$; $p=0,394$), Coll2-1 (19545 (9597; 22290) и 18930 (10230; 22600) pg/ml; $U=139$; $p=0,345$) и MMP-3 (24,35 (13,0; 63,5) и 37,50 (14,2; 85,4) ng/ml; $U=187$; $p=0,099$). Не се установи сигнификантна разлика в изследваните нива на Coll2-1, COMP, MMP-3 и CRP между пациенти с KLII и KLIII рентгенографски стадий.

Магнитно-резонансна оценка (WORMS) и серумни нива на биомаркери. Серумните нива на COMP корелираха положително с полуколичествената магнитно-резонансна оценка според WORMS ($r_s=0,454$; $p<0,001$), която представлява сбор от оценките на всички структурни промени, характерни за ГоА, засягащи хиалинен хрущял, костен мозък, субхондрална кост, костно триене, остеофитоза, менискуси и синовия във всички изследвани региони и подрегиони на колянната става (Фигура 3.4).

При по-подробна разбивка на отделните компоненти на WORMS, се установи, че серумните нива на COMP корелираха с най-голям афинитет с оценката на костно-мозъчните лезии (BML) ($p<0,001$, $r_s=0,479$) и структурните промени на хиалинния хрущял (JC) ($p<0,001$, $r_s=0,464$). Освен това серумният COMP показва положителна връзка с магнитно-резонансната оценка на остеофитозата ($p=0,019$, $r_s=0,312$) и на синовия ($p=0,004$, $r_s=0,383$). Многофакторен регресионен анализ бе

проведен, за да предскаже нивата на COMP в зависимост от морфологичните промени на отделните ставни структури. В тази връзка бе установено сигнификантно регресионно уравнение ($F(2,54) = 14,14$; $p < 0,001$), с $R^2 = 0,314$. Предиктивните стойности на COMP се определят по следната формула $279 + 75,5x(\text{BML}) + 21,4x(\text{JC})$, където COMP е измерен в ng/ml, а BML и JC са съответно оценката на костно-мозъчните лезии и ставния хрущял по WORMS. Серумните нива на COMP се увеличават със 75,5 и 21,4 за всяка измерена единица костно-мозъчен едем и промяна в ставния хрущял, респективно, които са независим предиктор за серумния COMP.



Фиг. 3.4. Зависимост на стойностите на COMP (X) от WORMS (Y) при пациентите с ГоА

3.2. Лонгитудинално проспективно проучване

99 пациенти ($62,21 \pm 8.56$; обхват 40-80 години) бяха разпределени в четири терапевтични групи и проследени за период от една година. Липсваше сигнификантно значима разлика във възрастта в четирите изследвани групи пациенти ($F(3, 95) = 1,047$, $p = 0,38$). Нивата на ИТМ на базисната визита обаче се различаваха сигнификантно в две от групите, а именно: между първата група ($n = 23$; приемащи перорален глюкозамин сулфат пациенти) и втората група ($n = 25$; с еднократно приложение на високомолекулна хиалуронова киселина за една година) ($U = 168,5$, $p =$

0,014). Останалите две терапевтични групи не показаха значими различия по отношение на ИТМ помежду си и с пациентите от гореизброените две групи. Четирите групи показаха сходно полово разпределение ($\chi^2(3) = 6,16, p = 0,104$).

По анамнестични данни, болката в коленните стави е датирана от 1/2 до 17 години ($Mdn = 3$) при болните, като не се отчете сигнификантна разлика между групите.

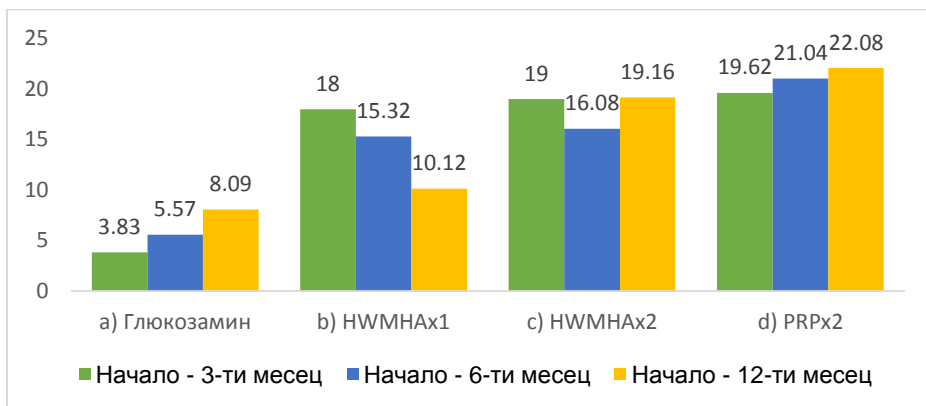
Оценка на болката в отделните групи. В групата на пациентите, лекувани с перорален глюкозамин сулфат (I група), липсва сигнификантно значима разлика в нивата на болката според VAS между началото и на третия месец лечение ($3,83 \pm 9,05$ mm; $t[22] = 1,5, p = 0,148, CI [-1,09; 6,74]$). Възприятието за болка при пациентите съществено се различаваше обаче след шестия месец, като се отчете сигнификантна разлика между началото и на шестия месец ($5,57 \pm 7,29$ mm; $t(22) = 3, p = 0,007, CI [1,4; 7,7]$) и между началото и дванадесетия месец ($8,09 \pm 10,46$ mm; $t(22) = 3,25, p = 0,004, CI [2,57; 11,61]$) (*Фигура 3.5.а*). Подобрението в края на година бе 13,2% в сравнение с началните нива на болка.

В групата на пациентите, лекувани с еднократно приложение на хиалуронова киселина за период от 1 година (II група), се установи сигнификантна разлика между възприятието за болка според VAS и WOMAC между началната визита и всички останали визити поотделно, като на третия месец разликата беше най-голяма и постепенно намаляваше. Наблюдавана бе промяна от $18 \pm 14,31$ mm, $15,32 \pm 12,43$ mm и $10,12 \pm 14,5$ mm съответно на 3, 6 и 12 месец ($t[24] = 6,32; p < 0,001, t[24] = 6,17, p < 0,001, t[24] = 3,49, p < 0,001$, респективно) (*Фигура 3.5.б*). Подобрението в края на година бе 17,7% в сравнение с началните нива на болка.

В групата на пациентите, лекувани с двукратно приложение на хиалуронова киселина през 6 месеца за период от 1 година (III група), както и в групата на пациентите, лекувани с 2 курса на PRP през 6 месеца за период от 1 година (IV група), се установи сигнификантна разлика във възприятието за болка, оценено чрез VAS, между началната визита и всички останали визити поотделно. Средните стойности на разликата в отчетената болка за първото тримесечие, шестмесечие и година в III група бяха съответно $19 \pm 15,02$ mm ($t[24] = 6,62, p < 0,001$), $16,08 \pm 10,83$ mm ($t[24] = 7,42, p < 0,001$) и $19,16 \pm 13,32$ mm ($t[24] = 7,19, p < 0,001$) (*Фигура*

3.5.с). Подобрението в края на година бе 33% в сравнение с началните нива на болка.

За IV група пациенти средната разлика между началото и третия месец беше $19,62 \pm 14,71$ ($t[25] = 6,8$, $p < 0,001$), между началото и шестия месец – $21,04 \pm 14,93$ ($t[25] = 7,2$, $p < 0,001$) и между началото и първата година – $22,08 \pm 15$ ($t[25] = 7,5$, $p < 0,001$) (Фигура 3.5.d). Подобрението в края на година бе 41% в сравнение с началните нива на болка.



Фиг. 3.5. Промяна (Δ) в перцепцията за болка, оценена чрез визуална аналогова скала, в терапевтичните групи за отделните времеви интервали

При проведен дисперсионен анализ ANOVA на промените в нивата на болка между началната визита и дванадесетия месец в отделните терапевтични групи се установи статистически значима разлика ($F(3, 95) = 6,88$, $p < 0,001$). Групата на пациентите, лекувани с PRP показа значително повлияване на болката според VAS в сравнение с групите на пациентите, лекувани с глюкозамин сулфат и еднократно инжектиране на хиалуронова киселина ($p = 0,001$ и $p = 0,011$, респективно). Групата на пациентите, лекувани с двукратно инжектирана високомолекулна хиалуронова киселина през 6 месеца, имаше сигнификантно по-добро повлияване на болката на дванадесетия месец в сравнение с пациентите, приемали глюкозамин сулфат ($p = 0,014$).

Оценка на болестната активност, физическата функция и сковаността (WOMAC) в отделните групи. В I група е налице сигнификантна разлика между болестната активност според общата оценка на WOMAC между началото (47 [21; 92]) и на третия месец (45 [23;

89]), между началото и на шестия месец (44,5 [21; 89]) на лечение и между началото и на дванадесетия месец (43 [17; 82]) на лечение, съответно: $Z = -2,26$, $p = 0,024$; $Z = -2,143$, $p = 0,032$; $Z = -2,1$, $p = 0,036$). Болестната активност се подобри 8,5% в края на първата година в сравнение с началните ѝ нива. Физическата функция според WOMAC индекса също търпи подобрене на дванадесетия месец от проследяването ($Z = -2.7$, $p = 0,006$), докато разликата в сковаността е статистически незначима ($Z = -1.81$, $p = 0,070$).

