



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
КАТЕДРА ПО ПЕДИАТРИЯ
КЛИНИКА ПО РЕВМАТОЛОГИЯ, КАРДИОЛОГИЯ И ХЕМАТОЛОГИЯ**

Д-р Маргарита Върбанова Ганева

БИОМАРКЕРИ ПРИ ЮВЕНИЛЕН ИДИОПАТИЧЕН АРТРИТ

АВТОРЕФЕРАТ

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

Област на образование: „Здравеопазване и спорт“

Научна област: „Медицина“

Научна специалност: „Педиатрия“

Шифър: 03.01.50

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

София, 2017

Дисертационният труд е написан на 146 машинописни страници и онагледен с 38 таблици, 8 графики и 6 фигури. Библиографската справка съдържа 243 литературни източника, от които 8 на кирилица и 235 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита на Катедрен съвет към Катедрата по педиатрия, Медицински университет – София.

Дисертантът е асистент към Клиника по ревматология, кардиология и хематология на Катедрата по педиатрия към Медицински университет – София и работи в същата клиника в СБАЛДБ „Проф. Иван Митев“-ЕАД, гр. София.

Публичната защита ще се състои на 12.06.2017 година от 14:00 часа в Аудиторията на СБАЛДБ „Проф. Иван Митев“-ЕАД, гр. София, бул. „Акад. Иван Гешов“ № 11, пред научно жури в състав:

доц. д-р Стефан Недев Стефанов, дм

проф. д-р Иван Олегovich Литвиненко, дм

доц. д-р Боряна Борисова Върбанова, дм

доц. д-р Росица Герасимова Митрова, дм

доц. д-р Лъчезар Радославов Маринов, дм

Материалите по защитата са на разположение в отдел „Наука“ на Медицински факултет към Медицински университет – София, както и на интернет страницата на Медицински университет – София.

Съдържание

| | |
|---|----|
| Въведение | 5 |
| Цел и задачи..... | 7 |
| 1.1. Цел..... | 7 |
| 1.2. Задачи | 7 |
| Материал и методи..... | 9 |
| 2.1. Материал..... | 9 |
| 2.2. Методи..... | 9 |
| 2.2.1. Диагностични методи | 9 |
| 2.2.2. Статистически методи | 13 |
| Резултати и обсъждане..... | 15 |
| Изводи | 45 |
| Приноси..... | 46 |
| Публикации, научни съобщения и научни проекти | 47 |

Използвани съкращения на кирилица

| | |
|-------|--|
| БА | <i>Биологичен агент</i> |
| БМАРА | <i>Болест модифициращи антиревмтични лекарства</i> |
| ГКС | <i>Глюкокортикостероиди</i> |
| ЕСА | <i>Ентезит-свързан артрит</i> |
| НЛР | <i>Нежелани лекарствени реакции</i> |
| НСПВС | <i>Нестероидни противовъзпалителни средства</i> |
| РФ | <i>Ревматоиден фактор</i> |
| СУЕ | <i>Скорост на утаяване на еритроцитите</i> |
| ТЗБС | <i>Тазобедрена става</i> |
| ЮИА | <i>Ювенилен идиопатичен артрит</i> |

Използвани съкращения на латиница

| | |
|----------|--|
| anti-CCP | <i>Anti-Cyclic Citrullinated Peptide</i> |
| ANA | <i>Antinuclear Antibodies</i> |
| CRP | <i>C-reactive Protein</i> |
| ELISA | <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> |
| HLA-B27 | <i>Human Leukocyte Antigen-B27</i> |
| IL-6 | <i>Interleukin-6</i> |
| JADAS | <i>Juvenile Arthritis Disease Activity Score</i> |
| ILAR | <i>International League of Associations for Rheumatology</i> |
| MTHFR | <i>Methylene Tetrahydrofolate Reductase</i> |
| MTX | <i>Methotrexate</i> |

Въведение

Детската ревматология се утвърждава като субспециалност във втората половина на XX век. Ювенилният идиопатичен артрит (ЮИА) е най-честото хронично заболяване, обект на диагностициране, лечение и проследяване от детските ревматолози.

Ювенилният идиопатичен артрит е комплексно възпалително заболяване с мултифакторна имунологична патогенеза и хронично рецидивиращ ход. Характерна особеност е клиничната му хетерогенност. Съществен момент в проследяването на хода на артритата в детска възраст е периодичната оценка на активността на заболяването.

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

Въпреки наличните в момента в рутинната практика маркери на възпаление за оценка на активността на заболяването, все още не съществуват утвърдени такива, които да подпомагат избора на терапия и да предсказват риска от възникване на рецидив. В редица проучвания обаче групата на S100 протеините показва своя потенциал като биомаркер, който може да бъде прилаган за проследяване на активността на заболяването. Доказано е, че те служат като показател за активността на ювенилния идиопатичен артрит, независимо от клиничната находка. Серумните нива на S100 протеините корелират с болестната активност при пациенти с артрит. Съществуват доказателства, че повишените им стойности могат да са израз на налична субклинична болестна активност при пациенти, достигнали клинична ремисия с прием на метотрексат. Във връзка с

това, друго приложение на изследването на серумните им концентрации при преустановяване на терапията е асоциацията на по-високите стойности с риска от възникване на рецидив на заболяването при проследяване. От друга страна се предполага, че серумните им нива, определени в дебюта на болестта, корелират добре с вероятността за добър отговор към провежданата терапия.

Възможно е различията в отговора към терапията при отделните пациенти с ЮИА да са генетично обусловени. Във връзка с това изследването на различни генетични полиморфизми, свързани с лекарствения отговор, е обект на редица научни проучвания. Генетични варианти също могат да бъдат използвани като биомаркери. Редица проучвания се занимават с оценка на възможни кандидат гени, въввлечени в сложния генетично обусловен път на фармакодинамика и фармакокинетика на метотрексат (MTX) – медикамент, първа линия на избор при децата с ювенилен идиопатичен артрит.

С напредъка в терапията на ювенилния идиопатичен артрит, клиницистите изгражда т.нар. „нулев толеранс“ към ставното възпаление. Целта е постигане на пълна ранна ремисия при всяко дете. Основна тенденция в ревматологичната практика е търсенето на критерии за ранна диагностика на ЮИА и на маркери с прогностична стойност за тежко протичащ артрит с цел по-агресивно лечение в ранните стадии на заболяването. Този проблем е актуален и обуславя интереса на изследователи и клиницисти не само в глобален план, но разбира се и в България. Във връзка с това си поставихме за цел да изследваме набор от едни от най-често проучваните биомаркери. Част от тези въпроси и проблеми са засегнати в настоящия дисертационен труд.

Цел и задачи

1.1. Цел

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

1.2. Задачи

За постигането на посочената цел си поставихме следните задачи:

Задача 1:

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

Задача 2:

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

Задача 3:

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

Задача 4:

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

Задача 5:

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

Задача 6:

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

Задача 7:

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

Материал и методи

2.1. Материал

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

| Характеристика | ЮИА | Здрави лица |
|----------------------------------|---------------------------|------------------------|
| Брой индивиди | 99 | 29 |
| Пол момчета/момичета | 38/61 | 13/16 |
| Средна възраст, години (граници) | 8.65±4.45 (1.58–17.92) | 9.53±4.67 (4.08–17) |

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

2.2. Методи

Към методите на изследване се включват диагностични и статистически методи.

2.2.1. Диагностични методи

Клинични изследвания

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

ЮИА се определя като наличие на артрит в една или повече стави, характеризиращ се с оток или изразен ставен излив, или наличие на два или повече от следните симптоми: ограничени движения и/или болка при дви-

жение, и/или повишена локална температура в съответната става. Артритът е с неизвестна етиология, с продължителност над шест седмици, а дебютът му е при лица под 16-годишна възраст. Диагнозата ЮИА е поставена според критериите на ILAR (International League of Associations for Rheumatology).

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

| | |
|------------------------------------|--|
| Системна форма | Артрит в една или повече стави, придружен с фебрилитет с характерна температурна крива и продължителност поне 6 седмици плюс един или повече от следните клинични белези: характерен обрив, генерализирана лимфаденопатия, хепато- или спленомегалия, серозит |
| Олигоартрит | Артрит в четири или по-малко от четири стави. В зависимост от броя на засегнатите стави на шестия месец от дебюта се подразделя на: <ul style="list-style-type: none"> • Персистиращ – броят на засегнатите стави не надхвърля четири след шестия месец • Разширен – броят на засегнатите стави надхвърля четири след шестия месец |
| Полиартрит с положителен РФ | Артрит в пет или повече от пет стави, придружен с наличие на РФ, доказан 2-кратно в разстояние на три месеца |
| Полиартрит с негативен РФ | Артрит в пет или повече от пет стави и липса на РФ |
| Псориатичен артрит | Наличие на артрит и псориазис или наличие на артрит плюс поне 2 от следните критерии: <ul style="list-style-type: none"> • Дактилит • Промени по ноктите – вдлъбвания или онихолиза • Фамилна обремененост за псориазис при роднина от първа линия |
| Ентезит-свързан артрит | Наличие на артрит и ентезит или наличие на артрит или ентезит плюс 2 или повече от следните критерии: <ul style="list-style-type: none"> • Болезненост в сакроилиачните стави и/или болка с възпалителен произход в лумбосакралния отдел • Носителство на HLA-B27 • фамилна обремененост за HLA-B27 – асоциирани заболявания (анкилозиращ спондилит, ентезит-свързан артрит, сакроилеит при възпалителни чревни заболявания, реактивен артрит, остър преден увеит) при роднина по първа линия • Остър преден увеит • Дебют на заболяването при момче над шест годишна възраст |
| Недиференциран артрит | <ul style="list-style-type: none"> • Не попада в нито една категория • Попада в повече от една категория |

Табл. 2. Класификация на ILAR за подформи на ЮИА

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

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

Лабораторни изследвания

С оглед на целта и задачите на дисертационния труд са изследвани следните биомаркери: S100 A8/A9, IL-6, СУЕ и CRP. Резултатите са отчетени в мерни единици по системата SI. Изследвани са също полиморфизми в *MTHFR* гена – с.677 C>T (rs1801133: C>T; p.A222V) и с.1298 A>C (rs1801131: A>C; p.E429A).

Използвани са следните лабораторни методи и анализи:

- За определяне на стойностите на стандартни показатели на възпаление – **С-реактивен протеин** е използван автоматичен анализатор, а за определяне на **скоростта на утаяване на еритроцитите** е приложен мануалният метод на Панченков. Изследванията са извършени в Клинична лаборатория на СБАЛ-ДБ-ЕАД „Професор Иван Митев“. За горна граница на CRP е приета 5 mg/L, а на СУЕ – 12 мм/ч.

