

Streszczenie

Młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów (MIZS) to heterogenna grupa autoimmunologicznych lub autozapalnych chorób stawów, które – poprzez zaburzenia struktury i funkcji układu kostno-stawowego – przyczyniać się mogą do niepełnosprawności chorego dziecka. Postępujące zużycie chrząstki stawowej, obserwowane w przebiegu MIZS, stymulowane procesami zapalno-immunologicznymi, skutkuje zachwianiem równowagi pomiędzy funkcją chrząstki i jej biologiczną odpornością na działające siły nacisku. Zaburzenie to przypisywane jest w szczególności zmianom homeostazy komponentów macierzy pozakomórkowej (ECM) tkanki łącznej, współtworzącej chrząstkę. Do tych ostatnich należą – zanurzone w obfitym proteoglikanowym „żelu” – włókna kolagenu typu II. Z uwagi na nie do końca poznany metabolizm wymienionego białka włóknistego u dzieci z MIZS, oraz na kliniczne konsekwencje zaburzeń struktur chrzęstnych, współtworzonych przez wymieniony typ kolagenu, za nadrzędny cel pracy przyjęto ocenę surowiczego stężenia zarówno C-końcowego propeptydu łańcucha α kolagenu typu II (PIICP) – odzwierciedlającego wielkość biosyntezy chrząstki stawowej, jak i C-końcowego telopeptydu łańcucha α kolagenu typu II (CTXII) – jako biomarkera resorpcji wymienionej tkanki, u dzieci z MIZS – zarówno przed leczeniem jak i po uzyskaniu u nich klinicznej poprawy. Ponadto, z uwagi na znaczący udział TNF- α w inicjowaniu procesów zapalnych, leżących u podstaw rozwoju omawianego schorzenia, za przedmiot niniejszej pracy przyjęto także ocenę związku wspomnianego czynnika z markerami obrotu chrząstkowego kolagenu typu II. Dla pełniejszej oceny dynamiki ewentualnych zmian surowiczych stężeń PIICP i CTXII oraz TNF- α postanowiono zweryfikować możliwość istnienia wpływu płci oraz postaci schorzenia, na stężenia ocenianych związków w surowicy krwi pacjentów z MIZS. Dla realizacji nadrzędnego celu pracy postanowiono ocenić także zależność pomiędzy stężeniami markerów obrotu chrzęstnego jak i stężeniem TNF- α a aktywnością procesu zapalnego u chorych, wyrażoną surowiczym stężeniem białka C-reaktywnego (CRP) oraz wartością wskaźnika opadania erytrocytów (ESR). Ilościowej oceny markerów obrotu kostnego dokonano we krwi pozyskanej od 30 dzieci, obojga płci – 19 dziewczynek i 11 chłopców, w wieku od 2 do 12 roku życia, z rozpoznanym nielicznostawowym oraz wielostawowym typem MIZS, zarówno przed – jak i po zastosowaniu terapii modyfikującej przebieg choroby i przyczyniającej się do uzyskania u pacjentów klinicznej poprawy.

W leczeniu chorych dzieci z umiarkowaną aktywnością choroby zastosowano sulfasalazynę (SSA) oraz prednizon (Encorton), zaś w grupie pacjentów z dużą aktywnością MIZS – do wspomnianego leczenia – dołączono metotreksat (MTX).

Materiał referencyjny stanowiły próbki krwi, pozyskane od 30 zdrowych dzieci, w tym 17 dziewczynek i 13 chłopców, w odpowiednio dobranych grupach wiekowych. Ilościowej oceny

markerów obrotu chrzęstnego oraz TNF- α w surowicy krwi zarówno dzieci z rozpoznaniem – w oparciu o kryteria ILAR – MIZS jak i osób zdrowych, dokonano metodami immunoenzymatycznymi, stosując komercyjnie dostępnymi testy, zgodnie z instrukcjami podanymi przez producenta tych testów. Wyniki poddano opracowaniu statystycznemu, przy użyciu programu komputerowego STATISTICA, wersja 12.0, firmy StatSoft Polska.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono znamienne statystycznie ($p=0,0009$) wzrost stężenia PIICP w surowicy krwi dzieci z nowo rozpoznaniem, nieleczonym MIZS, w stosunku do stężenia ocenianego markera we krwi dzieci zdrowych. Ponadto wykazano, że zastosowana terapia, przyczyniająca się do uzyskania u chorych klinicznej poprawy, równocześnie prowadzi do istotnego obniżenia stężenia omawianego markera ($p=0,001$) we krwi pacjentów z artropatią, do stężenia obserwowanego u dzieci zdrowych. Wzrost stężenia ocenianego markera obrotu chrzęstnego był szczególnie nasilony w grupie chorych kwalifikowanych do leczenia SSA i Encortonem ($p=0,004$), w grupie nieleczonych chłopców ($p=0,013$), jak i w grupie pacjentów z wielostawową postacią MIZS ($p=0,00025$). Wykazano ponadto, istotną zależność pomiędzy stężeniem PIICP u dzieci z nieleczonym MIZS a stwierdzoną u tych pacjentów wartością stężenia CRP ($r=0,427$, $p=0,023$) oraz wartością ESR ($r=0,480$, $p=0,007$). Nie stwierdzono natomiast zależności pomiędzy wymienionymi zmiennymi u leczonych dzieci chorych.

