

Karolina Adamczak

**Wybrane czynniki proapoptotyczne
i antyapoptotyczne
w młodzieńczym idiopatycznym zapaleniu stawów**

Rozprawa doktorska

Promotor: prof. dr hab. n. med. Marek Niedziela

Klinika Endokrynologii i Reumatologii Dziecięcej
II Katedra Pediatrii
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

Poznań 2014

Projekt finansowany był z grantu promotorskiego MNiSW (N N407 454037)

SPIS TREŚCI

Spis treści	2
Objaśnienia skrótów	4
Spis tabel	6
Spis rycin	8
I. Wstęp	10
1. Klasyfikacja MIZS	12
1.1 Układowa postać MIZS	14
1.2 Postać skąpostawowa	15
1.3 Postać wielostawowa z ujemnym czynnikiem reumatoidalnym	16
1.4 Postać wielostawowa z dodatnim czynnikiem reumatoidalnym	17
1.5 Łuszczycowe zapalenie stawów	18
1.6 Zapalenie przyczepów ścięgien z zapaleniem stawów	18
1.7 Niezróznicowane zapalenia stawów	19
2. Epidemiologia	19
3. Etiologia choroby	20
3.1 Czynniki genetyczne	20
3.2 Czynniki środowiskowe	22
4. Patogeneza choroby	22
5. Zmiany histopatologiczne	24
6. Homeostaza kostna	25
6.1 RANKL	26
6.2 RANK	27
6.3 OPG	28
6.4 Układ RANKL/RANK/OPG w procesie homeostazy kostnej	30
7. TRAIL	31
8. Zmiany kostne w przebiegu procesu zapalnego	32

9. Diagnostyka	34
10. Leczenie	35
II. Założenia pracy	39
III. Cele pracy	40
IV. Pacjenci i metody	41
V. Wyniki	50
1. Charakterystyka badanych grup	50
2. Podgrupa I - pacjenci ze świeżo rozpoznanym MIZS dotychczas nie leczeni	54
3. Podgrupa II - pacjenci z MIZS zakwalifikowani do leczenia biologicznego etanerceptem ze względu na brak uzyskania poprawy pod wpływem standardowego leczenia farmakologicznego	76
4. Ocena stężenia OPG, RANKL i TRAIL w płynie stawowym pacjentów z podgrupy I i podgrupy II	104
VI. DYSKUSJA	108
VII. WNIOSKI	119
VIII. STRESZCZENIE	120
IX. SUMMARY	123
X. PIŚMIENNICTWO	125

OBJAŚNIENIA SKRÓTÓW

ACR – American College of Rheumatology

ANA - przeciwciała przeciwjądrowe (ang. antinuclear antibodies)

ANCA – przeciwciała przeciw cytoplazmie neutrofilów (ang. anti-neutrophil cytoplasmic antibodies)

anty-CCP – przeciwciała przeciwcytrulinowe (ang. anti-cyclic citrullinated peptide antibodies)

AP-1 – białko aktywujące 1 (ang. activator protein 1)

AT – azatiopryna

CHAQ – kwestionariusz oceny stanu funkcjonalnego (ang. Childhood Health Assessment Questionnaire)

CMP – wirus cytomegalii (ang. Cytomegalovirus)

CRP – białko C-reaktywne (ang. C-reactive protein)

CsA – cyklosporyna A

EBV – wirus Ebsteina-Barr (ang. Epstein-Barr virus)

ELISA – test immunoenzymatyczny (ang. enzyme-linked immunosorbent assay)

FGF – czynnik wzrostu fibroblastów (ang. fibroblasts growth factor)

GKS – glikokortykosteroidy

GM-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (ang. granulocyte-macrophage colony stimulating factor)

Hb - hemoglobina

Ht - hematokryt

HLA – antygen ludzkich leukocytów (ang. human leukocyte antigen)

ILAR – Międzynarodowa Liga Stowarzyszeń Reumatologicznych (ang. International League of Associations for Rheumatology)

IGF-1 – insulinopodobny czynnik wzrostu (insulin-like growth factor 1)

IL-1 - interleukina 1

IL-6 – interleukina 6

IL-10 – interleukina 10

IL-17 – interleukina 17

IL-18 – interleukina 18

LMPCh – leki modyfikujące przebieg choroby

MAPKs – kinazy białek aktywnych mitogennie (ang. mitogen-activated protein kinases)

M-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów (ang. macrophage colony stimulating factor)

MIF – czynnik hamujący migrację makrofagów (ang. macrophage migration inhibitory factor)

MIZS – młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów

NFATc1 – jądrowy czynnik cytoplazmy aktywnych limfocytów T 1 (ang. nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1)

NF κ B – jądrowy czynnik κ B (ang. nuclear factor κ B)

NFZ – Narodowy Fundusz Zdrowia

MTX - metotrexat

OB – odczyn Biernackiego

OPG - osteoprotegeryna

PDGF – płytkopochodny czynnik wzrostu (ang. platelet-derived growth factor)

PGE2 – prostaglandyna E 2

PLT - płytki krwi

PTH - parathormon

RANK – receptor aktywatora jądrowego czynnika κ B (ang. receptor activator for nuclear factor κ B)

RANKL – ligand aktywatora receptora jądrowego czynnika κ B (ang. receptor activator of nuclear factor κ B ligand)

RBC – krwinki czerwone (ang. red blood cells)

RF – czynnik reumatoidalny (ang. rheumatoid factor)

RZS – reumatoidalne zapalenie stawów

TGF- β – transformujący czynnik wzrostu β (ang. transforming growth factor β)

TNF α - czynnik martwicy nowotworu α (ang. tumor necrosis factor α)

TNF-R1 – receptor dla czynnika martwicy nowotworów (ang. tumor necrosis factor receptor)

TRAIL – ligand receptora dla czynnika martwicy nowotworów indukującego apoptozę (ang. TNF-related apoptosis inducing ligand)

TRAF 6 – czynnik związany z receptorem czynnika martwicy nowotworów (ang. TNF receptor associated factor)

SSA – sulfosalazyna

VAS – skala wizualno-analogowa (ang. Visual Analogue Scale)

VEGF – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. vascular endothelial growth factor)

WBC – krwinki białe (ang. white blood cells)

SPIS TABEL

Tabela 1. Klasyfikacja młodzieńczego idiopatycznego zapalenia stawów (wg ILAR)	10
Tabela 2. Lista wykluczeń	11
Tabela 3. Klasyfikacja MIZS wg ILAR zmodyfikowana w 2001r.	12
Tabela 4. Udział alleli układu HLA w rozwoju poszczególnych podtypów MIZS	21
Tabela 5. Allele układu HLA zmniejszające ryzyko rozwoju MIZS	21
Tabela 6. Geny spoza układu HLA zwiększające ryzyko rozwoju MIZS	22
Tabela 7. Granica wykrywalności i precyzja metody oznaczanych cytokin	46
Tabela 8. Wartości referencyjne parametrów morfologii krwi żyłnej zależności od płci i wieku.	47 w
Tabela 9. Wiek, wzrost, masa ciała w badanych grupach oraz grupie kontrolnej	52
Tabela 10. Wiek zachorowania w zależności od płci	52
Tabela 11. Okres czasu pomiędzy badaniami kontrolnymi w badanych grupach	53
Tabela 12. Dawki metotrexatu i metyloprednizolonu stosowane w podgrupie I w czasie trwania badania.	55
Tabela 13. Charakterystyka podgrupy I oraz grupy kontrolnej - parametry laboratoryjne, stężenie badanych cytokin, wskaźnik aktywności choroby oraz wskaźnik stanu funkcjonalnego	57
Tabela 14. Porównanie stężenia OPG, RANKL i TRAIL w podgrupie I w zależności od obecności przeciwciał przeciwjądrowych ANA oraz czasu jaki upłynął od wystąpienia objawów do włączenia leczenia.	63
Tabela 15. Charakterystyka podgrupy I - parametry laboratoryjne, stężenie badanych cytokin, wskaźnik aktywności choroby oraz wskaźnik stanu funkcjonalnego w czasie 1 i 2.	64
Tabela 16. Stężenia OPG, RANKL, TRAIL u poszczególnych pacjentów w czasie 0, 1 i 2.	70
Tabela 17. Średnie wartości stężeń OPG, RANKL i TRAIL w czasie 0, 1 i 2	70
Tabela 18. Stężenia OPG, RANKL i TRAIL w czasie 0 i 2 w grupie chorych z aktywną oraz nieaktywną postacią MIZS	73

Tabela 19. Porównanie stężenia OPG, RANKL i TRAIL w podgrupie I, w czasie 1 i 2, w zależności od obecności przeciwciał ANA	75
Tabela 20. Charakterystyka podgrupy II oraz grupy kontrolnej - parametry laboratoryjne, stężenie badanych cytokin, wskaźnik aktywności choroby oraz wskaźnik stanu funkcjonalnego.	78
Tabela 21. Porównanie stężenia OPG, RANKL i TRAIL w podgrupie II, w zależności od obecności przeciwciał przeciwjądrowych ANA.	82
Tabela 22. Charakterystyka podgrupy II - parametry laboratoryjne, stężenie badanych cytokin, wskaźnik aktywności choroby oraz wskaźnik stanu funkcjonalnego w czasie 1 i 2.	83
Tabela 23. Stężenia OPG, RANKL, TRAIL u poszczególnych pacjentów w czasie 0, 1 i 2, w podgrupie II.	89
Tabela 24. Średnie wartości stężeń OPG, RANKL i TRAIL w podgrupie II, w czasie 0, 1 i 2.	89
Tabela 25. Stężenia OPG, RANKL i TRAIL w czasie 0 i 2 w grupie chorych z aktywną oraz nieaktywną postacią MIZS	93
Tabela 26. Porównanie stężenia OPG, RANKL i TRAIL w podgrupie II, w czasie 1 i 2, w zależności od obecności przeciwciał ANA.	94
Tabela 27. Charakterystyka grupy pacjentów z postacią skąpostawową w obrębie podgrupy II w czasie 0, 1 i 2 (parametry laboratoryjne, stężenia cytokin, wskaźniki aktywności choroby, wskaźnik niepełnosprawności).	97
Tabela 28. Charakterystyka grupy pacjentów z postacią wielostawową w obrębie podgrupy II w czasie 0, 1 i 2 (parametry laboratoryjne, stężenia cytokin, wskaźniki aktywności choroby, wskaźnik niepełnosprawności).	98
Tabela 29. Wartości stężeń OPG, RANKL i TRAIL w czasie 0,1, 2, w grupie chorych z postacią skąpostawową i wielostawową, w obrębie podgrupy II.	101
Tabela 30. Charakterystyka pacjentów, od których pobrano płyn stawowy.	104
Tabela 31. Stężenia OPG, RANKL, TRAIL w surowicy i płynie stawowym pacjentów, od których pobrano płyn stawowy.	105

SPIS RYCIN

Rycina 1. Schemat patogenezы MIZS wg McInnse [35] w modyfikacji własnej.	24
Rycina 2. Przekazywanie sygnału z receptora RANK do wnętrza komórki. Rycina wg Boyce [61] w modyfikacji własnej.	28
Rycina 3. Rola OPG w regulacji odpowiedzi immunologicznej wg Theill [70] w modyfikacji własnej.	29
Rycina 4. Rola RANKL/RANK/OPG w procesie osteoklastogenezy wg Takahashi [141] w modyfikacji własnej.	31
Rycina 5. Wiązanie TRAIL z receptorami wg Neve [71] w modyfikacji własnej	32
Rycina 6. Destrukcja kości w przebiegu MIZS wg Okamoto [74] w modyfikacji własnej.	33
Rycina 7. Postacie MIZS w badanych podgrupach.	50
Rycina 8. Obciążony wywiad rodzinny chorobami reumatycznymi w badanych podgrupach.	51
Rycina 9. Stawy zajęte procesem zapalnym.	53
Rycina 10. Porównanie wartości OB (A) oraz stężenia CRP (B) pomiędzy podgrupą I, a grupą kontrolną.	58
Rycina 11. Porównanie wartości OB (A) oraz stężenia CRP (B) w zależności od czasu jaki upłynął od wystąpienia objawów do postawienia rozpoznania.	59
Rycina 12. Porównanie stężeń OPG (A), RANKL (B) i TRAIL (C) pomiędzy podgrupą I i grupą kontrolną w czasie 0.	61
Rycina 13. Porównanie wartości OB w czasie 1 pomiędzy podgrupą I, a grupą kontrolną.	67
Rycina 14. Porównanie wartości OB w czasie 2 pomiędzy podgrupą I, a grupą kontrolną	67
Rycina 15. Porównanie wartości OB w podgrupie I pomiędzy czasem 0,1 i 2.	68
Rycina 16. Porównanie stężeń OPG w podgrupie 1, w zależności od czasu.	71
Rycina 17. Porównanie stężeń RANKL w podgrupie 1, w zależności od czasu.	72
Rycina 18. Porównanie stężeń TRAIL w podgrupie I, w zależności od czasu.	73
Rycina 19. Porównanie stężenia OPG w czasie 0 i 2 w grupie chorych, którzy nie spełniali kryteriów choroby aktywnej, w czasie 2 badania kontrolnego.	74

Rycina 20. Wartość OB w podgrupie II, w czasie włączenia do badania i w grupie kontrolnej.	79
Rycina 21. Stężenie CRP w podgrupie II, w czasie 0 oraz w grupie kontrolnej.	80
Rycina 22. Porównanie stężeń OPG (A), RANKL (B) i TRAIL (C) pomiędzy podgrupą II i grupą kontrolną w czasie 0.	80
Rycina 23. Porównanie wartości OB w podgrupie II pomiędzy czasem 0,1 i 2.	86
Rycina 24. Porównanie stężenia CRP w podgrupie II w czasie 0, 1 i 2.	87
Rycina 25. Porównanie stężeń OPG i TRAIL pomiędzy podgrupą II i grupą kontrolną w czasie 1.	90
Rycina 26. Porównanie stężeń OPG w podgrupie II, w zależności od czasu.	91
Rycina 27. Porównanie stężeń RANKL w podgrupie II, w zależności od czasu.	92
Rycina 28. Porównanie stężeń TRAIL w podgrupie II, w zależności od czasu.	93
Rycina 29. Porównanie stężenia TRAIL w czasie 1 pomiędzy postacią wielostawową podgrupy II i grupą kontrolną.	102
Rycina 30. Porównanie stężeń badanych cytokin pomiędzy stężeniami w surowicy i płynie stawowym.	105

I. WSTĘP

Młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów (MIZS) jest najczęstszą zapalną o podłożu immunologicznym chorobą tkanki łącznej wieku rozwojowego. Choroba przebiega z okresami zaostrzeń oraz remisji prowadząc do upośledzenia funkcji stawów, a w konsekwencji do inwalidztwa.

International League of Associations for Rheumatology (ILAR) w czasie spotkania w Durbanie, w 1997r. ustaliła definicję MIZS jako zapalenie stawów rozpoczynające się przed 16 r. ż. i trwające przynajmniej 6 tygodni. Wymagane jest także wykluczenie innych jednostek chorobowych, w przebiegu których może dojść do zapalenia stawów. Ze względu na niejednorodny przebieg choroby ILAR wyróżniła 7 podtypów MIZS w oparciu o liczbę zajętych stawów, objawy zajęcia narządów wewnętrznych, wyniki badań dodatkowych obraz kliniczny oraz rokowanie. **[Tabela 1].** Ustalenie podtypu MIZS następuje w ciągu pierwszych 6 miesięcy trwania choroby [1].

Tabela 1. Klasyfikacja młodzieńczego idiopatycznego zapalenia stawów (wg ILAR) [1].

1. Zapalenie stawów o początku uogólnionym.
2. Zapalenie stawów z zajęciem niewielu stawów
$\frac{35}{17}$ przetrwałe
$\frac{35}{17}$ rozszerzające się
3. Zapalenie wielu stawów z dodatnim czynnikiem reumatoidalnym.
4. Zapalenie wielu stawów z ujemnym czynnikiem reumatoidalnym.
5. Łuszczycowe zapalenie stawów.
6. Zapalenie przyczepów ścięgien z zapaleniem stawów.
7. Inne zapalenie stawów:
$\frac{35}{17}$ nie spełniające kryteriów ww. rozpoznań
$\frac{35}{17}$ posiadające cechy więcej niż jednego rozpoznania

W tabeli 2 przedstawiono listę wykluczeń [2].

Tabela 2. Lista wykluczeń

<p>1. Infekcyjne zapalenie stawów:</p> <ul style="list-style-type: none">³⁵/₁₇ Bakteryjne (w tym gruźlicze)³⁵/₁₇ Wirusowe³⁵/₁₇ Grzybicze³⁵/₁₇ Wywołane przez bakterie atypowe (<i>Mycoplasma pneumoniae</i>)³⁵/₁₇ Wywołane przez krętki i riketsje (<i>Borrelia burgdorferi</i>)
<p>2. Reaktywne zapalenia stawów</p>
<p>3. Alergiczne i toksyczne zapalenia stawów</p> <ul style="list-style-type: none">³⁵/₁₇ Reakcje poszczepienne³⁵/₁₇ Reakcje polekowe³⁵/₁₇ Reakcje pokarmowe
<p>4. Artropatie w przebiegu chorób nowotworowych</p> <ul style="list-style-type: none">³⁵/₁₇ białaczki³⁵/₁₇ chłoniaki³⁵/₁₇ guzy lite
<p>5. Artropatie w przebiegu chorób krwi</p> <ul style="list-style-type: none">³⁵/₁₇ hemofilie³⁵/₁₇ niedokrwistości hemolityczne
<p>6. Zapalenia stawów w przebiegu innych chorób zapalnych tkanki łącznej.</p>
<p>7. Artropatie w przebiegu chorób metabolicznych oraz niezapalnych chorób tkanki łącznej.</p>

8. Artropatie w przebiegu chorób o podłożu immunologicznym, a nie zaliczanych do układowych zapalnych chorób tkanki łącznej

³⁵₁₇ sarkoidoza

³⁵₁₇ gorączka śródziemnomorska

9. Fibromialgia i gościec psychogeny.

W przebiegu MIZS przewlekły proces zapalny obejmuje struktury stawowe. Występuje obrzęk stawów z towarzyszącym bólem, ograniczeniem ruchomości i wzmożonym uciepleniem. Skutkiem toczącego się procesu zapalnego w obrębie stawu jest przerost błony maziowej, uszkodzenie chrząstki stawowej, zwężenie szpar stawowych, powstanie nadżerek kostnych oraz geod, osteoporoza, powstanie przykurczy oraz ankylozy [2]. Oprócz zmian w obrębie stawów MIZS niesie ze sobą ryzyko powikłań pozastawowych: zaniku mięśni w okolicy stawów zajętych procesem zapalnym, osteoporozy okołostawowej i uogólnionej, zahamowania wzrostu, niedokrwistości, zapalenia błony naczyniowej oka (zwłaszcza wśród pacjentów ze skąpostawową postacią MIZS), amyloidozy, zespołu aktywacji makrofagów [4].

1. KLASYFIKACJA MIZS

W 2001r., w Edmonton ILAR zmodyfikowała klasyfikację MIZS przyjętą w 1997r. w Durbanie uściślając kryteria rozpoznania dla poszczególnych podtypów MIZS [Tabela 3].

Do czynników zwiększających ryzyko złego przebiegu choroby należą: wczesny wiek zachorowania (poniżej 6 r. ż), utrzymujące się powyżej 6 tygodni objawy układowe, czas trwania choroby powyżej 5 lat.

Możliwe powikłania:

³⁵₁₇ ryzyko rozwoju zespołu aktywacji makrofaga

³⁵₁₇ ryzyko rozwoju amyloidozy

³⁵₁₇ zaburzenia rozwoju, niskorosłość

³⁵₁₇ nawracające infekcje

³⁵₁₇ kalectwo związane z uszkodzeniem narządu ruchu

$\frac{35}{17}$ zgon [5]

Tabela 3. Klasyfikacja MIZS wg ILAR zmodyfikowana w 2001r.

<p>Postać układowa MIZS</p>	<p>Zapalenie jednego lub wielu stawów, gorączka obecna przynajmniej od 2 tygodni (występująca codziennie i utrzymująca się przynajmniej przez 3 dni, obecność co najmniej 1 z objawów:</p> <p style="padding-left: 20px;">³⁵/₁₇ zwiewna, polimorficzna wysypka</p> <p style="padding-left: 20px;">³⁵/₁₇ uogólnione powiększenie węzłów chłonnych</p> <p style="padding-left: 20px;">³⁵/₁₇ hepatomegalia lub/oraz splenomegalia</p> <p style="padding-left: 20px;">³⁵/₁₇ zapalenie błon surowiczych</p> <p>wykluczenie a, b, c, d</p>
<p>Postać skąpostawowa</p>	<p>Zapalenie 1 – 4 stawów obecne w pierwszych 6 miesiącach trwania choroby</p> <p style="padding-left: 20px;">³⁵/₁₇ postać przetrwała - zajęcie procesem zapalnym ≤ 4 stawów</p> <p style="padding-left: 20px;">³⁵/₁₇ postać rozszerzająca się – zajęcie procesem zapalnym ≥ 4 stawów po pierwszych 6 miesiącach trwania choroby</p> <p>wykluczenie a, b, c, d</p>
<p>Postać wielostawowa z dodatnim czynnikiem reumatoidalnym</p>	<p>Zapalenie ≥ 5 stawów w ciągu pierwszych 6 miesięcy trwania choroby, obecny RF przynajmniej w dwóch badaniach wykonanych w ciągu 3 miesięcy</p> <p>wykluczenie a, b, c, e</p>
<p>Postać wielostawowa z ujemnym czynnikiem reumatoidalnym</p>	<p>Zapalenie ≥ 5 stawów w ciągu pierwszych 6 miesięcy trwania choroby, ujemny RF</p> <p>wykluczenie a, b, c, d, e</p>
<p>Łuszczycowe zapalenie stawów</p>	<p>Zapalenie stawów i łuszczyca lub zapalenie stawów i przynajmniej obecne 2 objawy z poniższych:</p> <p style="padding-left: 20px;">³⁵/₁₇ dactylitis</p> <p style="padding-left: 20px;">³⁵/₁₇ zmiany łuszczycowe na paznokciach</p> <p style="padding-left: 20px;">³⁵/₁₇ łuszczyca u krewnego 1 stopnia</p> <p>wykluczenie: b, c, d, e</p>
<p>Zapalenie stawów z zapaleniem przyczepów ścięgien</p>	<p>Zapalenie stawów z zapaleniem przyczepów ścięgien lub zapalenie stawów i zapalenie przyczepów ścięgien oraz obecność 2 objawów z poniższych:</p> <p style="padding-left: 20px;">³⁵/₁₇ zapalenie stawów krzyżowo-biodrowych lub ból okolicy krzyżowo-biodrowej (w wywiadzie lub obecnie)</p> <p style="padding-left: 20px;">³⁵/₁₇ obecność antygenu HLA-B27</p> <p style="padding-left: 20px;">³⁵/₁₇ początek zapalenia stawów u chłopców powyżej 6 r.ż.</p> <p>³⁵/₁₇ występowanie u krewnych 1 stopnia zeszywniającego zapalenia kręgosłupa, zapalenia przyczepów ścięgien, zapalenia stawów krzyżowo-biodrowych z towarzyszącym nieswoistym zapaleniem jelit, zespół Reitera,</p>

	zapalenie błony naczyniowej oka wykluczenia a, d, e
Nie różnicowane zapalenie stawów	Zapalenie stawów nie spełniające kryteriów żadnego z powyższych lub spełnia kryteria ≥ 2 z powyższych postaci.

a - łuszczyca lub dodatni wywiad w kierunku łuszczycy u krewnych 1 stopnia

b - zapalenie stawów obecne u pacjentów płci męskiej z dodatnim HLA-B27, które rozpoczęło się powyżej 6 r. ż.

c - występowanie u krewnych 1 stopnia zeszywniającego zapalenia kręgosłupa, zapalenia przyczepów ścięgien, zapalenia stawów krzyżowo-biodrowych z towarzyszącym nieswoistym zapaleniem jelit, zespół Reitera, zapalenie błony naczyniowej oka

d - obecność RF przynajmniej w 2 badaniach wykonanych w ciągu 3 miesięcy

e - obecność układowej postaci MIZS

1.1 Układowa postać MIZS

Układowa postać MIZS dotyczy 10-20% chorych, chłopcy i dziewczynki chorują w równym stopniu, może wystąpić w każdym wieku [5]. Charakterystyczną cechą jest występowanie gorączki mającej tor septyczny, utrzymującej się przynajmniej dwa tygodnie z towarzyszącą polimorficzną wysypką, zapaleniem stawów oraz objawami wymienionymi w tabeli 3. Objawy zapalenia stawów mogą wystąpić jednocześnie z gorączką lub po kilku tygodniach od wystąpienia gorączki. W badaniach laboratoryjnych stwierdza się:

- wysokie OB, CRP
- leukocytozę
- niedokrwistość
- nadpłytkowość

W przebiegu systemowej postaci MIZS pacjenci mogą prezentować objawy zajęcia narządów wewnętrznych: zapalenia osierdzia, zapalenia mięśnia sercowego, śródmiąższowego zapalenia płuc, zaburzenia funkcji wątroby [6]. Ze względu na

objawy zajęcia narządów wewnętrznych, występowanie wysokich wartości wskaźników zapalenia systemową postacią MIZS należy różnicować z:

- chorobami infekcyjnymi
- zapaleniem opono mózgowo-rdzeniowych i mózgu
- procesami rozrostowymi
- innymi układowymi chorobami tkanki łącznej
- zapaleniem naczyń
- gorączką reumatyczną
- niedobory odporności
- rodzinną gorączką śródziemnomorską [5,6]

Przebieg choroby jest przewlekły z okresami zaostrzeń i remisji, u większości pacjentów przechodzi w postać wielostawową MIZS, u części pacjentów mogą utrzymywać się objawy uogólnione [6]. Do czynników zwiększających ryzyko złego przebiegu choroby należą: wczesny wiek zachorowania (poniżej 6 r.ż), utrzymujące się powyżej 6 tygodni objawy układowe, czas trwania choroby powyżej 5 lat. Możliwe powikłania to:

- ryzyko rozwoju zespołu aktywacji makrofaga
- ryzyko rozwoju amyloidozy
- zaburzenia rozwoju, niskorosłość
- nawracające infekcje
- kalectwo związane z uszkodzeniem narządu ruchu
- zgon [6]

1.2. Postać skąpostawowa

Postać skąpostawowa dotyczy 50% zachorowań na MIZS, przy czym częściej chorują dziewczęta przed 6 r. ż. W zależności od przebiegu choroby w pierwszych 6 miesiącach trwania MIZS wyróżniono 2 podtypy:

³⁵/₁₇ przetrwała - proces zapalny obejmuje ≤ 4 stawów przez cały okres trwania choroby

³⁵/₁₇ rozszerzająca się - zajęcie procesem zapalnym ≥ 4 stawów powyżej 6 miesięcy trwania choroby.