- Изследването на стойностите на **S100A8/A9** в серум е извършено в Централна клинична лаборатория към УМБАЛ „Александровска“ ЕАД, Направление „Клинична химия и имунохимия“ посредством ELISA-методика при използване на MRP8/14 (Calprotectin) ELISA kit (BioLegend, Сан Диего, Калифорния).

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

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

Като горна референтна граница на серумните концентрации на IL-6 са приети стойности ≤ 6.4 pg/mL.

- Определяне стойностите на **антинуклеарните антитела** чрез индиректна имуофлуоресцентна техника върху HEp-2 клетъчна линия в Клиника по Клинична имунология към УМБАЛ „Александровска“ ЕАД. Като положителен титър на ANA приехме стойности $\geq 1:160$.

- Изследване на серума за наличие и титър на **ревматоиден фактор**.

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

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

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

Определянето на полиморфизмите с.677 C>T (rs1801133: C>T; p.A222V) и с.1298 A>C (rs1801131: A>C; p.E429A) в **MTHFR** гена бе извършено в СБАЛАГ „Майчин дом“, Център по молекулярна медицина. За целта ДНК беше изолирана от венозна кръв посредством полуавтоматизирана апаратура за изолиране с магнитни частици (Chemagic Magnetic Separation Module I, Chemagen) и с използване на китове за изолиране на ДНК от венозна кръв (Chemagic DNA Blood kits). За генотипизирането на събраните ДНК проби за подбраните полиморфни варианти в гена **MTHFR** беше приложен метода High resolution melting. Методът включва намножаване на интересувания ни участък в геномната ДНК (полимеразна верижна реакция) посредством използване на ензим и последваща дисоциация на ДНК (топене на двойноверижната структура на ДНК) при постепенно повишаване на температурата през равни интервали от време.

Инструментални изследвания

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

Други използвани методи

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

Juvenile Arthritis Disease Activity Score (JADAS 27) – показател, използван в Европа, въведен през 2009-та година от Consolaro и сътрудници. Този по-

казател се определя на базата на изследване на 27 стави. Включват се следните стави: шиен гръбнак, лакетни, гривнени, метакарпофалангеални (от първа до трета), проксимални интерфалангеални, тазобедрени, коленни и лезенни стави. Тази скала е избрана за оценка, защото дава добра информативност, за разлика от JADAS 10 (основаващ се на преброяването на която и да е засегната става до максимум 10 стави).

JADAS 27 се формира на базата на четири показателя: цялостна оценка на болестната активност от страна на лекаря (използвайки точкова система от 0 до 10, където 0 е липсваща активност, а 10 е максимална активност); цялостна оценка на състоянието на гетето от страна на родителя (използвайки точкова система от 0 до 10, където 0 е много добро, а 10 е много лошо); стойност на CUE, съотнесена отново на скала от 0 до 10; и брой засегнати стави (табл. 3).

| | JADAS 27 |
|--|------------|
| Цялостна оценка на болестната активност от страна на лекаря | 0–10 |
| Цялостна оценка на състоянието на гетето от страна на родителя | 0–10 |
| Стойност на CUE | 0–10 |
| Брой засегнати стави | 0–27 стави |
| Резултат | 0–57 |

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

2.2.2. Статистически методи

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

Използваното критично ниво на значимост е $\alpha=0.05$. Съответната нулева хипотеза се отхвърля, когато P стойността е по-малка от α .

Използваните статистически методи и анализи включват:

● Описателен анализ

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

- честотен анализ (номинални и рангови променливи) – абсолютни и относителни честоти;

- графично представяне на резултатите – линейни, стълбовидни и секторни диаграми.

Методи за проверка на хипотези:

● Параметрични

● Непараметрични

– тестове на Колмогоров-Смирнов и Шапиро-Уилк – посредством които количествените променливи бяха изследвани за нормалност;

– Т-тест при две независими извадки – проверка за равенство на средните величини на две независими групи при нормално разпределение;

– тест на Ман-Уитни – сравнение на две независими групи, когато разпределението не е нормално;

– знаково-рангов тест на Уилкоксон – сравнение на две зависимы групи, когато разпределението не е нормално;

– хи-квадрат на Пийрсън или точен тест на Фишер – за сравнение на категориите променливи между две отделни групи;

– корелационен коефициент на Спирмън – изследване на връзката между две количествени променливи.

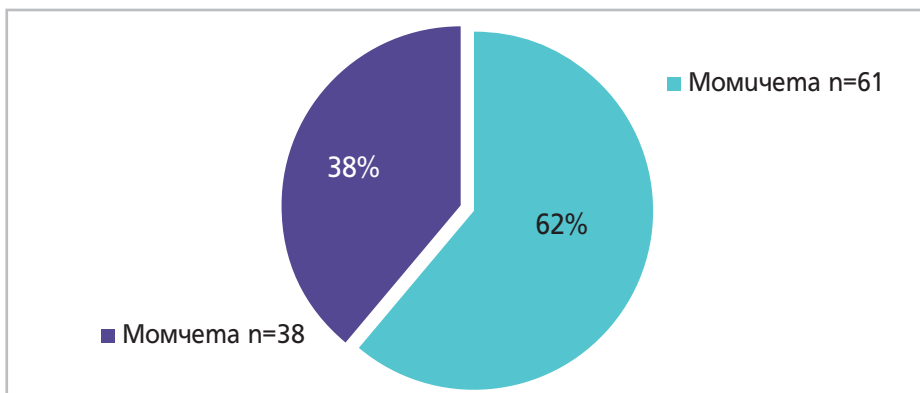
Резултати и обсъждане

3.1. Демографски характеристики

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

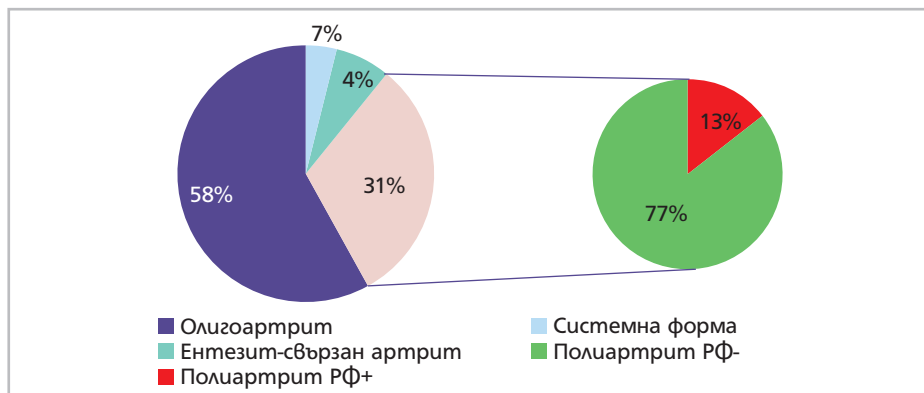
Сред децата с ЮИА преобладава женският пол – **61 момичета (62%)**, като **момчетата са 38 (38%)** (графика 1).

Пациентите са с различна активност и давност на заболяването.



Графика 1. Разпределение по пол на пациентите с ЮИА

Направено е разпределение на децата според погформата на ЮИА. Всички деца са проследени проспективно и ретроспективно в зависимост от стадия на заболяването. Най-голям процент от случаите са с олигоартрит (n=57, 58%), следвани от групата на деца с полиартрит (n=31, 31%). При децата с полиартрит тези, които са с отрицателен ревматоиден фактор са 24 (n=24/31, 77%), а тези с положителен ревматоиден фактор са 4 (n=4/31, 13%). За останалите 3 липсват данни за стойността на РФ. Най-рядко са регистрирани деца със системна форма на ЮИА (n=7, 7% от случаите) и ентезит-сързан артрит (n=4, 4% от случаите) (графика 2).



Графика 2. Разпределение на пациентите по подформа на ЮИА

Четиредесет и три от децата (43%) са с дебют на заболяването, а останалите 56 деца (57%) са с различна по давност еволюция на артрита.

Възрастта на децата с ювенилен идиопатичен артрит към момента на хоспитализация е от 1.58 до 17.92 години (средна възраст – 8.65 ± 4.45 години). Средната възраст на дебют на заболяването за цялата група пациенти ($n=99$) е 6.12 ± 4.29 години (от 0.66 до 15.83 години). При групата деца с дебют на ЮИА ($n=43$) се установи, че те са на възраст от 1.58–17.33 години (средна възраст 6.85 ± 4.27 години). Възрастта на пациентите от мъжки и женски пол в групата с дебют на заболяването е сравнима: при момчетата ($n=23$) варира от 1.83 до 17.33 (средна възраст 6.99 ± 4.80 години), а при момчетата ($n=20$) е от 1.58 до 16.5 години (средна възраст 6.69 ± 3.69 години). При цялата група деца с олигоартрит ($n=57$) регистрирахме най-ниска средна възраст в дебюта на заболяването – 5.41 ± 4.20 години, а най-голяма – при децата с ентезит-свързан артрит – 12.79 ± 4.53 години. Децата с полиартрит с отрицателен ревматоиден фактор ($n=24$) са на средна възраст в дебюта на болестта – 6.18 ± 4.20 години, а тези със системна форма на ЮИА ($n=7$) – 6.53 ± 4.16 години. Средната възраст в дебюта на заболяването при полиартритита с положителен ревматоиден фактор е 10.02 ± 4.27 години.

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

Демографските характеристики на контролната група от 29 здрави деца са сравними с тези на групата с децата с ЮИА – както по полово раз-

| Подформа на ЮИА, брой пациенти, n (%) | Пол | | Възраст, години | | Давност на артрит, месеци | |
|---------------------------------------|----------------|---------------|-----------------|------------|---------------------------|-------|
| | Момичета n (%) | Момчета n (%) | Средна, SD | от-до | Средна, SD | от-до |
| Олигоартрит, 57 (57%) | 38 (67%) | 19 (33%) | 5.41±4.20 | 0.83–15 | 27.6±35.8 | 0–156 |
| Полиартрит с (-) РФ, 24 (77%) | 16 (67%) | 8 (33%) | 6.18±4.20 | 0.66–15.83 | 38.25±41.3 | 1–144 |
| Полиартрит с (+) РФ, 4 (4%) | 3 (75%) | 1 (25%) | 10.02±4.27 | 7.08–12.83 | 23±28.11 | 6–65 |
| Системна форма, 7 (7%) | 2 (28%) | 4 (72%) | 6.53±4.16 | 1.08–12.66 | 38.85±34.77 | 1–84 |
| Ентезит-свързан артрит, 4 (4%) | 1 (25%) | 3 (75%) | 12.79±4.53 | 11–14.33 | 28.5±17.14 | 6–45 |

Табл. 4. Демографски данни на децата с ЮИА

| Характеристика | ЮИА | Здрави лица |
|----------------------------------|---------------------------|---------------------|
| Брой индивиди | 99 | 29 |
| Пол момичета/момчета | 61/38 | 16/13 |
| Средна възраст, години (граници) | 8.65±4.45 (1.58–17.92) | 8.13±4.75 (1–17) |

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

пределение (с преобладаване на женския пол), така и по възрастово (табл. 5). Разпределението по пол в групата е приблизително еднакво – 16 момичета (55%) и 13 момчета (45%). Те са на възраст от 1 до 17 години, със средна възраст 8.13±4.75 години.