Przeprowadzone w ramach niniejszej pracy badania pozwoliły także na stwierdzenie statystycznie znamiennego ($p=0,00041$) wzrostu stężenia CTXII w surowicy krwi dzieci z rozpoznaniem, nieleczonym MIZS, w stosunku do stężenia ocenianego markera w surowicy krwi osób zdrowych. Jednocześnie wykazano, że zastosowanie leków modyfikujących przebieg choroby, doprowadzających u pacjentów do uzyskania klinicznej poprawy, równocześnie przyczynia się do istotnego ($p=0,00086$) obniżenia stężenia CTXII we krwi osób chorych – poddanych terapii. Najwyższe wartości stężeń ocenianego telopeptydu stwierdzono w grupie pacjentów zakwalifikowanych do leczenia SSA, Encortonem oraz MTX ($p=0,00001$) oraz w grupie nieleczonych dziewczynek ($p=0,0009$). Nie stwierdzono zależności pomiędzy stężeniami CTXII w surowicy krwi pacjentów zarówno przed leczeniem jak i po zastosowaniu terapii, a wartościami wskaźników procesu zapalnego, tj. CRP oraz ESR, cechującymi tych chorych.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono ponadto znamienne statystycznie ($p=0,0057$) wzrost stężenia TNF- α w surowicy krwi dzieci z rozpoznaniem MIZS przed zastosowaniem leczenia, w stosunku do stężenia ocenianego markera w surowicy osób zdrowych. Uzyskane wyniki wskazują ponadto, że zastosowanie leków modyfikujących stan zapalny w przebiegu MIZS, równocześnie przyczynia się do znamiennego ($p=0,000284$) obniżenia stężenia TNF- α we krwi osób chorych – poddanych terapii. Wartości stężeń ocenianej cytokiny

były wyższe we krwi pacjentów leczonych SSA i Encortonem, we krwi nieleczonych chłopców, oraz we krwi dzieci z wielostawową postacią artropatii. Wykazano ponadto, istotny związek pomiędzy stężeniem TNF- α u dzieci z nieleczonym MIZS a stwierdzoną u tych pacjentów wartością stężenia CRP ($r=0,431$, $p=0,0196$) oraz wartością ESR ($r=0,390$, $p=0,0332$). Związek o podobnej sile do wyżej wspomnianych, stwierdzono pomiędzy surowiczym stężeniem TNF- α u leczonych dzieci chorych a charakteryzującą te dzieci wartością ESR ($r=0,382$, $p=0,041$).

Przeprowadzona w ramach niniejszej pracy analiza siły prostoliniowej zależności pomiędzy stężeniem PIICP a stężeniem CTXII w surowicy krwi kolejno dzieci zdrowych oraz pacjentów z MIZS zarówno przed terapią jak i po zastosowaniu u nich leczenia modyfikującego przebieg choroby, opisane wartościami współczynnika korelacji Pearsona, wynoszącymi odpowiednio: $r=0,0070$ ($p=0,971$), $r=-0,0457$ ($p=0,810$), $r=-0,0618$ ($p=0,746$), wskazały na brak korelacji pomiędzy ocenianymi parametrami. Podobnie, przeprowadzona ocena wzajemnych powiązań pomiędzy stężeniem PIICP a stężeniem TNF- α we krwi dzieci zdrowych, opisana współczynnikiem korelacji Pearsona $r=-0,2281$ ($p=0,226$), wskazała na brak związku pomiędzy wymienionymi cechami. Wykazano natomiast bardzo wysoką korelację ($r=0,8980$, $p=0,0001$) pomiędzy stężeniem propeptydu a stężeniem TNF- α we krwi nieleczonych dzieci z artropatią. Ponadto, istotną ($r=0,4201$, $p=0,021$) zależność pomiędzy wymienionymi zmiennymi stwierdzono w grupie pacjentów z wyrównanym w wyniku leczenia stanem klinicznym schorzenia. Przeprowadzona ocena współwystępowania zależności pomiędzy surowiczymi stężeniami CTXII i TNF- α wykazała odmienne tendencje u dzieci zdrowych w stosunku do tych cechujących pacjentów z MIZS. I tak, podczas gdy pomiędzy surowiczymi stężeniami CTXII i TNF- α u dzieci zdrowych stwierdzono nieistotną, dodatnią ($r=0,2001$, $p=0,289$) zależność, to ujemne związki o podobnej sile stwierdzono pomiędzy ocenianymi cechami zarówno w grupie dzieci z nieleczonym MIZS ($r=-0,2606$, $p=0,164$) jak i w grupie pacjentów po zakończeniu terapii ($r=-0,1694$, $p=0,371$).