Procesem zapalnym objęte są duże stawy, najczęstsza lokalizacja: stawy kolanowe, skokowe, nadgarstkowe [7]. W badaniach laboratoryjnych stwierdza się prawidłowe lub miernie podwyższone wartości OB oraz stężenia CRP, nieznacznego

stopnia leukocytozę. U 70-80% chorych obecne są przeciwciała przeciwjądrowe ANA [3]. W tej postaci MIZS występuje zwiększone ryzyko rozwoju zapalenia błony naczyniowej oka, dotyczy 20-30% chorych. Najbardziej narażone są dziewczynki z dodatnim mianem ANA, u których MIZS wystąpiło przed 2 r. ż. [4,7].

W różnicowaniu uwzględnić należy:

- ³⁵₁₇ infekcyjne zapalenie stawów
- ³⁵₁₇ odczynowe zapalenie stawów
- ³⁵₁₇ seronegatywne artropatie
- ³⁵₁₇ procesy rozrostowe
- ³⁵₁₇ uraz
- ³⁵₁₇ zmiany stawowe w przebiegu chorób krwi
- ³⁵₁₇ sarkoidoza
- ³⁵₁₇ zmiany stawowe w przebiegu niedoborów immunologicznych [5,8]

Najczęściej obserwowanymi powikłaniami są:

- ³⁵₁₇ uszkodzenie funkcji narządu ruchu prowadzące do kalectwa
- ³⁵₁₇ zaburzenia wzrastania
- ³⁵₁₇ powikłania oczne: zaćma, jaskra, zrosty tylne, utrata wzroku [4,6].

1.3. Postać wielostawowa z ujemnym czynnikiem reumatoidalnym

Postać wielostawowa dotyczy 15-20% chorych, częściej chorują dziewczynki, obserwowane są dwa szczyty zachorowań: 2-6 r. ż oraz 11-14r.ż [7]. Charakteryzuje się symetrycznym zajęciem drobnych i dużych stawów (stawy rąk, nadgarstków, stawy kolanowe, barkowe, skokowe). Proces zapalny może także objąć stawy skroniowe-żuchwowe oraz stawy kręgosłupa szyjnego [7]. Wyróżnia się 3 podtypy choroby:

- ³⁵₁₇ podtyp przypominający seronegatywną postać reumatoidalnego zapalenia stawów u dorosłych
 - początek w wieku szkolnym
 - symetryczne zapalenie dużych i małych stawów
 - podwyższona wartość OB
 - ujemne miano ANA
- ³⁵₁₇ podtyp przypominający postać skąpostawową
 - wczesny wiek zachorowania

- przewaga dziewcząt
- asymetryczne zapalenie stawów
- często obecne dodatnie miano ANA
- zwiększone ryzyko rozwoju zapalenia błony naczyniowej oka
- ³⁵₁₇ podtyp zwany „suchym zapaleniem błony maziowej”
 - początek w wieku szkolnym
 - nieznaczne pogrubienie błony maziowej
 - prawidłowe lub nieznacznie podwyższona wartość OB
 - ujemne miano ANA
 - słaba odpowiedź na leczenie farmakologiczne
 - nasilone zmiany destrukcyjne w obrębie stawu [9]

U 20-40% pacjentów obecne są przeciwciała przeciwjądrowe, ich obecność związana jest z wczesnym rozwojem MIZS. U 5-10% pacjentów może rozwinąć się zapalenie błony naczyniowej oka. Zwiększone ryzyko rozwoju dotyczy dziewcząt z dodatnim mianem ANA oraz wczesnym wystąpieniem choroby [8]. W badaniach laboratoryjnych stwierdza się miernie lub znacznie podwyższone OB, CRP. Postać wielostawową należy różnicować z:

- ³⁵₁₇ odczynowym i infekcyjnym zapaleniem stawów
- ³⁵₁₇ alergicznym zapaleniem stawów
- ³⁵₁₇ innymi układowymi chorobami tkanki łącznej
- ³⁵₁₇ nieswoistym zapaleniem jelit z zajęciem stawów [7]

Do powikłań należą:

- ³⁵₁₇ zmiany w obrębie narządu ruchu prowadzące do kalectwa
- ³⁵₁₇ osteoporoza
- ³⁵₁₇ zaburzenia wzrastania
- ³⁵₁₇ powikłania oczne
- ³⁵₁₇ amyloidoza [7]

1.4 Postać wielostawowa z dodatnim czynnikiem reumatoidalnym

Postać ta dotyczy 5% chorych, częściej chorują dziewczynki ze szczytem zachorowań pomiędzy 11-14 r. ż. Charakteryzuje się symetrycznym zajęciem głównie stawów drobnych rąk i stóp, proces zapalny może także objąć stawy skroniowo-

żuchwowe oraz stawy kręgosłupa szyjnego. Przebieg przypomina reumatoidalne zapalenie stawów u dorosłych. W badaniach laboratoryjnych stwierdza się znacznie podwyższone OB, CRP oraz leukocytozę, anemię, nadpłytkowość, dodatni czynnik reumatoidalny, mogą być obecne przeciwciała anti-CCP [7]. W różnicowaniu należy wziąć po uwagę:

- ³⁵₁₇ odczynowe i infekcyjne zapalenia stawów
- ³⁵₁₇ alergiczne zapalenie stawów
- ³⁵₁₇ inne układowe choroby tkanki łącznej
- ³⁵₁₇ nieswoiste zapalenia jelit z zajęciem stawów [8]

Do możliwych powikłań należą:

- ³⁵₁₇ zmiany w obrębie narządu ruchu prowadzące do kalectwa
- ³⁵₁₇ osteoporoza
- ³⁵₁₇ zaburzenia wzrastania
- ³⁵₁₇ powikłania oczne
- ³⁵₁₇ amyloidoza [7]

1.5. Łuszczycowe zapalenie stawów

Łuszczycowe zapalenie stawów dotyczy 1-3% chorych, chłopcy i dziewczęta chorują w równym stopniu. Charakteryzuje się asymetrycznym zapaleniem dużych stawów. Zmianom zapalnym w stawach mogą towarzyszyć: dactylitis, zmiany łuszczycowe w obrębie płytki paznokcia, objawy łuszczycy u krewnych I stopnia [4]. W badaniach laboratoryjnych stwierdza się prawidłowe lub podwyższone wskaźniki procesu zapalnego w zależności od aktywności choroby [7,8]. Łuszczycowe zapalenie stawów należy różnicować z :

- ³⁵₁₇ innymi postaciami MIZS
- ³⁵₁₇ grzybicą
- ³⁵₁₇ twardziną [10]

Powikłaniami jakie mogą wystąpić w przebiegu łuszczycowego zapalenia stawów są:

- ³⁵₁₇ zmiany w stawach prowadzące do kalectwa
- ³⁵₁₇ zapalenie aorty
- ³⁵₁₇ śródmiąższowe zapalenie płuc
- ³⁵₁₇ zapalenie kości [7,10]

1.6. Zapalenie stawów z towarzyszącym zapaleniem przyczepów ścięgien

Ten typ zapalenia dotyczy 10-15% chorych z MIZS, częściej chorują chłopcy ze szczytem zachorowań powyżej 8 r. ż. Choroba przebiega z zajęciem dużych stawów: kolanowych, skokowych, stawów palucha, może dojść do zapalenia stawów krzyżowo-biodrowych i mostkowo-obojczykowych. Spośród ścięgien najczęściej zajęte są: ścięgno Achillesa, rozciągno podeszwowe, przyczepy ścięgniaste do guzowatości piszczelowej i około kręgosłupowe [7,10]. Wskaźniki procesu zapalnego mogą być w normie lub podwyższone w zależności od aktywności choroby.

Różnicowanie tej postaci zapalenia obejmuje:

- ³⁵/₁₇ uraz
- ³⁵/₁₇ jałowa martwica kości
- ³⁵/₁₇ dyskopatie
- ³⁵/₁₇ procesy rozrostowe [10]

Powikłania tej postaci MIZS to:

- ³⁵/₁₇ zapalenie wsierdzia
- ³⁵/₁₇ zapalenie aorty
- ³⁵/₁₇ wady zastawki aortalnej
- ³⁵/₁₇ zapalenie tęczówki
- ³⁵/₁₇ amyloidoza [7]

1.7. Niezróznicowane zapalenie stawów

Niezróznicowane zapalenie stawów dotyczy pacjentów, którzy spełniają kryteria kilku wymienionych powyżej typów MIZS lub nie spełniają kryteriów żadnego z powyższych.

2. EPIDEMIOLOGIA

Dane dotyczące zachorowalności i zapadalności na MIZS różnią się pomiędzy poszczególnymi krajami. Różnice wynikają z niejednorodnego obrazu klinicznego choroby, braku specyficznych testów diagnostycznych pozwalających jednoznacznie rozpoznać chorobę, wpływu wielu czynników środowiskowych na rozwój choroby. Dostępne dane o zapadalności i zachorowalności nie zostały uzyskane na podstawie badań na populacji ogólnej, ale spośród grupy pacjentów zgłaszających się do lekarza z powodu zaburzeń układu ruchu. Częstość występowania MIZS wśród

chłopców i dziewczynek oraz wiek zachorowania jest różny w poszczególnych podtypach MIZS. W grupie dziewcząt dominuje postać skąpostawowa oraz wielostawowa, podczas gdy u chłopców częściej rozpoznawane jest zapalenie stawów z zapaleniem przyczepów ścięgnistych. W przypadku postaci systemowej chłopcy i dziewczynki chorują w równym stopniu [6]. Wiek zachorowania na postać skąpostawową wynosi 2-4 lata, szczyt zachorowań na postać wielostawową przypada na wiek 1- 4 lat i 6-12 lat [11].

Zachorowalność na poszczególne podtypy MIZS jest różna w zależności od rasy i zamieszkiwanego regionu geograficznego. W Europie oraz wśród mieszkańców rasy białej Ameryki Północnej najczęściej występuje postać skąpostawowa oraz seronegatywna postać wielostawowa. Wśród mieszkańców rasy czarnej Ameryki Północnej częściej występuje seropozytywna postać wielostawowa. Częstość występowania MIZS wśród mieszkańców Azji jest mniejsza niż wśród Europy oraz Ameryki Północnej. Największe ryzyko rozwoju zapalenia błony naczyniowej oka w przebiegu MIZS występuje wśród mieszkańców Skandynawii, najmniejsze wśród mieszkańców Azji Wschodniej i Indii [11].

Wg wyników z przeglądu systematycznego danych epidemiologicznych dokonanego w 2000r. przez Mannersa oraz Bowera częstość występowania choroby na świecie wynosi 0,07 - 4,01 na 100 tys. dzieci, a zapadalność 0,008 - 0,226 na 100 tys. dzieci [12]. W Kanadzie zapadalność wynosi 0,041 - 0,061 na 1000 dzieci [13]. W USA zachorowalność w latach 1960-1993 wynosiła 11,7/100 tys. dzieci, chorobowość 81,6/100 tys. dzieci [14]. W krajach skandynawskich zachorowalność wynosi 15/100 tys., w Islandii: 7,0/100 tys., Finlandii 2,0/100 tys., Szwecji 14,0/100 tys., Norwegii 19,0-23,0/100 tys., Danii 9-16/100 tys. [15]. W krajach środkowej i zachodniej Europy zachorowalność przedstawia się następująco: Niemcy 6,6/100 tys. [16], Czechy 13,0/100 tys. [17], Francja 3,2/100 tys. [18], Wielka Brytania 10,0/100 tys. [19].

W Polsce brak jest wielośrodkowych danych na temat zachorowalności na MIZS. Dostępne badania wskazują, że zachorowalność wynosi 6-7 zachorowań na 100 tys. dzieci [20,21,22].

3. ETIOLOGIA CHOROBY

Etiologia choroby nie jest do końca poznana. Uważa się, że w rozwoju choroby biorą udział czynniki genetyczne oraz środowiskowe, pod wpływem których następuje przełamanie tolerancji immunologicznej i wystąpienie nieprawidłowej odpowiedzi ze strony układu immunologicznego [23].

3.1 Czynniki genetyczne

Dotychczasowe badania wykazały wyraźny związek pomiędzy antygenami układu HLA, a rozwojem MIZS. Poszczególne podtypy MIZS różnią się udziałem genów kodujących określone allele układu HLA **[Tabela 4]**.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że na rozwój MIZS oprócz genów układu HLA wpływ mają także geny spoza układu HLA kodujące cytokiny, receptory dla limfocytów, białka przekazujące sygnał wewnątrz komórki [11,26] **[Tabela 6]**.

Tabela 4. Udział alleli układu HLA w rozwoju poszczególnych podtypów MIZS

Postać MIZS	Allele układu HLA zwiększające ryzyko wystąpienia MIZS
Systemowa	DRB1*11, DRB1*04, DQA1*05 [25,26]
Skąpo stawowa	HLA-A2, DRB1*11, DRB1*08, DRB1*13, DPB1*0201, DQA1*0102, DQA1*04 [24,25,26]
skąpostawowa (podtyp przetrwały)	DRB1*13, DQA1*0103, DQA1*05 [25]

skąpostawowa (podtyp rozszerzający się)	DRB1*01[25]
wielostawowa z ujemnym czynnikiem reumatoidalnym	HLA-A2, DRB1*04, DQA1*04, DQB1*03 [24,25,26]
wielostawowa z dodatnim czynnikiem reumatoidalnym	DRB1*04, DQA1*03, DQB1*03 [11,24,25]
zapalenie stawów z zapaleniem przyczepów ścięgien	B27, DRB1*01, DQA1*0101, DQB1*05 [25,26,27]
łuszczykowe zapalenie stawów	DRB1*01, DQA1*0101 [24,25]

W tabeli poniżej przedstawiono allele układu HLA, których występowanie zmniejsza ryzyko rozwoju MIZS.

Tabela 5. Allele układu HLA zmniejszające ryzyko rozwoju MIZS

Postać MIZS	Allele układu HLA zmniejszające ryzyko wystąpienia MIZS
Skąpo stawowa	DRB1*04, DRB1*07, DQA1*03 [25,26]

skąpostawowa (podtyp przetrwały)	DRB1*04, [25]
skąpostawowa (podtyp rozszerzający się)	DRB1*04[25]
wielostawowa z ujemnym czynnikiem reumatoidalnym	DRB1*04, DRB1*07 [24,25]
wielostawowa z dodatnim czynnikiem reumatoidalnym	DQA1*02, [24,25,26]
łuszczycowe zapalenie stawów	DRB1*04, DQA1*03 [24,25,26]

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że na rozwój MIZS oprócz genów układu HLA wpływ mają także geny spoza układu HLA kodujące cytokiny, receptory dla limfocytów, białka przekazujące sygnał wewnątrz komórki [11,26] **[Tabela 6]**.

Tabela 6. Geny spoza układu HLA zwiększające ryzyko rozwoju MIZS [27,28]

Gen	Produkt genu	Postać MIZS
<i>IL2RA/CD25</i>	Łańcuch α receptor o dużym powinowactwie do IL-2	przetrwała postać skąpostawowa
<i>MIF</i>	Czynnik hamujący migrację makrofagów	wszystkie
<i>PTPN22</i>	Fosfataza tyrozynowa hamująca przekazywanie sygnału w receptorze limfocytów T	skąpostawowa, wielostawowa
<i>SLC11A1</i>	Białko błonowe na lizosomach makrofagów, neutrofilii, komórek dendrytycznych	skąpostawowa, wielostawowa
<i>TNF</i>	cytokina	skąpostawowa, wielostawowa
<i>VTCN1</i>	Białko kostymulujące B7H4	wszystkie
<i>WISP3</i>	Czynnik wzrostu tkanki łącznej	skąpostawowa rozszerzająca się, wielostawowa

<i>STAT4</i>	Czynnik transkrypcyjny STAT4	wielostawowa
<i>SPP1</i>	osteopontyna	skąpostawowa
<i>TNFAIP3</i>	Białko 3 indukowane przez TNF α	skąpostawowa
Geny IL-1 <i>IL1A</i> <i>IL1B</i> <i>IL1RN</i> <i>IL1R</i>	IL-1 α IL-1 β antagonista receptora IL-1 receptor dla IL-1 α IL-1 β i IL1RN	skąpostawowa, systemowa wszystkie skąpostawowa, systemowa systemowa
<i>IL6</i>	IL-6	systemowa
<i>IL10</i>	IL-1-	skąpostawowa postać rozszerzająca się, systemowa
<i>IL18</i>	IL-18	skąpostawowa

3.2 Czynniki środowiskowe

Dotychczas przeprowadzono niewiele badań oceniających wpływ czynników środowiskowych na rozwój MIZS. Do znanych obecnie czynników zwiększających ryzyko rozwoju MIZS należą:

1. czynnik infekcyjny: wirus grypy A, wirus różyczki, parwowirus B19, EBV, CMV [29], *Mycoplasma pneumoniae* [30], paciorkowce grupy A [30]

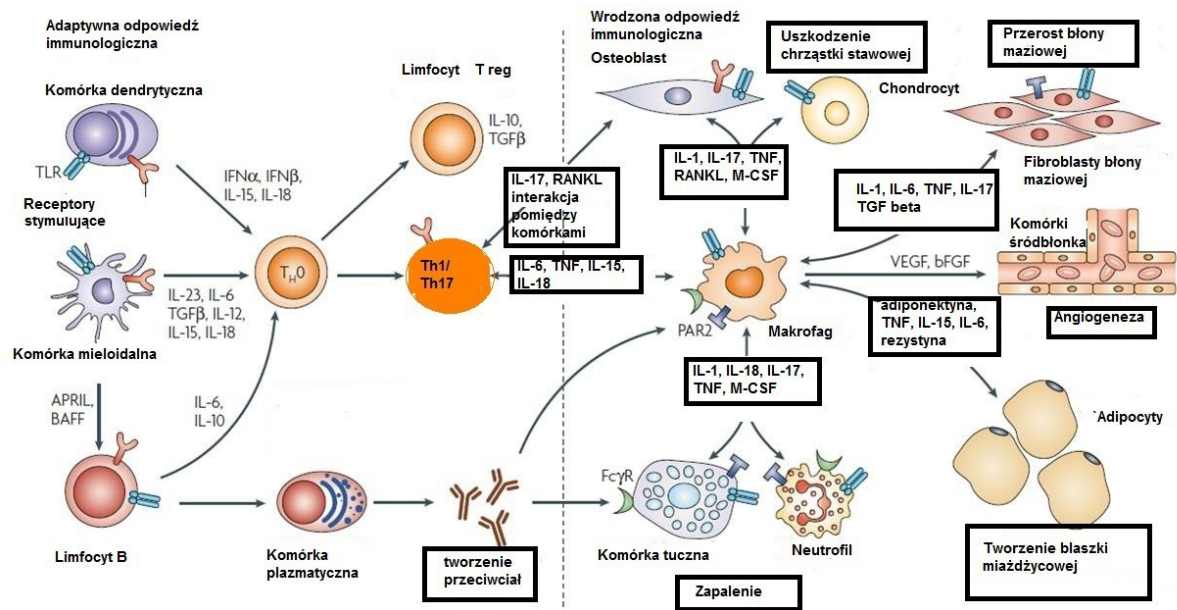
2. ekspozycja na tytoń w okresie prenatalnym [31]
3. poród w 42 t. c. [31]
4. szczepionki: szczepionka przeciwko różyczce [32]
5. stres [33]

4. PATOGENEZA CHOROBY

Pod wpływem czynników środowiskowych u osób genetycznie predysponowanych dochodzi do nadmiernej aktywacji układu immunologicznego i rozwoju MIZS. Głównymi komórkami odpowiedzialnymi za rozwój zapalenia są limfocyty Th. Przy udziale komórek dendrytycznych następuje prezentacja limfocytom Th: Th1 i Th17 autoantygenów pochodzących ze struktur stawowych, co prowadzi do ich aktywacji, proliferacji, produkcji prozapalnych cytokin INF- gamma, IL-17 oraz zahamowania produkcji przez limfocyty regulatorowe IL-10 będącej cytokiną hamującą proces zapalny. W obrębie płynu maziowego wzrasta stężenie chemokin CCL2, CXCL8, CXCL10 zwiększających napływ limfocytów Th1 do błony maziowej. Zwiększona aktywacja limfocytów Th, zaburzenie funkcji limfocytów regulatorowych poprzez IL-17 zaburza równowagę pomiędzy limfocytami Th a limfocytami T regulatorowymi, co prowadzi do braku tolerancji limfocytów Th w stosunku do autoantygenów. IL-17 stymuluje fibroblasty błony maziowej do produkcji prozapalnych cytokin. Wspólne z cytokinami wydzielanymi przez limfocyty Th stymuluje różnicowanie, dojrzewanie, aktywację neutrofilów, aktywują monocyty do produkcji prostaglandyn oraz metaloproteinaz, zwiększają migrację i aktywację makrofagów. Prozapalne cytokiny (IL β -1, IL-6, TNF- α , IL-17, IL-18, TGF- β , VEGF, MIF) wydzielane przez limfocyty T, makrofagi, fibroblasty błony maziowej utrzymują stan zapalny i biorą udział w uszkodzeniu tkanek [23,34,35,36].

U podłoża rozwoju postaci systemowej leży proces autozapalny, wynikający z aktywacji wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. Brak autoreaktywnych limfocytów T i prezentacji przez nie antygenów hamuje adaptacyjną odpowiedź immunologiczną. Następuje nadmierne pobudzenie białek ostrej fazy, neutrofilów, monocytów. Aktywne neutrofile oraz monocyty wydzielają prozapalne cytokiny: IL-1 β , IL-6, IL-18, białka S100A8, S100A9, S100A12 wywołując uogólniony proces zapalny [34,36,37,38].

Rycina 1. Schemat patogenezy MIZS wg McInnse [36] w modyfikacji własnej.



5. ZMIANY HISTOPATOLOGICZNE

W przebiegu procesu zapalnego błona maziowa, która w warunkach fizjologicznych jest skąpokomórkowa ulega hiperplazji na skutek proliferacji fibroblastów błony maziowej oraz nadmiernego nagromadzenia limfocytów, makrofagów, komórek plazmatycznych, limfocytów NK. Zwiększona proliferacja fibroblastów jest wynikiem działania pozapalnych cytokin oraz nabytej oporności fibroblastów na apoptozę. W obrębie zmienionej zapalnie błony maziowej następuje zwiększona angiogeneza. Głównym czynnikiem stymulującym angiogenezę jest VEGF wydzielany pod wpływem czynników prozapalnych: $TNF\alpha$, IL-1 oraz zmniejszonego utlenowania błony maziowej. Pod wpływem VEGF następuje proliferacja oraz migracja komórek śródbłonna tworzących naczynia krwionośne. W obrębie zapalnie zmienionej błony maziowej działają także inne czynniki stymulujące rozrost błony maziowej: PDGF, czynnik wzrostu fibroblastów (FGF), insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF-1). Przerośnięta błona maziowa nacieka chrząstkę stawową prowadząc do jej uszkodzenia przy udziale aktywnych osteoklastów oraz fibroblastów błony maziowej [36,42].

6. HOMEOSTAZA KOSTNA

Tkanka kostna jest aktywną metabolicznie tkanką ulegającą ciągłej przebudowie. W okresie wzrostu proces ten zwany jest modelowaniem kostnym. Zachodzące w tym czasie procesy prowadzą do utworzenia kości o prawidłowym kształcie, geometrii i strukturze. Formowanie kości odbywa się poprzez procesy resorpcji i tworzenia tkanki kostnej w różnych obszarach kości. Po zakończeniu wzrostu i osiągnięciu przez organizm dojrzałości, tkanka kostna ulega procesowi remodelowania pozwalający na zastąpieniu uszkodzonej pod wpływem działania czynników mechanicznych tkanki kostnej nową tkanką. Proces ten odbywa się poprzez aktywację resorpcji w obszarze podlegającym remodelowaniu, a następnie tworzeniu w tym miejscu nowej tkanki kostnej. Regulacja przebudowy odbywa się przy udziale miejscowego uwalniania cytokin, czynników wzrostowych, wpływu układu endokrynnego. Czynniki te regulują aktywność komórek bezpośrednio biorących udział w remodelowaniu - osteoblastów i osteoklastów. Utrzymanie prawidłowej struktury kości zależy od równowagi pomiędzy aktywnością osteoklastów i osteoblastów. Rozwój i aktywacja osteoblastów, i osteoklastów kontrolowana jest przez czynniki wzrostowe, hormony, cytokiny, molekuły adhezyjne, za pomocą których możliwa jest interakcja komórka-komórka niezbędna w przekazywaniu sygnału pomiędzy osteoklastami i osteoblastami [41,43,48,49,50].

Osteoblasty wywodzą się z multipotencjalnej komórki mezenchymatycznej. Pod wpływem TGF β , PDGF, IGF, FGF, estrogenów następuje wzbudzenie procesu osteoblastogenezy oraz aktywacja dojrzałych osteoblastów. Preosteoblasty oraz dojrzałe osteoblasty wykazują na swej powierzchni ekspresję receptora DR3, który poprzez związanie ze swym ligandem TL1A hamuje ich dojrzewanie, receptor TNF-R1 wiążący TNF α i wpływający na komunikację pomiędzy osteoblastami i osteoklastami, receptor DR5 wiążący TRAIL oraz receptor Fas, który po związaniu Fas liganda wzbudza apoptozę osteoblastów [44,45]. W pełni zróżnicowane i aktywne osteoblasty wytwarzają białka tworzące macierz kostną, która następnie ulega mineralizacji. Głównym produktem wytwarzanym przez osteoblasty jest kolagen I, ponadto wytwarzają także osteokalcynę, osteonektynę, glikozaminoglikany. Średni czas przeżycia osteoblastów wynosi 3 tygodnie [49,51].