В настоящия труд интересен бе фактът да установим какъв е периодът от появата на първия симптом до поставяне на диагнозата ювенилен идиопатичен артрит. За тази цел изследвахме децата с дебют на заболяването (n=43) и установихме следното: средният период от изява на първите симптоми до поставяне на диагнозата е 3.6±4.02 месеца, при олигоартритите той е 3.58±3.47 месеца, а при полиартритите е 3.92±5.28 месеца.

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

- Този на Скандинавските държави, стартирал 1997 година;
- Регистърът на Великобритания, основан през 2001 година – Childhood Arthritis Prospective Study, CAPS;
- Този на Канада, основан през 2005 година – Research on Arthritis in Canadian Children Emphasising Outcomes study, ReACCh Out;
- Регистърът на Германия, основан през 2010 година – Inception Cohort of Newly diagnosed patients with juvenile idiopathic arthritis, ICON.

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

Извън зададените цели и задачи, в настоящия дисертационен труд, се установи, че в групата с дебют на болестта средната възраст на диагностициране е 6.85 ± 4.27 години. Възрастта на изява на първите симптоми в тази подгрупа е 6.55 ± 4.17 години. Установи се, че при изследваните от нас деца с дебют на ЮИА срокът между изява на първия симптом и поставянето на диагноза ЮИА е приблизително 4 месеца. Това е и резултат, който е единствен и докладван за първи път в България.

Разгледахме и сравнихме параметрите пол, подформа на ЮИА, възраст на дебют и диагностициране на ЮИА, средна възраст в дебют при отделните подформи между изследваната от нас група деца и международните регистри.

Разпределението по пол е сравнимо с това в останалите анализирани регистри. Не установихме статистически значима разлика в разпределението по пол на пациентите с ЮИА в настоящия дисертационен труд с това в регистри на Скандинавия, Великобритания (CAPS), Канада (ReACCh Out) и Германия (ICON). В световен мащаб при ЮИА се засяга по-често женският пол, което се наблюдава и при нашата група. В изследваната от нас група децата честотата на засягане на женския пол е 1.6 пъти по-висока от тази на мъжкия пол. Тези данни съответстват на литературните данни за почти двойно по-често засягане на момичетата в страните от Европа и Канада.

При сравнение на честотата на наблюдаваните подформи на ЮИА, определени според класификацията на ILAR, установихме статистически значима разлика в честотата на олигоартритната форма. И при петте (регистри на Скандинавия, CAPS, ReACCh Out, ICON и нашето проучване) анализирани групи пациенти с ЮИА най-често наблюдаваната подформа е олигоартритът.

В обхванатата от нас група пациенти олигоартритът се наблюдава по-често в сравнение с групата деца, включени в регистъра на Германия – ICON ($\chi^2=5.48$; $df=1$; $p<0.05$) и тези на Канада – ReACCh Out ($\chi^2=8.64$; $df=1$; $p<0.05$). Не установихме статистически значима разлика при сравнение на честотата на олигоартрит в изследваната от нас група деца и тези на Великобритания ($\chi^2=1.08$; $df=1$; $p>0.05$) и Скандинавия ($\chi^2=1.34$; $df=1$; $p>0.05$).

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

Най-рядко регистрираната форма на ЮИА сред отделните регистри е полиартритът с положителен ревматоиден фактор. Установихме по-висока честота на тази подгрупа сред изследваните от нас деца в сравнение с честотата ѝ сред пациентите, включени в регистъра на Германия – ICON ($\chi^2=6.10$; $df=1$; $p<0.05$) и тези в регистъра на Скандинавия ($\chi^2=8.44$; $df=1$; $p<0.05$).

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

При анализ на разпределението на честотата на ентезит свързания артрит сред отделните групи пациенти, установихме статистически значима разлика между изследваната от нас група и регистъра на Германия – ICON ($\chi^2=4.27$; $df=1$; $p<0.05$).

При сравняване на средната възраст в дебюта на заболяването и данните от регистрите на групите сържави се установи, че при всички най-ранна възраст на изява е при олигоартритната форма, а най-голяма възраст се наблюдава при полиартритните форми с положителен ревматоиден фактор и ентезит-свързания артрит.

3.2. Терапия

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

Ретроспективно на базата на медицинската документация и от анамнестичните данни установихме, че 29 ($n=29/43$, 67%) от децата с дебют на заболяването са приемали медикаменти преди първата им хоспитализация в Клиниката. Нестероидни противовъзпалителни средства (НСПВС) са приемали 28 деца. Глюкокортикостероиди са назначени при 4 от тези приемачи НСПВС, а при едно дете като монотерапия.

По отношение на провежданата терапия в групата с дебют на ЮИА след постъпването при около половината ($n=22/43$, 51%) са назначени НСПВС. При 28 ($n=28/43$, 65%) от децата е започнато лечение с болест-модифициращи антиревматични лекарства (БМАРА) – метотрексат. Средната доза на МТХ е 8.14 ± 1.96 мг/м². Средната възраст на начало на терапията с МТХ в тази подгрупа е 6.38 ± 4.28 години, а средната възраст на изява на първите симптоми е 5.99 ± 4.10 години. Анализът показва, че лечението с МТХ започва средно 4.7 месеца по-късно от изявата на първите симптоми на заболяването. Периодът от изявата на първите симптоми до хоспитализацията в Клиниката е 4.26 ± 4.18 месеца.

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

При 69 ($n=69/99$, 70%) от всички включени в дисертационния труд деца е провеждана терапия с метотрексат. Установи се, че средната възраст на започване на лечение с Метотрексат при всички деца провеждащи терапия с този медикамент е 6.42 ± 4.45 години. От друга страна, средната възраст при изява на първите симптоми на заболяването в тази подгрупа е 5.85 ± 4.16 години. Анализът показва, че лечението с МТХ започва средно 6.8 месеца по-късно от изявата на първите симптоми на заболяването.

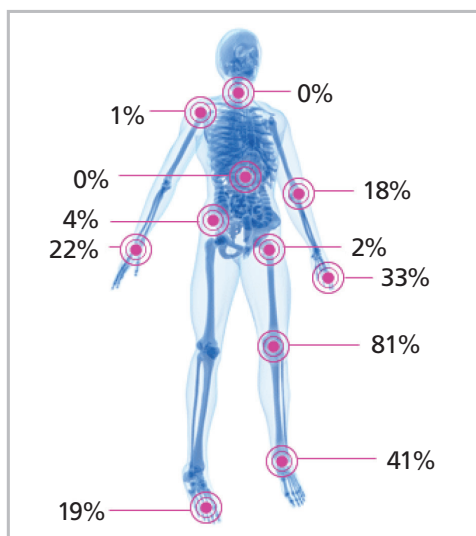
Лечение с глюкокортикостероиди (ГКС) е провеждано при 38 ($n=38/43$, 88%) от децата с дебют на ЮИА. Средната доза на ГКС е 0.41 ± 0.25 мг/кг. При 19 ($n=19/43$, 44%) е проведено лечение с интраартикуларно приложение на глюкокортикостероид (триамцинолон хексацетонид) – 16 деца с олигоартрит и 3 с полиартрит.

При 5 ($n=5/43$, 11.6%) от децата с дебют на заболяването се установи, че по-късно е започнато лечение с биологичен агент. Средно срокът на започване на това лечение е 10 ± 8.16 месеца от началото на заболяването. В цялата група броят на децата провеждащи терапия с биологичен агент е 47 ($n=47/99$, 47%) като при 16 ($n=16/47$, 34%) от тях е включен втори и трети подред биологичен агент. Периодът на започване на биологично лечение след дебюта на заболяването за цялата група, провеждащи терапия с биологичен агент, е 36.19 ± 36.09 месеца. Етанерсепт е прилаган при 21 пациента, адалимумаб при 10 и тоцилизумаб при 13 деца.

3.3. Характеристика на ставното засягане в дебюта на заболяването

Установихме, че най-често ангажираната става при дебют на ЮИА е колянната става – в над осемдесет процента (80.8%) от случаите, последвана от глезенната (41%) и малките стави на ръцете (33%). Гривнената става е ангажирана при дебют в 22% от децата с ЮИА, а малките стави на краката – в 19%. Засягане на лакетната става при началната изява на заболяването се установи в 18% от пациентите, а на сакроилиачните – в 4%. Най-рядко в изследваната група се засягат тазобедрената (ТЗБС) и раменната стави, съответно в 2% и 1% от случаите (фиг. 1). В $\frac{1}{4}$ (n=25/99) от случаите артритът дебютира като моноартрит – в 22 от случаите с ангажиране на колянна става, в 3 със засягане на глезенна става.

При 24 (n=24/99, 24%) от пациентите с ЮИА при рецидив на заболяването се ангажират и нови стави. При децата с олигоартрит (която е и най-честата подформа на ЮИА, n=57), ангажиране на нови стави при рецидив се установява при 13 (22.8%) пациента. При 8 от децата с полиартрит и при 3 от тези с ентезит-свързан артрит е установено ангажиране на нови стави при рецидив. Следователно, най-често засягане на нови стави при рецидив се наблюдава при групата на олигоартрит.



Фиг. 1. Честота на ангажираните стави при дебюта на ЮИА

| Артрит ≤ 4 става | Артрит ≥ 5 става | Системна форма |
|---|---|--|
| Неблагоприятна прогноза – необходимо е изпълнението на един критерий | | |
| Засягане на ТЗБС или шиен отгел на гръбначен стълб | Засягане на ТЗБС или шиен отгел на гръбначен стълб | 6-месечна продължителност на фебрилитет, повишени маркери на възпаление или необходимост от терапия със системни ГКС |
| Артрит на глезенна или гръбначна става ПЛЮС изразено или дълготрайно покачване на маркерите на възпаление | Наличие на ревматоиден фактор ИЛИ на антитела срещу антицикличния цитрулиниран пептид | Засягане на ТЗБС |
| Рентгенологични данни за увреда – ерозии или стеснение на ставната междина | Рентгенологични данни за увреда – ерозии или стеснение на ставната междина | Рентгенологични данни за увреда – ерозии или стеснение на ставната междина |

Табл. 6. Показатели за оценка на прогнозата на заболяването

Известно е, че не само броят на засегнатите стави, но и вида (например глезенна, тазобедренна става) и рентгенологичната еволюция на заболяването са критерии за лоша прогноза на ЮИА (табл. 6). В нашето проучване сме обърнали внимание и анализираме случаите, при които има включване на нови стави при рецидив, като се взима предвид вида на ангажираните стави. Не сме разглеждали рентгенологичния образ на засегнатите стави като показател за неблагоприятна прогноза на заболяването.