Stężenia krążących we krwi markerów obrotu chrząstnego – regulowane wpływami czynników prozapalnych, szczególnie TNF- α , proteolitycznych czy prooksydacyjnych, sprzyjających rozwojowi MIZS – ulegają w przebiegu omawianego schorzenia zmianom. Obserwowany u leczonych dzieci z MIZS, po uzyskaniu u nich klinicznej poprawy, obraz degradacji kolagenu typu II, wskazuje na potrzebę kontynuowania terapii, która przyczyniając się do zmniejszenia bólu i wygaszenia procesów zapalnych, jednocześnie doprowadzi do całkowitej regeneracji komponentów ECM tkanki łącznej.

Słowa kluczowe: młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów, markery obrotu chrząstnego, PIICP, CTXII, TNF- α

Abstract

Juvenile idiopathic arthritis (JIA) is a heterogeneous group of autoimmune or autoinflammatory joint diseases that may contribute to the disability of an afflicted child, due to disturbances in the structure and function of the osteoarticular system. Progressive wear of joint cartilage, observed in the course of JIA, stimulated by inflammatory and immunological processes, results in the imbalance between the biological resistance of the cartilage, its function and pressure. In particular, these disorders are attributed to changes in the homeostasis of extracellular matrix (ECM) components of connective tissue, of which the cartilage is composed. The latter include collagen type II, immersed in a rich proteoglycan "gel". Due to not fully understood metabolism of this type of fibrous protein in children with JIA and clinical consequences of abnormalities of cartilage structures - co-formed by the above-mentioned type of collagen - the primary aim of the study was to evaluate the serum concentration of both, C-terminal propeptide of collagen alpha-1 (II) chain (PIICP), which reflects the extent of joint cartilage biosynthesis, and C-terminal telopeptide of collagen alpha-1 (II) chain (CTXII) as a biomarker of resorption of this tissue, in JIA children before and after clinical improvement.

Additionally, due to the significant involvement of TNF- α in initiating the inflammatory processes underlying the development of this disorder, the object of the thesis was also to assess the relation of this factor with cartilage markers of collagen type II turnover. For a better assessment of the dynamics of possible changes in serum PIICP and CTXII and TNF- α concentrations, it was decided to verify if gender and the disease form could affect the concentrations of the evaluated compounds in the serum of JIA patients. In order to achieve the main objective of the thesis, I decided to assess the relationship between the cartilage markers and TNF- α concentrations, the activity of the inflammatory process in patients, expressed as serum C-reactive protein (CRP), and the erythrocyte sedimentation rate (ESR).

Quantitative assessment of bone turnover markers was performed in the blood obtained from 30 children of both sexes, i.e. 19 girls and 11 boys, aged from 2 to 12 years, diagnosed with an oligoarticular and polyarticular types of JIA, both, before and after the therapy modifying the course of the disease, and contributing to clinical improvement. In the treatment of afflicted children with moderate disease activity, sulfasalazine (SSA) was used, whereas Encorton was applied in the group of patients with high JIA activity, and methotrexate (MTX) was included to this treatment. The reference material consisted of blood samples obtained from 30 healthy children, including 17 girls and 13 boys, in accordingly selected age groups. Quantitative evaluation of cartilage markers and TNF- α in serum of both, children diagnosed with JIA (based on ILAR classification criteria) and healthy individuals, was performed with immunoenzymatic methods, and commercially available tests, in accordance with the manufacturer's instructions.

The results were analyzed statistically, using the STATISTICA computer software, version 12., by StatSoft Polska.