Osteoklasty wywodzą się z hematopoetycznej komórki szpiku linii monocytarnej. Są to wielojądrzaste komórki pozbawione mitochondriów zawierające

liczne lizosomy. Na powierzchni błony komórkowej zawierają liczne wypustki, za pomocą których dokonują resorpcji macierzy kostnej. Wydzielają metaloproteinazy, katepsyny K, B i L, które degradują kolagen. Rozwój osteoklastów stymulowany jest przez szereg cytokin: IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, onkostatynę M, TNF α , GM-CSF, M-CSF, C-kit ligand. Do czynników hormonalnych promujących osteoklastogenezę należą: PTH, 1,25(OH) $_2$ D $_3$, glikokortykosteroidy. Możliwość przekształcenia w osteoklasty wykazują także fibroblasty błony maziowej, monocyty, limfocyty T. Średni czas przeżycia osteoklastów wynosi 2 tygodnie [49,51]. Osteoklasty na swej powierzchni wykazują ekspresję receptora RANK, który po związaniu swego liganda wzbudza różnicowanie i aktywację osteoklastów. Na powierzchni osteoklastów obecne są także receptory TRAIL-R1, TRAIL-R2 oraz TNF R1. Receptory TRAIL-R1 oraz TRAIL-R2 poprzez związanie z ligandem TRAIL hamują dojrzewania osteoklastów. Z kolei receptor TNF R1 po związaniu TNF α nasila różnicowanie, dojrzewanie i aktywację osteoklastów [43,45,46].

Oprócz czynników hormonalnych, cytokin, czynników wzrostowych w procesie różnicowania, aktywacji i czasie przeżycia osteoklastów i osteoblastów niezbędna jest bezpośrednia interakcja pomiędzy tymi komórkami.

W 1997r. 4 niezależne laboratoria wykryły białka należące do grupy TNF, przy udziale których następuje komunikacja pomiędzy komórkami odpowiedzialnymi za utrzymanie homeostazy kostnej. Badania wykazały, że obecność tych białek jest niezbędna w procesie dojrzewania preosteoklastów, aktywacji dojrzałych osteoklastów i regulacji ich apoptozy. Białkami tymi są: RANKL, RANK oraz OPG [52,53,54].

6.1. RANKL

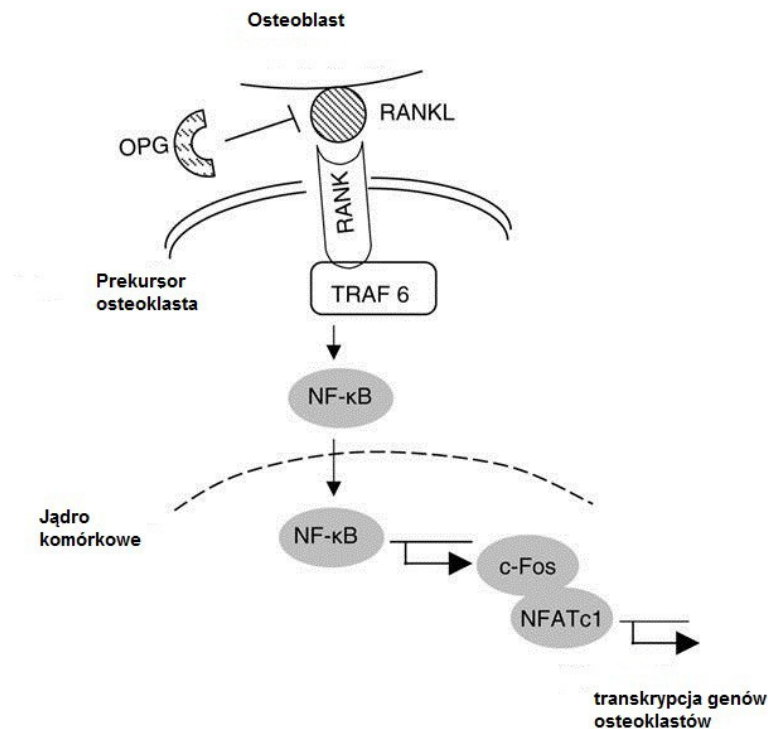
Jest białkiem należącym do grupy TNF, składa się z 317 aminokwasów. Występuje w postaci związanej z błoną komórkową osteoblastów, fibroblastów, limfocytów T lub w postaci wolnej po odszczepieniu przez metaloproteinazy 3 i 7. Jego obecność wykazano także w tkance węzłów chłonnych, gruczołów piersiowych śledziony, szpiku kostnego. Poprzez związanie ze swym receptorem RANK indukuje proces tworzenia, dojrzewania, aktywacji osteoklastów, hamuje także apoptozę aktywnych osteoklastów. Wzrost ekspresji RANKL na osteoblastach następuje pod wpływem czynników stymulujących resorpcję kostną: 1,25(OH) $_2$ D $_3$, PTH, GKS, IL-1, IL-6, PGE2 [52,55,56,58].

Oprócz znaczącej roli RANKL w procesie osteoklastogenezy, dotychczasowe badania wykazały, że białko to odgrywa także istotną rolę w tworzeniu tkanki limfatycznej węzłów chłonnych głównie w okresie rozwoju embrionalnego będąc czynnikiem warunkującym wzrost i przeżycie komórek tworzących strukturę węzłów chłonnych [58]. RANKL ponadto bierze udział w różnicowaniu limfocytów CD4⁻CD8⁻CD44⁻CD25⁺ w limfocyty CD4⁻CD8⁻CD44⁻CD25⁻, bierze także udział w regulacji różnicowania limfocytów B, jest czynnikiem wydłużającym czas przeżycia komórek dendrytycznych oraz bierze udział w aktywacji limfocytów T [55,64,65,66,65].

6.2 RANK

Jest homotrimerycznym białkiem receptorowym związanym z błoną komórkową należącym do grupy TNF, składającym się z 616 aminokwasów. Zawiera 2 regiony: zewnątrzkomórkowy region N wiążący ligand oraz wewnątrzkomórkowy region C przekazujący sygnał do wnętrza komórki. RANK obecny jest na powierzchni błony komórkowej preosteoklastów, osteoklastów, komórek dendrytycznych, limfocytów T CD4⁺ oraz CD8⁺, komórkach gruczołów piersiowych oraz komórkach nowotworowych [49,52,55,59,61]. Po związaniu ze swym ligandem RANKL następuje aktywacja wewnątrzkomórkowego końca receptora RANK, który przenosi sygnał na TRAF 6 aktywujący następnie kaskadę wewnątrzkomórkowych czynników transkrypcyjnych NF-κB, AP-1, NFATc1, MAPKs co doprowadza do rozpoczęcia różnicowania preosteoklastów w kierunku dojrzałych komórek oraz dojrzewania i aktywacji osteoklastów [48,50,60,62]. Proces wewnątrzkomórkowego przekazania sygnału przedstawiono na **Rycinie 2**.

Rycina 2. Przekazywanie sygnału z receptora RANK do wnętrza komórki. Rycina wg Boyce [63] w modyfikacji własnej.

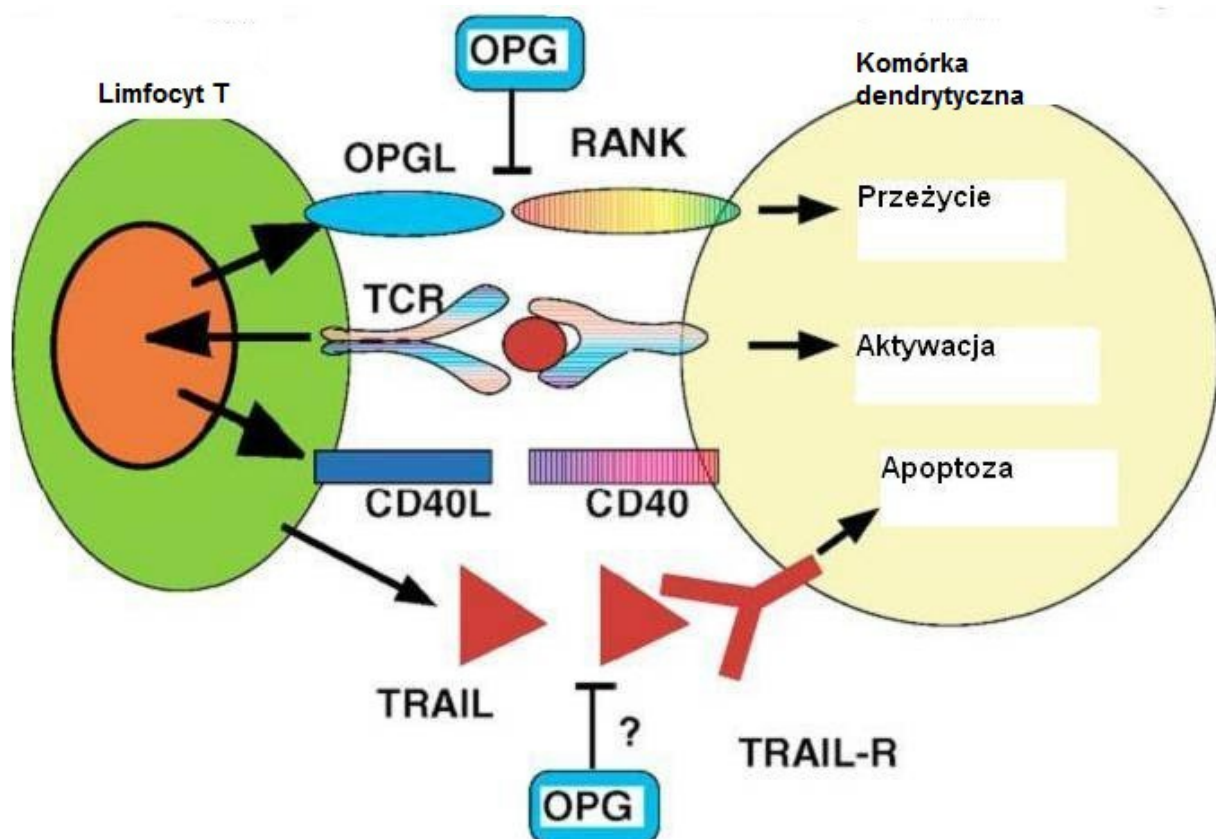


6.3 Osteoprotegeryna (OPG)

Jest homodimeryczną glikoproteiną składającą się z 401 aminokwasów należąca do grupy TNF. Występuje w formie niezwiązanej z błoną komórkową, zawiera 2 funkcjonalne domeny: część N końcową wiążącą ligand oraz część C-kończącą odpowiedzialną za homodimeryzację OPG w trakcie jej powstawania. OPG wytwarzana jest przez osteoblasty, komórki mięśnia sercowego, wątrobę, śledzionę, limfocyty B. Jest receptorem wiążącym RANKL blokując jego wiązanie z RANK co prowadzi do zahamowania osteoklastogenezy oraz zmniejszenia aktywacji osteoklastów oraz skraca czas ich przeżycia. Wzrost ekspresji OPG następuje pod wpływem TGFβ, estrogenów. Czynniki zwiększające ekspresję RANKL a tym samym nasilające resorpcję kostną takie jak PTH, 1,25(OH)₂D₃, GKS, TNFα, IL-1, IL-6 hamują wytwarzanie OPG.

OPG odgrywa także rolę w regulacji układu immunologicznego. Obecność OPG stwierdzono w węzłach chłonnych. Ekspresję OPG wykazują limfocyty B oraz dojrzałe komórki dendrytyczne, które prezentują antygen limfocytom T. OPG hamuje aktywację limfocytów T oraz zaburza komunikację pomiędzy limfocytami T, a komórkami dendrytycznymi. Interakcja pomiędzy limfocytami T, na których powierzchni obecny jest RANKL, a dojrzałymi komórkami dendrytycznymi posiadającymi receptor RANK prowadzi do wydłużonego przeżycia tych komórek. OPG wiążąc RANKL na powierzchni komórek dendrytycznych skraca czas ich przeżycia, przez co redukuje prezentację antygenów limfocytom T i hamuje aktywację odpowiedzi immunologicznej [56,71].

Rycina 3. Rola OPG w regulacji odpowiedzi immunologicznej wg Theill [56] w modyfikacji własnej.



Ekspresja OPG w komórkach mięśniowych oraz śródbłonku naczyniowym tętnic, żył oraz w komórkach mięśnia sercowego wskazuje, że OPG odgrywa także rolę w układzie krążenia. TNF α , IL-1, angiotensyna II, PDGF zwiększają ekspresję OPG na komórkach śródbłonka naczyń. OPG wykazuje zdolność wiązania trombospondyny 1 hamując proces zapalny w śródbłonku naczyń i tworzenia zmian

zakrzepowych. OPG ponadto wydłuża czas przeżycia komórek śródbłonna, przez co zapobiega rozwojowi miażdżycy [71,73].

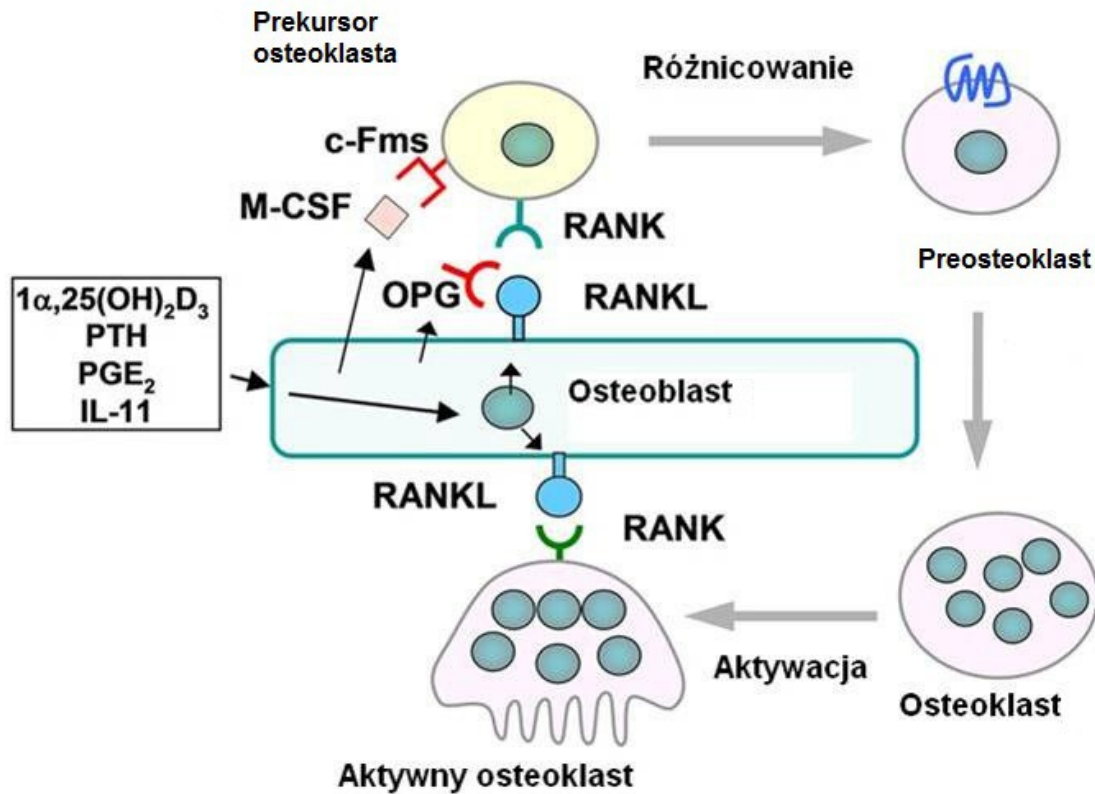
Oprócz wpływu na proces osteoklastogenezy poprzez wiązanie RANKL, OPG jest także białkiem wydłużającym czas przeżycia komórki poprzez zablokowanie czynnika wzbudzającego apoptozę TRAIL. Związanie TRAIL uniemożliwia jego połączenie z receptorem zawierającym domeny wzbudzające apoptozę przez co wydłuża się czas przeżycia komórek m.in. komórek nowotworowych [71,74].

6.4 Układ RANKL/RANK/OPG w procesie homeostazy kostnej

Pod wpływem czynników stymulujących resorpcję kostną: $TNF\alpha$, IL-1, IL-6, IL-17, GKS, PTH, $1,25(OH)_2D_3$ następuje wzrost ekspresji M-CSF oraz RANKL - czynników, które bezpośrednio stymulują prekursorów osteoklastów do różnicowania w kierunku osteoklastów. W obecności M-CSF RANKL wiąże się ze swym receptorem RANK obecnym na powierzchni komórek prekursorowych osteoklastów inicjując ich różnicowanie w kierunku osteoklastów. W kolejnym etapie poprzez związanie RANKL przez RANK obecny na powierzchni dojrzałych osteoklastów prowadzi do ich aktywacji oraz zahamowania apoptozy. Nadmierne dojrzewanie i aktywacja osteoklastów prowadzące do zaburzenia homeostazy kostnej hamowane jest poprzez OPG, która wiążąc RANKL blokuje możliwość jego połączenia z RANK na osteoklastach [63,64,150].

Badania przeprowadzone na myszach wykazały, że obecność RANKL oraz OPG jest niezbędna w procesie utrzymania prawidłowej homeostazy kostnej. Myszy pozbawione genu kodującego OPG rozwijały ciężką osteoporozę, natomiast w przypadku myszy, których pozbawiono genu kodującego RANKL dochodziło do rozwoju nasilonej osteopetrozy [57].

Rycina 4. Rola RANKL/RANK/OPG w procesie osteoklastogenezy wg Takahashi [141] w modyfikacji własnej.



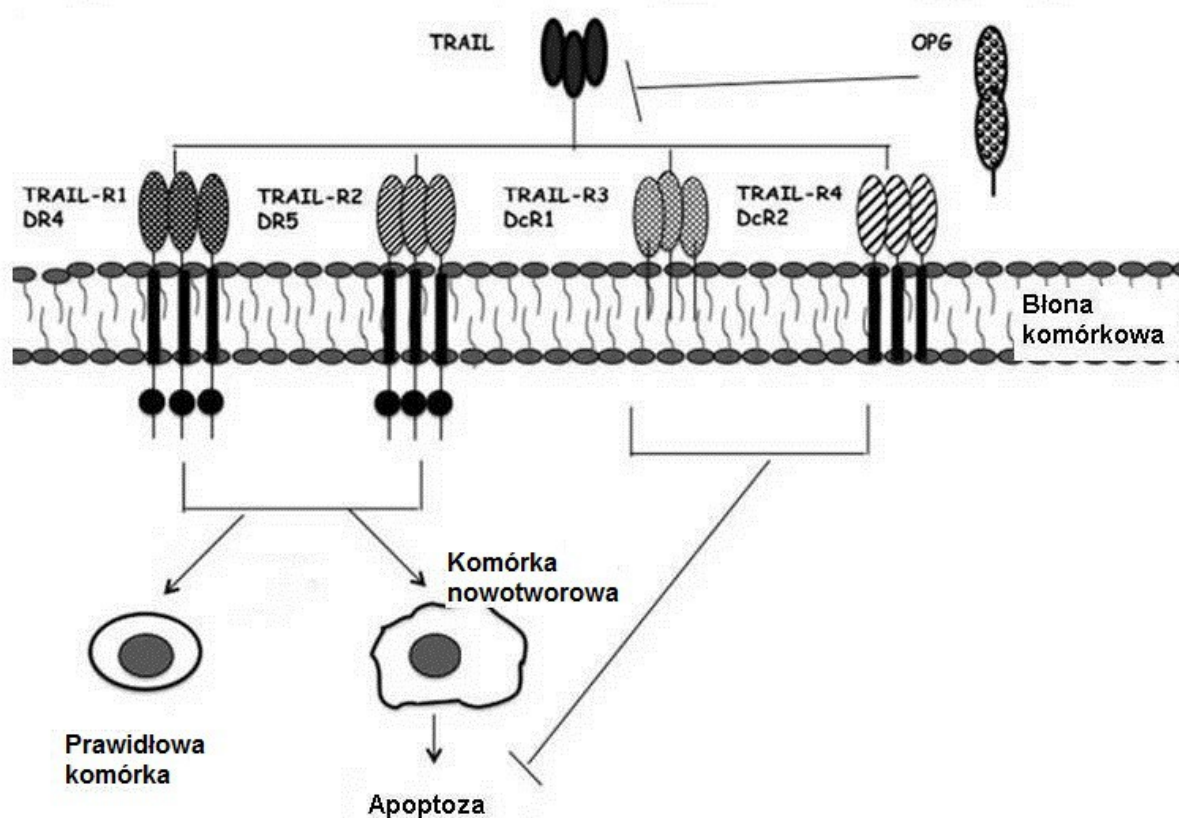
7. TRAIL

TRAIL, ligand TNF indukujący apoptozę, jest białkiem błonowym typu II należącym do rodziny TNF. Łączy się z 5 receptorami: DR1 (TRAIL-R3), DR2 (TRAIL-R4), DR4 (TRAIL-R1), DR5 (TRAIL-R2) oraz z OPG. Receptory DR4 oraz DR5 zawierają wewnątrzkomórkową domenę śmierci, poprzez którą aktywowana jest kaskada kaspaz prowadząc do wzbudzenia apoptozy komórki. Obecność na powierzchni komórki receptorów DR1 oraz DR2 pozbawionych domeny wewnątrzkomórkowej sprawia, że komórka staje się niewrażliwa na apoptozę wzbudzaną przez TRAIL.

OPG jest receptorem hamującym działanie TRAIL, poprzez jego związanie uniemożliwia jego połączenie z receptorami obecnymi na powierzchni komórek. Apoptozie wzbudzanej przez TRAIL ulegają w głównej mierze komórki nowotworowe. Wydzielane przez nie OPG sprawia, że apoptotyczne działanie TRAIL staje się nieefektywne. Ekspresję TRAIL wykazują także monocyty, limfocyty T, komórki

dendrytyczne oraz osteoklasty i osteoblasty. Ekspresję receptorów DR4, DR5 oraz DR1 stwierdzono na powierzchni osteoklastów oraz fibroblastów błony maziowej. TRAIL wiążąc się z receptorami DR4 oraz DR5 na osteoklastach zaburza komunikację pomiędzy osteoklastami oraz osteoblastami hamując w ten sposób proces tworzenia osteoklastów. Związanie z kolei z receptorami na powierzchni fibroblastów prowadzi do wzbudzenia ich apoptozy. Badania na myszach wykazały, że podanie w obręb zmienionego zapalnie stawu rekombinowanego ludzkiego TRAIL w znacznym stopniu zmniejszyło stan zapalny oraz destrukcję stawu poprzez zmniejszenie infiltracji przez komórki zapalne, zmniejszenie stężenia cytokin prozapalnych, a także zahamowanie proliferacji fibroblastów [44,79,80,81,83,84,85].

Rycina 5. Wiązanie TRAIL z receptorami wg Neve [79] w modyfikacji własnej.

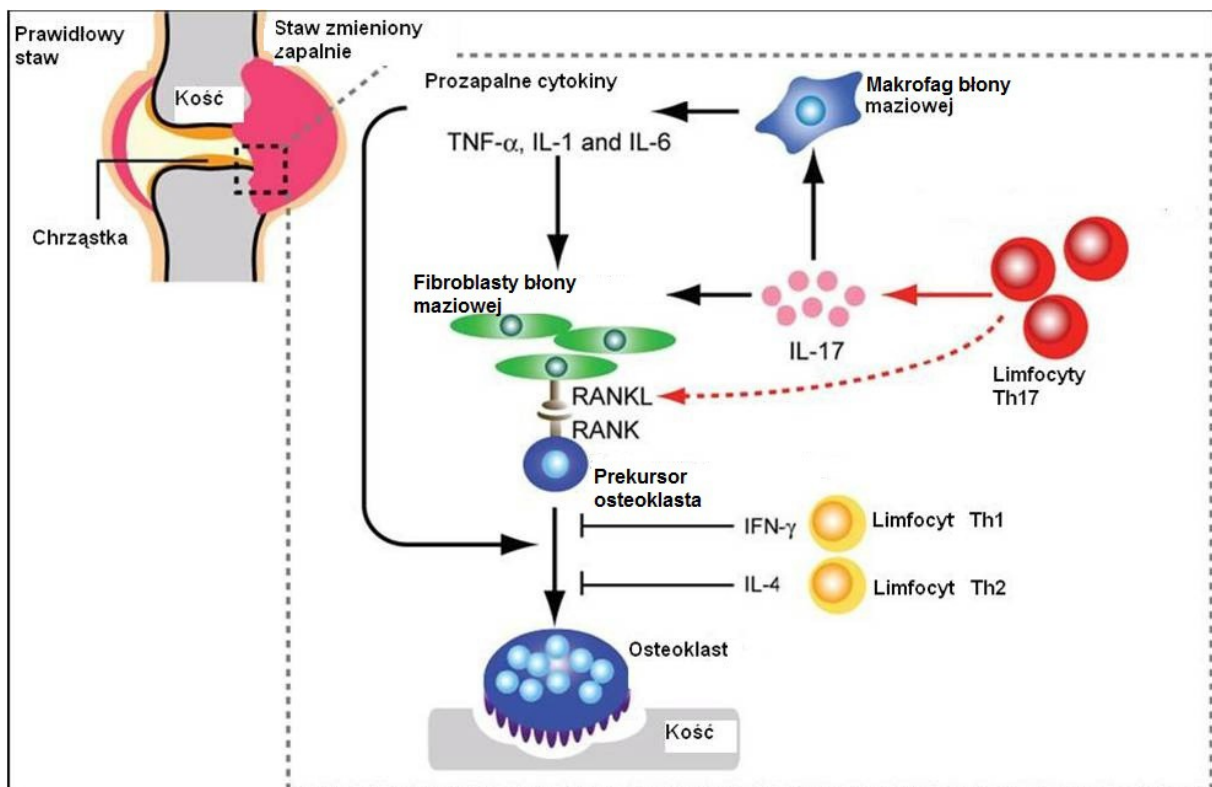


8. ZMIANY KOSTNE W PRZEBIEGU PROCESU ZAPALNEGO

W przebiegu procesu zapalnego błona maziowa ulega infiltracji przez makrofagi, monocyty, komórki dendrytyczne, limfocyty T. Zmniejszona aktywność limfocytów supresorowych sprawia, że pobudzone limfocyty T nie są hamowane w

dostateczny sposób, co prowadzi do nadmiernego uwalniania prozapalnych cytokin. $TNF\alpha$, IL-1, IL-6, IL-17 zwiększają ekspresję RANKL na powierzchni fibroblastów błony maziowej oraz na osteoblastach. IL-17 dodatkowo stymuluje produkcję prozapalnych cytokin, które stymulują ekspresję RANKL na limfocytach T. Aktywne limfocyty T poprzez RANKL bezpośrednio aktywują preosteoklasty do różnicowania w dojrzałe aktywne osteoklasty, wywołują także działanie pośrednie na osteoklastogenezę poprzez wydzielane prozapalne cytokiny stymulujące przekształcanie monocytów w osteoklasty. Ponadto dodatkowym źródłem osteoklastów stają się makrofagi, które w obecności M-CSF oraz RANKL przekształcają się w osteoklasty. Zwiększona aktywność osteoklastów prowadzi do nadmiernej resorpcji kostnej niszczącej strukturę kostne stawu [55,59,60,74,75,76,77,78].