Ангажиране на ТЗБС в дебюта на заболяването се установи при 4 (4%) от децата (2 пациента с полиартрит, 1 със системна форма и 1 с ентезит-свързан артрит). При двамата от тях има включване на нови стави при рецидива на заболяването. При проследяването на всичките четири пациента се е наложило включване към терапията на биологичен агент.

Засягане на глезенната става в дебюта на заболяването има при 41 (41%) от децата – 18 са с олигоартрит (от които само две деца са с моноартрит), 22 са с полиартрит и едно с ентезит-свързан артрит. При 9 (21.9%) от тях има ангажиране на нови стави при рецидив (при 16 – няма ангажиране на нови стави, а при останалите 16 липсват данни). Проследявайки децата с ангажиране на глезенната става в дебюта на ЮИА установихме, че при 24 (58.5%) от тях се налага добавяне на биологичен агент към терапевтичния план. Повече от двукратно покачване на СУЕ има при 18 от тях, а 14 от тях са и с двукратно покачване на стойностите на CRP.

В дебюта на заболяването гръбначната става е засегната при 22 (22.2%) от пациентите – 4 с олигоартрит, а останалите 18 с полиартрит. При 6

(27.3%) от тях има ангажиране на нови стави при рецидив (при 6 – няма ангажиране на нови стави, а при останалите 6 липсват данни). Добавяне на биологичен агент при пациентите с ангажиране на гривнената става в дебют е установено при 12 (54.5%) геца. Повече от двукратно покачване на СУЕ има при 14 от тях, а 12 от тях са и с двукратно покачване на стойностите на CRP.

Не установихме статистически значима разлика в честотата на включване на биологичен агент между цялата група и подгрупите с ангажиране на глезенна ($\chi^2=0.45$; $df=1$; $p>0.05$) и гривнена ($\chi^2=0.12$; $df=1$; $p>0.05$) стави при дебюта на болестта.

Честотата на вида на засегнатите стави в цялата група е сравнима с тези на другите гържави с регистри и не дава значими отклонения. Сравними резултати между отделните регистри и настоящия дисертационен труд се установиха и за броя на засегнатите стави при дебют (табл. 7).

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

Табл. 7. Среден брой засегнати стави при дебют на ЮИА

3.4. Изработване на граници на референтната област на използвания ELISA-кут за изследване на S100 A8/A9

Изследването на хетеродимера S100 A8/A9 (фекален калпротектин) се използва в практиката като неинвазивен маркер за диагностика и оценка на чревното възпаление. За първи път в България изследването на фекален калпротектин е въведено от В. Наков. С настоящия дисертационен труд за първи път в България се въвежда методът за изследване на серумен S100 A8/A9 при геца.

С цел тълкуване на резултатите, получени от нововъведения и използван от нас ELISA-кут [MRP8/14 (Calprotectin), BioLegend, САЩ] за изследване на серумен S100 A8/A9, предприехме определяне на собствени лабораторни референтни стойности за изследвания контингент. При 29 клинично

здравя деца с липса на клинични и лабораторни данни за възпаление – стойностите на СУЕ и CRP са в референтни граници – бяха изследвани серумните нива на S100 A8/A9 с диагностичния MRP8/14 (Calprotectin) ELISA kit (BioLegend, Сан Диего, Калифорния). Средната стойност на S100 A8/A9 на изследваната група здрави деца бе 620.19 ng/mL със стандартно отклонение 520.64 ng/mL. Интервалът минимални и максимални стойности бе 31–2186 ng/mL. На базата на тези резултати като повишени стойности на S100 A8/A9 в групата с ЮИА се приеха тези над $X \pm 3SD$ или 2186 ng/mL.

При изследваните от нас деца в дебюта на заболяването установихме изключително високи стойности на S100 A8/A9 хетеродимера. Тези резултати са почти 10 пъти по-високи от тези, установени при групата деца – здрави контроли. Резултатът може да се тълкува еднозначно, а именно – S100 A8/A9 хетеродимерът е силен индикатор за наличието на възпаление (табл. 8).

| S100 A8/A9, ng/mL (норма < 2186 ng/mL) | | p=0.000 |
|--|---------------|---------|
| Група дебют ЮИА – n=43 | 5497±5261.03 | |
| Здрави контроли – n=29 | 620.19±520.64 | |

Табл. 8. Сравнение на средните стойности на S100 A8/A9 между децата с дебют на ЮИА и здравите контроли

3.5. Средни стойности на изследваните биомаркери при отделните подформи на ЮИА

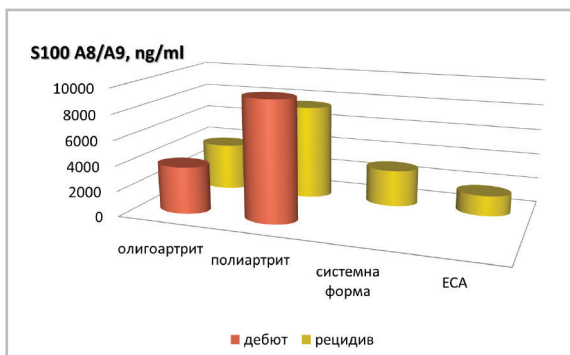
3.5.1. Изследване на S100 A8/A9 хетеродимер

В групата с полиартрит (n=31) се установиха най-високите средни стойности на S100 A8/A9 протеините (8097±5181 ng/mL) (графика 1). В същата тази група стойностите са по-високи при дебюта на заболяването (n=13; 9491±4696 ng/mL) и малко по-ниски при рецидив на полиартрита (n=18; 7091±5181 ng/mL). Разликата в стойностите между двете подгрупи с дебют и рецидив на полиартрит е статистически значима (p<0.05). По-ниският резултат в групата с рецидив може да се обясни с влиянието на вече провежданата терапия. Регистрираните най-високи стойности на S100 A8/A9 в групата с полиартрит могат да бъдат аргументирани с броя на засегнатите стави и по-изразената активност на заболяването в тази подгрупа.

При групата с олигоартрит (n=57) се установиха средно два пъти по-ниски стойности на маркера (3723±4876 ng/mL) в сравнение с тези при по-

лиартритите. Тази разлика в стойностите между групата с олигоартрит и тази с полиартрит е статистически достоверна ($p < 0.0005$). Не се установиха различия в средните стойности в дебюта (3706 ± 4876 ng/mL) и при рецидив (3741 ± 5241 ng/mL) на олигоартрита.

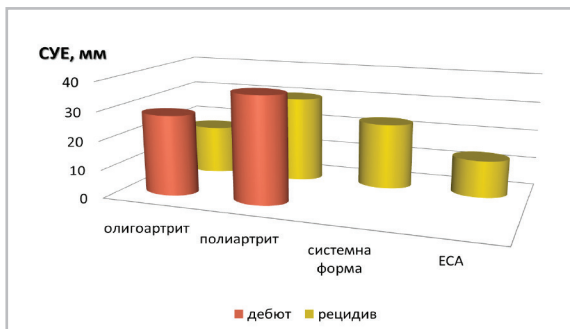
Най-ниски стойности на S100A8/A9 се регистрираха в подгрупата с ентезит-свързан артрит ($n=4$; 1604 ± 2103 ng/mL).



Графика 1. Средни стойности на S100 A8/A9 при отделните подформи ЮИА

3.5.2. СУЕ

Идентична тенденция се наблюдава и при изследване на СУЕ в отделните подгрупи на ЮИА. Най-високи средни стойности на СУЕ се установиха в групата с полиартрит (33 ± 17 мм/ч) и по-специално тази с дебют на полиартрит (37 ± 16 мм/ч). При подгрупата с рецидив на полиартрита се установиха по-ниски стойности – 30 ± 15 мм/ч. Отново най-ниски средни стойности са наблюдавани в подгрупата с ентезит-свързан артрит (13 ± 10 мм/ч).



Графика 2. Средни стойности на СУЕ при отделните подформи ЮИА

Средната стойност на СУЕ за цялата група с дебют (n=43) на ЮИА е 31 ± 17.71 мм/ч. При сравнение – средните стойности на СУЕ при дебют в регистъра на Германия – ICON са **двукратно по-ниски** 15 мм/ч (8.0–31.0). Разликата в средните стойности на СУЕ при дебют между ICON-регистъра и изследваната от нас група деца може да бъде обяснен с по-краткия период от изява на симптомите до поставяне на диагнозата между двете групи (3.0 срещу 3.6 месеца).

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

Табл. 9. Сравнение на средните стойности на СУЕ при дебют на ЮИА между пациентите включени в дисертационния труд и тази на международни регистри

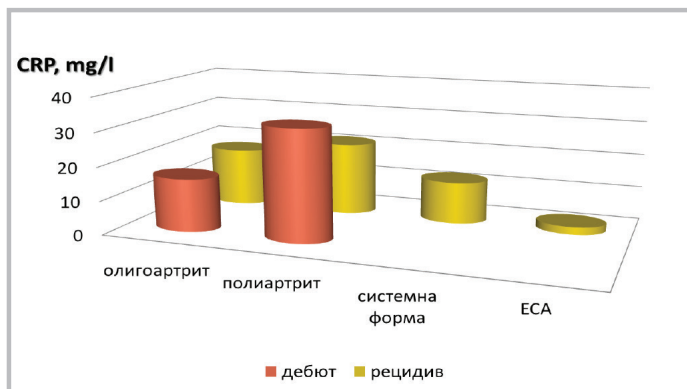
*Всички пациенти в изследваната от нас група с ентезит-свързан артрит са с рецидив на заболяването

3.5.3. CRP

Тенденцията, установена при изследване на СУЕ и S100 A8/A9 се запазва и при средните стойности на CRP (графика 3). Средната стойност на CRP е най-висока в подгрупата с дебют на полиартрит (32.74 ± 30.08 mg/L), следвани от подгрупата с рецидив на полиартрит (21.62 ± 25.36 mg/L). Отново най-ниски стойности са наблюдавани в подгрупата с ентезит свързан артрит (2.25 ± 2.07).

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

Общата възпалителна активност на деца с ЮИА е подробно изследвана още през 1976 година в дисертационния труд на Е. Маджарова. Направен е опит за пълна характеристика на активността на артритите в детска възраст. Основният и единствен показател на възпаление, който е изследван е СУЕ. Други лабораторни показатели включват ПКК, общ белтък, албумин, алфа-и гама-глобулини. Близо 20 години по-късно Д. Михайлова изследва груп показана



Графика 3. Средни стойности на CRP при отделните подформи ЮИА

тел на възпаление (CRP) при 70 деца с ЮИА, разделени в две групи – с моноолигоартритна и с полиартритна форма на ЮИА. Установяват се достоверно по-високи стойности на CRP при полиартритната форма. Колективът потвърждава извода, че CRP отразява активността на възпалителния процес – стойностите му са значително по-високи в групата с висока активност в сравнение с групата с минимална активност на заболяването. Установените от нас резултати потвърждават и тези, описани в дисертационния труд на Б. Върбанова. При изследване на биологичната активност при деца с ЮИА, се регистрират статистически значимо по-високи стойности на СУЕ и CRP в групата с полиартрит в сравнение с олигоартрит. Пациентите с активна форма на полиартрита са с по-високи стойности от тези с неактивна.