Във II група е налице статистически значима разлика между болестната активност според общата оценка на WOMAC между началото (45 [7; 92]) и третия месец (32 [3; 88]), между началото и шестия месец (33 [3; 62]) и между началото и дванадесетия месец (38 [9; 68]) на лечение, съответно: $Z = -3,8$, $p < 0,001$; $Z = -3,34$, $p = 0,001$; $Z = -2,44$, $p = 0,015$, което се равнява на 15,6% подобрене в края на първата година в сравнение с началните нива на болестната активност. Физическата функция според WOMAC индекса също търпи подобрене на дванадесетия месец от проследяването ($Z = -2.6$, $p = 0.009$), докато разликата в сковаността е статистически незначима ($Z = -0.44$, $p = 0.657$).

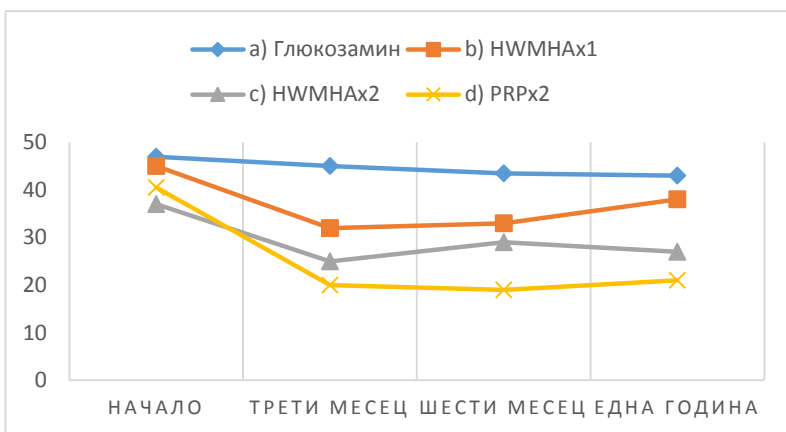
В III група е налице сигнафикантна разлика между болестната активност според общата оценка на WOMAC между началото (37 [10; 70]) и третия месец (25 [6; 50]), между началото и шестия месец (29 [5; 50]) и между началото и дванадесетия месец (27 [6; 51]) на лечение, съответно: $Z = -3,92$, $p < 0,001$; $Z = -3,88$, $p < 0,001$; $Z = -4,21$, $p < 0.001$. Тази промяна се равнява на 27% подобрене в края на първата година в сравнение с началните нива на болестната активност. Физическата функция и сковаността според WOMAC индекса също търпят подобрене на дванадесетия месец от проследяването ($Z = -4,3$, $p < 0,001$ и $Z = -3,03$, $p = 0,002$).

В IV група е налице значима разлика между болестната активност според общата оценка на WOMAC между началото (40,5 [23; 66]) и третия месец (20 [10; 40]), между началото и шестия месец (19 [7; 60]) и между началото и дванадесетия месец (21 [6; 65]) на лечение, съответно: $Z = -4,46$, $p < 0,001$; $Z = -4,46$, $p < 0,001$; $Z = -4,23$, $p < 0,001$. Тази промяна се равнява на малко над 50% подобрене в края на първата година в сравнение с началните нива на болестната активност в групата. Физическата функция и сковаността според WOMAC индекса също търпят

подобрене на дванадесетия месец от проследяването ($Z = -4,46$, $p < 0,001$ и $Z = -4,28$, $p < 0,001$).

При проведен Н тест на Kruskal-Wallis, сравняващ промените в нивата на болестната активност между началната визита и дванадесетия месец в отделните терапевтични групи, се установи статистически значима разлика ($H(3) = 25,6$, $p < 0,001$).

На *Фигура 3.6* са представени медианните стойности на WOMAC за четирите терапевтични групи в отделните периоди на изследване. Графично представено, макар и несигнификантно спрямо третата група, най-голямо подобрене в болестната активност се наблюдаваше при пациентите, лекувани с PRP.



Фиг. 3.6. Нива на WOMAC (медиани) в хода на лечение с а) глюкозамин сулфат, б) еднократна апликация на високомолекулна ХК, в) двукратна апликация на високомолекулна ХК, г) двукратен курс с PRP

Оценка на болестната тежест (Lequesne) в отделните групи. В

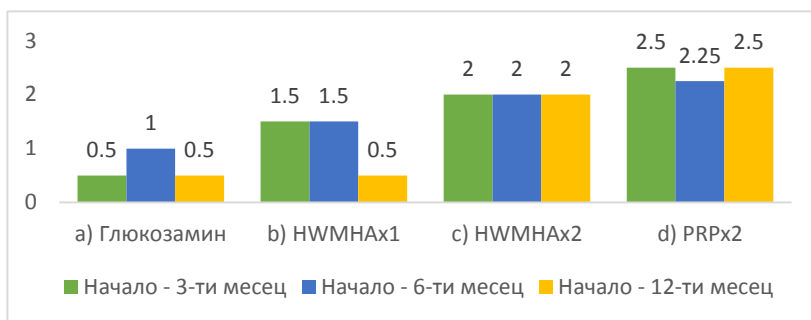
I група липсваше значима разлика в алгофункционалния индекс на Lequesne между началото (12 [4; 22]) и третия месец (11,5 [4,5; 21]), между началото и шестия месец (11 [4; 22]) и между началото и дванадесетия месец (11,5 [2,5; 23]) на лечение, съответно: $Z = -0,09$, $p = 0,93$; $Z = -0,75$, $p = 0,46$; $Z = -0,30$, $p = 0,77$ (*Фигура 3.7.а*).

Във II група е налице значима разлика в алгофункционалния индекс на Lequesne между началото (12 [4,5; 23]) и третия месец (10,5 [3,5; 18]), между началото и шестия месец (10,5 [3,5; 21]) на лечение, докато такава липсваше между началото и дванадесетия месец (11,5 [4,5; 23]) на

лечение, съответно: $Z = -3,62$, $p < 0,001$; $Z = -3,04$, $p = 0,002$; $Z = -1,08$, $p = 0,28$ (Фигура 3.7.б).

В III група е налице значима разлика в алгофункционалния индекс на Lequesne между началото (11 [5,5; 20]) и третия месец (9 [4; 18]), между началото и шестия месец (9 [4; 18,5]) и между началото и дванадесетия месец (9 [4; 15]) на лечение, съответно: $Z = -3,54$, $p < 0,001$; $Z = -2,86$, $p = 0,004$; $Z = -3,38$, $p = 0,001$. (Фигура 3.7.с).

В IV група е налице сигнафикантна разлика в алгофункционалния индекс на Lequesne между началото (10,5 [6; 21]) и на третия месец (8 [5; 17]), между началото и шестия месец (8,25 [4,5; 17]) на лечение и между началото и дванадесетия месец (8 [2,5; 16,5]) на лечение, съответно: $Z = -4,02$, $p < 0,001$; $Z = -4,15$, $p < 0,001$; $Z = -4,21$, $p < 0,001$. (Фигура 3.7.д).



Фиг. 3.7. Промяна (Δ) в болестната тежест според Lequesne индекса в терапевтичните групи през отделните времеви интервали

При проведен Н тест на Kruskal-Wallis, сравняващ промените в нивата на болестната активност между началната визита и дванадесетия месец в отделните терапевтични групи, се установи статистически значима разлика ($H(3) = 13,5$, $p = 0,004$). Последващото сдвоено сравнение очертава групите, между които тази разлика е налице.

Оценка на качеството на живот (HAQ-DI) в отделните групи. В I група липсваше значима разлика в алгофункционалния индекс на Lequesne между началото (1,13 [0,13; 2]) и третия месец (1,13 [0,13; 2]), между началото и шестия месец (1,13 [0; 2,13]) на лечение и между началото и дванадесетия месец (1 [0; 2,13]) на лечение, съответно: $Z = 0$, $p = 1$; $Z = -0,25$, $p = 0,81$; $Z = -1,38$, $p = 0,17$.

Във II група е налице значима разлика в качеството на живот, оценено чрез HAQ-DI, между началото (1 [0; 2,25]) и третия месец (0,75 [0,1; 2]), между началото и шестия месец (0,75 [0,1; 2,25]), докато такава липсваше между началото и дванадесетия месец (0,88 [0; 2,5]) на лечение, съответно: $Z = -3,99$, $p < 0,001$; $Z = -3,65$, $p < 0,001$; $Z = -0,902$, $p = 0,367$.

В III група е налице значима разлика в качеството на живот, оценено чрез HAQ-DI, между началото (1 [0,13; 2]) и третия месец (0,75 [0,13; 1,5]), между началото и шестия месец (0,75 [0; 1,5]) и между началото и дванадесетия месец (0,75 [0; 1,5]) на лечение, съответно: $Z = -3,2$, $p = 0,002$; $Z = -3,35$, $p = 0,001$; $Z = -3,35$, $p = 0,001$.

В IV група е налице сигнафикантна разлика в качеството на живот (HAQ-DI) между началото (0,88 [0,38; 1,5]) и третия месец (0,63 [0,25; 1,5]), между началото и шестия месец (0,63 [0; 1,62]) и между началото и дванадесетия месец (0,63 [0; 1,62]) от лечението, съответно: $Z = -3,6$, $p < 0,001$; $Z = -3,25$, $p = 0,001$; $Z = -3,25$, $p = 0,001$.

При проведен Н тест на Kruskal-Wallis, сравняващ промените в качеството живот между началната визита и дванадесетия месец в отделните терапевтични групи, се установи липса на статистически значима разлика ($H(3) = 5,74$, $p = 0,125$).