Rycina 6. Destrukcja kości w przebiegu MIZS wg Okamoto [75] w modyfikacji własnej.



9. DIAGNOSTYKA

Ze względu na niejednorodny obraz choroby oraz nie do końca poznane czynniki wywołujące chorobę nie ma specyficznych testów diagnostycznych pozwalających na rozpoznanie choroby. Wykonywane badania laboratoryjne oraz obrazowe wykorzystywane są, aby określić stopień toczącego się procesu zapalnego, obecność markerów immunologicznych oraz ocenić stopień zmian jakie zaszły w obrębie stawów. Badania serologiczne oraz mikrobiologiczne wykonywane są, aby wykluczyć zakażenia mogące być przyczyną zapalenia stawów oraz nasilenia zmian zapalnych w przebiegu MIZS. Biopsja szpiku kostnego z oceną mielogramu i immunofenotypu wykonywana jest celem wykluczenia procesu rozrostowego. Dodatkowo wykonywane są badania pomocne w wykluczeniu innych chorób układowych tkanki łącznej: ANA, ANA profil, aktywność enzymów mięśniowych, badania oceniające funkcję i aktywność układu immunologicznego.

Wykonywane są badania pozwalające ocenić aktywność procesu zapalnego: (OB, CRP, morfologia krwi obwodowej) oraz obecność markerów immunologicznych (ANA, RF, anty-CCP) i funkcję narządów wewnętrznych (enzymy wątrobowe, parametry nerkowe, elektrokardiografia, badanie echokardiograficzne, badanie ultrasonograficzne jamy brzusznej, badanie okulistyczne). Dodatkowe badania laboratoryjne, które są także niezbędne, aby wykluczyć inne przyczyny mogące wywołać objawy zapalenia stawów to:

- biopsja szpiku z mielogramem oraz immunofenotypem celem wykluczenia chorób rozrostowych
- badania serologiczne i mikrobiologiczne (wymaz z gardła, posiew moczu, kału, krwi) celem wykluczenia czynników infekcyjnych
- badania pozwalające wykluczyć choroby układowe tkanki łącznej (miano ANA, profil ANA, ANCA, przeciwciała antykardiolipinowe, aktywność enzymów mięśniowych, stężenie składników dopełniacza C3 i C4).

W przypadku objawów zajęcia innych układów poza układem ruchu przeprowadzane są konsultacje specjalistyczne.

W ocenie zmian w obrębie stawów wykorzystywane są badania obrazowe: badania ultrasonograficzne, rentgenograficzne, rezonans magnetyczny. W badaniu ultrasonograficznym można ocenić stopień przerostu i przekrwienia błony maziowej, ilość płynu stawowego, zmiany strukturalne w obrębie stawu. Badanie radiologiczne

dostarcza informacji o stopniu zniszczenia struktur stawowych. Stopień zaawansowania zmian widocznych na zdjęciu radiologicznym zależy od stopnia zaawansowania choroby, nasilenia procesu zapalnego i podtypu MIZS. Typowe zmiany radiologiczne widoczne w przebiegu MIZS to: obrzęk tkanek miękkich, osteopenia, zaburzenia wzrostu kości, tworzenie nowej tkanki kostnej, zwężenie szpar stawowych, skrócenie długości kości palców rąk, erozje okołostawowe, ankyloza, zniekształcenia stawów [40]. Do oceny stopnia zaawansowania zmian radiologicznych służą kryteria Steinbrockera:

I - obrzęk tkanek miękkich, osteopenia, osteoporoza okołostawowa

II - zwężenie szpar stawowych, erozje kostne, geody

III - przykurcze, zniekształcenia stawów

IV - ankyloza [2]

10. LECZENIE

Leczenie chorych na MIZS jest wieloletnie, wymaga stałego monitorowania przebiegu choroby i odpowiedzi na leczenie. Ze względu na niejednorodny obraz choroby, współwystępowanie innych jednostek chorobowych, indywidualną odpowiedź na leczenie rodzaj postępowania leczniczego ustalany jest indywidualnie dla każdego pacjenta. Leczenie obejmuje leczenie farmakologiczne, rehabilitację, leczenie chirurgiczne, pacjenci często wymagają także wsparcia psychologicznego. Ze względu na możliwość wystąpienia powikłań oraz zajęcia narządów wewnętrznych i narządu wzroku pacjenci chorzy na MIZS mogą wymagać także opieki okulistycznej oraz innych specjalistów.

Leczenie farmakologiczne obejmuje leczenie miejscowe w postaci dostawowego podania glikokortykosteroidów oraz synowektomię chemiczną i izotopową stosowaną w sytuacjach, gdy dochodzi do nadmiernego przerostu błony maziowej. W farmakoterapii ogólnej stosowane są następujące leki: niesterydowe leki przeciwzapalne, glikokortykosteroidy, leki modyfikujące przebieg choroby, cyklofosfamid oraz leki biologiczne.

Niesterydowe leki przeciwzapalne. Stosowane są w sytuacji, gdy choroba nie jest ostatecznie rozpoznana.

Glikokortykosteroidy (GKS). Stosowane są w przypadku nasilonego procesu zapalnego, stanów gorączkowych, objawów uogólnienia zapalenia, a także u pacjentów z towarzyszącym zapaleniem błony naczyniowej oka. GKS stosowane są w formie dożylniej oraz doustnej w skojarzeniu z lekami modyfikującymi przebieg choroby. W początkowym okresie choroby, gdy proces zapalny jest bardzo nasilony z towarzyszącymi silnymi dolegliwościami bólowymi i znacznym ograniczeniem funkcji stawów stosowane są w formie dożylniej (metyloprednizolon) w dawce 1-3mg/kg m.c/dobę. W miarę poprawy stanu klinicznego dalsze leczenie kontynuowane jest w formie doustnej preparatami metyloprednizolonu oraz prednizonu stopniowo redukując dobową dawkę w zależności od stanu klinicznego pacjenta oraz uzyskania efektu terapeutycznego przez leki modyfikujące przebieg choroby. W postaci systemowej MIZS GKS stosowane są w postaci pulsów metyloprednizolonu w dawce 20-30mg/kg/d przez 3-6 dni.

Leki modyfikujące przebieg choroby (LMPCh)

Metotrexat (MTX)

Jest lekiem pierwszego wyboru w leczeniu MIZS. Jego działanie polega na zahamowaniu reduktazy dihydrofolianowej zmniejszając przez to produkcję nukleotydów purynowych i tymidylanu potrzebnych do syntezy DNA i podziałów komórkowych [39]. Stosowany jest w formie doustnej w dawce 10-20 mg/m² pow. ciała 1 raz w tygodniu. W przypadku wystąpienia objawów ubocznych ze strony przewodu pokarmowego lek może być podawany podskórnie. Efekt terapeutyczny uzyskuje się po około 4-6 tygodniach, leczenie powinno być kontynuowane przez 6-12 miesięcy od chwili uzyskania remisji. Wcześniejsze zakończenie leczenia MTX może spowodować nawrót objawów chorobowych.

Najczęstsze objawy uboczne zgłaszane przez pacjentów w trakcie terapii MTX to: objawy ze strony przewodu pokarmowego: nudności, wymioty oraz wzrost stężenia enzymów wątrobowych. Zaleca się podawanie kwasu foliowego dzień po przyjęciu MTX celem zredukowania dolegliwości ze strony przewodu pokarmowego. Dotychczasowe obserwacje wskazują na duże bezpieczeństwo stosowania MTX, nie zaobserwowano zwiększonego ryzyka uszkodzenia wątroby, zaburzeń funkcji płuc, ciężkich zakażeń oraz rozwoju chłoniaków [39,41].

Sulfosalazyna (SSA)

Stosowana jest w postaci skapostawowej oraz w wielostawowej w skojarzeniu z MTX w dawkach 20 - 30 mg/kg/dobę. Najczęstsze objawy niepożądane to: wysypki, objawy ze strony układu pokarmowego, leukopenia.

Cyklosporyna A (CsA)

Stosowana jest u chorych z postacią systemową MIZS, wielostawową oraz u chorych z zapaleniem błony naczyniowej oka. Dawki: 2,5-5 mg/kg /dobę w dwóch dawkach podzielonych.

Azatiopryna (AT)

Nie jest obecnie powszechnie stosowana.

Chlorambucil

Znajduje zastosowanie w przypadku, gdy u pacjenta występują objawy amyloidozy.

Cyklofosamid

Jest stosowany w przypadku wystąpienia objawów zapalenia naczyń.

Leki biologiczne

Leki biologiczne hamują rozwój oraz postęp procesu zapalnego poprzez zahamowanie działania cytokin i aktywności limfocytów T i B. Dotychczasowe doniesienia wskazują, że wczesne włączenie leczenia biologicznego może w znacznym stopniu zahamować postęp choroby oraz zapobiec powstaniu nieodwracalnych zmian w stawach [86]. W leczenie MIZS stosowane są głównie leki blokujące działanie TNF- α , który jest główną cytokiną odgrywającą rolę w rozwoju procesu zapalnego w przebiegu MIZS. Aktywuje ona leukocyty, monocyty, komórki śródbłonna, fibroblasty błony maziowej, hamuje apoptozę fibroblastów, limfocytów T, zwiększa uwalnianie innych prozapalnych cytokin [36]. W Polsce zarejestrowane są 2 leki blokujące działanie TNF- α w leczeniu MIZS: etanercept oraz adalimumab. Leczenie odbywa się w ramach programu terapeutycznego finansowanego przez NFZ. Kwalifikacja do leczenia w ramach programu terapeutycznego odbywa się na podstawie poniższych kryteriów:

- co najmniej 5 obrzękniętych stawów oraz co najmniej 3 stawy o ograniczonej ruchomości z towarzyszącym bólem

- niepowodzenie terapii dwoma lekami modyfikującymi przebieg choroby przez okres 3 miesięcy każdym oraz maksymalną dawką MTX
- agresywny przebieg choroby
- aktywne zapalenie błony naczyniowej oka
- postać uogólniona choroby
- postać skąpostawowa choroby rozszerzająca się i przetrwała ponad 6 miesięcy pomimo leczenia MTX
- w innych przypadkach po uzyskaniu zgody Zespołu Koordynacyjnego do Spraw Leczenia Biologicznego w Chorobach Reumatycznych [89].

Etanercept

Jest to białko fuzyjne występujące w postaci dimera chimerycznego białka wyprodukowanego metodą inżynierii genetycznej. Połączono zewnątrzkomórkowy ligand wiążący domenę receptora-2 ludzkiego czynnika martwicy nowotworów z domeną Fc ludzkiej immunoglobuliny G1. Etanercept blokując miejsca wiążące na cząsteczce TNF α blokuje możliwość jego związania z receptorami obecnymi na błonie komórkowej. Lek podawany jest podskórnie w dawce 0,4mg/kg m.c. 2 razy w tygodniu [87,88].

Adalimumab

Adalimumab jest to w pełni humanizowane monoklonalne przeciwciało wiążące rozpuszczalną podjednostkę i fragment błonowy prekursora TNF α . Reguluje także stężenia cząstek adhezji międzykomórkowej ELAM-1, VCAM-1, ICAM-1, które stymulują migrację leukocytów. Adalimumab stosowany jest u pacjentów z wielostawową postacią MIZS w dawce 24mg/m² powierzchni ciała. Maksymalna pojedyncza dawka adalimumabu wynosi 40mg i jest podawana co 2 tygodnie podskórnie [89,90].

Tocilizumab

Jest to rekombinowane humanizowane przeciwciało monoklonalne, które hamuje działanie IL-6 poprzez związanie z receptorem dla IL-6. Stosowany jest w leczeniu uogólnionej postaci MIZS u pacjentów powyżej 2 r. ż., u których nie uzyskano poprawy w trakcie leczenia LMPCh oraz glikokortykosteroidami [91,92].

Anakinra

Lek nie jest zarejestrowany w Polsce. Jest to rekombinowany, nieglikolizowany homolog antagonisty ludzkiego receptora IL-1, hamujący IL-1 poprzez związanie z jej receptorem [93,94].

II. ZAŁOŻENIA PRACY

Młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów jest przewlekłą chorobą o podłożu autoimmunologicznym wieku dziecięcego, której obraz jest niejednorodny. Niezależnie od postaci MIZS cechą wspólną jest proces zapalny obejmujący struktury stawowe prowadząc do destrukcji stawu, a przy agresywnym przebiegu pacjent może prezentować powikłania pozastawowe w postaci zahamowania wzrostu, zajęcia narządów wewnętrznych oraz zapalenia przedniego odcinka gałki ocznej. Pacjenci wymagają długofalowego leczenia często kilkoma lekami, które nie są obojętne dla rozwijającego się organizmu. Duże znaczenie w zahamowaniu postępującego procesu zapalnego niszczącego stawu jest wczesne wdrożenie odpowiedniego leczenia. Mimo znanych czynników prognostycznych przebiegu choroby oraz odpowiedzi na leczenie niejednokrotnie występują przypadki, w których pomimo braku nasilonych zmian w stawach na początku choroby oraz braku znacząco podwyższonych wskaźników zapalenia trudno uzyskać remisję choroby. Znacznym problemem jest także decyzja o czasie zakończenia leczenia. Obserwowane są przypadki, w których po redukcji dawek leku lub po podjęciu decyzji o zakończeniu leczenia farmakologicznego, w oparciu o ocenę kliniczną i wskaźniki biochemiczne procesu zapalnego, dochodziło do wznowy zapalenia stawach. W patogenezie MIZS główną rolę odgrywają limfocyty T, które bezpośrednio oraz poprzez wydzielane prozapalne cytokiny nadmiernie stymulują proces osteoklastogenezy, co prowadzi do zniszczenia stawu. Nadmierna osteoklastogeneza wynika z zaburzonej równowagi pomiędzy RANKL i OPG, które są białkami bezpośrednio biorącymi udział w procesie utrzymania homeostazy kostnej. Wzrost ekspresji tych białek następuje nie tylko pod wpływem czynników stymulujących resorpcję kostną oraz tworzenia tkanki kostnej, ale stymulowany jest także przez komórki układu immunologicznego oraz cytokiny prozapalne. OPG, która blokując RANKL hamuje osteoklastogenezę, zaangażowana jest także w proces zapalny poprzez blokadę TRAIL - białka indukującego apoptozę m.in. w komórkach nowotworowych oraz fibroblastach błony maziowej oraz osteoklastach.

Ocena stężenia OPG, RANKL i TRAIL w surowicy oraz płynie stawowym może być wskaźnikiem wczesnego procesu zapalnego w sytuacji, gdy inne wskaźniki zapalne nie odbiegają od normy. Monitorowanie stężenia RANKL, OPG, TRAIL może być także pomocne w prognozowaniu przebiegu choroby i odpowiedzi na leczenie oraz przy podejmowaniu decyzji o zakończeniu leczenia.

III. CELE PRACY

1. Ocena kliniczna (wskaźniki aktywności choroby oraz poprawy klinicznej, leczenie, ocena stanu funkcjonalnego), ocena biochemiczna (wskaźniki stanu zapalnego, morfologia krwi, RANKL, OPG, TRAIL) w odstępach sześciomiesięcznych, w okresie 12 miesięcy (0-6-12).
2. Porównawcza ocena stężenia OPG, RANKL, TRAIL w surowicy oraz w płynie stawowym pobranym od pacjentów, u których istniały wskazania kliniczne do punkcji stawu.
3. Ocena wartości diagnostycznej RANKL, OPG, TRAIL w MIZS.

IV. PACJENCI I METODY

Grupę 43 pacjentów z MIZS wyselekcjonowano spośród 104 dzieci z młodzieńczym idiopatycznym zapaleniem stawów będących pod opieką Poradni Reumatologicznej oraz Kliniki Endokrynologii i Reumatologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu w okresie od marca 2007r. do lutego 2009r.

Głównym kryterium włączenia do badania było rozpoznanie MIZS w oparciu o kryteria ILAR. Do badań nie włączono pacjentów, u których MIZS towarzyszyła inna przewlekła choroba (autoimmunologiczna, alergiczna) ze względu na możliwy wpływ tych chorób na poziom badanych cytokin.

Grupę 43 pacjentów włączonych do badania podzielono na 2 podgrupy:

I – grupa pacjentów ze świeżo rozpoznanym MIZS dotychczas nie leczonych (n=24)

II – grupa pacjentów, u których pomimo stosowanego dotychczas standardowego leczenia nie udało się uzyskać remisji klinicznej i zostali zakwalifikowani do leczenia biologicznego etanerceptem (n=19).

U każdego z pacjentów badania przeprowadzone były 3-krotnie:

1. w chwili włączenia do badania (czas 0)
2. po 6 miesiącach (czas 1)
3. po 12 miesiącach (czas 2)

Pacjenci, którzy nie stawili się na badania po 6 oraz 12 miesiącach lub, u których decyzją lekarza pediatry reumatologa zmieniono leczenie, zostali wykluczeni z grupy badanej. O sposobie leczenia decydowali lekarze specjaliści reumatolodzy pracujący w Klinice Endokrynologii i Reumatologii Dziecięcej.

Badaniem objęto także grupę kontrolną (n=18), którą stanowiły zdrowe dzieci hospitalizowane w Klinice z powodu podejrzenia choroby endokrynologicznej, a u których uzyskano prawidłowe wyniki badań (n=10), pacjenci hospitalizowani z powodu ostrej infekcji (n=4) – badania zostały wykonane po zakończeniu leczenia oraz zdrowe dzieci pracowników Kliniki (n=4).

W badanej grupie w chwili włączenia do badania dokonano szczegółowej oceny wywiadu chorobowego, stanu przedmiotowego, wskaźników aktywności choroby, stanu funkcjonalnego, oznaczenia OB, CRP, morfologii krwi, obecności przeciwciał przeciwjądrowych ANA, obecności czynnika reumatoidalnego RF, stężeń OPG, RANKL, TRAIL w surowicy krwi badanej grupy oraz grupy kontrolnej.

Badania kontrolne przeprowadzono po 6 i 12 miesiącach. Obejmowały one: ocenę wywiadu chorobowego, stanu przedmiotowego, wskaźników aktywności choroby, wskaźników stanu funkcjonalnego, wskaźników poprawy klinicznej, oznaczenia OB, CRP, morfologii krwi, stężenia OPG, RANKL, TRAIL.

Projekt uzyskał pozytywną opinię Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu (uchwała nr 396/07 Komisji Bioetycznej z dnia 12.04.2007r.).

Każdy z pacjentów oraz rodziców/opiekunów prawnych uzyskał pełne informacje na temat badań. Od każdego pacjenta oraz rodzica/opiekuna prawnego uzyskano pisemną zgodę na udział w badaniu. Krew do badań została pobrana w trakcie rutynowej wizyty w Klinice lub w Poradni Reumatologicznej.

Do oznaczenia stężenia cytokin wykorzystano krew żylną pobraną z żyły łokciowej. Po pobraniu krew odwirowano i schłodzono, następnie rozdzielono i podzielono na części. Do czasu oznaczenia przechowywano w temperaturze -20°C . Badanie wykonano także w płynie stawowym pobranym od pacjentów, u których stwierdzono wskazania kliniczne do punkcji stawu. Decyzję o punkcji stawu podejmował lekarz reumatolog i przeprowadzał w Klinice Endokrynologii i Reumatologii Dziecięcej. Przed punkcją stawu wykonano badanie ultrasonograficzne stawu przeprowadzone przez lekarza radiologa. Po aspiracji płynu stawowego płyn odwirowano, schłodzono i podzielono na części. Do czasu oznaczenia przechowywano w temperaturze -20°C .

Stężenie OPG, RANKL, TRAIL w surowicy krwi oraz w płynie stawowym oznaczono metodą immunoenzymatyczną ELISA przy użyciu komercyjnych zestawów firmy BenderMed System (Wiedeń, Austria) dla TRAIL oraz firmy Biomedica dla oznaczeń OPG i RANKL. Badanie zostało wykonane w Pracowni Endokrynologii Molekularnej Kliniki Endokrynologii i Reumatologii Dziecięcej (mgr farm. H. Mikoś).

Pomiar absorbancji wykonano czytnikiem płytek Elisa przy długości fali 450 nm względem referencyjnej fali o długości 620 nm. Parametry reakcji ELISA dla poszczególnych cytokin podano w Tabeli 7.

Metoda oznaczenia OPG

Oznaczenie stężenia osteoprotegeryny w surowicy krwi wykonano w oparciu o metodę immunoenzymatyczną ELISA, z zastosowaniem komercyjnych zestawów do ilościowego oznaczenia osteoprotegeryny firmy Biomedica (Austria, Vienna), numer katalogowy: BI-20402, wg zaleceń producenta. Zestaw wykrywa obie formy, monomer i dimer OPG, włączając OPG związaną z ligandem RANKL. Zestaw przygotowany jest do oznaczania OPG w ludzkiej surowicy, osoczu EDTA, osoczu z heparyną oraz hodowli komórkowej. Czas inkubacji wynosi odpowiednio 18-24 godziny, 1 godzina, 20 min. Objętość krwi potrzebna do wykonania oznaczenia wynosi 50 µl. Badaną próbkę krwi po pobraniu odwirowano, uzyskaną po odciążeniu surowicę przechowywano w temperaturze -80°C do czasu wykonania oznaczeń.

Technika wykonania

Przed wykonaniem oznaczeń badane surowice oraz płyny stawowe rozmrożono, a odczynniki do wykonania oznaczenia pozostawiono w temp. pokojowej przez 30 min. W pierwszym etapie do dołków płytek opłaszczonych monoklonalnym ludzkim przeciwciałem przeciw osteoprotegerynie dodaje się 100 µl buforu, 50 µl kalibratorów, surowicy dzieci z grupy badanej oraz surowicy dzieci z grupy kontrolnej. Następnie dodaje się poliklonalne przeciwciało anty-OPG znakowane biotyną. W wyniku reakcji powstaje kompleks immunologiczny osteoprotegeryna-przeciwciało przeciw osteoprotegerynie. Płytkę inkubuje się przez 24 godziny w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$. Po zakończeniu inkubacji, płytkę należy dokładnie przepłukać buforem w celu usunięcia nadmiaru niezwiązanych kompleksów. W kolejnym etapie po dodaniu 200 µl konjugatu streptawidyna-HRPO przeprowadza się inkubację przez 1 godzinę w temp. pokojowej ok. 20°C . Po powtórnym 5-krotnym przemyciu płytki i dokładnym usunięciu resztek buforu płuczącego, do każdego dołka dodaje się 200 µl roztworu substratu. Po 20 minutach inkubacji w ciemności, w temp. pokojowej, reakcję należy zatrzymać, przez dodanie 50 µl roztworu hamującego reakcję enzymatyczną.,

Do płukania mikroplatek zastosowano płuczkę automatyczną ETI-System Washer firmy DiaSorin. Absorbancję odczytano za pomocą czytnika mikroplatek ELX 800 firmy BioTek przy długości fali 450 nm z filtrem referencyjnym 620 nm. Test poddano ewaluacji za pomocą programu komputerowego Gen 5 przy użyciu krzywej

4 PL. Limit detekcji wynosi 0,14 pmol/l. Precyzja metody wewnątrzoznaczeniowa wynosi 10 CV%, a międzyoznaczeniowa 8 CV%.

Wartości referencyjne podane przez producenta wynoszą: mediana 1,8 pmol/l (dla n=1134 i wieku 19-96 lat).

Metoda oznaczenia RANKL

Oznaczenie stężenia liganda rozpuszczalnego receptora aktywującego jądrowy czynnik kappaB (który jest również ligandem osteoprotegeryny) w surowicy krwi, wykonano w oparciu o metodę immunoenzymatyczną ELISA, z zastosowaniem komercyjnych zestawów do ilościowego oznaczenia amplii sRANKL firmy Biomedica (Austria, Vienna), numer katalogowy: BI-20452 wg zaleceń producenta. Zestaw przygotowany jest do oznaczania sRANKL w ludzkiej surowicy, osoczu EDTA, osoczu z heparyną oraz hodowli komórkowej. Czas inkubacji wynosi odpowiednio 18-24 godziny, 1 godzina, 45 min. Ponieważ stężenie sRANKL jest zwykle dość niskie w tym teście ELISA stosuje się dodatkowy układ amplifikujący. Objętość krwi potrzebna do wykonania oznaczenia wynosi 100 µl. Badaną próbkę krwi po pobraniu odwirowano, uzyskaną po odciążeniu surowicę przechowywano w temperaturze -80²³⁸ do czasu wykonania oznaczeń.

Technika wykonania

Przed wykonaniem oznaczeń badane surowice rozmrożono, a odczynniki do wykonania oznaczenia pozostawiono w temp. pokojowej przez 30 min. W teście wykorzystano technikę opłaszczonych płytek. W pierwszym etapie do dołków płytek opłaszczonych ludzką, rekombinowaną osteoprotegeryną (receptorem dla RANKL), dodano 100 µl standardów, surowicy pacjentów grupy badanej oraz surowicy dzieci z grupy kontrolnej. Poliklonalne znakowane biotyną przeciwciała anty-sRANKL zastosowano jako przeciwciała detekcyjne. W wyniku reakcji powstaje kompleks immunologiczny o osteoprotegeryna – rozpuszczalny ligand receptora aktywującego czynnik jądrowy kappaB - poliklonalne przeciwciała anty-sRANKL. Płytkę inkubuje się przez 24 godziny w temperaturze pokojowej +18-26²³⁸. Po zakończeniu inkubacji płytkę należy dokładnie przepłukać buforem, w celu usunięcia nadmiaru niezwiązanych kompleksów. W kolejnym etapie po dodaniu 200 µl konjugatu (streptawidyna-fosfataza alkaliczna) przeprowadza się inkubację przez 1 godzinę w temp. pokojowej ok.18-26²³⁸. Po powtórnym 5-krotnym przemyciu płytki i dokładnym

usunięciu resztek buforu płuczącego, do każdego dołka dodaje się 100 µl roztworu amplifikującego A (roztwór soli nieorganicznych i zbuforowanego enzymu) oraz 100 µl roztworu amplifikującego B (stabilizowany roztwór NADPH) wzmacniających reakcję i po 45 minutach inkubacji w ciemności, w temp. pokojowej, reakcję należy zatrzymać, przez dodanie 50 µl roztworu hamującego reakcję enzymatyczną. Stężenia próbek odczytano z krzywej standardowej.