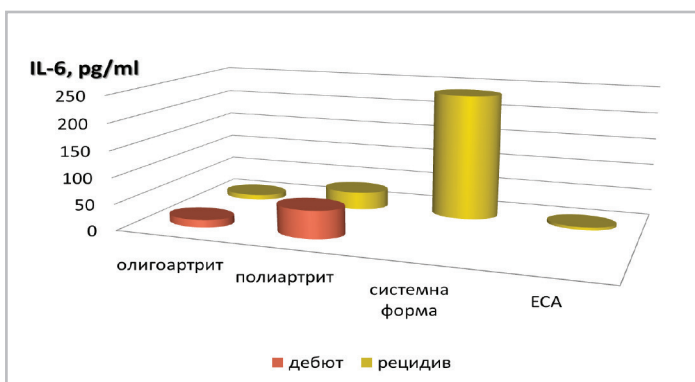
| Подформа на ЮИА | ReACCh Out n=354 | CAPS n=740 | Скандинавия n=440 | Дисертационен труд n=43 |
|------------------------|---------------------|---------------|----------------------|----------------------------|
| Олигоартрит | 3 (0–7) | 7 (0–16) | 11 (0–24) | 16 (0.3–149.09) |
| Полиартрит с (-) РФ | 6 (1–14) | 14 (4–52) | 24 (0–47) | 35 (0.4–82.95) |
| Полиартрит с (+) РФ | 25 (3–33) | 12 (5–33) | 27 (10–44) | 6 |
| Системна форма | 33 (5–62) | 98 (36–246) | 146 (83–184) | 28 |
| Ентезит-свързан артрит | 5 (1–16) | 3 (0–21) | 23 (10–53) | * |

Табл. 10. Сравнение на средните стойности на CRP при дебют на ЮИА между нашата група и тази на ReACCh Out регистъра на Канада, CAPS регистъра на Великобритания и този на Скандинавия

*Всички пациенти в изследваната от нас група с ентезит свързан артрит са с рецидив на заболяването

3.5.4. Изследване на интерлевкин-6 (IL-6)

Анализът на средните стойности на IL-6 в отделните подгрупи ЮИА показва: най-високи стойности се установиха в подгрупата на деца със системно начало на ЮИА (237.07 ± 451.82 pg/mL), следвани от подгрупата на полиартрит в дебют на болестта (52.99 ± 47.88 pg/mL) (графика 4).



Графика 4. Средни стойности на IL-6 при отделните подформи ЮИА

В дисертационния си труд З. Коларов установява, че серумната концентрация на IL-6 корелира с общата активност на пациентите с ревматоиден артрит. Не е регистрирана връзка между серумната му концентрация и клиничните показатели, характеризиращи локална активност при пациентите с ревматоиден артрит. Установява се, че стойностите на IL-6 корелират с някои острофазови лабораторни показатели, характеризиращи активността на артритата, като СУЕ и фибриноген. Констатира, че разликите в серумните концентрации на IL-6 между пациентите с ниска и висока болестна активност, са сигнификантни.

Д. Михайлова и колектив определят нивото на серумен интерлевкин-6 при 34 деца с активен ЮИА. Установяват отново най-висока концентрация при системната форма в сравнение с олигоартритната и полиартритната. Установяват корелация на IL-6 с клиничната активност на заболяването – сигнификантно по-високи стойности в активна фаза в сравнение с неактивна фаза на заболяването. Регистрират корелация между стойностите на IL-6, СУЕ и CRP при олигоартрита и системната форма на ЮИА. De Benedetti и сътрудници също установяват повишени серумни концентрации на IL-6 при активната фаза на олигоартрит и полиартрит в сравнение с неактивната такава.

Установената значимо по-високата концентрация на IL-6 при пациентите със системна форма на ЮИА може да се обясни с по-високата обща възпалителна активност при тази подформа на болестта. Известна е и ролята на IL-6 в патогенезата на системната форма.

3.5.5. Сравнително изследване на биомаркерите при групата деца с дебют на ЮИА

Групата от деца с дебют на заболяването (n=43) включва 29 деца с олигоартритна форма, 13 с полиартритна форма и един пациент със системна форма. При сравнително изследване на средните стойности на биомаркерите при децата с олигоартрит и с полиартрит установихме, че средните стойности на S100 A8/A9, CRP и IL-6 са сигнификантно по-високи в подгрупата с полиартрит в сравнение с олигоартритната подгрупа. Този резултат може да се обясни с по-големия брой засегнати стави (табл. 11).

| Биомаркер | Олигоартрит дебют n=29 | Полиартрит дебют n=13 | |
|------------------|---------------------------|--------------------------|--------|
| S100A8/A9, ng/mL | 3706.51±2662.85 | 9490.85±7434.91 | p<0.05 |
| СУЕ, мм/ч | 28±17 | 37±16 | p>0.05 |
| CRP, mg/L | 15.72±30.19 | 32.74±30.08 | p<0.05 |
| IL-6, pg/mL | 14.37±18.18 | 52.99±47.88 | p<0.05 |

Табл. 11. Сравнение на стойностите на биомаркерите в дебют на ЮИА

3.5.6. Сравнителен анализ на средните стойности на биомаркерите в групата с рецидив на ЮИА

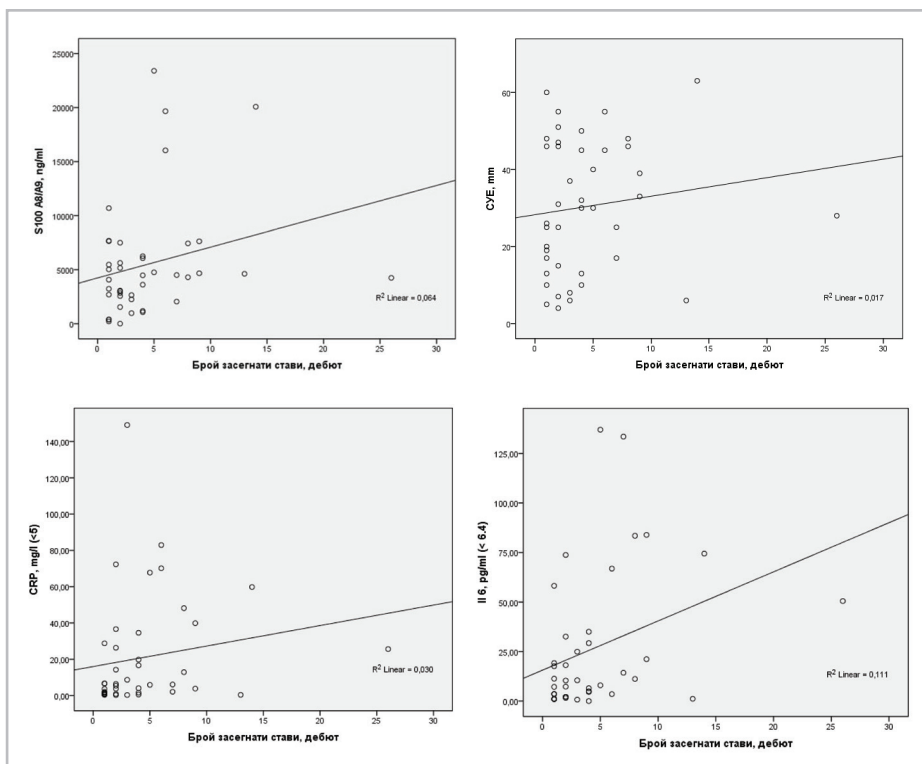
При провеждане на идентичен анализ в подгрупите с рецидив на олиго- и полиартрит се наблюдаваха сигнификантни разлики в средните стойности на S100 A8/A9, СУЕ и IL-6 между двете подгрупи (табл. 12).

| Биомаркер | Олигоартрит рецидив n=28 | Полиартрит рецидив n=18 | |
|-------------------|-----------------------------|----------------------------|--------|
| S100 A8/A9, ng/mL | 3740.00±3076.00 | 7507.88±7514.00 | p<0.05 |
| СУЕ, мм/ч | 17±12 | 30±15 | p<0.05 |
| CRP, mg/L | 17.33±47.69 | 21.62±25.07 | p>0.05 |
| IL-6, pg/mL | 9.67±13.26 | 33.57±37.72 | p<0.05 |

Табл. 12. Сравнение на стойностите на биомаркерите при рецидив на ЮИА

3.5.7. Корелационен анализ между стойностите на биомаркерите и броя засегнати стави в групата с дебют на ЮИА

Проведохме корелационен анализ между стойностите на изследваните биомаркери в групата с дебют на ЮИА (n=43) и броя на засегнатите стави (графика 5). Установихме макар и умерена статистически значима корелация за стойностите на CRP (r=0.370) и IL-6 (r=0.382) и броя на засегнатите стави при дебют. Слаба корелация се установи между стойностите на S100 A8/A9 (r=0.267) и тези на CYE (r=0.191) и броя на засегнатите стави.



Графика 5. Корелационен анализ между стойностите на биомаркерите при дебют на ЮИА и броя на засегнатите стави

3.5.8. Зависимост на измерените при дебют стойности на S100 A8/A9 с еволюцията на болестта

С ангажиране на нови стави при рецидив

Изследвахме дали съществува взаимовръзка между стойностите на S100 A8/A9, измерени при дебют с ангажирането на нови стави при рецидив на болестта. Анализирахме дали повишените стойности на S100 A8/A9 биха ни дали отговор на въпроса дали ще има включване на нови стави при рецидива на ЮИА.

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

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

С давността на болестта

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

3.6. Влияние на приема на медикаменти върху стойностите на изследваните биомаркери

В групата с дебют на заболяването ($n=43$) констатирахме, че 29 от децата са приемали медикаменти преди първата им хоспитализация в Клиниката по ревматология, кардиология и хематология към СБАЛДБ-ЕАД „Проф. Иван Митев“. Най-голям е дялът на приемащите нестероидни противовъзпалителни средства – 28 от децата. Четири деца са приемали и

глюкокортикостероид с НСПВС, а на едно е бил назначен само кортикостероид преди хоспитализацията. Не установихме сигнификантна разлика в средните стойности на биомаркерите между децата приемали медикаменти преди хоспитализацията и тези които не са (табл. 13). Следователно, приемът на лекарства преди първата хоспитализация не оказва влияние върху средните стойности на изследваните биомаркери.