Минимално клинично значимо подобрене (МКЗП) на болката на първата година постигнаха 17,4% (4/23) пациенти в I група, 32% (8/25) пациенти от II група, 56% (14/25) от III група и 69,2% (18/26) от IV група. Това разпределение доведе до наличие на сигнификантна разлика в пропорцията повлияни пациенти по отношение на болката в групите ($\Phi = 0,405$, $p = 0,001$). МКЗП на болестната активност на първата година постигнаха 17,4% (4/23) пациенти в I група, 32% (8/25) пациенти от II група, 52% (13/25) в III група и 80,8% (21/26) в IV група. Това разпределение доведе до наличие на сигнификантна разлика в относителния дял на повлияните пациенти по отношение на болестната активност в групите ($\Phi = 0,477$, $p = 0,001$). Отговорилите на лечението според обединените критерии на OARSI и OMERACT на първата година бяха 26,1% (6/23) от пациентите в I група, 40% (10/25) от пациентите във II група, 60% (15/25) от III група и 84,6% (22/26) от IV група. Това разпределение показва наличие на сигнификантна разлика в относителния дял на постигналите отговор към лечението в отделните терапевтични групи ($\Phi = 0,442$, $p < 0,001$).

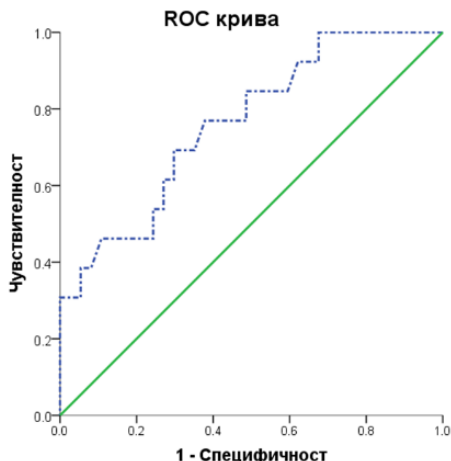
Резултатите от бинарна многофакторна логистична регресия (стъпкова процедура) показаха, че лечението с двукратно инжектирана високо-молекулярна хиалуронова киселина (III група) увеличава шанса за постигане на МКЗП на болката (VAS) с около 5 пъти в сравнение с групата, която приема глюкозамин сулфат (OR=4,76; 95% CI: 1,155-19,655, $p=0,031$), а попадането в IV група (лекувани с PRP) увеличава този шанс с над 10 пъти (OR = 10,3; 95% CI: 2,43-43,8, $p = 0,002$). Всяко нарастване на изходния индекс на телесна маса с 1, води до намаляване на шанса за МКЗП на болката с 20,2% (OR = 0,798; 95% CI: 0,687-0,928, $p=0,003$), независимо от начина на лечение. Подобна констелация наблюдавахме и при МКЗП на болестната активност (WOMAC). Лечението с двукратно инжектирана високомолекулярна хиалуронова киселина (III група) увеличава шанса за постигане на МКЗП на болестната активност с близо 6 пъти в сравнение с групата, която приема глюкозамин сулфат (OR = 6,05; 95% CI: 1,59-23, $p=0,008$), а лечението с PRP в два курса (IV група) увеличава този шанс с повече от 10 пъти (OR = 10,69; 95% CI: 2,74-41,74, $p = 0,001$). Отчете се също различна вероятност за постигане на обединените критерии на OARSI и OMERACT в отделните терапевтични групи. Лечението с двукратно приложена ХК увеличи шанса за постигане на отговор към терапията с над 4 пъти (OR = 4,25, 95% CI: 1,25-14,5, $p = 0,021$) в сравнение с лечението с глюкозамин сулфат, докато терапията с PRP – над 20 пъти (OR 21,7; 95% CI: 4,7-99,4, $p < 0,001$).

Средните нива на С-реактивен протеин при пациентите бяха $3,99 \pm 3,06$ mg/dL. Според референтните граници за лабораторията повишени нива (< 6 mg/dL) на CRP бяха наблюдавани едва в 21,2% (21/99) от пациентите в началото и 18,3% (17/93) на дванадесетия месец. Липсва сигнификантна разлика в относителния дял на пациентите с повишени нива на CRP, постигнали МКЗП и отговорили на терапията, както и на пациенти с или без прогресия в структурните промени. Началните нива на CRP корелираха сигнификантно с възрастта ($r_s = 0,23$, $p = 0,022$), оценката по Kellgren-Lawrence ($r_s = 0,22$, $p = 0,029$), магнитно-резонансната находка (цялостната оценка по WOMBS) ($r_s = 0,27$, $p = 0,007$), качеството на живот (HAQ-DI) ($r_s = 0,284$, $p = 0,004$), болката (VAS) ($r_s=0,415$, $p < 0,001$), тежестта на заболяването (Lequesne индекс) ($r_s = 0,3$, $p = 0,003$) и болестната активност (общия WOMAC скор) ($r_s = 0,38$, $p < 0,001$). Връзката с KL и WOMBS не остана значима след корекция за допринасящи фактори

(възраст, пол, болка). Корелациите на CRP с клиничните параметри се запазиха и на дванадесетия месец (N = 93). При базисната визита липсваше сигнификантна разлика между отделните терапевтични групи. Статистически значима разлика не бе установена и на дванадесетия месец. Връзка не бе установена между нивата на CRP (базални и на дванадесети месец) и прогресията на заболяването: не се установи корелация със структурните промени (WORMS) и промяната в клиничните параметри. Нямаше сигнификантна разлика при пациентите с прогресия и с липса на такава при рентгенографската находка.

MMP-3 – прогностичен белег за прогресираща хрущялна увреда. При 50 пациенти, приключили 12-месечния проследяващ период, бяха изследвани базалните нива на MMP-3 (ng/ml). Те, освен с генерализацията на остеоартроза, се асоциираха с прогресията на структурните увреди (промяната в общата WORMS оценка), отразяващи цялостната магнитно-резонансна оценка на коляното, след една година на проследяване ($r_s = -0,38$, $p = 0,006$). Нива над 60 ng/ml се наблюдаваха в 22% (11/50) от изследваните и проследени пациенти с ГоА, които бяха означени като MMP-3 позитивни. Останалите 78% от пациентите имаха нива на MMP-3 под 60 и бяха означени като MMP-3 отрицателни. В терапевтичните групи дялът на MMP-3 позитивните болни бе съответно 15,3% (2/13), 21,7% (5/23), 37,5% (3/8) и 16,7% (1/6) за I, II, III и IV група, без статистически значима разлика в пропорционалното разпределение ($\Phi = 0,176$, $p = 0,670$). Сигнификантно по-високи стойности бяха наблюдавани при пациенти с настъпила прогресия на хрущялната увреда в медиалния компартмент на коляното (30,7 [12,6; 82,5]), отколкото при пациентите с липса на прогресия (44,3 [26,1; 128,2]) на дванадесетия месец, Mann-Whitney U = 114,5, $p = 0,005$. Всяко покачване на MMP-3 с 1 ng/ml увеличава шанса за прогресия на хрущялната увреда в медиалната тибιο-феморална става с 4% (OR = 1,043, CI 95%: 1,01-1,08, $p = 0,01$). Бинарен логистичен регресионен анализ показва, че по-високите от 60 ng/ml начални нива на MMP-3 увеличават шанса за последваща прогресия на хрущялната увреда в медиалния отдел на индексното коляно с над 6 пъти, установени чрез MPT след 12 месеца проследяване (OR 6,28, CI 95% 1,3-30,5, $p = 0,023$). Потенциални ко-фактори (възрастови групи, пол, терапия, генерализирана ОА) не допринасяха за този резултат след провеждане на Mantel-Haenszel тест и парциален коефициент на корелация.

При анализ на ROC крива, с цел отграничаване на прогресорите от непрогресорите за настъпване или влошаване на хрущялната увреда, въз основа на началните нива на MMP-3, площта под кривата (AUC) за серумните нива на MMP-3 бе 0,761. ROC анализът определи гранични нива от 40,8 ng/ml с чувствителност 69,2% и специфичност 70,3%. 100% специфичност за серумния MMP-3 се постигна при нива на биомаркера под 26,1 ng/ml с чувствителност 32,4% (Фигура 3.8).



Фиг. 3.8. ROC крива за отграничаване на прогресори от непрогресори с помощта на серумните нива на MMP-3 при AUC = 0.761

Рентгенографска прогресия. Рентгенография е проведена в началото и на дванадесетия месец от проследяването. Липсваше статистически значима разлика в разпределението по рентгенографските стадии в началото ($\Phi = 0,24$, $p = 0,44$) и дванадесетия месец ($\Phi = 0,252$, $p = 0,390$) между отделните терапевтични групи.

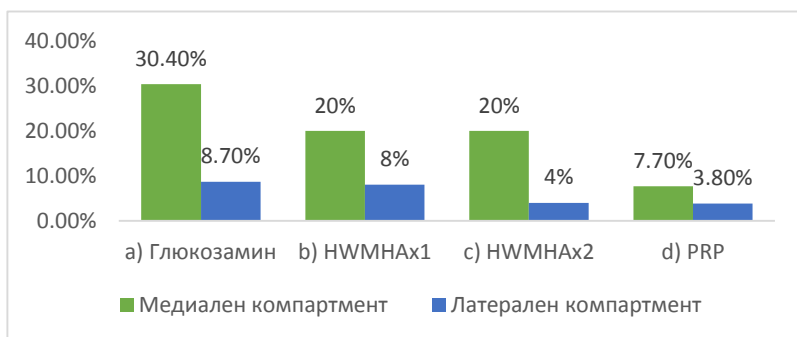
При анализ на рентгенографиите на дванадесети месец и сравнението им с тези от началото на проучване се установява, че по един пациент от II, III и IV група са преминали от първи рентгенографски стадий по KL във втори. В I група липсваха пациенти с първи рентгенографски стадий в началото и отчетена прогресия на дванадесетия месец. От втори рентгенографски стадий в трети са преминали 2, 2, 0 и 0 съответно в I, II, III и IV групи в рамките на едногодишния период на проследяване. Обратно развитие не се наблюдава при нито един пациент. Общият брой на

пациентите с прогресия, бе 7,1% (7/99). Липсваше статистически сигнификантна разлика в пропорцията на рентгенографските прогресори между отделните групи ($p = 0,618$).