Do płukania mikroplótek zastosowano płuczkę automatyczną ETI-System Washer firmy DiaSorin. Absorbancję odczytano za pomocą czytnika mikroplótek ELX 800 firmy BioTek przy długości fali 490 nm z filtrem referencyjnym 620 nm. Test poddano ewaluacji za pomocą programu komputerowego Gen 5 przy użyciu krzywej 4 PL. Precyzja metody wewnątrztestowa wynosi 9 CV% a międzytestowa 6 CV%. Według podanych przez producenta informacji, poziom detekcji testu wynosi 0,02 pmol/l.

Zakres wartości referencyjnych podanych przez producenta wynosi dla kobiet: mediana 0,37 pmol/l (n=635) i dla mężczyzn mediana 0,46 pmol/l (n=394).

Metoda oznaczenia TRAIL

Mikroplótki reakcyjne do oznaczeń ELISA zestawami firmy BenderMedSystem z opłaszczonym monoklonalnym przeciwciałem, specyficznym dla TRAIL inkubowano z analizowaną próbką surowicy pacjenta. TRAIL zawarty w badanym materiale wiązały się specyficznie ze swoistymi przeciwciałami I rzędu, unieruchomionymi na powierzchni mikrostudzienek reakcyjnych, tworząc fazę stałą. Po dodaniu konjugatu biotyna-anty-ludzkie przeciwciało, następowało wiązanie utworzonego kompleksu z przeciwciałem II rzędu. W kolejnym etapie po wypłukaniu zbędnych składników w trakcie inkubacji z enzymem peroksydazą chrzanowa HRP sprzężoną ze streptawidyną, otrzymano kompleks immunologiczny o strukturze kanapkowej: opłaśczone na płycie przeciwciało monoklonalne I rzędu – badana cytokina – przeciwciało monoklonalne II rzędu - enzym HRP. Po usunięciu niezwiązanych z kompleksem immunologicznym substancji, do układu reakcyjnego dodano roztwór substratu dla enzymu znacznikowego - tetrametylobenzydynę (TMB). W wyniku reakcji enzym–substrat, powstała ilość kolorowego produktu, wprost proporcjonalna do ilości cytokiny oznaczanej w badanej próbce, oraz

dodanych standardów, tworzących krzywą kalibracyjną. Zatrzymanie reakcji nastąpiło przez dodanie 1 M roztworu kwasu fosforowego.

Do płukania mikroplatek zastosowano płuczkę automatyczną ETI-System Washer firmy DiaSorin. Absorbancję odczytano za pomocą czytnika mikroplatek ELx 800 firmy BioTek Instruments (USA) przy długości fali 450 nm z filtrem referencyjnym 620 nm. Test poddano ewaluacji za pomocą programu komputerowego Gen 5 przy użyciu krzywej 4 PL. Wartości absorbancji przeliczano na jednostki stężenia badanego parametru w oparciu o wielopunktową krzywą kalibracyjną.

Tabela 7. Granica wykrywalności i precyzja metody oznaczanych cytokin

	OPG	RANKL	TRAIL
limit detekcji	2,5 pmol/l	0,08 pmol/l	5,4 pg/ml
precyzja w serii	CV 7,0 %	CV 5,0 %	6.5 %
precyzja między seriami	CV 8,0 %	CV 9,0 %	7,7 %

Oznaczenia laboratoryjne pozostałych parametrów.

- a) Odczyn Biernackiego (OB) – oznaczenie metodą manualną, grawimetryczną w pełnej krwi żyłnej. Wartość referencyjna: 1 – 10 mm/h.
- b) Białko C–reaktywne (CRP) – oznaczono w surowicy krwi żyłnej metodą immunoturbimetryczną analizatorem biochemicznym KONELAB firmy BioMerieux. Wartość referencyjna 0,5 mg/dl.
- c) Czynn timerumatoidalny (RF) – oznaczono w surowicy krwi metodą lateksową (wynik dodatni przy widocznej aglutynacji). Wartość referencyjna: wynik ujemny.
- d) Przeciwciała przeciwjądrowe (ANA) – oznaczono metodą immunofluorescencji pośredniej przy użyciu komercyjnych zestawów firmy Euroimmun. Wynik dodatni: miano \geq 1:160.
- e) Parametry gospodarki wapniowo - fosforanowej
 - Wapń (Ca) - oznaczono metodą kolorymetryczną na analizatorze biochemicznym Cobas Integra. Wartość referencyjna: 2,1 - 2,6 mmol/l.
 - Fosfor (P) - oznaczono metoda kolorymetryczną na analizatorze biochemicznym Cobas Integra. Wartość referencyjna: 4,5 - 5,52 mg/dl mmol/l.

- Fosfataza zasadowa (ALP) – oznaczono metodą spektrofotometryczną przy użyciu zestawu firmy BioMed. Wartość referencyjna 108-360 U/l.
 - 25(OH)D3 (metabolit witaminy D3) – oznaczono metodą radioimmunochemiczną. Wartość referencyjna 7,6 -75,0 ng/ml
- f) Parametry morfologii krwi – oznaczono we krwi pełnej przy pomocy automatycznego analizatora hematologicznego SYSMEX XT200i. Wartości referencyjne przedstawiono w tabeli 8.

Pomiar CRP, OB, RF, Ca, P, ALP, witaminy D oraz morfologii krwi obwodowej został wykonany w Centralnym Laboratorium Szpitala Klinicznego im. K. Jonschera w Poznaniu. Pomiar przeciwciał przeciwjądrowych został wykonany w Pracowni Diagnostyki Reumatologicznej Ortopedyczno – Rehabilitacyjnego Szpitala Klinicznego im. W. Degi w Poznaniu.

Tabela 8. Wartości referencyjne parametrów morfologii krwi żyłnej w zależności od płci i wieku

	WIEK	WARTOŚCI REFERENCYJNE
Krwinki białe (WBC) [G/l]	7 dni - 12 m.ż.	4,0 - 20,0
	2 r.ż. - 6 r.ż.	4,5 - 13,0
	6 r.ż. – 12 r.ż.	4,0 – 12,0
	> 12 r.ż.	4,0 – 10,0
Krwinki czerwone (RBC) [T/l]	9 m.ż. – 2 r.ż.	4,2 -5,5
	2 r.ż. - 6 r.ż.	4,3 -5,5
	6 r.ż. – 12 r.ż.	4,5 - 5,5
	> 12 r.ż. chłopcy	4,5 – 5,5
	> 12 r.ż. dziewczynki	4,0 – 5,0
Hemoglobina (Hb) [g/dl]	9 m.ż. – 2 r.ż.	11,0 -14,0
	2 r.ż. - 6 r.ż.	10,9 -14,2
	6 r.ż. – 12 r.ż.	12,0 – 15,5
	> 12 r.ż. chłopcy	14,0 – 18,0
	> 12 r.ż. dziewczynki	12,0 – 16,0
Hematokryt (Ht) [%]	9 m.ż. – 2 r.ż.	34,0 – 40,0
	2 r.ż. - 6 r.ż.	34,0 – 41,0
	6 r.ż. – 12 r.ż.	37,0 – 43,0
	> 12 r.ż. chłopcy	40,0 – 54,0
	> 12 r.ż. dziewczynki	37,0 -47,0
Płytki krwi (PLT) [G/l]		150 -400

Ocena aktywności choroby oraz stanu funkcjonalnego:

- a) całkowita ocena aktywności choroby przez lekarza (VAS) mierzona na 10 cm skali analogowej, gdzie 0 oznaczało stan nieaktywny, 10 – maksymalna aktywność choroby.
- b) ocena dobrego samopoczucia pacjenta (VAS) oceniona przez pacjenta lub jego rodzica/opiekuna prawnego, mierzona na 10 cm skali analogowej, gdzie 0 oznaczało maksymalnie dobre samopoczucie, 10 – maksymalnie złe samopoczucie związane z aktywnością choroby.
- c) liczba stawów z aktywnym zapaleniem - stawy, w których stwierdzono obrzęk lub ograniczenie ruchomości oraz wzmożone ocieplenie i ból.
- d) liczba stawów z ograniczeniem ruchomości.
- e) CHAQ (Childhood Health Assessment Questionnaire) – kwestionariusz oceny stanu funkcjonalnego chorego z MIZS. Zawiera 30 pytań podzielonych na 8 kategorii, każde pytanie zawiera 4 warianty odpowiedzi ocenianych w skali 0 – 3. Średnia z ośmiu najwyższych ocen z każdej kategorii pytań opisuje wskaźnik funkcjonalności.
- f) wskaźnik dyskomfortu opisywany jest na podstawie nasilenia bólu mierzonego na 100 mm skali analogowej.

Wskaźnik poprawy klinicznej:

Poprawę kliniczną oceniono w oparciu o kryteria ACR 30 Paediatric opracowane przez Gianniniego i wsp. [95]. Poprawa u chorych z MIZS występuje, gdy nastąpi polepszenie o 30% w 3 spośród 6 następujących parametrów:

1. liczba stawów z czynnym zapaleniem
2. liczba stawów z ograniczeniem ruchomości
3. ocena samopoczucia dokonana przez pacjenta lub rodzica/opiekuna prawnego na 10 cm skali analogowej
4. ocena aktywności choroby dokonana przez lekarza na 10 cm skali analogowej
5. CHAQ
6. OB

oraz brak pogorszenia o 30% wśród pozostałych parametrów.

W 2011r. ACR opracowało kryteria choroby nieaktywnej [96]:

1. brak aktywnego zapalenia stawów
2. stężenie CRP oraz wartość OB utrzymują się w granicach normy

3. czas trwania sztywności porannej krótszy niż 15 min.
4. uzyskanie maksymalnie najwyższego wyniku oceny aktywności choroby przeprowadzonej przez lekarza
5. brak gorączki, wysypki, powiększenia śledziony oraz węzłów chłonnych, zapalenia błon surowiczych
6. brak aktywnego zapalenia błony naczyniowej oka

W oparciu o kryteria choroby nieaktywnej ustalono definicję remisji klinicznej: remisja kliniczna w czasie trwania farmakoterapii - kryteria choroby nieaktywnej są spełnione przez okres 6 kolejnych miesięcy w czasie przyjmowania leków.

remisja kliniczna po zaprzestaniu leczenia farmakologicznego - kryteria choroby nieaktywnej są spełnione przez okres 12 kolejnych miesięcy, w czasie których pacjent nie przyjmuje leków stosowanych w terapii MIZS.

Analiza statystyczna:

W analizie statystycznej dla cech ilościowych obliczono wartości średnie, odchylenia standardowe, mediany oraz wartości maksymalne i minimalne. Test Shapiro – Wilka został użyty do sprawdzenia, czy badanie parametry charakteryzują się rozkładem normalnym. Dla porównania dwóch grup ze zmiennymi niezależnymi wykorzystano test Manna-Whitney'a, a dla większej liczby grup test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post – hoc wg Dunna. W przypadku porównań grup w układzie zmiennych zależnych użyto testu Wilcoxon – porównanie dwóch grup oraz testy Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post – hoc wg Dunna dla wielu grup. Współczynnik korelacji Spearmana został wykorzystany do analizy korelacji zmiennych. Dla przeprowadzonych analiz ustalono poziom istotności $\alpha = 0,05$. Obliczenia wykonano w Zakładzie Informatyki i Statystyki Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (prof. dr hab. J. Moczko) przy pomocy pakietu STATISTICA PL, wersja 10.

V. WYNIKI

1. Charakterystyka badanych grup.

Do badania włączono 43 pacjentów z MIZS rozpoznanym według kryteriów ILAR. Badaną grupę podzielono na 2 podgrupy:

$\frac{35}{17}$ Podgrupa I – pacjenci ze świeżo rozpoznanym MIZS dotychczas nie leczeni (n=24)

$\frac{35}{17}$ Podgrupa II – pacjenci z MIZS zakwalifikowani do leczenia biologicznego etanerceptem ze względu na brak uzyskania poprawy pod wpływem standardowego leczenia farmakologicznego (n=19)

Grupę kontrolną stanowiło 18 zdrowych dzieci. W analizowanych podgrupach stwierdzono występowanie 2 postaci MIZS: skąpostawowej oraz wielostawowej [Rycina 7].

Rycina 7. Postacie MIZS w badanych podgrupach.

U 4 dzieci współistniało zapalenie błony naczyniowej oka (grupa I n=1, grupa II n=3). U 1 pacjenta zapalenie błony naczyniowej oka rozwinęło się w trakcie leczenia biologicznego. W obu podgrupach nie stwierdzono współistnienia innych chorób przewlekłych.

Obciążony wywiad rodzinny dotyczący występowania chorób reumatycznych stwierdzono u 9 pacjentów (21%) [Rycina 8].

Wśród chorób reumatycznych występujących u krewnych I i II stopnia były następujące: łuszczykowe zapalenie stawów (n=3), zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa (n=3), młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów (n=2), choroba Behceta (n=1).

W badanej grupie pacjentów było 31 dziewczynek (72,1%) oraz 12 chłopców (27,9%). W grupie dziewcząt postać skąpostawowa występowała u 21 pacjentek, a postać wielostawowa u 10. Wśród chłopców postać skąpostawowa występowała u 10, postać wielostawowa u 2.

Rycina 8. Obciążony wywiad rodzinny chorobami reumatycznymi w badanych podgrupach.

W obu podgrupach średni wiek, wzrost, masa ciała były porównywalne i nie różniły się statystycznie od grupy kontrolnej. W tabeli 9 przedstawiono charakterystykę grupy pod względem wzrostu, masy ciała i wieku.

Tabela 9. Wiek, wzrost, masa ciała w badanych grupach oraz grupie kontrolnej

	podgrupa I	podgrupa II	grupa kontrolna	ANOVA Rang Kruskalla-Wallis
wiek [lata]	8,00 (4,96-13,300)	10,83 (6,83-13,8)	12,54 (6,14-15,83)	p=0,2065
masa ciała [kg]	130,0 (106,0-159,0)	126,0 (112,4-128,0)	44,0 (23,0-50,0)	p=0,1089
wzrost [cm]	23,75 (16,5-46,5)	23,60 (20,0-47,0)	152,00 (118,0-167,0)	p=0,1227
powierzchnia ciała [kg/m ²]	0,94 (0,7-1,95)	0,92 (0,81-1,46)	1,40 (0,90-1,53)	p=0,1104

Średni wiek zachorowania pacjentów wynosił $6,7 \pm 5,09$ roku (mediana 5,50 roku). W podgrupie I wiek zachorowania był wyższy niż dzieci w grupie II.

W badanej grupie 43 pacjentów stwierdzono istotnie statystycznie niższy wiek zachorowania u dziewcząt niż u chłopców (test Manna-Whitneya, $p=0,011$). W podgrupie I wiek zachorowania nie różnił się statystycznie pomiędzy obiema płciami (test Manna-Whitneya $p=0,375$). W podgrupie II wiek zachorowania dziewcząt był istotnie statystycznie niższy niż chłopców (test Manna-Whitneya $p=0,014$). Wiek zachorowania w zależności od płci przedstawia tabela 10.

Tabela 10. Wiek zachorowania w zależności od płci.

	badana grupa	podgrupa I	podgrupa II
Dziewczęta	mediana 4,83 IQR	mediana 7,21 IQR 2,21- 11,09	mediana 1,50 IQR 1,33 – 5,17
Chłopcy	mediana 9,83 IQR	mediana 9,67 IQR 4,59- 14,09	mediana 10,42 IQR 7,67 – 14,67

Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej (test Manna-Whitneya $p=0,701$) pomiędzy wiekiem zachorowania pacjentów z postacią skąpostawową (mediana 5,00 lat, IQR 1,67 – 9,83), a postacią wielostawową (mediana 5,75, IQR 1,5 – 11,0).

W podgrupie I średni czas od wystąpienia objawów do postawienia rozpoznania i włączenia leczenia wynosił $4,65 \pm 5,55$ miesiąca (mediana=2,50 miesiąca), a w podgrupie II $5,53 \pm 13,28$ miesiąca (mediana=2,00 miesiąca).

Najczęściej zajętymi stawami w momencie włączenia do badania były: staw kolanowy (39%), staw skokowy (16%), staw nadgarstkowy (16%), drobne stawy rąk (9%) **[Rycina 9]**.

W obu podgrupach jednorazowo oznaczono miano przeciwciał przeciwjądrowych ANA w chwili postawienia rozpoznania w podgrupie I oraz przed

włączeniem leczenia biologicznego w podgrupie II. W obu podgrupach dodatkowo miano przeciwciał stwierdzono u 12 pacjentów.

Pacjenci po włączeniu do grupy badanej zostali poddani w czasie 2 badaniom kontrolnym. Do pierwszego badania kontrolnego nie zgłosiło się 5 pacjentów z podgrupy I, a do drugiego badania kontrolnego nie zgłosiło się 4 pacjentów z podgrupy I. Okres czasu pomiędzy poszczególnymi badaniami kontrolnymi przedstawiono w tabeli 11.

Tabela 11. Okres czasu pomiędzy badaniami kontrolnymi w badanych grupach

	podgrupa I	podgrupa II
Okres pomiędzy włączeniem do badania a pierwszym badaniem kontrolnym [miesiące]	6,18 ± 1,7	6,26 ± 1,62
Okres pomiędzy pierwszym a drugim badaniem kontrolnym [miesiące]	6,35 ± 1,94	5,95 ± 1,89

Rycina 9. Stawy zajęte procesem zapalnym.

2. Podgrupa I: pacjenci ze świeżo rozpoznany MIZS, dotychczas nie leczeni.

W badanej podgrupie czas jaki upłynął od wystąpienia objawów do postawienia rozpoznania i włączenia leczenia wynosił średnio $4,65 \pm 5,55$ miesiąca.

U wszystkich pacjentów po włączeniu do grupy badanej rozpoczęto leczenie lekami modyfikującymi przebieg choroby. U 22 pacjentów zastosowano leczenie metotreksatem w dawce początkowej $10,04 \text{ mg/m}^2/\text{tydz}$. Po 6 i 12 miesiącach mediany stosowanych dawek były porównywalne [**Tabela 12**].

Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej pomiędzy stosowanymi dawkami MTX w czasie od włączenia do badania do kontroli 1 (test Wilcoxona, $p=0,056$) oraz pomiędzy badaniem kontrolnym 1 i 2 (test Wilcoxona, $p=0,133$).

Wykazano istotną różnicę statystyczną pomiędzy dawką MTX w czasie od włączenia do badania do kontroli 1, a dawką stosowaną w czasie kontroli 2 (test Wilcoxona, $p=0,028$).

U dwojga pacjentów leczenie MIZS rozpoczęto od sulfosalazyny w dawkach $38,46 \text{ mg/kg}$ i $26,32 \text{ mg/kg}$.

16 pacjentów w czasie włączenia do badania wymagało także zastosowania sterydoterapii. Początkowa dawka metyloprednizolonu wynosiła 0,55 mg/kg/tydz. W trakcie 1 badania kontrolnego metyloprednizolon otrzymywało 13 pacjentów, a w czasie 2 badania kontrolnego 11 pacjentów [Tabela 12]. Średni okres redukcji dawki GKS do dawki podtrzymującej lub całkowitego odstawienia GKS wynosił $2,06 \pm 0,85$ miesiąca.

Wykazano istotną różnicę statystyczną w dawce GKS zastosowaną w chwili włączenia do badania, a dawkami stosowanymi w czasie 1 wizyty kontrolnej (test Wilcoxona, $p=0,003$) oraz 2 wizyty kontrolnej (test Wilcoxona, $p<0,001$). Dawki GKS stosowane w czasie 1 wizyty kontrolnej i 2 wizyty kontrolnej nie różniły się statystycznie (test Wilcoxona, $p=0,767$).

Dostawowego podania octanu metyloprednizolonu wymagało 8 pacjentów w czasie włączenia do badania oraz 3 pacjentów w czasie wizyt kontrolnych.

Dwoje pacjentów w czasie trwania badania wymagało modyfikacji leczenia. U 1 z pacjentów do terapii metotrexatem i metyloprednizolonem dołączono cyklosporynę A, u 2 z pacjentów sulfosalazynę zastąpiono metotrexatem.

Tabela 12. Dawki metotrexatu i metyloprednizolonu stosowane w podgrupie I w czasie trwania badania

	czas 0	1 badanie kontrolne	2 badanie kontrolne
MTX [mg/m ² /tydz]	mediana 10,04 IQR 9,14-13,40	mediana 10,00 IQR 8,60-12,30	mediana 9,29 IQR 8,50-10,60
Metyloprednizolon [mg/kg/tydz]	mediana 0,55 IQR 0,43-0,66	mediana 0,09 IQR 0,08-0,15	mediana 0,08 IQR 01,06-0,15

Po zakwalifikowaniu do badanej podgrupy oznaczono parametry morfotyczne krwi obwodowej, wartość OB, stężenie CRP, parametry gospodarki wapniowo - fosforanowej, stężenia badanych cytokin, oceniono stopień aktywności choroby oraz stan funkcjonalny. Wartości poszczególnych parametrów przedstawiono w tabeli 13.

W obrębie badanej grupy stwierdzono podwyższone stężenie WBC u 2 pacjentów, obniżone stężenie RBC u 4 pacjentów, obniżone stężenie HGB u 8 pacjentów oraz podwyższone stężenie PLT u 9 pacjentów w odniesieniu do norm laboratorium.

Stwierdzono istotną statystycznie różnicę w stężeniu WBC pomiędzy podgrupą I a grupą kontrolną (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych porównań typu post-hoc wg Dunna, $p < 0,001$).

Nie wykazano znamiennej różnicy w stężeniu RBC pomiędzy podgrupą I a grupą kontrolną (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych porównań typu post-hoc wg Dunna, $p = 0,801$).

Stwierdzono istotną różnicę statystyczną w stężeniu hemoglobiny pomiędzy podgrupą I, a grupą kontrolną (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych porównań typu post-hoc wg Dunna, $p = 0,039$).

Stwierdzono istotną różnicę statystyczną w stężeniu PLT pomiędzy podgrupą 1 a grupą kontrolną (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych porównań typu post-hoc wg Dunna, $p < 0,001$).

Parametry gospodarki wapniowej nie odbiegały od norm laboratorium. Nie wykazano znamiennej różnicy statystycznej pomiędzy podgrupą I a grupą kontrolną w stężeniu Ca (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych porównań typu post-hoc wg Dunna, $p = 0,403$), P (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych porównań typu post-hoc wg Dunna, $p = 0,056$), ALP (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych porównań typu post-hoc wg Dunna, $p = 0,701$), 25(OH)D3 (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych porównań typu post-hoc wg Dunna, $p = 0,065$).

Tabela 13. Charakterystyka podgrupy I oraz grupy kontrolnej - parametry laboratoryjne, stężenie badanych cytokin, wskaźnik aktywności choroby oraz wskaźnik stanu funkcjonalnego

Czas 0	Podgrupa I	Grupa kontrolna			
		mediana	IQR	mediana	IQR
WBC [G/l]		8,78	7,04-9,87	6,23	5,09-7,28
RBC [T/l]		4,54	4,23-4,76	4,67	4,39-4,76
HGB [g/dl]		12,40	11,75-12,85	13,30	12,2-13,9
PLT [G/l]		352,5	297,0-493,0	272,0	226,0-312,0
Ca [mmol/l]		2,51	2,36-2,56	2,52	2,48-2,56
P [mg/dl]		4,23	3,83-4,45	4,38	4,36-4,41
ALP [U/l]		281	206-348	266	188-284
25(OH)D3 [ng/ml]		41,0	37,5-58,4	45,6	38,2-52,6
OB [mm/h]		47,5	29,0-69,0	6,5	5,0-9,0
CRP [mg/dl]		1,13	0,49-3,06	0,38	0,33-0,41
OPG [pmol/l]		4,43	2,81-6,16	3,02	2,20-3,86
RANKL [pmol/l]		0,368	0,070-0,600	0,139	0,053-0,056
TRAIL [pg/ml]		64,09	41,92-85,27	60,65	38,76-79,04
Całkowita ocena aktywności przez lekarza [cm]		4,0	3,0-5,0		
Całkowita ocena dobrego samopoczucia pacjenta [cm]		4,0	3,0-4,5		
Ocena stanu funkcjonalnego wg CHAQ		0,375	0,250-0,625		
Liczba stawów z aktywnym procesem zapalnym		2,0	1,0-3,0		
Liczba stawów z ograniczeniem ruchomości		2,0	1,0-3,0		

W czasie zakwalifikowania do badania w podgrupie I wartość OB była wyższa niż w grupie kontrolnej. Stwierdzono znamiennej różnicę statystyczną w wartości OB pomiędzy podgrupą I, a grupą kontrolną (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych porównań typu post-hoc wg Dunna, $p=0,001$) **[Rycina 10]**.

Stężenie CRP było podwyższone u 66,7% pacjentów w podgrupie 1. Stwierdzono znamiennej różnicę statystyczną w stężeniu CRP pomiędzy podgrupą 1 a grupą kontrolną (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych porównań typu post-hoc wg Dunna, $p=0,001$) **[Rycina 10]**.

Rycina 10. Porównanie wartości OB (A) oraz stężenia CRP (B) pomiędzy podgrupą I, a grupą kontrolną.

A

B

Badaną podgrupę podzielono w zależności od czasu jaki upłynął od wystąpienia objawów do postawienia rozpoznania (powyżej 8 tygodni i poniżej 8 tygodni). Nie wykazano znamiennej różnicy w wartości OB ($p=0,42$) oraz w stężeniu CRP ($p=1,00$) w zależności od czasu jaki upłynął od wystąpienia objawów do postawienia rozpoznania (test Kruskala – Wallisa z opcją wielokrotnych porównań typu post-hoc wg Dunna) **[Rycina 11]**.

Rycina 11. Porównanie wartości OB (A) oraz stężenia CRP (B) w zależności od czasu jaki upłynął od wystąpienia objawów do postawienia rozpoznania.

A

B

Aktywność choroby w oparciu o ocenę aktywności choroby przez lekarza, ocenę samopoczucia pacjenta oraz liczbę stawów z aktywnym procesem zapalnym i liczbę stawów z ograniczeniem ruchomości była niska. Średnie oceny aktywności choroby dokonanej przez lekarza i pacjenta/rodzica były podobne. Średnia liczba stawów z aktywnym procesem zapalnym była taka sama jak liczba stawów z ograniczeniem ruchomości **[Tabela13]**.

Analiza stężeń OPG, RANKL i TRAIL wykazała ich podwyższenie w surowicy krwi pacjentów w porównaniu z grupą kontrolną **[Tabela 13]**.

Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej dla stężeń OPG (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych porównań typu post-hoc wg Dunna, $p=0,069$), RANKL (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych porównań typu post-hoc wg Dunna,

p=0,069) oraz TRAIL (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych porównań typu post-hoc wg Dunna, p=1,00) **[Rycina 12]**.