Независимо от малката бройка деца приемали глюकोкортикостероиди преди първата хоспитализация, решихме да анализираме дали има влияние приемът им върху средните стойности на изследваните биомаркери. Децата, приемали ГКС са 5, а останалите 24 от групата не са приемали ГКС. Отново не установихме статистически значима разлика между средните стойности на маркерите на възпаление между двете групи (табл. 14).

| Биомаркер | Приемали медикаменти n=29 | Не са приемали медикаменти n=14 | |
|-------------------|------------------------------|------------------------------------|--------|
| S100 A8/A9, ng/mL | 5419.96±5207.15 | 5668.61±5791.11 | p>0.05 |
| СУЕ, мм/ч | 30±18 | 32±17 | p>0.05 |
| CRP, mg/L | 20.48±33.29 | 22.12±25.67 | p>0.05 |
| IL-6, pg/mL | 24.36±32.79 | 32.25±41.53 | p>0.05 |

Табл. 13. Сравнение на средните стойности на биомаркерите между групите деца, които са приемали медикаменти и тези, които не са

| Биомаркер | (-) ГКС n=24 | (+) ГКС n=5 | |
|-------------------|-----------------|-----------------|--------|
| S100 A8/A9, ng/mL | 4662.91±3470.39 | 9053.8±10030.24 | p>0.05 |
| СУЕ, мм/ч | 28±17 | 35±20 | p>0.05 |
| CRP, mg/L | 19.52±32.67 | 30.22±38.50 | p>0.05 |
| IL-6, pg/mL | 22.91±32.61 | 30.74±36.63 | p>0.05 |

Табл. 14. Сравнение на средните стойности на биомаркерите между групите деца, които са приемали ГКС и тези, които не са

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

3.7. Сравнителен анализ на средните стойности на биомаркерите в групата с дебют на ЮИА спрямо отговора към провежданата терапия с МТХ

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

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

- Подгрупа с лош отговор към МТХ – n=5, при която при проследяване се е наложило включване на биологичен агент поради липса на ефект от провежданата терапия с МТХ.

При сравнителен анализ на изследваните в дебюта на заболяването стойности на S100 A8/A9 в тези две подгрупи установихме, че стойността на S100 A8/A9 при началната изява на болестта е статистически значимо по-висока в подгрупата, при която впоследствие при проследяване е включен биологичен агент (табл. 15). Следователно, може да се предположи, че по-високите стойности на S100 A8/A9 могат да служат за диференциране на пациентите с потенциален очакван лош от тези с добър лекарствен отговор. Също така статистически значима разлика между двете подгрупи констатирахме и за стойностите на СУЕ, CRP и IL-6.

| Биомаркер | Отговор към МТХ | | |
|-------------------|-----------------------|------------------------|--------|
| | ДОБЪР, без БА n=23 | ЛОШ, Включен БА n=5 | |
| S100 A8/A9, ng/mL | 4315.91±1818.09 | 14306.20±9361.18 | p<0.05 |
| СУЕ, мм/ч | 34±17 | 49±9 | p<0.05 |
| CRP, mg/L | 13.56±13.80 | 43.08±38.03 | p<0.05 |
| IL-6, pg/mL | 22.34±32.22 | 70.48±54.56 | p<0.05 |

Табл. 15. Сравнение на средните стойности на биомаркерите в дебют между групите деца, които впоследствие са приемали БА и тези, които не са

Получените от нас резултати не подкрепят тези от проучването CHARMS (при което измерените в дебют на заболяването по-високи стойности на S100 протеините се асоциират с добър отговор към провежданата терапия). Разбира се, не трябва да се пренебрегва фактът, че настоящият дисертационен труд включва значително по-малка група пациенти.

3.8. Сравнителен анализ на възрастта на изява на ЮИА и броят на засегнатите стави при дебют спрямо отговора към провежданата терапия с МТХ

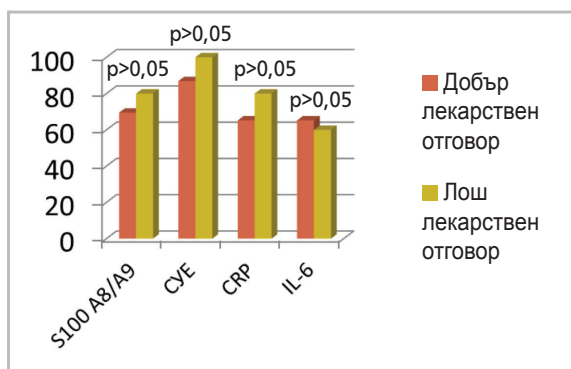
Идентичен анализ в двете подгрупи с добър (n=23) и лош (n=5) лекарствен отговор показва статистически значима разлика за възрастта на изява на ЮИА. Констатирахме асоциация на по-малката възраст на дебют на заболяването с по-лоша прогноза на артритата и необходимост от включване на биологичен агент при проследяване (табл. 16). Полученият от нас резултат не потвърждава този от проучването ICON, проведено от немски изследователи и включващо голяма група деца (n=695). Изследователският колектив от Германия намира зависимост на по-малката възраст на изява на болестта с по-голяма вероятност за достигане на състояние на липсваща активност на заболяването. Нещо повече, ние установихме статистически значима разлика в обратна посока, което заслужава потвърждаване или отхвърляне на нахождката с разширени проучвания при нашите болни. Би било много рано да се правят окончателни изводи на базата на тези данни, но наблюдаваната разлика в получените резултати, наред с множество причини, може да се дължи на индивидуални особености на българските деца с ЮИА. Това всъщност би могло да бъде причина и за наблюдаваните различия в лекарствения отговор на нашите болни и регистрираната асоциация на високите стойности на изследваните биомаркери с лош лекарствен отговор.

| Показател | Отговор към МТХ | | |
|------------------|-----------------------|------------------------|--------|
| | ДОБЪР, без БА n=23 | ЛОШ, включен БА n=5 | |
| Възраст на изява | 7.13 | 2.76 | p<0.05 |
| Брой стави | 4 | 6 | p>0.05 |

Табл. 16. Сравнение на възрастта на изява на ЮИА и брой засегнати стави в групите деца, които впоследствие са приемали БА и тези, които не са

3.9. Сравнителен анализ на абсолютния брой положителни стойности на изследваните биомаркери при дебют на заболяването спрямо отговора към провежданата терапия с MTX

Анализирахме и абсолютния брой на пациенти с положителни стойности на биомаркерите при дебют на ЮИА в двете подгрупи – с добър ($n=23$) и лош ($n=5$) лекарствен отговор (графика 6). Не установихме статистически значима разлика в броя на пациентите с положителни стойности на биомаркерите при дебют между двете подгрупи (S100 A8/A9 – $\chi^2=1.01$; $p>0.05$; CYE – $\chi^2=0.73$; $p>0.05$; CRP – $\chi^2=0.41$; $p>0.05$; IL-6 – $\chi^2=0.15$; $p>0.05$).



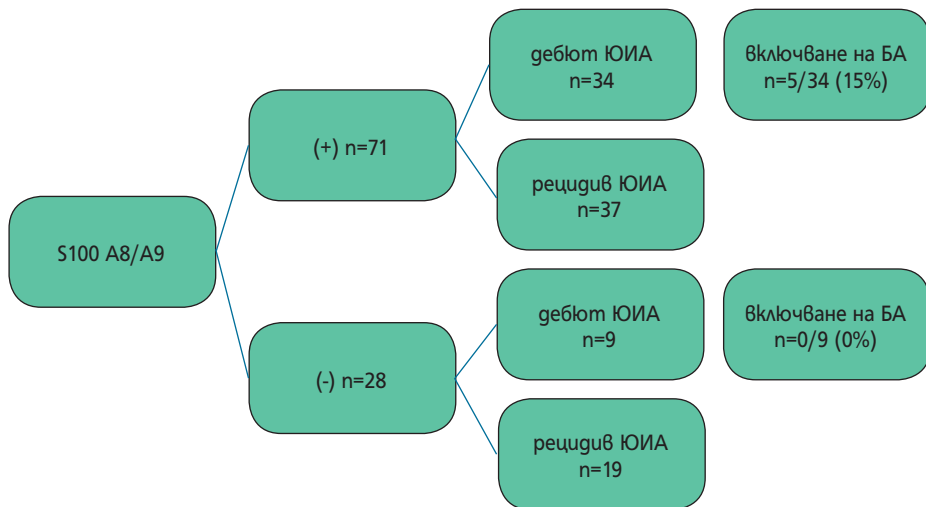
Графика 6. Сравнение на абсолютния брой пациенти с положителни стойности на биомаркерите в дебют между групите с добър и лош лекарствен отговор

3.10. Сравнителен анализ на абсолютния брой пациенти с положителни стойности на S100 A8/A9 в цялата група с ЮИА

В цялата група пациенти положителни стойности на S100 A8/A9 протеините са установени при 71 деца (71.7%), като 34 от тях са с дебют на ЮИА (фиг. 2). От тези 34 деца при 5 е включен впоследствие биологичен агент или това са 15% от пациентите с положителни стойности на S100 A8/A9 при дебют.

При 28 деца (28.3%) са регистрирани отрицателни стойности на S100 протеините. От тях 9 деца са с дебют на заболяването и при нито едно дете не е включен биологичен агент впоследствие. Следователно, в заклю-

чение установяваме, че по-често се включва биологичен агент към терапията при пациентите с положителни стойности на S100 A8/A9 в дебюта на болестта в сравнение с пациентите с отрицателни стойности на S100 A8/A9. При провеждане на χ^2 -квадрат анализ не се установи статистически значима разлика в разпределението на честотата на включване на БА между двете групи с положителни и отрицателни стойности на изследвания биомаркер ($\chi^2=1.50$, $p>0.05$).