Промени в магнитно-резонансната находка. МРТ е проведена в началото и на дванадесетия месец от проследяването. Средните стойности на промяната в общия WORMS скор (отразяващ комплексната оценка на отделните тъкани при ОА) е $-0,93 \pm 4,8$ (Mdn = 0; Min = -16; Max = 14)). Независимо от терапията, средните стойности на общия WORMS са намалели с приблизително 1 единица за период от 12 месеца. Не се установи статистически значима разлика в нивата на промяна на общия WORMS между отделните терапевтични групи ($F(3; 95) = 0,897, p = 0,482$).

Сигнификантна разлика в промяната на общата WORMS оценка се отчете между рентгенографските прогресори и непрогресори ($-6,6 \pm 5,3$ и $-0,5 \pm 4,5$, респективно, $t[97] = 3,41; p = 0,001$).

Отчете се прогресия в увредата на хиалинния хрущял на медиалния компартмънт на индексното коляно при 19,2% (19/99) от пациенти на дванадесетия месец. По групи отчетеното влошаване на хиалинния хрущял е 30,4% (7/23), 20% (5/25), 20% (5/25) и 7,7% (2/26) съответно в I, II, III и IV групи. Екзатният тест на Фишер не установи разлика между групите ($\Phi=0,2; p=0,25$). При отчитане на прогресията в хрущялната увреда на латералния тибioфеморален компартмънт на индексното коляно се установи, че влошаване е налице при 8,7% от пациентите в I група, 8% във II група, 4% в III група и 3,8% в IV група. Липсва статистически значима разлика в групите ($p = 0,84$) (Фигура 3.9).



Фиг. 3.9. Пациенти с прогресия в хрущялната увреда по терапевтични групи

Освен нивата на MMP-3, прогностичен фактор за влошаване на хиалинния хрущял беше индекса на телесна маса в началото на проучването, (OR=1,208; 95% CI: 1,048-1,390, p=0,009). Всяко нарастване на ИТМ с 1 kg/m², води до увеличаване на шанса за прогресия с 20,8%.

Придържане към лечението. В хода на проследяване отпаднаха почти половината от пациентите в първата група (20/43), лекувани с глюкозамин сулфат. При тях се установи най-лош комплайънс към терапията в сравнение с останалите три терапевтични рамена, като 11 болни започнаха лечението с глюкозамин сулфат, но в хода му бяха изключени поради по-кратък прием от заложения в дизайна.

Съответно 5, 4, 3 и 1 пациенти от I, II, III и IV група не се явиха при една или повече от проследяващите визите и бе невъзможно тяхното проследяване, поради което отпаднаха от крайния анализ на данните.

Един пациент от групата с PRP отпадна от проследяването поради нежелание за последващи ставни манипулации след първата поставена инжекция. При него не се наблюдаваха странични реакции след манипулацията.

Регистрирани странични реакции. В хода на проследяването 1 (2,3%) пациент отказа прием на глюкозамин сулфат след първия месец поради покачване на телесно тегло, което свързва с приема на изследваното средство. 1 пациент съобщи за транзиентен „стомашен дискомфорт“ след прием на глюкозамин сулфат, което обаче не доведе до спиране на препарата, тъй като отмина след третия прием. 1 пациент от втората група съобщи за транзиентен оток и затопляне в областта на инжектираното с ХК коляно, които отзвучаха в рамките на 24 часа след апликацията. Пациентът бе инструктиран да приеме парацетамол и да прилага лед локално, да повдигне долния си крайник високо и да се въздържа от физическа активност за период от 24 часа. При двама пациенти (7,6%) от четвъртата група наблюдавахме преходна болка и оток в инжектираното коляно, които отзвучаха след прилагане на лед, покой, прием на парацетамол, елевация на крайника. Единият от тези пациенти не бе следвал стриктно нашите препоръки за почивка след интраартикуларното приложение на богата на тромбоцити плазма, описани подробно в материали и методи. Този страничен ефект не отказа нито едни от пациентите да продължат участието си в проучването, съобразно неговия протокол.

4. Обсъждане

В настоящото проучване си поставихме за цел да съчетаем и съпоставим добре познатите и използвани в рутинната клинична практика методи за диагностика с други иновативни и малко проучени диагностични модалности, с оглед постигане на комплексна оценка на основните ключови компоненти на заболяването. По този начин събрахме ценна информация, от една страна, за клиничните и образните характеристики на болестта като болка, ограничена функция, скованост и структурна увреда, а от друга страна – информация за процесите на ставно ремоделиране, използвайки набор от серологични биомаркери. С помощта на тези методи, част от които препоръчани от международната организация OARSI, сравнихме болни в различни стадии на заболяването помежду им и със здрави контроли. Едногодишният период на проследяване чрез образни методики не е случайно избран, а е в съответствие с актуалните препоръки за определяне на минималния времеви интервал за детекция и акуратна оценка на структурните промени чрез рентгенография и МРТ.

Включените в проучването пациенти и контроли бяха балансирани по антропометрични характеристики като пол и индекс на телесна маса. Все пак съществуваше сигнификантна разлика във възрастта на пациентите, тъй като не успяхме да подберем контроли над 60-годишна възраст, при които да липсват данни (клинични или рентгенографски) за гонартроза. Този проблем се очертава основен за проучванията с участие на пациенти с ГоА. ОА е класически пример за асоциирано с възрастта заболяване и често, дори и асимптоматични, пациентите над 60-годишна възраст показват белези на ГоА при снемане на щателна анамнеза и преглед, и провеждане на рентгенография. Все пак в нашите анализи коригирахме данните по възраст чрез статистически способности. Повечето участници в проучването бяха от женски пол, което се обяснява с факта, че ГоА е по-често срещана при жени и относително по-голям брой пациенти от женски пол потърсиха медицинска помощ в изследователския център и писмено се съгласиха да участват в изследването.

В подбора на пациенти насочихме нашите усилия към селектиране и последващ анализ на популация от болни с различна продължителност на болестта и разнородни по характер реализирани структурни промени.

Само по този начин бихме успели да обхванем възможно най-голям спектър на въздействие на болестта върху пациента.

В дизайна на проучването имплементирахме най-популярните форми на лечение в рутинната клиничната практика, които сравнихме с по-малко познато терапевтично средство в лицето на PRP. За целта бе използван кит (TriCell® [Rev-Med Inc, Korea]), който разделя отделните фракции на кръвта чрез двуетапно центрофугиране (double-spinning) и позволява постигане на концентрация на тромбоцити 5 пъти над тази в кръвта на конкретния пациент. И накрая се опитахме да отговорим на въпрос с голяма приложно-практическа стойност, а именно кой е оптималният терапевтичен режим при пациенти с гонартроза, предвид ограничения набор от средства, с които разполага българският ревматолог?

Оценка на болката. Болката е доминантният симптом при ГоА, който кара пациента да посети кабинета на ревматолога. В представените резултати интезитетът ѝ корелираше положително с възрастта на пациентите, но по-важното е, че тя показва по-силна връзка с давността на оплакванията. Това отчасти отдадохме на напредналите структурни промени, но и на централните механизми на сенсibiliзация, присъщи за пациентите с ОА. „Очувствяването“ към болкови стимули се осъществява чрез развитие на сенсibiliзиращи централни ноцицептивни вериги, които амплифицират болковото усещане, при различна степен на периферна тъканна увреда. Полът може да бъде рисков фактор за сенсibiliзация, предполагат скорошни изследвания и подобна констатация може да бъде направена от настоящето проучване, където бе налице сигнификантна разлика между двата пола в болковото възприятие. Жените отбелязаха статистически по-високи нива на болка върху визуалната аналогова скала, въпреки че те не се отличаваха статистически значимо от мъжете по своите структурни увреди, оценени посредством рентгенография и МРТ. Някои автори предполагат, че половите различия се дължат по-скоро на по-ниския болков праг, съчетан с по-голямата чувствителност на жените към болка, отколкото на напреднали структурни промени. При анализа на данните оценката на болката според Likert скалата не показва особени различия спрямо VAS, което говори за взаимозаменяемост на двете скали. Тези данни са в

съответствие с констатираните в други проучвания резултати при пациенти с ГоА.

Пациентите, стратифицирани според нивата на болка, се характеризираха както със сигнификантна разлика при отчитане на останалите клинични параметри като качество на живот, болестна активност и тежест, така и с различна степен на структурна увреда. Интересен е фактът, че липсваше сигнификантна разлика между двете групи с най-висок интензитет на болка (60-80 mm и ≥ 80 mm върху визуалната аналогова скала) по отношение на качеството на живот, болестната активност, болестната тежест и структурните промени, оценени чрез образните методи. Тези резултати говорят от една страна за многофакторните механизми, които играят роля в определянето на перцепцията за болка на болния с ГоА, а от друга – за известно несъответствие между интензитета на болката и реализираните структурни увреждания в резултат на болестната активност. Още повече при проследяване на лекуваните пациенти не се отчете корелация между рентгенографската находка и интензитета за болка. Това говори още веднъж в полза на твърдението, че основна роля във формирането на болковия усет играят централните механизми на въздействие и възбуда, подобно на фибромиалгичния синдром.