Rycina 12. Porównanie stężeń OPG (A), RANKL (B) i TRAIL (C) pomiędzy podgrupą I i grupą kontrolną w czasie 0.

- A
- B
- C

Stężenia badanych cytokin w badanej podgrupie przeanalizowano w zależności od obecności przeciwciał przeciwjądrowych oraz czasu jaki upłynął od wystąpienia objawów do włączenia leczenia. Dla żadnej z badanych cytokin nie uzyskano istotnej różnicy statystycznej [**Tabela 14**].

W obrębie badanej podgrupy nie wykazano korelacji pomiędzy OPG, RANKL i TRAIL w czasie 0 (korelacja porządku rang Spearmana, $p > 0,05$).

Dla badanych cytokin przeanalizowano zależność z parametrami morfologii krwi obwodowej, parametrami gospodarki wapniowo-fosforanowej, wskaźnikami biochemicznymi procesu zapalnego oraz wskaźnikami aktywności choroby.

Nie wykazano zależności pomiędzy stężeniem OPG, RANKL i TRAIL a badanymi parametrami (korelacja porządku rang Spearmana, $p > 0,05$).

W podgrupie I 1 badanie kontrolne (czas 1) zostało wykonane u 19 pacjentów po średnio $6,18 \pm 1,17$ miesiąca od badania wykonanego w czasie 0. Drugie badanie kontrolne zostało przeprowadzone u 20 pacjentów po średnio $6,35 \pm 1,94$ miesiąca od badania wykonanego w czasie 1. W trakcie badań kontrolnych oceniono aktywność choroby, stan funkcjonalny, parametry biochemiczne procesu zapalnego, morfologię krwi, parametry gospodarki wapniowo-fosforanowej oraz stężenia badanych cytokin [**Tabela 15**] i porównano z wartościami wyjściowymi i grupą kontrolną. Ponadto oceniono aktywność choroby wg kryteriów Wallace'a oraz poprawę stanu klinicznego wg Gianniniego.

Tabela 14. Porównanie stężenia OPG, RANKL i TRAIL podgrupie I w zależności od obecności przeciwciał przeciwjądrowych ANA oraz czasu jaki upłynął od wystąpienia objawów do włączenia leczenia

		Podgrupa 1	Test Manna-Whitneya	
		Czas od wystąpienia objawów do włączenia leczenia		
	Powyżej 8 tygodni	Poniżej 8 tygodni		

OPG [pmol/l]	mediana 4,19 IQR 2,81-4,75	mediana 4,97 IQR 2,92-6,71	p=0,41
RANKL [pmol/l]	mediana 0,527 IQR 0,146-0,642	mediana 0,345 IQR 0,079-0,408	p=0,35
TRAIL [pg/ml]	mediana 70,49 IQR 46,91-75,47	mediana 59,52 IQR 41,92-172,20	p=0,93
	ANA dodatnie	ANA ujemne	
OPG [pmol/l]	mediana 4,49 IQR 2,56-6,56	mediana 4,10 IQR 3,30-5,42	p=0,89
RANKL [pmol/l]	mediana 0,34 IQR 0,07-0,60	mediana 0,43 IQR 0,37-0,52	p=0,96
TRAIL [pg/ml]	mediana 59,87 IQR 40,56-93,12	mediana 70,68 IQR 58,02-77,42	p=0,32

Tabela 15. Charakterystyka podgrupy I - parametry laboratoryjne, stężenie badanych cytokin, wskaźnik aktywności choroby oraz wskaźnik stanu funkcjonalnego w czasie 1 i 2

	Czas 1	Czas 2			
		mediana	IQR	Mediana	IQR
WBC [G/l]		7,21	6,81-9,99	7,61	6,16-9,23
RBC [T/l]		4,50	4,13-4,92	4,54	4,27-4,66
HGB [g/dl]		12,80	11,90-14,10	12,85	12,40-13,40
PLT [G/l]		352,5	271,0-415,0	313,0	269,0-394,0
Ca [mmol/l]		2,48	2,32-2,53	2,51	2,38-2,58
P [mg/dl]		4,15	3,61-4,45	4,24	3,82-4,42
ALP [U/l]		279	210-336	291	216-356
25(OH)D3 [ng/ml]		51,0	39,0-60,4	50,0	39,0-59,6
OB [mm/h]		12,0	7,0-32,0	8,5	6,0-17,5
CRP [mg/dl]		0,42	0,38-0,50	0,39	0,34-0,60
OPG [pmol/l]		3,25	1,95-4,56	2,26	1,96-3,87
RANKL [pmol/l]		0,152	0,173-0,362	0,252	0,073-0,475
TRAIL [pg/ml]		24,95	9,19-105,9	42,97	20,38-79,85
Całkowita ocena aktywności przez lekarza [cm]		1,0	1,0-2,0	1,0	1,0-2,0
Całkowita ocena dobrego samopoczucia pacjenta [cm]		1,0	1,0-2,0	1,0	0,0-2,0
Ocena stanu funkcjonalnego wg CHAQ		0,125	0,000-0,250	0,000	0,000-0,188
Liczba stawów z aktywnym procesem zapalnym		0,5	10,5-1,0	0,0	0,0-1,0
Liczba stawów z ograniczeniem ruchomości		0,5	0,5-1,0	0,0	0,0-1,0

Stężenie WBC w 1 badaniu kontrolnym było podwyższone u 4 pacjentów, natomiast w drugim badaniu kontrolnym stężenie WBC u wszystkich pacjentów było w normie. Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej pomiędzy stężeniem WBC w podgrupie I i grupie kontrolnej w czasie 1 (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,091$) oraz w czasie 2 (test

Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,057$). Porównując stężenia WBC w czasie 0 i w czasie 1 oraz w czasie 0 i w czasie 2 oraz pomiędzy czasem 1 i czasem 2 nie wykazano istotnej różnicy statystycznej (ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,076$).

Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej pomiędzy stężeniem RBC w podgrupie I i grupie kontrolnej w czasie 1 (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,907$) oraz w czasie 2 (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,945$). Porównując stężenia RBC w czasie 0 i w czasie 1 oraz w czasie 0 i w czasie 2 oraz pomiędzy czasem 1 i czasem 2 nie wykazano istotnej różnicy statystycznej (ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,402$).

Niedokrwistość stwierdzono u 3 pacjentów zarówno w pierwszym jak i drugim badaniu kontrolnym. Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej pomiędzy stężeniem HGB w podgrupie I i grupie kontrolnej w czasie 1 (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,736$) oraz w czasie 2 (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,449$). Porównując stężenia HGB w czasie 0 i w czasie 1, w czasie 0 i w czasie 2 oraz pomiędzy czasem 1 i czasem 2 nie wykazano istotnej różnicy statystycznej (ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,081$).

Nadpłytkowość była obecna u pięciorga pacjentów w obu badaniach kontrolnych. Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej pomiędzy stężeniem PLT w podgrupie I i grupie kontrolnej w czasie 1 (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,094$) oraz w czasie 2 (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,166$).

Stwierdzono istotną różnicę statystyczną w stężeniu PLT pomiędzy czasem 0 i czasem 2 (ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,017$). Natomiast nie wykazano różnicy statystycznej pomiędzy czasem 0 i czasem 1 oraz czasem 1 i czasem 2.

Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej pomiędzy stężeniem Ca w podgrupie I i grupie kontrolnej w czasie 1 (test Kruskala-Wallisa z opcją

wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,084$) oraz w czasie 2 (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,246$).

Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej pomiędzy stężeniem P w podgrupie I i grupie kontrolnej w czasie 1 (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,312$) oraz w czasie 2 (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,186$).

Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej pomiędzy stężeniem ALP w podgrupie I i grupie kontrolnej w czasie 1 (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,070$) oraz w czasie 2 (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,104$).

Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej pomiędzy stężeniem 25(OH)D3 w podgrupie I i grupie kontrolnej w czasie 1 (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,206$) oraz w czasie 2 (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,019$).

Podwyższone wartości OB stwierdzono u 58% pacjentów w czasie 1 oraz 40% pacjentów w czasie 2. Wykazano znamiennej różnicę w wartości OB w podgrupie I w czasie 1, a grupą kontrolną (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,009$) **[Rycina 13]**. Nie wykazano różnicy w wartości OB w czasie 2 pomiędzy podgrupą I a grupą kontrolną (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,158$) **[Rycina 14]**.

Rycina 13. Porównanie wartości OB w czasie 1 pomiędzy podgrupą I, a grupą kontrolną.

Rycina 14. Porównanie wartości OB w czasie 2 pomiędzy podgrupą I, a grupą kontrolną.

Stwierdzono istotną różnicę statystyczną pomiędzy wartością OB w czasie 0 i czasie 1 oraz w czasie 0 i czasie 2 (ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p < 0,001$). Wartości OB pomiędzy czasem 1 i czasem 2 nie różniły się statystycznie [**Rycina 15**].

Rycina 15. Porównanie wartości OB w podgrupie I pomiędzy czasem 0,1 i 2.

Podwyższone stężenie CRP stwierdzono u 4 pacjentów zarówno w pierwszym jak i drugim badaniu kontrolnym. Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej pomiędzy stężeniem CRP w podgrupie I i grupie kontrolnej w czasie 1 (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p = 0,088$) oraz w czasie 2 (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p = 0,552$). Porównując stężenia CRP w czasie 0 i w czasie 1, w czasie 0 i w czasie 2 oraz pomiędzy czasem 1 i czasem 2 nie wykazano istotnej różnicy statystycznej (ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p = 0,060$).

Wartości parametrów aktywności choroby [**Tabela 15**] w pierwszym i drugim badaniu wskazują na niską aktywność choroby.

Wskaźnik niepełnosprawności wg CHAQ w czasie 1 i 2 uległ poprawie o 0,13 w stosunku do wartości uzyskanej w chwili włączenia do badania. Stwierdzono istotną różnicę statystyczną pomiędzy wskaźnikiem niepełnosprawności wg CHAQ w czasie 0 i w czasie 1 oraz czasie 0 i w czasie 2 (ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p < 0,001$).

Uzyskano istotną różnicę statystyczną pomiędzy oceną aktywności choroby przez lekarza w czasie 0 i w czasie 1 oraz w czasie 0 i w czasie 2 (ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p < 0,001$).

Uzyskano istotną różnicę statystyczną pomiędzy oceną dobrego samopoczucia dokonaną przez rodzica/pacjenta w czasie 0 i w czasie 1 oraz w

czasie 0 i w czasie 2 (ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p < 0,001$).

Stwierdzono istotną różnicę statystyczną pomiędzy liczbą stawów z czynnym zapaleniem w czasie 0 i w czasie 1 oraz czasie 0 i w czasie 2 (ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p < 0,001$).

Stwierdzono istotną różnicę statystyczną pomiędzy liczbą stawów z ograniczeniem ruchomości w czasie 0 i w czasie 1 oraz czasie 0 i w czasie 2 (ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p < 0,001$) Poprawę ACR Pediatric 30 po 6 miesiącach leczenia osiągnęło 89,5% pacjentów, ACR Pediatric 50 79,0% pacjentów, a ACR Pediatric 70 57,9% pacjentów. Poprawę ACR Pediatric 100 stwierdzono u 36,8% pacjentów.

Po 12 miesiącach leczenia poprawę ACR Pediatric 30 osiągnęło 90,0% pacjentów, ACR Pediatric 50 75,0% pacjentów, a ACR Pediatric 70 70,0% pacjentów. Poprawę ACR Pediatric 100 stwierdzono u 55,0% pacjentów.

Wartości badanych cytokin u niektórych z pacjentów w czasie 0, 1 i 2 wyraźnie różniły się, przy czym różnice nie dotyczyły jednocześnie wszystkich trzech badanych cytokin **[Tabela 16]**. Średnie stężenia cytokin w poszczególnych badaniach przedstawiono w tabeli **[Tabela 17]**.

Tabela 16. Wartości OPG, RANKL, TRAIL u poszczególnych pacjentów w czasie 0, 1 i 2

Numer pacjenta	OPG 0 [pmol/l]	OPG 1 [pmol/l]	OPG 2 [pmol/l]	RANKL 0 [pmol/l]	RANKL 1 [pmol/l]	RANKL 2 [pmol/l]	TRAIL 0 [pg/ml]	TRAIL 1 [pg/ml]	TRAIL 2 [pg/ml]
1	3,06	3,35	2,36	0,043	0,013	0,000	13,36	0	0,00
2	4,77	-	2,05	0,604	-	0,121	74,06	-	9,34
3	6,87	5,57	6,75	0,000	0,000	0,018	9,19	9,19	50,26
4	2,56	-	1,89	0,931	-	0,078	73,09	-	79,66
5	4,74	3,25	2,01	0,529	0,366	0,575	35,33	9,09	42,67
6	3,30	1,89	1,75	0,378	0,269	0,241	1288,28	872,96	1268,84
7	2,25	1,25	1,49	0,359	0,274	0,346	50,62	9,702	34,11
8	7,13	4,61	-	1,527	0,221	-	1049,00	73,48	-
9	3,54	4,78	4,48	0,435	0,421	0,264	73,48	1385,25	314,27
10	4,53	4,03	5,28	0,274	0,268	0,303	67,15	31,06	43,89
11	3,94	-	5,22	0,68	-	0,006	97,84	-	106,72
12	6,56	3,83	-	0,059	0,041	-	251,29	192,58	-
13	4,44	2,65	2,22	0,357	0,073	0,068	93,12	109,02	71,73
14	7,18	-	3,61	0,086	-	0,541	29,84	-	23,73
15	2,16	2,53	2,18	2,600	0,075	0,09	26,17	43,28	36,56
16	2,54	3,54	1,94	0,333	0,152	0,406	43,28	12,75	39,00
17	4,66	1,79	2,76	0,525	0,409	0,223	77,42	12,75	0,54
18	2,19	2,23	2,29	0,25	0,106	0,385	58,71	0,00	80,04
19	6,61	-	4,14	0,001	-	0,046	67,89	-	118,52
20	5,42	3,21	2,51	0,438	0,121	0,608	58,02	0,00	13,36
21	0,96	1,59	1,35	0,729	0,405	0,556	61,03	24,95	43,28
22	7,76	4,56	-	0,000	0,054	-	112,23	101,99	-
23	5,76	5,80	-	0,072	0,090	-	40,56	105,94	-
24	4,45	1,95	1,97	0,605	0,362	0,564	58,49	23,73	17,02

Tabela 17. Średnie wartości stężeń OPG, RANKL i TRAIL w czasie 0, 1 i 2

OPG 0 [pmol/l] 4,47	OPG 1 [pmol/l] 3,28	OPG 2 [pmol/l] 2,91
RANKL 0 [pmol/l] 0,492	RANKL 1 [pmol/l] 0,195	RANKL 2 [pmol/l] 0,271
TRAIL 0 [pg/ml] 158,73	TRAIL 1 [pg/ml] 158,30	TRAIL 2 [pg/ml] 119,68

W badanej podgrupie w czasie 1 badania kontrolnego nie stwierdzono istotnej różnicy statystycznej w stężeniu badanych cytokin pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną (test Manna-Whitneya OPG $p=0,71$, RANKL $p=0,86$, TRAIL $p=0,20$). W drugim badaniu kontrolnym również nie wykazano istotnej różnicy statystycznej w stężeniu OPG (test Manna-Whitneya, $p=0,35$), RANKL (test Manna-Whitneya, $p=0,79$) oraz TRAIL (test Manna-Whitneya, $p=0,73$) w porównaniu z grupą kontrolną. Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej pomiędzy stężeniami OPG w podgrupie I w chwili włączenia do badania i w czasie 1 (test ANOVA Friedmana z opcją

wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,25$), w chwili włączenia do badania i w czasie 2 (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,07$) oraz pomiędzy czasem 1 i 2 (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,43$) [**Rycina 16**].

Rycina 16. Porównanie stężeń OPG w podgrupie 1 w zależności od czasu.

Wykazano istotną różnicę statystyczną pomiędzy stężeniami RANKL w podgrupie I w chwili włączenia do badania i w czasie 1 (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p<0,001$). Nie wykazano różnicy statystycznej pomiędzy stężeniem RANKL w chwili włączenia do badania i czasie 2 (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,37$) oraz pomiędzy czasem 1 i 2 (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,19$) [**Rycina 17**].

Rycina 17. Porównanie stężeń RANKL w podgrupie 1, w zależności od czasu.

Wykazano istotną różnicę statystyczną pomiędzy stężeniami TRAIL w podgrupie I w chwili włączenia do badania i w czasie 1 (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,01$). Nie wykazano różnicy statystycznej pomiędzy stężeniem TRAIL w chwili włączenia do badania i czasie 2 (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,37$) oraz pomiędzy czasem 1 i 2 (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,28$) [**Rycina 18**].

Rycina 18. Porównanie stężeń TRAIL w podgrupie I, w zależności od czasu.

Stężenia cytokin przeanalizowano także w podgrupie I w zależności od spełnienia kryteriów choroby nieaktywnej w czasie 2 badania kontrolnego. Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w stężeniu badanych cytokin pomiędzy grupą w aktywnej fazie choroby oraz w fazie nieaktywnej [**Tabela 18**].

Tabela 18. Stężenia OPG, RANKL i TRAIL w czasie 0 i 2 w grupie chorych z aktywną oraz nieaktywną postacią MIZS

	Faza aktywna choroby	Faza nieaktywna choroby	Test Manna-Whitneya
OPG 0 [pmol/l]	4,45 (2,56-5,42)	4,23 (3,06-6,56)	p=0,97
OPG 2 [pmol/l]	2,49 (4,94-5,22)	2,27 (1,94-5,22)	p=0,67
RANKL 0 [pmol/l]	0,398 (0,250-0,604)	0,390 (0,059- 0,680)	p=0,47
RANKL 2 [pmol/l]	0,298 (0,078-0,541)	0,245 (0,575-0,406)	p=0,57
TRAIL 0 [pg/ml]	63,30 (58,02-74,06)	64,09 (35,33-112-23)	p=0,52
TRAIL 2 [pmol/l]	28,92(13,36-79,66)	43,89 (39,00-106,72)	p=0,52

Wykazano istotną różnicę statystyczną w stężeniu OPG w czasie 0 i 2 w grupie chorych, którzy nie spełniali kryteriów choroby nieaktywnej w czasie 2 badania kontrolnego (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, p=0,01) [**Rycina 19**]. Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej w stężeniu OPG w czasie 0 i 2 w grupie chorych, którzy spełniali kryteria choroby nieaktywnej w czasie 2 badania kontrolnego.

Rycina 19. Porównanie stężenia OPG w czasie 0 i 2 w grupie chorych, którzy nie spełniali kryteriów choroby aktywnej, w czasie 2 badania kontrolnego.

Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej w stężeniu RANKL i TRAIL w czasie 0 i 2 w grupie chorych, którzy nie spełniali kryteriów choroby nieaktywnej w czasie 2 badania kontrolnego(RANKL test Manna-Whitneya, $p=0,52$, TRAIL test Manna-Whitneya, $p= 0,20$).

Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej w stężeniu RANKL i TRAIL w czasie 0 i 2 w grupie chorych, którzy spełniali kryteria choroby nieaktywnej w czasie 2 badania kontrolnego (RANKL test Manna-Whitneya, $p=0,52$, TRAIL test Manna-Whitneya, $p=0,73$).

Stężenia cytokin w czasie 1 i 2 przeanalizowano także w zależności od obecności ANA stwierdzonych w czasie kwalifikacji do badania.

Nie stwierdzono istotnej różnicy statystycznej w stężeniu OPG, RANKL i TRAIL w grupie pacjentów z dodatnim mianem przeciwciał ANA w porównaniu z grupą pacjentów z ujemnym mianem przeciwciał ANA [Tabela 19]

Tabela 19. Porównanie stężenia OPG, RANKL i TRAIL w podgrupie I, w czasie 1 i 2 w zależności od obecności przeciwciał ANA

Czas 1	ANA dodatnie	ANA ujemne	Test Manna-Whitneya
OPG [pmol/l]	mediana 3,45 IQR 2,23-4,56	mediana 2,53 IQR 1,89-3,21	$p= 0,85$
RANKL [pmol/l]	mediana 0,129 IQR 0,054-0,274	mediana 0,152 IQR 0,730-0,362	$p=0,23$
TRAIL [pg/ml]	mediana 23,73 IQR 9,09-101,99	mediana 43,28 IQR 12,75-872,96	$p=0,34$
Czas 2	ANA dodatnie	ANA ujemne	Test Manna-Whitneya
OPG [pmol/l]	mediana 2,26 IQR 1,96-3,82	mediana 3,76 IQR 2,45-4,78	$p= 0,55$
RANKL [pmol/l]	mediana 0,324 IQR 0,068-0,541	mediana 0,232 IQR 0,090-0,264	$p=0,79$
TRAIL [pg/ml]	mediana 42,97 IQR 23,737-71,73	mediana 77,54 IQR 13,36-314,21	$p=0,73$

W trakcie 1 i 2 badania kontrolnego oceniono korelacje pomiędzy stężeniami badanych cytokin, a parametrami laboratoryjnymi oraz wskaźnikami aktywności choroby oraz stanu funkcjonalnego.

Nie stwierdzono korelacji pomiędzy stężeniem OPG, a badanymi parametrami zarówno w 1 jak i w 2 badaniu kontrolnym (korelacja porządku rang Spearmana, $p > 0,05$).

Nie stwierdzono korelacji pomiędzy stężeniem RANKL, a badanymi parametrami zarówno w 1 jak i w 2 badaniu kontrolnym (korelacja porządku rang Spearmana, $p > 0,05$).

Nie stwierdzono korelacji pomiędzy stężeniem TRAIL, a badanymi parametrami zarówno w 1 jak i w 2 badaniu kontrolnym (korelacja porządku rang Spearmana, $p > 0,05$).

Nie stwierdzono korelacji pomiędzy badanymi cytokinami zarówno w czasie 1 i 2 (korelacja porządku rang Spearmana, $p > 0,05$).

3. Podgrupa II: pacjenci z MIZS zakwalifikowani do leczenia biologicznego etanerceptem ze względu na brak uzyskania poprawy pod wpływem standardowego leczenia farmakologicznego.

W badanej podgrupie czas jaki upłynął od wystąpienia objawów do postawienia rozpoznania i włączenia leczenia lekami modyfikującymi przebieg choroby wynosił średnio $5,53 \pm 13,28$ miesięcy. Średni czas stosowania LMPCh jaki upłynął do momentu włączenia leczenia etanerceptem wynosił $63,39 \pm 82,35$ miesięcy.

Wszyscy pacjenci do czasu włączenia leczenia etanerceptem otrzymywali LMPCh. 10 pacjentów otrzymywało MTX w średniej dawce $10,68 \pm 2,37$ mg/m² /tydz. Siedmiu dzieci otrzymywało MTX w średniej dawce $11,34 \pm 4,27$ mg/m² /tydz w skojarzeniu z cyklosporyną A stosowanej w średniej dawce $2,76 \pm 0,78$ mg/kg. Dwoje pacjentów otrzymywało cyklosporynę A w dawkach: 2,6 mg oraz 2,5 mg/kg. Piętnaścioro pacjentów wymagało dodatkowo sterydoterapii w dawce 0,13 mg/kg/24h. Octan metyloprednizolonu podano dostawowo 13 pacjentom w czasie włączenia do badania oraz 2 pacjentom w czasie pomiędzy czasem 0 i 1 lub 1 i 2.

W chwili włączenia leczenia biologicznego u części pacjentów zmodyfikowano leczenie LMPCh: u dwojga cyklosporynę A zastąpiono MTX, u sześciorga, u których stosowano MTX w skojarzeniu z cyklosporyną A zakończono terapię cyklosporyną.

Po 6 miesiącach od włączenia etanerceptu (czas 1) mediana dawki MTX wynosiła 11,36 mg/m²/tydz (IQR 10,10-12,82), po 12 miesiącach (czas 2) 10,97 mg/m² /tydz (IQR 9,20-12,30).

Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej pomiędzy stosowanymi dawkami MTX w czasie od włączenia do badania do kontroli 1, od włączenia do badania do kontroli 2 oraz pomiędzy badaniem kontrolnym1 i 2 (test ANOVA Friedmanna z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, p=0,191).

W trakcie 1 badania kontrolnego metyloprednizolon otrzymywało 9 pacjentów (mediana 0,09mg/kg/24h IQR 0,06-0,14), a w czasie 2 badania kontrolnego 6 pacjentów (mediana 0,09 mg/kg/24h IQR 0,07-0,11).

Wykazano istotną różnicę statystyczną w dawce GKS zastosowaną w chwili włączenia do badania, a dawkami stosowanymi w czasie 2 wizyty kontrolnej (test ANOVA Friedmanna z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, p<0,001)

Leczenie etanerceptem rozpoczęto w dawce 0,47 mg/kg (IQR 0,42-0,52). Po 6 miesiącach mediana stosowanej dawki wynosiła 0,40 mg/kg (IQR 0,40-0,48), a po 12 miesiącach 0,40 mg/kg (IQR 0,40-0,44).

Wykazano istotną różnicę statystyczną pomiędzy dawkami etanerceptu stosowanymi w czasie 0 a dawkami w czasie 1 (test Wilcoxona, p=0,001) oraz pomiędzy dawkami stosowanymi w czasie 0 i czasie 2 (test Wilcoxona, p=0,002). Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej pomiędzy dawkami etanerceptu stosowanymi w czasie 1 i 2 (test Wilcoxona, p=0,447).

Po zakwalifikowaniu do badanej podgrupy oznaczono parametry morfotyczne krwi obwodowej, wartość OB, stężenie CRP, stężenie badanych cytokin, oceniono stopień aktywności choroby oraz stan funkcjonalny. Wartości poszczególnych parametrów przedstawiono w tabeli 20.

W obrębie podgrupy II w czasie 0 stwierdzono podwyższone stężenie WBC u 4 pacjentów, obniżone stężenie RBC u 5 pacjentów, obniżone stężenie HGB u 6 pacjentów oraz podwyższone stężenie PLT u 7 pacjentów.

Stwierdzono istotną statystycznie różnicę w stężeniu WBC pomiędzy podgrupą II, a grupą kontrolną (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych porównań typu post-hoc wg Dunna, $p=0,002$).

Nie wykazano znamiennej różnicy w stężeniu RBC pomiędzy podgrupą II, a grupą kontrolną (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych porównań typu post-hoc wg Dunna, $p=0,801$).

Nie stwierdzono istotnej różnicy statystycznej w stężeniu HGB pomiędzy podgrupą II, a grupą kontrolną (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych porównań typu post-hoc wg Dunna, $p=0,147$).