Фиг. 2. Абсолютен брой пациенти с положителни/отрицателни стойности на S100 A8/A9 в цялата група с ЮИА и абсолютен брой пациенти с включен БА

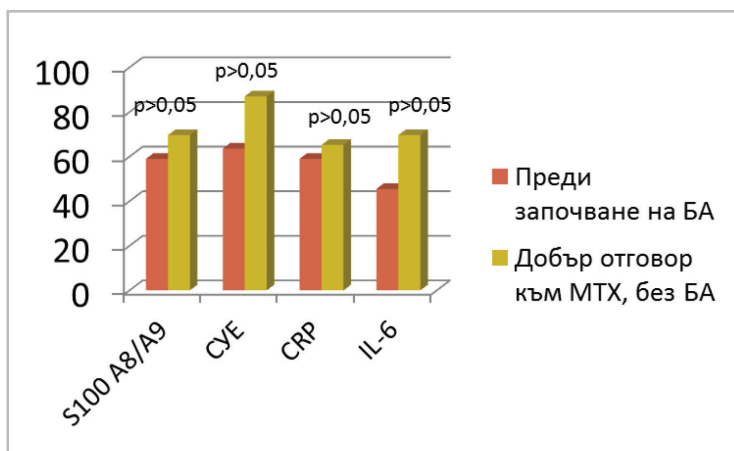
3.11. Сравнителен анализ на средните стойности на биомаркерите, определени в група непосредствено преди започване на лечение с биологичен агент и групата с добър отговор към МТХ

Стойностите на изследваните биомаркери бяха определени и в група от 22 пациента непосредствено преди започване на лечение с биологичен агент. Сравнихме средните стойности с тези на подгрупата с дебют на артрит, при която наблюдавахме при проследяване добър отговор към МТХ (n=23). Констатирахме статистически значима разлика в стойностите на изследваните биомаркери между двете групи. Получените резултати подкрепят твърдението, че S100 A8/A9 може да служи като маркер за активността на заболяването и диференциране на лекарствения отговор (табл. 17).

| Биомаркер | Преди започване на БА – n=22 | Добър отговор към МТХ, без БА – n=23 | |
|-------------------|------------------------------|--------------------------------------|--------|
| S100 A8/A9, ng/mL | 7085.5±7203.53 | 4315.91±1818.09 | p<0.05 |
| CVE, мм | 22±15 | 34±17 | p<0.05 |
| CRP, mg/L | 12.18±16.64 | 43.08±38.03 | p<0.05 |
| IL-6, pg/mL | 26.94±39.92 | 70.48±54.56 | p<0.05 |

Табл. 17. Сравнение на средните стойности на биомаркерите, изследвани непосредствено преди започване на терапия с БА спрямо тези в група с добър лекарствен отговор

Тези две подгрупи бяха сравнени и по абсолютен брой пациенти с положителни стойности на биомаркерите (графика 7). Не установихме статистически значима разлика в броя на изследваните положителни стойности между двете подгрупи.



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

3.12. Корелационен анализ между активността на ЮИА, определена чрез биомаркерите и активността, определена по скалата JADAS 27

В групата от 22 пациента, при които стойностите на биомаркерите бяха изследвани, непосредствено преди започване на лечение с биологичен агент, бяха определени стойностите на JADAS 27. Скалата JADAS 27 е по-

казател за активността на ЮИА. В скорошна публикация на Vulatovic и сътрудници са предложени cut-off стойности, определящи активността – на 75-ти перцентил за ниска болестна активност (JADAS-27 ≤ 2.7) и на 25-ти перцентил за висока болестна активност (JADAS-27 ≥ 6.0). Сред пациентите, при които JADAS 27 е изчислен преди започване на биологично лечение, имаме данни за стойностите му при 19 пациента. При 17 от тях той е със стойност над 6, т.е. това са деца с висока болестна активност според споменатата публикация. Проведеният корелационен анализ не показва статистически значима корелация между стойностите на S100 A8/A9, CRP и IL-6, определени преди започване на биологично лечение и изчисления JADAS 27 (табл. 18). Установихме статистически значима умерена корелация единствено между СУЕ и JADAS 27, което е и очаквано, тъй като скоростта на утаяване на еритроцитите е включена в съставянето на JADAS 27.

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

При провеждане на χ^2 -анализ не установихме статистически значима разлика в честотата на разпределение на абсолютните стойности на S100 A8/A9 между групата с ускорена и тази с нормална СУЕ – $\chi^2=2.54$, $df=1$, $p>0.05$.

При 10 от децата в групата с изследвани биомаркери преди започване на лечение с биологичен агент ($n=22$) проведохме повторно изследване на част от биомаркерите (S100 A8/A9, CRP, IL-6) в еволюцията на заболяването – в рамките на две години от началото на лечението. Сравнихме сред-

| Биомаркер | Преди започване на БА – $n=22$ | |
|------------------|-----------------------------------|------------------------|
| S100A8/A9, ng/mL | 6201.47 \pm 6455.39 | $p=0.681$. $r= -0.10$ |
| СУЕ, мм/ч | 21 \pm 15 | $p<0.05$. $r=0.44$ |
| CRP, mg/L | 9.97 \pm 11.88 | $p=0.304$. $r=0.07$ |
| IL-6, pg/mL | 23.42 \pm 33.48 | $p=0.266$. $r=0.22$ |

Табл. 18. Корелация на стойностите на биомаркерите, определени преди започване на терапия с БА спрямо стойността на JADAS 27

ните стойности между двете изследвания и отчетохме статистически значима разлика между тях (табл. 19). Това показва, че проследяването на стойностите на изследваните биомаркери може да служи като допълнителен показател към клиничната оценка и да се използва за проследяване на ефекта от провежданото лечение.

Сравнихме и абсолютните честоти по отношение на положителните и отрицателните стойности на биомаркерите между двете групи. Статистически значима разлика констатирахме за S100 A8/A9 ($\chi^2=13.33$; $df=1$; $p<0.05$) и CRP ($\chi^2=12.80$; $df=1$; $p<0.05$) (табл. 20).

| Биомаркер | Преди започване на БА – n=10 | Повторно изследване в еволюция – n=10 | |
|-------------------|------------------------------|---------------------------------------|--------|
| S100 A8/A9, ng/mL | 10 611.5±8997.18 | 951.5±1705.17 | p<0.05 |
| CRP, mg/L | 17.57±22.19 | 4.81±11.71 | p<0.05 |
| IL-6, pg/mL | 42.25±53.53 | 14.45±20.89 | p<0.05 |

Табл. 19. Средни стойности на биомаркерите преди започване на лечение с БА и при повторно контролно изследване

| Изследване преди започване на БА | Повторно изследване: |
|----------------------------------|--------------------------------------|
| (+) S100 A8/A9 – 80% (9/10) | (+) S100 A8/A9 – 0% (0/10) p<0.05 |
| (+) CRP – 60% (6/10) | (+) CRP – 0% (0/10) p<0.05 |
| (+) IL-6 – 50% (5/10) | (+) IL-6 – 40% (4/10) p>0.05 |

Табл. 20. Сравнение на абсолютните честоти на положителни и отрицателни стойности на биомаркерите преди започване на лечение с БА и при повторно контролно изследване

3.13. Сравнителен анализ на взаимовръзката на носителството на полиморфизми в *MTHFR* гена при деца с ЮИА с лекарствения отговор и появата на НЛР

При 40 деца бяха изследвани полиморфизмите с.677 C>T (rs1801133: C>T; p.A222V) и с.1298 A>C (rs1801131: A>C; p.E429A) в *MTHFR* гена. Тази група подразделихме на такава с добър лекарствен отговор (n=14) и такава с лош лекарствен отговор (n=26) на базата на липсата или наличие на лечение с биологичен агент съответно. Изследването на полиморфизма с.1298 A>C

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

Табл. 21. Разпределение на алелите в групата с добър лекарствен отговор

не е проведено при двамата пациенти по технически причини. Не установихме сигнификантна разлика в разпределението на алелните честоти на двата полиморфизма в групата с добър и тази с лош лекарствен отговор (с.677 C>T $\chi^2=0.40$; $df=2$; $p>0.05$; с.1298 A>C $\chi^2=0.23$; $df=2$; $p>0.05$) (табл. 21, 22).

При 4 от децата, при които са изследвани полиморфизми регистрирахме НЛР към МТХ – при две хепатотоксичност, при едно загене и при едно главоболие и изтръпване на крайниците. Всички деца, при които наблюдавахме НЛР са носители на редкия алел с.677 C>T – двамата от тях са хомозиготни носители (ТТ) и двамата са хетерозиготни носители (СТ) (табл. 23). Сред всички останали пациенти ($n=36$), при които не са констатирани НЛР към провежданата терапия с МТХ, има двамата хомозиготни (ТТ) носители на редкия алел. Възможно е хомозиготното носителство на този алел да се асоциира с развитието на НЛР, тъй като изглежда значително по-често сред лицата с развитие на странични реакции. Тази находка следва да бъде проверена (потвърдена или отхвърлена) при разширено проучване върху значително по-големи групи индивиди. При провеждане на χ^2 анализ за сравнение на разпределението на алелните честоти между децата с поява на НЛР и тези без НЛР – установихме статистически значима разлика в разпределението на редкия алел в групата с поява на странични реакции (с.677 C>T $\chi^2=9.12$; $df=2$; $\Phi=0.48$; $p<0.05$).

Средната доза на МТХ сред пациентите с изследвани полиморфизми е 8.35 мг/м^2 . Средната доза на МТХ сред децата с поява на НЛР е 6.76 мг/м^2 .

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

Табл. 23. Разпределение на алелите сред групата пациенти с НЛР

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

Табл. 22. Разпределение на алелите в групата с лош лекарствен отговор

Известно е, че терапията с МТХ може да бъде без ефект при част от пациентите с ЮИА. Лош или незадоволителен отговор към МТХ може да се наблюдава в 30–50% от пациентите с ЮИА. Междувременно, терапията с МТХ може да доведе до непоносимост и поява на странични

реакции (най-често от страна на гастроинтестиналния тракт, супресия на костния мозък и хепатотоксичност) при част от пациентите с ЮИА.

Schmeling и колеktiv провеждат първото проучване, касаещо влиянието на полиморфизми в *MTHFR* гена върху ефикасността и токсичността на МТХ при ЮИА. Изследователският колеktiv докладва асоциация на полиморфизма 677 С/С с по-добра поносимост към МТХ. Тази находка се наблюдава и сред нашата група пациенти, при които изследвахме полиморфизмите в *MTHFR* гена. Сред децата без проява на НЛР има само двама носители на дивия алел на полиморфизма с.677 С>Т, докато сред четиримата с проява на НЛР – всички са носители. Странични реакции към МТХ регистрирахме при 4 (10%) от пациентите. Schmeling и колеги докладват странични реакции при 34% от изследваните пациенти – най-често симптоми от страна на гастроинтестиналния тракт, следвани от повишение на серумните нива на чернодробните ензими и косопаг. Странични реакции са регистрирани по-често при пациенти с хетерозиготен генотип 677 С/Т в сравнение с хомозиготния 677 С/С (65% срещу 31%; $p<0.05$). В проведеното от тях проучване са включени 58 деца с ЮИА, приемащи перорално МТХ за период от поне 3 месеца в доза 12.8 ± 2.6 мг/м² (от 8.4 до 20.5 мг/м²). Изполваната средна доза МТХ в групата деца с изследвани полиморфизми, обект на настоящия дисертационен труд, е 8.79 ± 2.2 мг/м² (от 5.0 до 17.8 мг/м²). Вероятно по-малката честота на наблюдавани странични реакции сред изследваните от нас деца може да се обясни с по-ниската използвана доза МТХ в сравнение с използваната от Schmeling и колеktiv. Същият екип докладва асоциация на хомозиготното носителство на 1298 А/А с по-ниска клинична ефективност на терапията с МТХ. Сред пациентите, носители на дивия С алел на полиморфизма А1298С, е наблюдавано по-често подобрение в броя на оточните стави, броя на болезнените стави и спаг в стойностите на СУЕ и CRP в сравнение с хомозиготните носители 1298 А/А. Ние не установихме асоциация на полиморфизма А1298С с лекарствения отговор към МТХ. Факт, който се потвърждава и от проучване проведено от изследователски колеktиви в Япония. В това проучване не се установява асоциация между носителството на полиморфизми в *MTHFR* гена и ефективността и токсичността на провежданата терапия с МТХ.