В лонгитудиналната част на настоящото изследване се установи сигнификантна разлика в болката между началото и третия месец, между началото и шестия месец и между началото и дванадесетия месец в хода на лечение с интраартикуларна хиалуронова киселина (II и III група) и богата на тромбоцити плазма (PRP, IV група). Ефектът на лечението с глюкозамин сулфат бе по-късно осезаем, като то доведе до статистически сигнификантно намаляване на болката едва на шестия месец. Оценени на дванадесетия месец, пациентите в I и II група имаха сходна промяна в болковото възприятие.

Провеждането на лечение с PRP според протокола на проучването превъзхождаше терапията с глюкозамин сулфат и еднократно инжектиране на хиалуронова киселина при болни с гонартроза в края на проследявания период по отношение на облекчаване на болката, а при сравнението с двукратното инжектиране на високомолекулна хиалуронова киселина (IV група) се наблюдават сходни резултати. Необходимо е да се отбележи, че макар и незначима, имаше разлика от почти 3 mm в

болковата перцепция върху VAS скалата в полза на PRP, която може да достигне “сигнификантност” при по-голяма кохорта от пациенти или по-дълъг период за проследяване. Нашите клинични резултати бяха в съответствие със скорошни литературни съобщения, сравняващи ефекта върху болката на PRP и ХК при пациенти с гонартроза, които показват, че богатата на тромбоцити плазма е поне толкова ефективна в облекчаване на болката, колкото ХК.

В този си формат, по наши данни, това е първото изследване, което сравнява подобен „интензифициран“ (състоящ се от 2 курса през 6 месеца по 3 инжекции) PRP режим с най-често използваните в клиничната практика лечебни режими за повлияване на болката при гонартроза. Предпочетохме провеждането на 2 курса PRP през шест месеца, поради факта, че предишни проучвания показват, че при провеждане на еднократен курс нивата на болка прогресивно се повишават между 24 и 52 седмица от проследяването. В настоящото изпитване не открихме сигнификантна разлика на болката между шестия и дванадесетия месец в групата на PRP, въпреки че известно подобрене, макар и несигнификантно, имаше. Само чрез подобен интензифициран инжекционен режим на PRP, какъвто сме приложили, можем правилно да оценим наличието или не на болестопроменящ (в това число хондропротективен) ефект от терапията. Според нас въведените еднократно или в рамките на няколко седмици анти-инфламаторни цитокини и растежни фактори, съдържащи се в богатата на тромбоцити плазма, не биха достигнали критичния минимум за значима промяна на дисбаланса, който стои в основата на активирана каскада от протеолитични ензими, водеща до хрущялна деструкция.

Особен интерес от практическа гледна точка представляват резултатите от директното сравнение в края на първата година на еднократното с двукратното (през 6 месеца) инжектиране на ХК – два от най-често прилаганите режими на вискосуплементация с кръстосаносвързана ХК при пациенти с ГоА в рутинната практика. Представените данни показват, че еднократното приложение на използваната в проучването ХК води до статистически значимо подобрене на болката дори и на 12 месец, въпреки че ефектът прогресивно намалява след третия месец. Когато сравняваме двата режима на инжектиране на ХК, средната разлика в промяната на болката

бе около 9 mm в полза на двукратното инжектиране, но този резултат не е достатъчен за достигане на „статистическа“ сигнификантност. Ако търсим максимален ефект върху болката, би било логично да изберем двукратен режим, но ако вземем под внимание и финансовия аспект, вероятно би ни задоволил и еднократното инжектиране на кръстосаносвързана ХК за период от 1 година.

Болестна активност. Оценката на болестната активност е извършена с помощта на WOMAC индекса, който включва основните симптоми на заболяването, а именно – болка, физическа функция и скованост. Индексът на WOMAC е първоначално разработен за употреба при пациенти с гонартроза и коксартроза, а години по-късно намира приложение и при пациенти с други ревматични заболявания.

След анализ на резултатите се установи, че за разлика от болката, болестната активност не корелираше с давността ѝ, а само с възрастта. Тенденция, без наличие на статистическа връзка, се наблюдаваше между ITM и WOMAC индекса.

Изследването на WOMAC индекса в различните времеви интервали при отделните групи показва сходни резултати с тези за болката, разгледани в предходната точка. Съществена разлика се установи в I група, където се наблюдава статистически значима промяна на болестната активност в началото и на трети месец. Тази констелация може да се обясни с факта, че общият WOMAC индекс включва, освен оценка на болката чрез Likert скала, но и раздели, оценяващи сковаността и физическата функция, което прави методът по-чувствителен към промени, продиктувани от терапията. Като отделен компонент от WOMAC индекса, сковаността обаче не е повлияна в степен на статистическа значимост в I група в рамките на 12-месечния период на проследяване. Провеждането на двукратен курс на инжектиране на PRP показва превъзходство в намаляване на болестната активност спрямо пероралния прием на глюкозамин сулфат и еднократното инжектиране на изследваната ХК, оценено в края на първата година. Спрямо двукратното инжектиране на ХК през 6 месеца данните показват, че PRP е поне толкова ефективна в постигането на подобрение.

Болестна тежест. С помощта на алгофункционалния индекс на Lequesne може да се оцени тежестта на заболяването, ефективността на фармакологичните интервенции и да се подпомогне процеса на подбор на

кандидати, подходящи за ендопротезиране. С негова помощ е възможна стратификацията на пациентите в зависимост от тежестта на заболяването в пет групи. В крос-секционната част стойностите на Lequesne показваха връзка с възрастта на пациентите, давността на болката и ИТМ. Медианата на алгофункционалния индекс е 11 точки, като избраната кохорта пациенти е предимно с тежка и много тежка ГоА. Добрата корелация с HAQ-DI ($p < 0,001$) предполага, че доминантната част от пониженото качество на живот и инвалидизацията се дължат именно на болестната тежест при болни от ГоА, въпреки полиморбидитета на изследваната популация.

При проследяване на отговора към лечение с глюкозамин сулфат липсва сигнификантна разлика в болестната тежест според индекса на Lequesne между началото и останалите измервания, извършени на трети, шести и дванадесети месец. Това говори, че въпреки известното облекчаване на болката и ставната функция, глюкозамин сулфатът има по-малък ефект по отношение на един по-консервативен показател, какъвто е тежестта на заболяването. При еднократно инжектиране на високомолекулна хиалууронова киселина също липсва сигнификантен ефект след 1 година проследяване. В сравнение с другия използван болест-специфичен въпросник WOMAC и оценката на болката според VAS се установява, че индексът на Lequesne е по-малко чувствителен към промени и може би нетолкова ефективен за проследяване на симптоматичното подобрене. Тази констатация е направена още от Stucki и сътрудници, а по-късно потвърдена от Konstantinidis в гръцка популация.

Качеството на живот. Първоначално разработен за оценка на качеството на живот при ревматоиден артрит, въпросникът HAQ-DI (още известен като съкратената форма на HAQ) се прилага в широка гама от заболявания, включително ГоА. Докладваната от нас медиана за HAQ-DI (0,88) в изследваната популация от пациенти с ГоА е сходна с рапортуваните стойности в епидемиологични проучвания на по-големи кохорти от пациенти.

Проведеният множествен линеен анализ показва, че стойностите на HAQ-DI могат да бъдат прогнозирани с голяма точност, когато са известни индексите WOMAC и Lequesne, извлечени от болест-специфични въпросници, както следва:

$$\text{HAQ} - \text{DI} = -0,23 + 0,014 * (\text{WOMAC}) + 0,045 * (\text{LEQ}),$$

където WOMAC и LEQ са съответно оценките в WOMAC и Lequesne индексите. Имайки предвид и коефициента на детерминация на представения модел, двата болест-специфични индекса определят близо 63% от вариациите в стойностите на HAQ-DI.

В хода на лечение статистически значимо подобрение е налице единствено в III и IV група. Въпреки това при анализ на промяната между началото и дванадесетия месец, HAQ-DI е единственият клиничен параметър без статистически значима разлика в отделните групи.

МКЗП и отговор към терапията. Оказва се, че статистически значимата промяна невинаги съответства на клинично значимото подобрение на индивидуално ниво. Поради тази причина се въвежда терминът минимално клинично значимо подобрение (МКЗП), който се дефинира като най-малката промяна в измерването на определен клиничен показател, която води до значимо подобрение на симптомите на пациента. Към днешна дата МКЗП изглежда най-подходящият показател за дихотомизация и поляризация на болните, с цел проследяване на отговора към приложената терапия. МКЗП дава допълнителна информация на читателя за размера на реализирания ефект чрез предоставяне на по-съдържателна информация под формата на брой (респективно процент) подобрили се болни в хода на лечение. Това се оказва валидно и за нашия масив от данни: При пациентите, лекувани с PRP, се постигна сигнификантно по-висока честота на МКЗП, отчитащо болестната активност, в сравнение с всички останали терапевтични групи, включително и пациентите, провели лечение с двукратни инжекции на кръстосаносвързана ХК. Лечението с PRP увеличи шанса за постигане на МКЗП на болестната активност с около 2 пъти в сравнение с терапията, приложена в III група, с 5 пъти в сравнение с II група и с над 10 пъти в сравнение с I група. До подобна констатация е достигнато и в скорошен мета-анализ, сравняващ ефективността на PRP и хиалуронова киселина. В друг мета-анализ, изготвен от Chang и сътрудници и включващ 16 отделни проучвания, се установи, че PRP е по-ефективен начин на лечение от терапията с плацебо и кортикостероиди.