Stwierdzono istotną różnicę statystyczną w stężeniu PLT pomiędzy podgrupą II, a grupą kontrolną (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych porównań typu post-hoc wg Dunna, $p<0,001$).

Nie stwierdzono odchyień w stężeniu Ca, P, witaminy D w obrębie podgrupy II w odniesieniu do norm laboratorium. Wartości ALP były podwyższone u 2 pacjentów w pierwszym badaniu kontrolnym oraz u 1 pacjenta w 2 badaniu kontrolnym.

Nie wykazano znamiennej różnicy statystycznej pomiędzy podgrupą II a grupą kontrolną w stężeniu Ca (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych porównań typu post-hoc wg Dunna, $p=0,215$), P (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych porównań typu post-hoc wg Dunna, $p=0,087$), ALP (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych porównań typu post-hoc wg Dunna, $p=0,425$), metabolitu witaminy D (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych porównań typu post-hoc wg Dunna, $p=0,098$).

Tabela 20. Charakterystyka podgrupy II oraz grupy kontrolnej - parametry laboratoryjne, stężenie badanych cytokin, wskaźnik aktywności choroby oraz wskaźnik stanu funkcjonalnego

Czas 0	Podgrupa II	Grupa kontrolna			
		mediana	IQR	mediana	IQR
WBC [G/l]		8,48	6,90-10,90	6,23	5,09-7,28
RBC [T/l]		4,57	4,19-4,92	4,67	4,39-4,76
HGB [g/dl]		12,50	11,80-12,80	13,30	12,2-13,9
PLT [G/l]		372,0	326,0-425,0	272,0	226,0-312,0

Ca [mmol/l]	2,50	2,43-2,53	2,52	2,48-2,56
P [mg/dl]	4,23	3,86-4,37	4,38	4,36-4,41
ALP [U/l]	237	122-398	266	188-284
25(OH)D3 [ng/ml]	51,4	28,5-60,3	45,6	38,2-52,6
OB [mm/h]	34,0	16,0–70,0	6,5	5,0-9,0
CRP [mg/dl]	1,49	0,42-4,20	0,38	0,33-0,41
OPG [pmol/l]	3,08	2,22-3,72	3,02	2,20-3,86
RANKL [pmol/l]	0,141	0,061-0,273	0,139	0,053-0,056
TRAIL [pg/ml]	36,39	22,51-58,71	60,65	38,76-79,04
Całkowita ocena aktywności przez lekarza [cm]	4,0	3,0-6,0		
Całkowita ocena dobrego samopoczucia pacjenta [cm]	4,0	3,0-4,5		
Ocena stanu funkcjonalnego wg CHAQ	0,500	0,375-0,875		
Liczba stawów z aktywnym procesem zapalnym	3,0	1,0-5,0		
Liczba stawów z ograniczeniem ruchomości	4,0	1,0-7,0		

Stwierdzono znamiennej różnicę statystyczną w wartości OB pomiędzy podgrupą II, a grupą kontrolną (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych porównań typu post-hoc wg Dunna, $p=0,001$) **[Rycina 20]**.

Stężenie CRP było podwyższone u 13 pacjentów w podgrupie II.

Stwierdzono znamiennej różnicę statystyczną w stężeniu CRP pomiędzy podgrupą II, a grupą kontrolną (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych porównań typu post-hoc wg Dunna, $p<0,001$) **[Rycina 21]**.

Rycina 20. Wartość OB w podgrupie II, w czasie włączenia do badania i w grupie kontrolnej.

Średnie oceny aktywności choroby dokonanej przez lekarza i pacjenta/rodzica były podobne. Średnia liczba stawów z aktywnym procesem zapalnym była niższa niż liczba stawów z ograniczeniem ruchomości. Stopień niepełnosprawności wg kwestionariusza CHAQ wynosił 0,5, co wg Dempstera określany jest jako łagodny **[Tabela 20]**.

U wszystkich pacjentów w podgrupie II oznaczono stężenie OPG, RANKL i TRAIL. Analiza wykazała podwyższone stężenie TRAIL w surowicy krwi pacjentów w porównaniu z grupą kontrolną. Stężenia OPG i RANKL były porównywalne ze stężeniami w grupie kontrolnej [Tabela 20].

Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej dla stężeń OPG (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych porównań typu post-hoc wg Dunna, $p=0,86$), RANKL (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych porównań typu post-hoc wg Dunna, $p=0,86$) oraz TRAIL (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych porównań typu post-hoc wg Dunna, $p=0,14$) pomiędzy podgrupą II, a grupą kontrolną [Rycina 22].

Rycina 21. Stężenie CRP w podgrupie II, w czasie 0 oraz w grupie kontrolnej.

Rycina 22. Porównanie stężeń OPG (A), RANKL (B) i TRAIL (C) pomiędzy podgrupą II i grupą kontrolną w czasie 0.

- A
- B
- C

Stężenia badanych cytokin w badanej podgrupie przeanalizowano w zależności od obecności przeciwciał przeciwjądrowych. Dla żadnej z badanych cytokin nie uzyskano istotnej różnicy statystycznej [Tabela 21].

Tabela 21. Porównanie stężenia OPG, RANKL i TRAIL podgrupie II, w zależności od obecności przeciwciał przeciwjądrowych ANA

	podgrupa II		test Manna-Whitneya
	ANA dodatnie	ANA ujemne	
OPG [pmol/l]	mediana 3,14 IQR 2,11-3,93	mediana 2,85 IQR 2,29-3,48	$p=0,71$
RANKL [pmol/l]	mediana 0,181 IQR 0,092-0,225	mediana 0,064 IQR 0,021-0,332	$p=0,30$
TRAIL [pg/ml]	mediana 39,61 IQR 29,95-58,71	mediana 30,12 IQR 20,99-60,16	$p=0,59$

W obrębie badanej podgrupy wykazano korelację pomiędzy OPG i TRAIL w czasie 0 (korelacja porządku rang Spearmana, $p=0,01$ $r_s=0,56$ czy r_s). Nie wykazano korelacji pomiędzy OPG i RANKL oraz RANKL i TRAIL (korelacja porządku rang Spearmana, $p>0,05$).

Dla badanych cytokin przeanalizowano zależność z parametrami morfologii krwi obwodowej, wskaźnikami biochemicznymi procesu zapalnego, parametrami gospodarki wapniowo-fosforanowej oraz wskaźnikami aktywności choroby.

Nie wykazano zależności pomiędzy stężeniem OPG, RANKL i TRAIL, a badanymi parametrami (korelacja porządku rang Spearmana, $p > 0,05$).

W podgrupie II 1 badanie kontrolne (czas 1) zostało wykonane u 19 pacjentów po średnio $6,26 \pm 1,62$ miesiąca od badania wykonanego w czasie 0. Drugie badanie kontrolne zostało przeprowadzone u 18 pacjentów po średnio $5,96 \pm 1,89$ miesiąca od badania wykonanego w czasie 1. W trakcie badań kontrolnych oceniono aktywność choroby, stan funkcjonalny, parametry biochemiczne procesu zapalnego, morfologię krwi, parametry gospodarki wapniowo-fosforanowej oraz stężenia badanych cytokin [Tabela 22] i porównano z wartościami wyjściowymi i grupą kontrolną. Ponadto oceniono aktywność choroby wg kryteriów Wallace'a oraz poprawę stanu klinicznego wg Gianniniego.

Stężenie WBC w 1 i 2 badaniu kontrolnym było podwyższone u 2 pacjentów. W pierwszym badaniu kontrolnym pacjenci z podwyższonym stężeniem WBC otrzymywali metyloprednizolon w dawce 0,1 mg/kg, nie stwierdzono u tych pacjentów podwyższonych wskaźników procesu zapalnego. W drugim badaniu kontrolnym pacjenci z podwyższonym stężeniem WBC również otrzymywali metyloprednizolon w dawce 0,1 mg/kg, natomiast wskaźniki procesu zapalnego były podwyższone. Leukopenia występowała u 1 pacjenta w 1 oraz 2 badaniu kontrolnym.

Tabela 22. Charakterystyka podgrup II - parametry laboratoryjne, stężenie badanych cytokin, wskaźnik aktywności choroby oraz wskaźnik stanu funkcjonalnego w czasie 1 i 2

	Czas 1		Czas 2		
		mediana	IQR	Mediana	IQR
WBC [G/l]		7,26	4,94-8,53	7,07	5,35-8,78
RBC [T/l]		4,52	4,23-4,78	4,49	4,14-4,83
HGB [g/dl]		12,90	12,30-13,70	12,60	11,80-14,20
PLT [G/l]		326	292,0-379,0	299,0	251,0-394,0
Ca [mmol/l]		2,55	2,49-2,57	2,51	2,48-2,55

P [mg/dl]	4,35	3,96-4,45	4,43	4,02-4,55
ALP [U/l]	216	106-318	248	164-386
25(OH)D3 [ng/ml]	51,0	39,0-62,4	53,2	41,2-68,3
OB [mm/h]	10,0	6,0-15,0	12,0	7,0-18,0
CRP [mg/dl]	0,39	0,36-0,41	0,38	0,38-0,51
OPG [pmol/l]	2,47	2,15-3,28	2,73	2,26-3,46
RANKL [pmol/l]	0,125	0,021-0,332	0,132	0,061-0,232
TRAIL [pg/ml]	35,95	22,52-73,48	53,48	21,29-76,66
Całkowita ocena aktywności przez lekarza [cm]	2,0	1,0-2,0	1,0	0,0-2,0
Całkowita ocena dobrego samopoczucia pacjenta [cm]	1,0	1,0-2,0	1,0	0,0-2,0
Ocena stanu funkcjonalnego wg CHAQ	0,125	0,000-0,250	0,125	0,000-0,125
Liczba stawów z aktywnym procesem zapalnym	0,0	0,0-0,0	0,0	0,0-1,0
Liczba stawów z ograniczeniem ruchomości	0,0	0,0-1,0	0,0	0,0-1,0

Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej pomiędzy stężeniem WBC w podgrupie II i grupie kontrolnej w czasie 1 (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,094$) oraz w czasie 2 (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,064$).

Wykazano istotną różnicę statystyczną pomiędzy stężeniem WBC w czasie 0 i czasem 1 oraz czasem 0 i czasem 2 (ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,008$). Nie wykazano różnicy statystycznej pomiędzy stężeniem WBC w czasie 1 i 2.

Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej pomiędzy stężeniem RBC w podgrupie II i grupie kontrolnej w czasie 1 (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,575$) oraz w czasie 2 (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,521$).

Porównując stężenia RBC w czasie 0 i w czasie 1 oraz w czasie 0 i w czasie 2 oraz pomiędzy czasem 1 i czasem 2 nie wykazano istotnej różnicy statystycznej

(ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,404$).

Niedokrwistość stwierdzono u 3 pacjentów w pierwszym badaniu kontrolnym oraz u 6 pacjentów w drugim badaniu kontrolnym.

Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej pomiędzy stężeniem HGB w podgrupie II i grupie kontrolnej w czasie 1 (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,736$) oraz w czasie 2 (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,449$).

Porównując stężenia HGB w czasie 0 i w czasie 1 oraz w czasie 0 i w czasie 2 oraz pomiędzy czasem 1 i czasem 2 nie wykazano istotnej różnicy statystycznej (ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,280$).

Nadpłytkowość była obecna u dwójga pacjentów w pierwszym oraz u 3 pacjentów w drugim badaniu kontrolnym. Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej pomiędzy stężeniem PLT w podgrupie II i grupie kontrolnej w czasie 1 (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,067$) oraz w czasie 2 (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,692$).

Stwierdzono istotną różnicę statystyczną w stężeniu PLT pomiędzy czasem 0 i czasem 2 (ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,017$). Natomiast nie wykazano różnicy statystycznej pomiędzy czasem 0 i czasem 1 oraz czasem 1 i czasem 2.

Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej pomiędzy stężeniem Ca w podgrupie II i grupie kontrolnej w czasie 1 (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,369$) oraz w czasie 2 (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,185$).

Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej pomiędzy stężeniem P w podgrupie II i grupie kontrolnej w czasie 1 (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,365$) oraz w czasie 2 (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,174$).

Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej pomiędzy stężeniem ALP w podgrupie II i grupie kontrolnej w czasie 1 (test Kruskala-Wallisa z opcją

wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,082$) oraz w czasie 2 (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,068$).

Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej pomiędzy stężeniem metabolitu witaminy D w podgrupie II i grupie kontrolnej w czasie 1 (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,526$) oraz w czasie 2 (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,278$).

Podwyższone wartości OB stwierdzono u 47,4% pacjentów w czasie 1 oraz 63,2% pacjentów w czasie 2. Nie wykazano znamiennej różnicy w wartości OB w podgrupie II w czasie 1, a grupą kontrolną (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,096$). Wykazano różnicę w wartości OB w czasie 2 pomiędzy podgrupą II, a grupą kontrolną (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,002$).

Stwierdzono istotną różnicę statystyczną pomiędzy wartością OB w czasie 0 i czasie 1 oraz w czasie 0 i czasie 2 (ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p<0,001$). Wartości OB pomiędzy czasem 1 i czasem 2 nie różniły się statystycznie **[Rycina 23]**.

Rycina 23. Porównanie wartości OB w podgrupie II pomiędzy czasem 0,1,i 2.

Podwyższone stężenie CRP stwierdzono u 3 pacjentów zarówno w pierwszym jak i drugim badaniu kontrolnym.

Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej pomiędzy stężeniem CRP w podgrupie II i grupie kontrolnej w czasie 1 (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,047$) oraz w czasie 2 (test Kruskala-Wallisa z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,552$).

Porównując stężenia CRP w czasie 0 i w czasie 1, w czasie 0 wykazano istotną różnicę statystyczną (ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p<0,001$). Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej pomiędzy stężeniem CRP w czasie 1 i 2 [**Rycina 24**].

Rycina 24. Porównanie stężenia CRP w podgrupie II w czasie 0, 1 i 2.

Wartości parametrów aktywności choroby [Tabela 22] w pierwszym i drugim badaniu wskazują na niską aktywność choroby.

Wskaźnik niepełnosprawności wg CHAQ w czasie 1 i 2 uległ poprawie o 0,13 w stosunku do wartości uzyskanej w chwili włączenia do badania. Wartości CHAQ [Tabela 22] w obu badaniach kontrolnych odpowiada łagodnemu stopniowi niepełnosprawności. Stwierdzono istotną różnicę statystyczną pomiędzy wskaźnikiem niepełnosprawności wg CHAQ w czasie 0 i w czasie 1 oraz czasie 0 i w czasie 2 (ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p < 0,001$).

Oceny aktywności choroby dokonane przez lekarza oraz pacjenta w czasie 1 i 2 były zbliżone. Uzyskano istotną różnicę statystyczną pomiędzy oceną aktywności choroby przez lekarza w czasie 0 i w czasie 1 oraz w czasie 0 i w czasie 2 (ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p < 0,001$).

Uzyskano istotną różnicę statystyczną pomiędzy oceną dobrego samopoczucia dokonaną przez rodzica/pacjenta w czasie 0 i w czasie 1 oraz w czasie 0 i w czasie 2 (ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p < 0,001$).

Liczba stawów z aktywnym procesem zapalnym w czasie 1 była niższa niż liczba stawów z ograniczeniem ruchomości (11 vs. 49). Również w czasie 2 liczba stawów z aktywnym procesem zapalnym była niższa niż liczba stawów z ograniczeniem ruchomości (9 vs. 37).

Stwierdzono istotną różnicę statystyczną pomiędzy liczbą stawów z czynnym zapaleniem w czasie 0 i w czasie 1 oraz czasie 0 i w czasie 2 (ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p < 0,001$).

Stwierdzono istotną różnicę statystyczną pomiędzy liczbą stawów z ograniczeniem ruchomości w czasie 0 i w czasie 1 oraz czasie 0 i w czasie 2 (ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p < 0,001$).

Poprawę ACR Pediatric 30 oraz 50 po 6 miesiącach leczenia osiągnęło 89,5% pacjentów, ACR Pediatric 70 63,2% pacjentów. Poprawę ACR Pediatric 100 stwierdzono u 36,8% pacjentów. Po 12 miesiącach leczenia poprawę ACR Pediatric

30 osiągnęło 84,2% pacjentów, ACR Pediatric 50 79,0% pacjentów, a ACR Pediatric 70 73,9% pacjentów. Poprawę ACR Pediatric 100 stwierdzono u 47,4% pacjentów.

W trakcie terapii etanerceptem monitorowano stężenia cytokin. Wartości badanych cytokin u niektórych z pacjentów w czasie 0, 1 i 2 wyraźnie różniły się, przy czym różnice nie dotyczyły jednocześnie wszystkich trzech badanych cytokin. Zaobserwowano także różnicę w stężeniu poszczególnych cytokin pomiędzy pacjentami [**Tabela 23**]. Średnie stężenia cytokin w poszczególnych badaniach przedstawiono w tabeli 24.

Tabela 23. Stężenia OPG, RANKL, TRAIL u poszczególnych pacjentów w czasie 0, 1 i 2, w podgrupie II

Numer pacjenta	OPG 0 [pmol/l]	OPG 1 [pmol/l]	OPG 2 [pmol/l]	RANKL 0 [pmol/l]	RANKL 1 [pmol/l]	RANKL 2 [pmol/l]	TRAIL 0 [pg/ml]	TRAIL 1 [pg/ml]	TRAIL 2 [pg/ml]
25	4,96	4,80	5,09	0,100	2,100	0,132	47,03	75,07	76,66
26	4,28	2,26	-	0,490	0,124	-	48,59	22,52	-
27	2,36	2,16	2,26	0,273	0,223	0,368	22,51	35,95	14,58
28	1,814	1,36	1,97	0,014	0,052	0,328	29,95	17,11	25,56
29	3,25	4,15	4,26	0,000	0,000	0,000	34,06	20,92	53,48
30	2,71	2,29	2,73	0,392	0,249	0,160	19,29	43,45	66,74
31	3,60	2,61	2,66	0,544	0,141	0,084	64,87	37,26	17,11
32	2,22	4,30	5,35	0,068	0,140	0,261	71,73	121,66	137,3
33	2,99	2,67	3,08	0,061	0,04	0,000	26,17	42,06	18,85
34	3,72	5,07	4,94	0,000	0,000	0,000	79,04	73,48	73,48
35	2,64	3,28	3,33	0,225	0,639	0,264	58,71	19,46	65,93
36	4,27	1,95	2,46	0,192	0,066	0,045	36,39	7,061	0,000
37	3,14	2,33	1,87	0,188	0,248	0,232	122,50	189,44	810,43
38	3,08	2,62	2,74	0,141	0,024	0,069	39,61	39,00	48,78
39	2,11	2,94	2,59	0,092	0,125	0,119	21,90	24,34	21,29
40	1,62	2,03	2,26	0,181	0,154	0,202	0,00	22,52	22,52
41	1,77	1,92	-	0,043	0,068	-	19,46	26,17	-
42	3,64	2,47	3,43	0,060	0,015	0,061	51,06	73,48	87,77
43	3,93	2,15	1,83	1,306	0,232	0,155	32,75	27,84	103,19

Tabela 24. Średnie wartości stężeń OPG, RANKL i TRAIL w podgrupie II, w czasie 0, 1 i 2

OPG 0 [pmol/l] 3,02	OPG 1 [pmol/l] 2,81	OPG 2 [pmol/l] 3,11
RANKL 0 [pmol/l] 0,230	RANKL 1 [pmol/l] 0,244	RANKL 2 [pmol/l] 0,146
TRAIL 0 [pg/ml] 43,45	TRAIL 1 [pg/ml] 48,36	TRAIL 2 [pg/ml] 96,69

W badanej podgrupie w czasie 1 badania kontrolnego stwierdzono istotną różnicę statystyczną w stężeniu OPG pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną (test Kruskala-Wallisa, $p=0,03$) oraz w stężeniu TRAIL pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną (test Kruskala-Wallisa, $p=0,006$) **[Rycina 25]**. Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej w stężeniu RANKL pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną (test Kruskala-Wallisa, $p=0,86$).

Rycina 25. Porównanie stężeń OPG i TRAIL pomiędzy podgrupą II i grupą kontrolną w czasie 1.

W drugim badaniu kontrolnym nie wykazano istotnej różnicy statystycznej w stężeniu OPG (test Kruskala-Wallisa, $p=0,42$), RANKL (test Kruskala-Wallisa, $p=0,85$) oraz TRAIL (test Kruskala-Wallisa, $p=0,85$) w porównaniu z grupą kontrolną.

Wykazano istotną różnicę statystyczną w stężeniu OPG w podgrupie II pomiędzy czasem 0 i 1 (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,01$), czasem 0 i 2 (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,02$). Różnicy statystycznej nie wykazano pomiędzy czasem 1 i 2 (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,23$) [**Rycina 26**].

Rycina 26. Porównanie stężeń OPG w podgrupie II, w zależności od czasu.

Wykazano istotną różnicę statystyczną w stężeniu RANKL w podgrupie II pomiędzy czasem 0 i 1 (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p<0,02$), czasem 0 i 2 (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,04$) oraz pomiędzy czasem 1 i 2 (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,02$) [**Rycina 27**].

Rycina 27. Porównanie stężeń RANKL w podgrupie II, w zależności od czasu.

Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej w stężeniu TRAIL w podgrupie II pomiędzy czasem 0 i 1 (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,05$). Wykazano różnicę statystyczną w stężeniu TRAIL pomiędzy czasem 0 i 2 (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,04$) oraz pomiędzy czasem 1 i 2 (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,04$) **[Rycina 28]**.

Stężenia cytokin przeanalizowano także w podgrupie II w zależności od spełnienia kryteriów choroby nieaktywnej w czasie 2 badania kontrolnego ($n=11$). Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w stężeniu OPG pomiędzy grupą w aktywnej fazie choroby oraz w fazie nieaktywnej. Różnicę statystyczną wykazano dla RANKL **[Tabela 25]**.

Rycina 28. Porównanie stężeń TRAIL w podgrupie II, w zależności od czasu.

Tabela 25. Stężenia OPG, RANKL i TRAIL w czasie 0 i 2 w grupie chorych z aktywną oraz nieaktywną postacią MIZS

	Faza aktywna choroby	Faza nieaktywna choroby	Test Manna-Whitneya
OPG 0 [pmol/l]	3,12 (1,81-3,93)	3,09 (2,36-3,64)	p=0,96
OPG 2 [pmol/l]	3,08 (1,81-3,93)	2,69 (1,97-4,26)	p=1,00
RANKL 0 [pmol/l]	0,188 (0,014-0,095)	0,052 (0,092-0,273)	p=0,02
RANKL 2 [pmol/l]	0,298 (0,078-0,541)	0,245 (0,575-0,406)	p=0,56
TRAIL 0 [pg/ml]	31,35 (26,17-34,06)	48,59 (22,51-64,87)	p=0,20
TRAIL 2 [pmol/l]	53,48 (25,56-76,06)	57,36 (19,29-80,62)	p=0,79

Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej w stężeniu OPG w czasie 0 i 2 w grupie chorych, którzy spełniali kryteria choroby nieaktywnej w czasie 2 badania kontrolnego (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, p=0,17). Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej w stężeniu OPG w czasie 0 i 2 w grupie chorych, którzy nie spełniali kryteriów choroby nieaktywnej w czasie 2 badania kontrolnego (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, p=0,46).

Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej w stężeniu RANKL w czasie 0 i 2 w grupie chorych, którzy spełniali kryteria choroby nieaktywnej w czasie 2 badania kontrolnego (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, p=0,52) oraz w grupie chorych, którzy nie spełniali kryteriów choroby nieaktywnej w czasie 2 badania kontrolnego (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, p=0,86).

Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej w stężeniu TRAIL w czasie 0 i 2 w grupie chorych, którzy spełniali kryteria choroby nieaktywnej w czasie 2 badania kontrolnego (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, p=0,56) oraz w grupie chorych, którzy nie spełniali kryteriów choroby

nieaktywnej w czasie 2 badania kontrolnego (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,65$).

Stężenia cytokin w czasie 1 i 2 przeanalizowano także w zależności od obecności ANA stwierdzonych w czasie kwalifikacji do badania.

Nie stwierdzono istotnej różnicy statystycznej w stężeniu OPG, RANKL i TRAIL w grupie pacjentów z dodatnim mianem przeciwciał ANA w porównaniu z grupą pacjentów z ujemnym mianem przeciwciał ANA [Tabela 26].

Tabela 26. Porównanie stężenia OPG, RANKL i TRAIL w podgrupie II, w czasie 1 i 2, w zależności od obecności przeciwciał ANA

Czas 1	ANA dodatnie	ANA ujemne	Test Manna-Whitneya
OPG [pmol/l]	mediana 2,48 IQR 2,03-2,94	mediana 2,48 IQR 2,21-4,43	$p=0,53$
RANKL [pmol/l]	mediana 0,141 IQR 0,052-0,248	mediana 0,096 IQR 0,020-0,181	$p=0,30$
TRAIL [pg/ml]	mediana 27,46 IQR 19,34-73,48	mediana 39,00 IQR 24,34-58,46	$p=0,53$
Czas 2	ANA dodatnie	ANA ujemne	Test Manna-Whitneya
OPG [pmol/l]	mediana 2,59 IQR 1,97-3,32	mediana 3,76 IQR 2,74-4,94	$p=0,09$
RANKL [pmol/l]	mediana 0,132 IQR 0,069-0,232	mediana 0,080 IQR 0,000-0,261	$p=0,57$
TRAIL [pg/ml]	mediana 48,78 IQR 21,29-87,77	Mediana 112,55 IQR 80,62-473,88	$p=1,00$

W trakcie 1 i 2 badania kontrolnego oceniono korelacje pomiędzy stężeniami badanych cytokin, a parametrami laboratoryjnymi oraz wskaźnikami aktywności choroby oraz stanu funkcjonalnego.

W czasie 1 OPG korelowało z oceną dobrego samopoczucia dokonaną przez pacjenta/opiekuna ($r_s=0,03$). Nie stwierdzono korelacji pomiędzy stężeniem OPG, a pozostałymi badanymi parametrami w czasie 1 (korelacja porządku rang Spearmana, $p>0,05$).

Nie stwierdzono korelacji pomiędzy stężeniem RANKL, a badanymi parametrami w czasie 1 (korelacja porządku rang Spearmana, $p>0,05$).

Stwierdzono korelację pomiędzy stężeniem TRAIL, a wizualną oceną aktywności choroby dokonaną przez lekarza ($r_s=0,009$) oraz CRP ($r_s=0,04$). Nie

stwierdzono korelacji pomiędzy badanymi cytokinami zarówno w czasie 1 i 2 (korelacja porządku rang Spearmana, $p > 0,05$).