As a result of the tests, a statistically significant ($p=0.0009$) increase in PIICP concentration in the blood serum of children with newly diagnosed, untreated JIA was found, in relation to the concentration of the marker in the blood of healthy children. Moreover, it was shown that the applied therapy contributing to the clinical improvement in patients, at the same time led to a significant reduction in the concentration of the marker ($p=0.001$) in the blood of patients with the arthropathy, to its level observed in healthy children.

The increase in the concentration of the assessed cartilage turnover marker was particularly high in the group of patients qualified for SSA and Encorton ($p=0.004$), in the group of untreated boys ($p=0.013$), and in the group of patients with polyarticular JIA ($p=0.00025$). Moreover, there was a significant relationship between PIICP concentration in children with untreated JIA and the CRP concentration ($r=0.427$, $p=0.023$) and ESR ($r=0.480$, $p=0.007$) in these patients. However, no relationship was found between these variables in treated children. The research conducted as part of this thesis also allowed to observe statistically significant ($p=0.00041$) increase in CTXII concentration in the blood serum of children with diagnosed but untreated JIA, in relation to the concentration of this marker in the blood serum of healthy subjects. At the same time, it was shown that the use of disease-modifying drugs that resulted in achieving clinical improvement of patients, simultaneously contributed to a significant ($p=0.00086$) reduction in CTXII in the blood of patients who underwent therapy.

The highest concentrations of the evaluated telopeptide were found in the group of patients qualified for SSA, Encorton and MTX treatments ($p=0.00001$), and in the group of untreated girls ($p=0.0009$). There was no relationship between CTXII levels in the patients' blood serum both, before and after treatment, and the values of the inflammatory process indicators, i.e. CRP and ESR, which characterize these patients.

As a result of the conducted research, a statistically significant ($p=0.0057$) increase in TNF- α concentration in the blood serum of children with diagnosed JIA before the treatment was observed, in relation to the serum concentration of this marker in healthy individuals. The obtained results also indicate that the use of drugs modifying inflammation in the course of JIA, simultaneously contributes to a significant ($p=0.000284$) reduction in TNF- α concentration in the blood of patients who underwent therapy. The concentration of the evaluated cytokine was higher in the blood of patients treated with SSA and Encorton, in the blood of untreated boys, and in the blood of children with polyarticular arthropathy. What is more, there was a significant correlation between TNF- α concentration in children with untreated JIA and the CRP concentration ($r=0.431$,

$p=0.0196$) and ESR ($r=0.390$, $p=0.0332$) observed in these patients. A similar correlation was found between serum TNF- α concentration in the treated children and the ESR characterizing these patients ($r=0.382$, $p=0.041$).

The analysis of the strength of linear relationship between the PIICP concentration and serum concentration of CTXII in healthy children and patients with JIA before and after the disease-modifying treatment, described by the Pearson correlation coefficient, $r=0.0070$ ($p=0.971$), $r=-0.0457$ ($p=0.810$), $r=-0.0618$ ($p=0.746$) respectively, indicated a lack of correlation between the assessed parameters. Likewise, the assessment of relation between PIICP concentration and TNF- α concentration in healthy children's blood, described by Pearson's correlation coefficient $r=-0.2281$ ($p=0.226$), indicated a lack of correlation between these features.

On the other hand, a very high correlation was found ($r=0.8980$, $p=0.0001$) between the concentration of the propeptide and the concentration of TNF- α in the blood of untreated children with the arthropathy. In addition, significant ($r=0.4201$, $p=0.021$) dependence between these variables was observed in the group of patients whose clinical status stabilized after treatment. The performed assessment of the coexistence of the relationship between serum concentrations of CTXII and TNF- α showed different trends in healthy children compared to those of JIA patients. Namely, non-significant positive correlation ($r=0.2001$, $p=0.289$) was recorded between serum concentrations of CTXII and TNF- α in healthy children, whereas negative correlations of similar strength were found between the assessed features in both children with untreated JIA ($r=-0.2606$, $p=0.164$) and in the group of patients after completion of therapy ($r=-0.1696$, $p=0.371$).

Concentrations of cartilage markers circulating in the blood - which are regulated by the effects of pro-inflammatory factors, especially TNF- α , proteolytic or prooxidative ones, contributing to the development of JIA - are changing in the course of the disease. Degradation of collagen type II observed in treated children with JIA, after their clinical improvement, indicates the need to continue therapy, which will help to reduce pain and suppress inflammatory processes, and will simultaneously lead to complete regeneration of ECM components of connective tissue.

Key words: juvenile idiopathic arthritis, cartilage turnover markers, PIICP, CTXII, TNF- α