Освен от груповата принадлежност, постигането на клинично подобрение на болката зависеше от ИТМ на пациентите, като всяко

покачване на изходния индекс на телесна маса с 1 kg/m^2 , водеше до намаляване на шанса за МКЗП на болката с 1/5. White и неговият колектив също наблюдават подобна зависимост. При тях клинично подобрените пациенти са имали по-нисък ИТМ, по-висока скорост на ходене и по-малко симптоми на депресия. Още повече, че в същото проучване се отчита връзка между понижаването на телесната маса в хода на проследяване и симптоматичното подобрене при болни с ГоА.

Данните за постигнат OARSI отговор на 12 месец бяха най-впечатляващи за лекуваната с PRP група – при цели 22 от 26 (84,6%) проследени болни се постигна отговор към терапията, което е значително по-висок процент от лекуваните пациенти в останалите терапевтични групи.

От изнесените дотук данни можем да заключим, че, що се отнася до облекчаването на симптомите, провеждането на 2 курса с интраартикуларно инжектиране на PRP през 6 месеца е поне толкова ефективна терапия (ако не и по-ефективна), колкото двукратното инжектиране на кръстосаносвързана високомолекулна хиалуронова киселина през 6 месеца при едногодишно проследяване.

Биомаркери. Въпреки че в световен мащаб темата изглежда широко изследвана, всички биомаркери за ОА се класифицират като кандидати и нито един от тях не е навлязал в рутинната клинична практика. В този контекст обстойното изследване и сравнение на COMP, MMP-3, Coll 2-1 и CRP, използвайки клинични и образни методи, би било ценно с цел по-нататъшна валидация, определяне на референтни граници и разработването на диагностични алгоритми, комбиниращи панел от биомаркери с или без други диагностични модалности.

Серумните нива на Coll2-1, COMP и MMP-3 не отразяваха нито един от заложените клинични параметри при пациентите с ГоА. Това вероятно се дължи на факта, че докладваните от пациента болка и ограничена функция се основават на психо-емоционалното му състояние и индивидуалния праг на болка, което води до несъответствие в някои случаи между симптомите и структурните увреди или биомаркерите, отразяващи ремоделиращите ставата процеси.

С-реактивен протеин. С-реактивният протеин е острофазов белтък, който се продуцира от хепатоцитите и адипоцитите и се регулира от про-инфламаторни цитокини. Граничните нива на CRP се наблюдават

при заболявания, характеризиращи се с локален, нискостепенен възпалителен процес, какъвто е случаят с исхемичната болест на сърцето. Гонартрозата не прави изключение от това правило: в настоящото проучването серумните нива на CRP се различаваха значимо между пациентската и контролната групи, въпреки че средните нива при болните останаха в референтни за нашата лаборатория граници (< 6 mg/L). Подобно твърдение изказват още през 1997 г. Spectog и сътрудници, като в тяхната група нивата на CRP са били умерено, но сигнификатно повишени при жени с ранна гонартроза. Тези нива са предсказали болестната прогресия през следващите 4 години на проследяване – твърдение, което ние не потвърдихме, вероятно поради по-късия период на проследяване. От друга страна скорошен мета-анализ показва, че серумната концентрация на CRP няма съществена предиктивна стойност за прогресията на структурните увреждания при ГоА (OR=0,99; $p = 0,93$).

В различните студия се отчита голяма разлика в средните нива на CRP, вариращи от 0,9 до 9,8 mg/L. За настоящото проучване средните нива на CRP бяха 3,99 mg/L. Вариабилността в нивата на CRP може би се дължат на различните техники за изследване на острофазовия показател или на факта, че в някои студия болните с CRP над определена стойност за били изключени, поради опасения за наличието на придружаващо възпалително ставно заболяване.

Във връзка с проследяване на прогресията, изходните и крайните нива на CRP и тяхната промяна във времето не предоставиха ценна информация за прогресията в клиничните или структурните характеристики на пациентите с ГоА. Според мета-анализ от 2010 от всички разгледани студия, изследващи асоциацията на CRP с прогресията на ОА, липсват категорични данни, които свързват този възпалителен показател с прогнозата на ГоА.

Coll 2-1. Серумните нива на изследвания биомаркер не се различаваха между болни и здрави индивиди. Те не корелираха нито с интензитета на болката, тежестта, физическата функция и инвалидизацията, нито със структурните промени, оценени чрез рентгенография и MPT. Нивата на Coll 2-1 не показаха връзка с останалите изследвани серумни биомаркери, в това число – CRP, COMP и MMP-3. Тези резултати са в противовес на докладваните от Deberg и Henrotin, и техните колективи. Това несъответствие може да се обясни с малкия брой

пациенти, които бяха изследвани в настоящото проучване, както и с различните китове, които бяха използвани. Нивата на Coll2-1 по време на началната визита не отразяваха нито клиничното подобрене, нито структурната прогресия в изследваните групи.

COMP. Деструкцията на хиалинния хрущял е една от основните характеристики на артрозната болест и логично серумните нива на разградните продукти на ставния хрущял като COMP да се увеличават при пациенти с ГоА и напреднали структурни промени. MMP-3 е важен ефектор на хрущялния метаболизъм и затова неговата корелация с COMP не е изненадваща. Серумните нива на COMP могат да бъдат полезни в диагностиката на ГоА и за отграничаването на пациенти от здрави индивиди.

Освен рентгенографската прогресия COMP отразява в добра степен и магнитно-резонансната находка, оценена чрез полуколичествена скала WORMS. Този резултат потвърждава твърдението на Bruyere, който установява също статистически значима връзка между серумните нива на COMP и WORMS. Допълнителната верификация на тези резултати в големи кохорти може да подпомогне процеса на имплементиране на COMP и други биомаркери в клиничната практика в определени случаи, когато употребата на MPT е ограничена поради нейната висока цена, лимитирана наличност или множество контраиндикации. Следваща стъпка, която предприехме и описахме в резултатите, е корелацията на отделните структурни промени, оценени с MPT и COMP, хвърляйки известна светлина върху енигматичните патогенетични механизми на болестта. Установени чрез магнитно-резонансна томография и оценени чрез WORMS, костно-мозъчните лезии и увредата на хиалинния хрущял корелираха в най-висока степен с нивата на COMP и бяха негови независими предиктори.

Проведеният множествен линеен анализ показва, че серумните нива на COMP могат да бъдат прогнозирани, когато са известни стойностите на костно-мозъчния едем и хрущялната увреда, извлечени след анализ на MPT и оценени чрез полуколичествения скор WORMS.

Подобно на костно-мозъчния едем при възпалителните ставни заболявания, костно-мозъчните лезии отразяват моментното възпаление при ГоА. Предвид корелацията им с нивата на COMP, нашите данни могат да служат за потвърждение на твърдението, че възпалителният процес в

колянната става (в частност субхондралната кост) води до интензивно разграждане на хиалинен хрущял и повишен инфлукс на СОМР в серума. Друг биомаркер, също показал завишени стойности при наличие на магнитно-резонансни данни за възпаление на субхондралната кост, е уринарният СТХ-II, метаболит на колаген тип II. Неговите нива корелират с присъствието и степента на костно-мозъчен едем, оценен чрез МРТ при пациенти с ГоА.

Матриксна металопротеиназа 3. Серумните нива на MMP-3 отразяваха генерализацията на артрозния процес, изразяваща се в ангажиране на поне още една ставна зона, освен коляното. Полиартикуларната остеоартроза, не само нейната тежест, може да бъде основен фактор, който повлиява серумните концентрации на MMP-3. Въпреки че тази хипотеза не е нова и е изказана за пръв път през далечната 1999 г. от Naito и колеги, тя все още остава слабо проучена. Тъй като MMP-3 се секретира от хондроцитите и синовиалните клетки, неговите серумни нива кореспондират със степента и площта на засегнатата синовиална и хрущялна тъкан.

Биомаркерите на ставна увреда като MMP-3 могат да носят потенциално важна информация за бъдещите структурни промени при пациенти с ОА. В изследваната група, нивата на MMP-3 се асоциираха и бяха независим предиктор за прогресията на структурните увреди, оценени чрез промяната в общата WORMS оценка. Бинарна логистична регресия показва, че при пациенти със серумни нива на ензима над 60 ng/ml шансът за прогресия на хрущялната увреда на медиалния регион на тибео-феморалната става е увеличен с над 6 пъти след период от 12 месеца. Отделно всяко покачване на MMP-3 с 1 ng/ml увеличи вероятността за влошаване на хрущялната увреда с 4%. Тези резултати не зависеха от проведеното лечение и/или от генерализацията на артрозната болест. Въз основа на тези данни бе построена ROC крива, която определи стойност от 40,8 като гранична между прогресори и непрогресори.

Доколкото ни е известно, към днешна дата това е първото проспективно проучване, което установява връзка между нивата на MMP-3 и последващата магнитно-резонансната прогресия на хрущялната увреда при пациенти с ОА. Връзката между нивата на MMP-3 и структурните промени предполага, че този биомаркер може да се използва

като сурогатен показател в клиничните проучвания на болест-модифициращи средства, които протектират ставния хрущял.

Образни проучвания. Рентгенографията представлява „златен“ стандарт в диагностиката на ГоА и отправна точка за стратификация на групите в представеното проучване. Въпреки това то притежава редица недостатъци. Най-важният от тях, в контекста на настоящото изследване, е ниската чувствителност към промени на ставните структури, реализирани за кратък период от време. Ето защо ние бяхме длъжни да включим в дизайна на проучването метод с по-висока чувствителност в лицето на МРТ, с цел проследяване на тъканните промени.