Друго проучване, потвърждаващо асоциацията на носителство на полиморфизми в *MTHFR* гена с токсичността при терапия с МТХ, е проведено от изследователски екип от Чешката република. Включени са 69 пациента с ЮИА. Установено е отново, че честотата на носителство на дивия

алел 677Т е по-висока сред пациентите с проява на НЛР (52.4% срещу 20.9%; OR 3.88, 95% CI 1.8–8.6, $p < 0.002$). Вероятността за изява на странични лекарствени реакции е значително по-висока сред пациентите с носителство на 677 Т/Т генотип в сравнение с тези носители на 677 С/С генотип (OR 55.5, 95% CI 2.9–1080, $p < 0.001$). Изследователският колектив от Чехия докладва 30% НЛР сред изследваните пациенти при средна използвана доза на МТХ – 14.9 мг/м² седмично. Отново използваната средна доза на МТХ е по-висока (1.7 пъти) от прилаганата при изследваната от нас група деца.

Екипът на Albers и колеги (съставен от изследователи от Холандия, Германия и Белгия) провежда изследване върху 128 пациенти с ЮИА и потвърждава идеята, че различни единични нуклеотидни полиморфизми могат да повлияят ефикасността на провежданата терапия с МТХ. Те изследват шест полиморфизма, разположени в пет различни гени, асоциирани с метаболизма на МТХ [adenosine monophosphate deaminase (*AMPD1*) (34C_T; rs17602729), aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase (*ATIC*) (347C_G; rs2372536), inosine triphosphate pyrophosphatase (*ITPA*) (94C_A; rs41320251), methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) (677C_T; rs1801133 и 1298A_C; rs1801131) и methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (*MTHFD1*)] и установяват, че носителството на хаплотип 1298А-677С се наблюдава значително по-рядко сред пациенти с лош лекарствен отговор към МТХ в сравнение с пациентите с добър лекарствен отговор.

От груга страна едно от последните проучвания, касаещо токсичността на терапията с МТХ, е на екип от Холандия и Италия. Това е проспективно проучване, обхващащо 142 деца с ЮИА. Не установяват статистически значима асоциация между носителството на полиморфизми в *MTHFR* гена и вероятността за поява на странични реакции към МТХ.

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

3.14. Антинуклеарни антитела и взаимовръзка на някои показатели с развитието на увеит

Данни за стойностите на ANA в дебюта на заболяването имахме при 67 от децата. При 25 от тях (37%) е регистриран отрицателен титър на антинуклеарните антитела. При останалите 42 деца (63%) е налице положителен титър. Наблюдавахме инверсия в разпределението по пол между двете групи. Женският пол (29 момичета (69%) сред 42 деца) преобладава в групата с положителни стойности на ANA. В групата с отрицателни стойности на ANA преобладава мъжкият пол – 16 момчета (64%) сред 25 деца. При сравнение на двете групи чрез χ^2 -тест установихме статистическа достоверност на наблюдението, че положителни стойности на антинуклеарни антитела се срещат по-често сред момичета с дебют на ЮИА ($\chi^2=6.97$; $df=1$; $p<0.05$). Този резултат съответства с данните в литературата, че сред пациентите с положителни титри на ANA се наблюдава превалиране на женския пол.

Най-често положителен титър на антинуклеарни антитела в дебюта на болестта установихме при олигоартритната форма на ЮИА ($n=26/42$, 62%), следвани от подгрупата на деца с полиартрит с отрицателен РФ ($n=12/42$, 29%).

Не установихме статистически значима разлика във възрастта на изява на болестта между двете групи с положителни и отрицателни стойности на ANA (6.07 ± 4.36 години срещу 7.11 ± 3.96 години, табл. 24). Не се наблюдава статистически значима разлика и в наличието на положителни или отрицателни титри при децата под и над 6-годишна възраст. И все пак, прави впечатление, че сред децата с положителни титри на антинуклеарните антитела над половината (59%) са на възраст под 6 години. Докато при пациентите с негативни титри малко повече от половината (56%) са на възраст над 6 години.

Не регистрирахме статистически значима корелация между наличието на положителни или отрицателни стойности на ANA, както и титърът им, и активността на артритата, определена чрез брой засегнати стави при дебюта на ЮИА.

В изследваната от нас група пациенти не установихме статистическа достоверност по отношение на титъра на ANA в дебюта на заболяването и включването на нови стави при проследяване на пациентите.

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

Табл. 24. Характеристики на групите с (+) и (-) титри на ANA

Данни за развитие на увеит имахме при седем (n=7/99; 7%) от децата – шест момичета и едно момче. При пет от описаните пациенти е установен двустранен иридоциклит. Всички деца са с олигоартритна форма на ЮИА. Средната възраст на изява на артритта е 3.82 ± 2.67 години. Средната възраст за изява на артритта сред останалите деца (n=92) без увеит е 6.30 ± 4.35 години. Наблюдавахме статистически значима по-ранна възраст на изява на ЮИА в групата с увеит в сравнение с тази без увеит. Средната възраст на изява на увеита е 4.72 ± 2.35 години, т.е. средно около 11 месеца след дебюта на артритта. При едно от децата увеитът предшества с два месеца ставната симптоматика, а при четири от тях се установява съевременно със ставния синдром. При останалите двама от пациентите увеитът възниква на фона на лечение с биологичен агент (етанерсепт), съответно на девети и седемнадесети месец от началото на биологичното лечение и на 49-ти и 34-ти месец след дебюта на ЮИА.

Данни за титъра на антинуклеарните антители при дебюта на артритта имахме при три от седемте деца – и при трите е повишен, съответно 1:320, 1:640 и 1:1280.

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

Изводи

1. В изследваната група деца ювенилният идиопатичен артрит се наблюдава 1.6 пъти по-често при момичета в сравнение с момчета, най-честата наблюдавана подформа е тази на олигоартрит (58%), а най-често засегнатата става е колянната. В близо $\frac{1}{4}$ от случаите се регистрира разширяване на ставния синдром при рецидив.
2. Сравняването на средните стойности на S100 A8/A9 при дебют на ЮИА и при здрави контроли потвърди убедително, че този биомаркер може да е силен индикатор за възпаление.
3. Стойностите на някои от изследваните биомаркери (S100 A8/A9, CRP и IL-6) са сигнификантно по-високи в подгрупата с полиартрит в сравнение с тази с олигоартрит.
4. Изследваните биомаркери не могат да предскажат риска от включване на нови стави при рецидив на заболяването.
5. Приемът на медикаменти преди хоспитализацията не повлиява сигнификантно стойностите на биомаркерите.
6. Изследването на S100 A8/A9 може да служи за диференциране на пациентите с лош от тези с добър лекарствен отговор.
7. По-ранната възраст на дебют на заболяването се асоциира с по-лоша прогноза на артрита и необходимост от включване на биологичен агент при проследяване.
8. Проследяването на стойностите на биомаркерите може да служи като допълнителен показател към клиничната оценка и да се използва за проследяване на ефекта от провежданото лечение.
9. Не се установи сигнификантна разлика в разпределението на алелните честоти на изследваните полиморфизми в *MTHFR* гена в групата с добър и тази с лош лекарствен отговор.
10. Носителството на редкия алел с.677 C>T се асоциира с поява на НЛР към провежданата терапия с МТХ.

Приноси

ПРИНОСИ С ОРИГИНАЛЕН ХАРАКТЕР

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

ПРИНОСИ С ПОТВЪРДИТЕЛЕН ХАРАКТЕР

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

Публикации, научни съобщения и научни проекти

- Ganeva M., St. Stefanov, A. Telcharova, A. Tsakova. Serum levels of biomarkers in patients with juvenile idiopathic arthritis. C. R. Acad. Bulg. Sci. 2017, nog печат.
- Ганева М., Ст. Стефанов. Биомаркери при ювенилен идиопатичен артрит. Педиатрия. 2016, 4; 7-12.
- Ganeva M., St Stefanov, A. Telcharova, D. Mihaylova, R. Saraeva, R. Tzveova, R. Kaneva, A. Tsakova, T. Temelkova. Assessment of disease activity and prognosis in a group of JIA patients. 23rd PReS Congress, Sept. 2016, Genoa, Italy.
- Ганева М., Ст. Стефанов. Генетични маркери за оценка на ефективността от терапията при ювенилен идиопатичен артрит. Практическа педиатрия. 2016, 1; 4-5.
- Ganeva M. Serum MRP8/14 levels in patients with juvenile idiopathic arthritis. Young Investigator Meeting, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, June 2015, Rome, Italy.
- Научен проект „ГРАНТ-2015“ на тема: Анализ на полиморфни варианти в кандидат гени асоциирани с отговора към терапия с метотрексат при деца с юношески идиопатичен артрит. Договор №68/2015 г. към МУ-София.

Благодарности

Бих искала да изразя благодарността си към научния ръководител доц. Стефан Стефанов за ценните напътствия, търпението и съдействието при изготвянето на дисертационния труд, за полезните и изключително интересни дискусии, след които винаги съм се чувствала по-насърчена и вдъхновена.

На скъпите ми колеги и целия екип от медицински сестри на Клиниката по ревматология, кардиология и хематология към СБАЛДБ-ЕАД, благодарение на чиято незаменима и постоянна подкрепа ми бе предоставено във всеки един момент необходимото време и спокойствие за осъществяването на различните етапи от дисертационния труд.

На доц. Росица Митрова и колегите от болница „Лозенец“, сред които, скоро след напускането на студентската скамейка, срещнах постоянна подкрепа и необходим кураж при първите ми стъпки в педиатрията, както и създадох прекрасни приятелства.

На екипа на Клинична лаборатория към СБАЛДБ-ЕАД, които обработваха биологичния материал и оказваха постоянно съдействие и съществен принос за осъществяването на дисертационния труд. На екипа на Централна клинична лаборатория към УМБАЛ „Александровска“ и специално на д-р Аделина Цакова, без чиято помощ нямаше да бъде възможно извършването на основна част от изследванията.

На всички колеги и приятели от СБАЛДБ-ЕАД за помощта и подкрепата във всеки един момент.

Не на последно място на моето семейство за това, че са били винаги до мен и са ме подкрепяли, давали са ми сили и вдъхвали вяра, за неизменната им обич, помощ и търпение.

На моите приятели, с които споделях така необходимите моменти извън подготовката на дисертационния труд.

Сърдечно благодаря на всички, които по един или друг начин допринесоха за осъществяването на дисертационния труд.