Рентгенография. Оценката по KL корелираше с болката, болестната активност, тежестта и качеството на живот. Най-осезаемо различие в отделните рентгенографски групи има в качеството на живот. Медианата на пациентите в KLI стадий на ГоА е 0,5, което ги определя като болни с предимно лека към умерена степен на инвалидизация, докато в групата на пациентите с KLIII медианата на HAQ-DI е 1 – стойност отговаряща на умерена към тежка инвалидизация.

Рентгенографска прогресия се наблюдава в общо 7 болни в четирите терапевтични групи на дванадесетия месец от началото на проследяването. Статистическа разлика между групите не се установи. Възможно е това да се дължи на ниската честота на това събитие в групите, респективно 8,7%, 12%, 4% и 3,8% в I, II, III и IV група, и малкия брой участници.

Магнитно-резонансна томография. Използването на МРТ и извлечените посредством разчитането ѝ данни са се превърнали в задължителна част от методологията на клиничните изпитвания при пациенти с ГоА. Литературни данни показват, че полуколичествената оценка на магнитно-резонансната находка при ГоА е валиден и надежден метод, който подпомага изследователите в по-доброто разбиране на естествения ход на комплексната природа на болестта и в селектирането и оценката на потенциално нови терапевтични средства в клиничните изпитвания. Съществуват няколко надеждни полуколичествени оценъчни системи, които са валидирани в големи, многоцентрови, крос-секционни и лонгитудинални, епидемиологични и интервенционални проучвания. В представеното проучване предпочетохме да използваме предложението от Peterfy полуколичествен скор за магнитно-резонансна оценка на

колянната става – WORMS. Методът се отличава с предоставяне на точна информация за пространствените взаимодействия между различните структурни промени при гонартроза в сравнение с останалите полуколичествени оценъчни системи, поради относително по-големия брой включени ставни повърхности и по-голямата площ оценена субхондрална кост.

Нашите резултати показват, че костно-мозъчните лезии са свързани както с най-важния симптом при ОА – болката ($p = 0,002$), така и с цялостната болестна активност (общия WOMAC скор) ($p = 0,006$) и сковаността, оценена отново чрез WOMAC индекса ($p = 0,001$). Връзката между костно-мозъчните лезии и нивата на болка не може напълно да бъде обяснена със съпътстващи фактори като тежест на рентгенографската прогресия и наличието на излив. Ето защо резултатите потвърждават, че костно-мозъчните лезии при ГоА допринасят за появата на болка при болните. В друга статия по темата Arnoldi и колеги съобщават, че пациентите с ГоА и придружаваща болкова симптоматика често имат повишено налягане в костната структура поради слабия венозен дренаж от костния мозък. Такива пациенти имат положителна сцинтиграфска находка при използване на радиофармацевтик като технеций (^{99m}Tc) станипирофосфат – находка, която силно корелира с костно-мозъчния едем на МРТ.

Данни от по-нови проучвания показват, че не само интензитета, но и честотата във флукуацията на болката е асоциирана със синовиата и костно-мозъчния едем, като последният е по-силен предиктор за настъпване на болка в коляното. Подобриенето на костно-мозъчните лезии е било асоциирани с намален риск за рецидив на болката, а при наличие все пак на такъв, болката е била с по-нисък интензитет. При хистологични срезове се оказва, че костните участъци, в които се визуализира костно-мозъчни лезии от МРТ, съответстват на зони с костно-мозъчен едем, некроза или фиброза, но могат да бъдат и нормална тъкан.

Освен костно-мозъчните лезии, загубата на хрущял, остеофитозата и синовиът или ставният излив също корелират с болката. Възпалението на синовиалната мембрана по презумпция се асоциира с възпалителните ставни заболявания, но в последните години се доказва, че ниско-степенното възпаление е неизменна част от патогенетичните механизми на ОА. Пролиферацията на синовиата и разграничаването ѝ от

ставния излив може най-акуратно да се прецизира чрез контрастно усилване с гадолиний, което би подобрила визуализацията на възпалението.

По-доброто разбиране на магнитно-резонансните характеристики на ОА и асоциацията им с болката ще внесе голяма доза яснота върху точните патогенетични механизми на болестта, а в дългосрочен план ще допринесе за разработването на лечение, което да таргетира точния субстрат на болката. Една от задачите на представеното от нас лонгитудинално проучване е именно да проследи структурните промени при оболени пациенти за период от 1 година.

Въпреки че ГоА често има инвалидизиращ и необратим ход, в представеното проучване прогресия в хрущялната увреда за период от една година е установена едва в около 1/5 от пациентите, а средната промяна в WORMS е едва 1 единица. Сред независимите предиктори за хрущялна увреда в медиалния тибео-ферморален регион бяха ИТМ и нивата на MMP-3. Тъй като по-горе се обсъдиха обстойно нивата на MMP-3 като независим предиктор, тук ще се спрем по-подробно на наднорменото тегло (респективно затлъстяването). Всяко нарастване на ИТМ с 1 kg/m^2 , води до увеличаване на шанса за прогресия с 20,8%. Тъй като по-голяма хрущялна загуба при пациенти с висок ИТМ е бил докладван и в други публикувани проучвания, тя бе очаквана от нас. За съжаление обаче употребата единствено на ИТМ като мярка за телесна композиция не предоставя адекватна информация за връзката между затлъстяването и ОА, тъй като ИТМ отразява количествено както мастната, така и мускулната маса. Още повече отношението между килограмите и височината в метри² не притежава информативна стойност по отношение на метаболитната среда, характерна за индивида, или нивата на адипоцитокени, които вероятно допринасят за прогресията на ГоА. В бъдеще е необходимо да се обърне специално внимание на адипоцитокенините, метаболитните фактори и механичния стрес като компоненти на затлъстяването, за да разширим нашия периметър на мислене относно потенциалните таргети за превенция и интервенция при ГоА.

В първата терапевтична група (перорален глюкозамин сулфат) наблюдавахме влошаване на хиалинния хрущял в медиалния компартмент при 30% от пациентите. За същия период прогресия в

останалите групи е наблюдавана съответно в 20%, 20% и 7,7% от болните в II, III и IV група. Макар и статистически несигнификантна, тази разлика в групите поражда идеята, че терапията с PRP може да бъде хондропротективна, защото едва при двама души е установена прогресия в хрущялната увреда в медиалната част на тибιο-феморалната става. Трябва да отбележим също, че и двамата пациенти бяха със затлъстяване с нива на ИТМ 30,28 и 35,16 kg/m², а както вече установихме, високият ИТМ се асоциира с по-агресивен ход на болестта. В латералния регион на тибιο-феморалната става, където увредите по правило се наблюдават рядко, пропорцията на прогресорите бе сходна в терапевтичните групи.

Ефективност на терапията. Пероралният прием на глюкозамин сулфат за минимален период от девет месеца в рамките на една година и еднократно приложената кръстосаносвързана високомолекулна хиалуронова киселина за период от една година, макар и различни концептуално, имаха статистически сходни нива на подобрение на заложените клинични параметри в края на периода на проследяване. Подобрението на болката е съответно 13,2% и 17,3% от изходните ѝ стойности. Въпреки че проведеното лечение във втората група показва малко по-добри резултати в нивата на болката, болестната активност и тежест, качеството на живот в края на първата година от проследяването, те не достигнаха статистически значимост. От фармако-икономическа гледна точка двата коренно различни типа лечение имаха подобна финансова тежест за пациентите, но придържането към терапията се различаваше значимо. Все пак ефектът върху симптомите след инжектирането на ХК настъпва много по-бързо и се задържа във времето. Разбира се, в индивидуалния подбор на подходяща терапия в реалната клинична практика се вземат под внимание и други фактори, като свързаните с вътреставното инжектиране болка и последващ дискомфорт.

Третата група пациенти, при които е инжектирана двукратно през период от 6 месеца кръстосаносвързана високомолекулна хиалуронова киселина, е по-добре клинично повлияна в края на първата година в сравнение с първите две групи. Въпреки че например подобрението в болката е почти двойно по-голямо в третата група в сравнение с втората (съответно 17,7% и 33%), не се установи статистически значима разлика между двете групи. Вземайки под внимание обаче пропорцията на пациентите с минимално клинично значимо подобрение в болката и

болестната активност, разликата в двете групи е статистически сигнификантна.

Четвъртата група представляваше специален интерес за нас. Тя се отличаваше също със статистически по-значимо подобрене в клиничните характеристики в сравнение с първата и втората групи. Анализирайки количествената промяна в клиничните параметри на дванадесетия месец в хода на терапията, ние не установихме сигнификантна разлика, но можем да заключим, че терапията с два курса от по три инжекции с PRP е поне толкова ефективна, колкото терапията с двукратно инжектиране на ХК. В отчитане на пропорцията пациенти, постигнали минимално клинично значимо подобрене за болестна активност и изпълнили обединените критерии за отговор към терапията, се отчете сигнификантна разлика между III и IV група. При всички случаи провеждането на два курса през 6 месеца PRP е поне толкова ефективно, колкото е двукратното инжектиране на кръстосаносвързана високомолекулна хиалуронова киселина през 6 месеца за период от една година.

По отношение на структурните промени можем само да предположим известна хондропротективна роля на лечението с PRP, която следва да се потвърди в по-големи кохорти. Halpern и колеги, използвайки количествен метод за определяне на хрущялната увреда, наблюдават прогресия в нея в 27% от пациентите, лекувани с PRP за период от 1 година. Проучването не може пряко да бъде съпоставено с изложеното, поради различните режими на PRP, използвани в тях, и различията в методите на отчитане на хрущялна увреда. „Интензифицираният“ режим на PRP, който ние предлагаме, получен след двойно центрофугиране, вероятно притежава различен потенциал за повлияване на хрущялната увреда. Голям брой теории са предложени за обяснение на механизмите, по които богатата на тромбоцити плазма може да забави хрущялната увреда. Пролиферация на автоложни хондроцити и мезенхимни стволови клетки е демонстрирана след излагане на PRP в ин витро условия. Повишената секреция на ендогенна хиалуронова киселина (вискоиндукция) е също описана в присъствието на плазма богата на тромбоцити.

Комплайънс към терапията. Комплайънс (compliance) е понятие, което дефинира степента, в която поведението на пациента съответства

на препоръките на лекаря относно приема на лекарството. Сериозен проблем се оказа придържането към терапията при проследената група пациенти с глюкозамин сулфат, при която близо 1/4 отпадна поради лош комплайънс за период от 1 година. Лошият комплайънс към терапията е характерна особеност на пероралните режими на лечение при остеоартроза с т.нар. симптоматичните бавнодействащи средства за ОА (SYSADOA), тъй като част от пациентите имат негативна перцепция за даденото им перорално лечение и чувство на „безнадеждност“ във връзка с развитието на ГоА, което може да намали техния комплайънс и да доведе до търсене на алтернативни средства.

Безопасност на терапията. И трите вида терапии се очертах като безопасни. Към страничните реакции не отчетохме съпътстващите болка и дискомфорт при интраартикуларното приложение на ХК и PRP, съпътстващи неизбежно манипулацията. Като основен недостатък се отчете по-големият брой инжекции, които бяха заложили по протокол в групата с PRP – общо 6 за периода на проследяване 1 година. Те обаче се извършваха с игла с по-малък лумен от иглата, с която бе инжектирана високомолекулната хиалуронова киселина, което водеше до по-ниска степен на травматичност при манипулациите.

Тъй като PRP се приготвя чрез центрифугиране на автоложна кръв, всякакъв риск от алергични реакции и пренос на трансмисивни заболявания е елиминиран. Към днешна дата липсват данни, че PRP може да индуцира хиперплазия, канцерогенеза или туморен растеж.

Описаните странични реакции след вътреставно приложение на богатата на тромбоцити плазма бяха самоограничаващи се в рамките на 24 часа след вътреставната манипулация. Те доведоха до транзитно влошаване на болковата симптоматика, съпътствана с оток, и трябва да се разглеждат в контекста на направените в проучването 156 инжекции с автоложна богата на тромбоцити плазма. Подобни странични реакции са описани в част от студията, изследващи безопасността на вътреставното инжектиране на PRP в колянната става, и бяха очаквани събития.

5. Изводи

1. Серумните нива на COMP в най-добра степен отразяват структурните промени, оценени чрез рентгенография и МРТ.
2. Определените посредством ROC криви прагови стойности на серумен COMP могат да послужат като клинично референтен индикатор за разграничаване на болни с ГоА от здрави индивиди, а на серумен MMP-3 – за разграничаване на пациентите с генерализирана ОА от тези с изолирана ГоА.
3. В сравнение с останалите изследвани биомаркери, CRP в най-добра степен отразява болката, болестната активност и тежест.
4. Лечението с PRP се отличава с по-голяма ефективност по отношение на едногодишното подобрене в болката, сковаността, болестната активност и тежест спрямо лечението с перорален глюкозамин сулфат и с еднократна инжекция на кръстосаносвързана високомолекулна хиалуронова киселина.
5. Провеждането на два курса с PRP през 6 месеца е със съпоставима или по-голяма ефективност по отношение на облекчаване на симптомите болка и скованост, оценени в края на първата година, в сравнение с двукратното инжектиране на кръстосаносвързана високомолекулна хиалуронова киселина през 6 месеца.
6. По отношение на относителния дял на пациентите, отговорили на терапията, PRP превъзхождаше останалите терапевтични режими.
7. Структурната прогресия на хрущялната увреда не зависи от избора на терапия, а от изходните нива на MMP-3 и ИТМ.
8. Лечението с глюкозамин сулфат се отличава с по-лош комплайънс в сравнение с вътреставните терапевтични средства.
9. Лечението с PRP притежава добър профил на безопасност, като наблюдаваните странични реакции са леки и самоограничаващи се.

6. Приноси

Методични

1. За пръв път в ревматологичната практика у нас са приложени препоръчаните от международната експертна група OARSI средства за оценка на болката, болестната активност, физическата функция, рентгенографската и магнитно-резонансната структурна увреда.
2. За пръв път в българска популация бе използван полуколичествен метод за оценка на магнитно-резонансните структурни промени на цялото коляно при болни с ГоА.

Научно-приложни

1. За пръв път в българската популация бяха изследвани циркулиращите биомаркери COMP, MMP-3 и Coll2-1, отразяващи ставната ремоделация, и бе установена връзката им с редица клинични и образни показатели.
2. Установени бяха независими предиктори за прогресия на хрущялната увреда в лицето на повишените нива на MMP-3 и индекса на телесна маса при болни с гонартроза.
3. За пръв път в българската популация бе предложен и изследван режим на лечение с 2 курса по 3 вътреставни инжекции на вътреставна богата на тромбоцити плазма за период от 1 година, като същевременно бе доказана неговата ефективност за облекчаване на болката и сковаността, за подобряване на физическата функция и за понижаване на болестната активност и тежест при пациенти с ГоА.

Научно-теоретични

1. Формулирани са рисковите фактори, повлияващи постигането на минимално клинично значимо подобрене на болката и болестната активност и отговор на терапията според OARSI-OMERACT критериите.

С потвърдителен характер

1. Определена е чувствителността и специфичността на праговите стойности на COMP и MMP-3 за диференциация на болни от здрави индивиди.

7. Публикации и научни съобщения

7.1. Публикации

1. Georgiev, T., Ivanova, M., Kopchev, A., Velikova, T., Miloshov, A., Kurteva, E., Yuzeir, K., Penkov, M., Kabakchieva, P., Rashkov, R., Stoilov, R. Cartilage oligomeric protein, matrix metalloproteinase-3, and Coll2-1 as serum biomarkers in knee osteoarthritis: a cross-sectional study (2017) *Rheumatology international*, 1-10.
2. Георгиев, Ц., Иванова, М., и Стоилов, Р. Нови насоки в патогенетичните механизми на остеоартрозата (2013) *Ревматология* 21:3, 49-53
3. Георгиев, Ц., Иванова, М., и Стоилов, Р. Биомаркери при остеоартроза (2013) *Ревматология* 21:4, 21-25
4. Георгиев, Ц., Дачева, Р., Иванова, М., Стоилов, Р., Рашков Р., Мястото на автоложната богата на тромбоцити плазма в лечението на гонартроза (2016) *Ревматология* 24:4, 3-13

7.2. Участия в научни форуми и научни съобщения

1. Георгиев, Ц., Стоилов, Р., Бояджиева, В., Дачева, Р. Мястото на автоложната, богата на тромбоцити плазма в лечението на гонартроза, *Юбилейна национална конференция по ревматология*, 12-15 май 2016 г., гр. Поморие
2. Георгиев, Ц., Иванова, М., Младенова, Цв., Кюркчиев, Д., Стоилов, Р. СОМР, COLL2-1 и MMP-3 като маркери за болестна активност при пациенти с гонартроза, *V-та юбилейна национална конференция по остеопороза и остеоартроза с международно участие*, 24-26 ноември 2016г., гр. Банско
3. Георгиев, Ц., Иванова, М., Стоилов, Р., Рашков, Р. Лечение с перорален глюкозамин сулфат, интраартикуларна хиалуринова киселина и богата на тромбоцити плазма (PRP) – резултати от проспективно лонгитудинално проучване при пациенти с гонартроза, *Националната конференция по ревматология*, 12 – 14 май 2017 г., гр. Ахелой

Благодарности

Настоящия научен труд посвещавам на паметта на моята скъпа и обичана майка доц. д-р инж. Нели Генчева Георгиева – дългогодишен преподавател в Технически университет – Варна и автор на над 100 научни труда. Благодаря на семейството си – моята съпруга д-р Пламена Петрова Кабакчиева-Георгиева и сина ми Андрей Цветославов Георгиев за проявеното разбиране, търпение и подкрепа по време на работата ми по дисертацията. Признателен съм на моя баща доц. д-р инж. Антон Славчев Георгиев д.т.н. и на сестра ми д-р Ивелина Антонова Георгиева д.м. за дадените ценни насоки в подготовката и оформлението на настоящия научен труд. Изказвам своите искрени благодарности на моя научен ръководител проф. д-р Румен Малинов Стоилов д.м. и на проф. д-р Рашо Колев Рашков д.м.н. за предоставената възможност за качествено обучение и работа в конкурентна среда, използвайки най-иновативните методи за диагностика и лечение в съвременната медицина. Изразявам своята признателност към доц. д-р Мариана Иванова Гойчева д.м. и д-р Александър Александров Копчев д.м. за дадените полезни съвети и напътствия в хода на разработване на дисертацията. Благодаря също и на останалите колеги от Клиниката по ревматология за насочените болни и помощта, която са ми оказвали през годините на работа. Искрено благодаря за съдействието на персонала на Лабораторията по клинична имунология и Отделението по образна диагностика към УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ ЕАД – София. Изказвам благодарност на всички колеги, с които сме апробирали постигнатите резултати в съвместни публикации, както и на останалите, с които сме работили съвместно през петте ми години като лекар в Клиниката по ревматология.