W czasie 2 OPG oraz RANKL nie korelowały z żadnymi z ocenianych parametrów (korelacja porządku rang Spearmana, $p > 0,05$). TRAIL w czasie korelowało z CRP ($r_s = 0,01$).

Podgrupę II przeanalizowano także pod względem postaci choroby:

$\frac{35}{17}$ skąpostawowa $n=8$

$\frac{35}{17}$ wielostawowa $n=11$

Wiek zachorowania pacjentów z postacią skąpostawową był niższy (mediana 1,5 roku, IQR 1,21-4,09) niż pacjentów z postacią wielostawową (mediana 5,5 IQR 1,5-11,0).

Przed włączeniem do leczenia MTX w monoterapii otrzymywało czworo pacjentów z postacią skąpostawową w średniej dawce 11,20 mg/m²/tydz oraz 7 pacjentów z postacią wielostawową w średniej dawce 10,38 mg/m²/tydz. Pięcioro pacjentów z postacią skąpostawową otrzymywało MTX w średniej dawce 12,13 mg/m²/tydz w połączeniu z cyklosporyną A w średniej dawce 4,71 mg/kg. W grupie pacjentów z postacią skąpostawową 2 pacjentów otrzymywało MTX w średniej dawce 11,99 mg/m²/tydz w skojarzeniu z cyklosporyną A (w średniej dawce 3,09 mg/kg).

Cyklosporynę A w monoterapii otrzymywało 2 pacjentów z postacią skąpostawową (w dawkach 2,6 mg/kg oraz 2,5 mg/kg). Dodatkowo 7 pacjentów z postacią skąpostawową oraz 8 pacjentów z postacią wielostawową otrzymywało metyloprednizolon w średnich dawkach 0,11 mg/kg oraz 0,14 mg/kg. Po 6 miesiącach (czas 1) średnia dawka MTX w grupie pacjentów z postacią skąpostawową wynosiła 10,77 mg/m²/tydz oraz 12,59 mg/m²/tydz w grupie pacjentów z postacią wielostawową. Metyloprednizolon otrzymywało 3 pacjentów z postacią skąpostawową (w średniej dawce 3,33 mg/kg) oraz 6 pacjentów z postacią wielostawową (w średniej dawce 3,33 mg/kg). Po 12 miesiącach (czas 2) średnia dawka MTX w grupie pacjentów z postacią skąpostawową wynosiła 9,85 mg/m²/tydz oraz 12,80 mg/m²/tydz w grupie pacjentów z postacią wielostawową. Metyloprednizolon otrzymywało 3 pacjentów z postacią skąpostawową (w średniej dawce 1,66 mg/kg) oraz 3 pacjentów z postacią wielostawową (w średniej dawce 2,66 mg/kg). Charakterystykę grupy pacjentów z postacią skąpostawową oraz wielostawową przedstawiono w tabeli 27 oraz tabeli 28.

Porównując wartości OB w czasie 0 wykazano znamienne wyższe statystycznie wartości OB w grupie pacjentów z postacią wielostawową MIZS (test Manna-Whitneya, $p=0,023$). Zarówno 6 miesiącach i 12 miesiącach leczenia etanerceptem wartość OB była wyższa w grupie pacjentów z postacią wielostawową.

Nie wykazano znamiennej różnicy statystycznej w wartości OB pomiędzy grupą pacjentów z postacią skąpostawową i wielostawową w czasie 1 (test Manna-Whitneya, $p=0,508$) oraz czasie 2 (test Manna-Whitneya, $p=0,608$).

W grupie pacjentów z postacią skąpostawową nie stwierdzono istotnej różnicy statystycznej pomiędzy wartością OB w czasie 0 i czasie 1, pomiędzy czasem 0 i czasem 2 oraz pomiędzy czasem 1 i 2 (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,081$).

W grupie pacjentów z postacią wielostawową stwierdzono istotną różnicę statystyczną pomiędzy wartością OB w czasie 0 i czasie 1, pomiędzy czasem 0 i czasem 2 (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p<0,001$). Wartości OB pomiędzy czasem 1 i 2 nie różniły się statystycznie.

Stężenia CRP pomiędzy obiema grupami pacjentów w czasie 0, czasie 1 i czasie 2 nie różniły się (czas 0 - test Manna-Whitneya, $p=0,107$, czas 1 - test Manna-Whitneya, $p=0,967$, czas 2 - test Manna-Whitneya, $p=0,386$).

Wykazano istotną różnicę statystyczną w grupie pacjentów z postacią skąpostawową pomiędzy stężeniem CRP w czasie 0 i czasie 2 (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,023$). Stężenia CRP pomiędzy czasem 0 i 1 oraz czasem 1 i 2 nie różniły się statystycznie.

Tabela 27. Charakterystyka grupy pacjentów z postacią skąpostawową w obrębie podgrupy II w czasie 0, 1 i 2 (parametry laboratoryjne, stężenia cytokin, wskaźniki aktywności choroby, wskaźnik niepełnosprawności)

	Czas 0	Czas 1	Czas 2			
	mediana	IQR	mediana	IQR	mediana	IQR
WBC [G/l]	7,03	7,02-8,27	5,76	4,16-7,00	6,20	4,83-7,92
RBC [T/l]	4,55	4,37-4,76	4,45	4,23-4,69	4,47	4,14-4,61
HGB [g/dl]	12,70	12,40-12,90	12,95	12,5-12,7	12,70	12,20-13,55
PLT [G/l]	360,00	322,00-327,00	325,5	243,0-325,5	282,00	245,0-323,0

OB [mm/h]	17,0	14,50-30,00	12,5	7,0-16,0	11,0	7,0-15,0
CRP [mg/dl]	0,91	0,41-1,97	0,39	0,36-0,42	0,37	0,35-0,46
Ca [mmol/l]	2,53	2,39-2,58	2,57	2,41-2,60	2,52	2,38-2,50
P [mg/dl]	4,64	4,05-4,80	4,58	4,10-4,74	4,71	4,12-4,85
ALP [U/l]	289	212-420	391	330-432	299	206-286
25(OH)D3 [ng/ml]	51,9	39,5-62,4	51,2	38,0-62,0	50,2	36,4-63,5
OPG [pmol/l]	3,19	2,17-3,76	2,61	2,24-3,62	2,63	2,07-3,91
RANKL [pmol/l]	0,161	0,093-0,366	0,147	0,132-0,240	0,143	0,101 -0,217
TRAIL [pg/ml]	43,32	27,32-68,30	38,13	26,09-98,36	62,72	21,90-120,26
Całkowita ocena aktywności przez lekarza [cm]	3,0	3,0-4,5	1,0-0,0-2,0	0,0-2,0	0,5	0,0-1,5
Całkowita ocena dobrego samopoczucia pacjenta [cm]	3,0	3,0-4,0	0,5	0,0-2,0	0,0	0,0-2,0
Ocena stanu funkcjonalnego wg CHAQ	0,375	0,250-0,500	0,125	0,000-0,188	0,063	0,000-0,125
Liczba stawów z aktywnym procesem zapalnym	1,0	1,0-1,0	0,0	0,0-0,0	0,0	0,0-0,0
Liczba stawów z ograniczeniem ruchomości	1,0	1,0-1,0	0,0	0,0-1,0	0,0	0,0-0,0

Tabela 28. Charakterystyka grupy pacjentów z postacią wielostawową w obrębie podgrupy II w czasie 0, 1 i 2 (parametry laboratoryjne, stężenia cytokin, wskaźniki aktywności choroby, wskaźnik niepełnosprawności)

	Czas 0	Czas 1	Czas 2			
	mediana	IQR	mediana	IQR	mediana	IQR
WBC [G/l]	10,43	14,5-30,0	8,16	5,51-9,74	8,00	5,79-8,78
RBC [T/l]	4,55	4,37-4,76	4,52	4,23-4,90	4,64	4,14-4,87
HGB [g/dl]	12,70	12,40-12,90	12,90	12,30-13,70	12,40	11,70-14,20
PLT [G/l]	360,00	322,0-377,5	326,00	296,0-374,0	310,00	267,0-417,0
OB [mm/h]	17,0	14,5-30,0	10,0	6,0-15,0	12,0	6,0-23,0
CRP [mg/dl]	0,91	0,41-1,97	0,39	0,35-0,91	0,41	0,35-0,57
OPG [pmol/l]	2,99	2,36-4,27	2,29	1,95-3,28	3,08	2,46-3,43
Ca [mmol/l]	2,50	2,37-2,56	2,51	2,39-2,56	2,50	2,37-2,55
P [mg/dl]	3,99	3,80-4,21	4,16	3,96-4,35	4,17	4,05-4,40
ALP [U/l]	211,5	176-235	216,0	185-251	248,0	198-310
25(OH)D3 [ng/ml]	50,0	37,0-60,3	59,4	41,2-68,0	60,2	52,6-69,5
RANKL [pmol/l]	0,061	0,490-0,014	0,067	19,46-43,45	0,061	18,85-66,74
TRAIL [pg/ml]	34,06	22,51-51,69	26,17	19,46-43,45	53,48	18,85-66,74
Całkowita ocena aktywności przez lekarza [cm]	3,0	3,0-4,5	2,0	2,0-2,0	1,0	1,0-2,0
Całkowita ocena dobrego samopoczucia pacjenta [cm]	3,0	3,0-4,0	1,0	0,0-2,0	1,0	0,0-2,0
Ocena stanu funkcjonalnego wg CHAQ	0,375	0,250-0,500	0,125	0,000-0,375	0,125	0,000-0,375
Liczba stawów z aktywnym procesem zapalnym	1,0	1,0-1,0	0,0	0,0-0,0	0,0	0,0-1,0

Liczba stawów z ograniczeniem ruchomości	1,0	1,0-1,0	0,0	0,0-4,0	0,0	0,0-2,0
------------------------------------------	-----	---------	-----	---------	-----	---------

Nie wykazano istotnej różnicy w stężeniu WBC (test Manna-Whitneya, $p=0,052$), RBC (test Manna-Whitneya, $p=0,967$), HGB (test Manna-Whitneya, $p=0,091$), PLT (test Manna-Whitneya, $p=0,052$) pomiędzy grupą pacjentów z postacią skąpostawową oraz wielostawową w czasie 0. Stwierdzono istotną różnicę statystyczną w stężeniu WBC w czasie 1 pomiędzy grupą pacjentów z postacią skąpostawową i wielostawową (test Manna-Whitneya, $p=0,019$). W czasie 2 stężenia WBC pomiędzy obiema grupami pacjentów nie różniły się statystycznie (test Manna-Whitneya, $p=0,265$).

Nie stwierdzono istotnej różnicy statystycznej w stężeniu RBC, HGB oraz PLT w czasie 1 pomiędzy grupą pacjentów z postacią skąpostawową i wielostawową (RBC - test Manna-Whitneya, $p=0,680$, HGB-test Manna-Whitneya, $p=0,901$, PLT -test Manna-Whitneya, $p=0,650$) oraz w czasie 2 (RBC - test Manna-Whitneya, $p=0,592$, HGB - test Manna-Whitneya, $p=0,649$, PLT - test Manna-Whitneya, $p=0,283$).

Wykazano istotną różnicę statystyczną w stężeniu WBC w grupie chorych z postacią skąpostawową pomiędzy czasem 0 i 1 (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,023$). Stężenia WBC pomiędzy czasem 0 i 2 oraz 1 i 2 nie różniły się statystycznie.

W grupie pacjentów z postacią wielostawową nie stwierdzono istotnej różnicy statystycznej w stężeniu WBC pomiędzy czasem 0 i 1, czasem 0 i 2 oraz czasem 1 i 2 (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,148$).

W grupie pacjentów z postacią skąpostawową nie stwierdzono istotnej różnicy statystycznej w stężeniu RBC pomiędzy czasem 0 i 1, czasem 0 i 2 oraz czasem 1 i 2 (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,497$).

W grupie pacjentów z postacią wielostawową nie stwierdzono istotnej różnicy statystycznej w stężeniu RBC pomiędzy czasem 0 i 1, czasem 0 i 2 oraz czasem 1 i 2 (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,529$).

Stężenie HGB zarówno w grupie pacjentów z postacią skąpostawową jak i wielostawową nie różniło się istotnie statystycznie pomiędzy czasem 0 i 1, czasem 0 i 2 oraz czasem 1 i 2 (postać skąpo stawowa - test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,670$, postać wielostawowa - test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,404$).

W grupie pacjentów z postacią skąpostawową nie stwierdzono istotnej różnicy statystycznej w stężeniu PLT pomiędzy czasem 0 i 1, czasem 0 i 2 oraz czasem 1 i 2 (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,197$).

Wykazano istotną różnicę statystyczną w stężeniu PLT w grupie chorych z postacią wielostawową pomiędzy czasem 0 i 1 (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,033$). Stężenia PLT pomiędzy czasem 0 i 2 oraz 1 i 2 nie różniły się statystycznie.

Wartość oceny aktywności choroby dokonanej przez lekarza oraz ocena dobrego samopoczucia dokonana przez pacjenta/opiekuna była zbliżona zarówno w czasie 0 jak i w czasie 1 i 2.

Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej w całkowitej ocenie aktywności choroby dokonanej przez lekarza w czasie 0 pomiędzy grupą pacjentów z postacią skąpostawową, a grupą pacjentów z postacią wielostawową (test Manna-Whitneya, $p=0,052$), a także w czasie 1 (test Manna-Whitneya, $p=0,296$) i czasie 2 (test Manna-Whitneya, $p=0,223$).

Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej w całkowitej ocenie samopoczucia dokonanej przez pacjenta/opiekuna w czasie 0 pomiędzy grupą pacjentów z postacią skąpostawową, a grupą pacjentów z postacią wielostawową (test Manna-Whitneya, $p=0,069$) oraz czasie 1 (test Manna-Whitneya, $p=0,761$) i czasie 2 (test Manna-Whitneya, $p=0,436$).

Stopień niepełnosprawności w czasie 0 na podstawie kwestionariusza CHAQ w grupie pacjentów z postacią skąpostawową oceniono jako łagodny, a w grupie pacjentów z postacią wielostawową jako umiarkowany. Po 6 miesiącach leczenia etanerceptem (czas1) wskaźnik niepełnosprawności w grupie pacjentów ze skąpostawową postacią choroby wskazywał na łagodny stopień niepełnosprawności, a po 12 miesiącach leczenia odpowiadał pełnej sprawności. W grupie chorych z

postacią wielostawową wskaźnik niepełnosprawności w czasie 1 i 2 wskazywał na łagodny stopień niepełnosprawności.

W grupie pacjentów z postacią skąpostawową wykazano istotną różnicę statystyczną w wartości CHAQ pomiędzy czasem 0 i 1 (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,003$).

W grupie pacjentów z postacią wielostawową wykazano istotną różnicę statystyczną w wartości CHAQ pomiędzy czasem 0 i 1 oraz czasem 0 i 2 (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p<0,001$).

W grupie chorych z postacią wielostawową liczba stawów z ograniczeniem ruchomości była wyższa niż liczba stawów z aktywnym procesem zapalnym w czasie 0, 1 i 2.

Stwierdzono istotną różnicę statystyczną w grupie chorych z postacią skąpostawową i wielostawową pomiędzy liczbą stawów z aktywnym procesem zapalnym w czasie 0 i 1 oraz czasie 0 i 2 (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p<0,001$).

Stwierdzono istotną różnicę statystyczną w grupie chorych z postacią skąpostawową pomiędzy liczbą stawów z ograniczeniem ruchomości w czasie 0 i 2 (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,002$).

Stwierdzono istotną różnicę statystyczną w grupie chorych z postacią wielostawową pomiędzy liczbą stawów z ograniczeniem ruchomości w czasie 0 i 1 oraz w czasie 0 i 2 (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,004$).

Wartości stężeń OPG, RANKL i TRAIL w czasie 0, 1 i 2 dla grupy pacjentów z postacią skąpostawową i wielostawową przedstawiono w tabeli 29.

Tabela 29. Wartości stężeń OPG, RANKL i TRAIL w czasie 0,1, 2, w grupie chorych z postacią skąpostawową i wielostawową w obrębie podgrupy II

	Postać skąpostawowa	postać wielostawowa	test Manna-Whitneya		
	Mediana	IQR	mediana	IQR	
OPG 0 [pmol/l]	3,19	2,17-3,76	2,99	2,36-4,27	$p=0,836$

OPG 1 [pmol/l]	2,61	2,24-3,62	2,29	1,95-3,28	p=0,432
OPG 2 [pmol/l]	2,63	2,07-3,91	3,08	2,46-3,43	p=0,531
RANKL 0 [pmol/l]	0,161	0,093-0,366	0,061	0,490-0,014	p=0,264
RANKL 1 [pmol/l]	0,147	0,132-0,240	0,067	0,027-0,236	p=0,107
RANKL 2 [pmol/l]	0,143	0,101-0,217	0,061	0,000-0,264	p=0,530
TRAIL 0 [pg/ml]	43,32	27,32-68,30	34,06	22,51-51,69	p=0,535
TRAIL 1 [pg/ml]	38,13	26,09-98,36	26,17	19,46-43,45	p=0,136
TRAIL 2 [pg/ml]	62,72	21,90-120,26	53,48	18,85-66,74	p=0,312

Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej w stężeniu OPG, RANKL i TRAIL w czasie 0 pomiędzy grupą pacjentów z postacią skąpostawową, a grupą kontrolną (OPG - test Kruskala-Wallis, p=1,0, RANKL - test Kruskala-Wallis, p=1,0, TRAIL - test Kruskala-Wallis, p=0,402).

Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej w stężeniu OPG, RANKL i TRAIL w czasie 0 pomiędzy grupą pacjentów z postacią wielostawową, a grupą kontrolną (OPG - test Kruskala-Wallis, p=0,808, RANKL - test Kruskala-Wallis, p=0,808, TRAIL - test Kruskala-Wallis, p=0,302).

Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej w stężeniu OPG, RANKL i TRAIL w czasie 1 pomiędzy grupą pacjentów z postacią skąpostawową, a grupą kontrolną (OPG - test Kruskala-Wallis, p=0,402, RANKL - test Kruskala-Wallis, p=1,0, TRAIL - test Kruskala-Wallis, p=0,402).

Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej w stężeniu OPG i RANKL w czasie 1 pomiędzy grupą pacjentów z postacią wielostawową, a grupą kontrolną (OPG - test Kruskala-Wallis, p=0,081, RANKL - test Kruskala-Wallis, p=0,465). Wykazano istotną różnicę statystyczną w stężeniu TRAIL w czasie 1 pomiędzy grupą pacjentów z postacią wielostawową, a grupą kontrolną (test Kruskala-Wallis, p=0,005) **[Rycina 29]**.

Rycina 29. Porównanie stężenia TRAIL w czasie 1 pomiędzy postacią wielostawową podgrupy II i grupą kontrolną.

Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej w stężeniu OPG, RANKL i TRAIL w czasie 2 pomiędzy grupą pacjentów z postacią skąpostawową, a grupą kontrolną (OPG - test Kruskala-Wallisa, $p=0,09$, RANKL - test Kruskala-Wallisa, $p=1,0$, TRAIL - test Kruskala-Wallisa, $p=1,0$).

Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej w stężeniu OPG, RANKL i TRAIL w czasie 2 pomiędzy grupą pacjentów z postacią wielostawową, a grupą kontrolną (OPG - test Kruskala-Wallisa, $p=0,78$, RANKL - test Kruskala-Wallisa, $p=0,78$, TRAIL - test Kruskala-Wallisa, $p=0,78$).

W grupie pacjentów z postacią skąpostawową nie stwierdzono istotnej różnicy statystycznej w stężeniu OPG pomiędzy czasem 0 i 1, czasem 0 i 2 oraz czasem 1 i 2 (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,089$).

W grupie pacjentów z postacią wielostawową nie stwierdzono istotnej różnicy statystycznej w stężeniu OPG pomiędzy czasem 0 i 1, czasem 0 i 2 oraz czasem 1 i 2 (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,263$).

W grupie pacjentów z postacią skąpostawową nie stwierdzono istotnej różnicy statystycznej w stężeniu RANKL pomiędzy czasem 0 i 1, czasem 0 i 2 oraz czasem 1 i 2 (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,125$).

W grupie pacjentów z postacią wielostawową nie stwierdzono istotnej różnicy statystycznej w stężeniu RANKL pomiędzy czasem 0 i 1, czasem 0 i 2 oraz czasem 1 i 2 (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,09$).

W grupie pacjentów z postacią skąpostawową nie stwierdzono istotnej różnicy statystycznej w stężeniu TRAIL pomiędzy czasem 0 i 1, czasem 0 i 2 oraz czasem 1 i 2 (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,05$).

W grupie pacjentów z postacią wielostawową nie stwierdzono istotnej różnicy statystycznej w stężeniu TRAIL pomiędzy czasem 0 i 1, czasem 0 i 2 oraz czasem 1 i 2 (test ANOVA Friedmana z opcją wielokrotnych powtórzeń typu post-hoc wg Dunna, $p=0,10$).

4. Ocena stężenia OPG, RANKL i TRAIL w płynie stawowym pacjentów z podgrupy I i podgrupy II.

W trakcie prowadzonych badań przeprowadzono analizę stężenia OPG, RANKL i TRAIL w płynie stawowym. Płyn stawowy uzyskano od 11 pacjentów (7 z podgrupy I, 4 pacjentów podgrupy II). Od 1 pacjenta z podgrupy I oraz 2 pacjentów z podgrupy II płyn pobrano 2 krotnie w trakcie kolejnych wizyt kontrolnych. W grupie pacjentów, od których pobrano płyn postać skąpostawowa występowała u 7 pacjentów, postać wielostawowa u 4 pacjentów. Charakterystykę pacjentów, od których uzyskano płyn stawowy przedstawiono w **Tabeli 30**.

Wśród pacjentów, od których pobrano płyn stawowy zaobserwowano wyższe stężenia OPG i TRAIL w surowicy krwi niż w płynie stawowym oraz wyższe stężenie RANKL w płynie stawowym niż w surowicy **[Tabela 31]**.

Tabela 30. Charakterystyka pacjentów, od których pobrano płyn stawowy

Nr pacjenta	OB	CRP	OPG [pmol/l] surowica	OPG [pmol/l] płyn stawowy	RANKL [pmol/l] surowica	RANKL [pmol/l] płyn stawowy	TRAIL [pg/ml] surowica	TRAIL [pg/ml] płyn stawowy
podgrupa 1								
2	51	3,58	4,77	3,51	0,604	2,100	74,06	37,94
2	20	0,78	2,05	0,05	0,121	0,541	9,34	0,00
8	33	0,65	7,13	18,71	1,527	2,100	1049,00	1049,22
15	82	3,15	2,16	8,43	2,600	0,305	26,17	29,23
16	45	0,56	2,54	0,48	0,333	0,310	43,28	0,00
17	45	0,56	4,66	2,99	0,525	2,100	77,42	0,00
19	15	0,42	6,61	6,65	0,001	2,100	67,89	62,30
23	15	0,79	5,76	3,01	0,072	0,505	40,56	15,09
podgrupa II								
31	37	0,64	3,60	2,48	0,544	0,21	64,87	45,07

32	5	0,40	4,30	1,56	0,140	0,144	121,66	0,00
32	5	0,38	5,35	1,23	0,261	0,121	137,33	0,00
41	38	2,10	1,92	1,85	0,068	0,043	26,17	0,00
43	40	3,40	3,93	1,49	1,306	0,861	32,75	27,99
43	10	1,05	2,15	1,30	0,232	0,274	27,84	0,00

Tabela 31. Stężenia OPG, RANKL, TRAIL w surowicy i płynie stawowym pacjentów, od których pobrano płyn stawowy

	Mediana	IQR
OPG [pmol/l] surowica	4,11	2,16-5,35
OPG [pmol/l] płyn stawowy	2,16	1,30-3,51
RANKL [pmol/l] surowica	0,297	0,121-0,604
RANKL [pmol/l] płyn stawowy	0,407	0,210-2,100
TRAIL [pg/ml] surowica	54,07	27,84-77,43
TRAIL [pg/ml] płyn stawowy	7,54	0,00-37,94

Nie wykazano istotnej różnicy statystycznej w stężeniu OPG oraz RANKL pomiędzy surowicą, a płynem stawowym (OPG - test Wilcozona, $p=0,12$, RANKL - test Wilcozona, $p=0,39$). Wykazano istotną różnicę statystyczną w stężeniu TRAIL pomiędzy surowicą, a płynem stawowym [**Rycina 30**].

Rycina 30. Porównanie stężeń badanych cytokin pomiędzy stężeniami w surowicy i płynie stawowym.

W obrębie badanej grupy oceniono, czy istnieje korelacja pomiędzy stężeniami cytokin w płynie stawowym, a stężeniami cytokin w surowicy oraz z wartościami OB i stężeniem CRP. OPG w płynie stawowym korelowało ze stężeniem OPG w surowicy (test Spearmana $p=0,04$ $r_s =0,53$) oraz stężeniem TRAIL w płynie stawowym (test Spearmana $p=0,001$ $r_s =0,77$).

Nie wykazano korelacji RANKL w płynie stawowym z żadnym z badanych parametrów (test Spearmana $p>0,05$).

Stężenie TRAIL w płynie stawowym korelowało ze stężeniem OPG w surowicy (test Spearmana $p=0,047$ $r_s =0,53$) oraz ze stężeniem OPG w płynie stawowym (test Spearmana $p=0,001$ $r_s =0,77$).

VI. DYSKUSJA

Młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów jest to najczęstsza w wieku rozwojowym artropatia, która charakteryzuje się przewlekłym przebiegiem i autoimmunologicznym podłożem. Wymaga długotrwałego leczenia, które u części chorych jest nieefektywne, co prowadzi do wielu powikłań, m.in. uszkodzenia stawów, niedokrwistości, zahamowania wzrastania. Wyodrębnionych jest 7 podtypów MIZS a klasyfikacja oparta jest na liczbie zajętych stawów, współwystępowaniu zajęcia narządów wewnętrznych i obecności czynnika reumatoidalnego. W poszczególnych podtypach występuje różna częstość zachorowań wśród chłopców i dziewczynek. Obserwowany jest także różny poziom biochemicznych wykładników zapalenia oraz ryzyko rozwinięcia zapalenia błony naczyniowej oka [2,4,25].

W związku z autoimmunologicznym przebiegiem choroby w leczeniu stosowane są leki modyfikujące przebieg choroby (LMPCh), m.in. MTX, CsA. Badania nad rolą prozapalnych cytokin w przebiegu MIZS oraz udokumentowanie przewagi poszczególnych cytokin w podtypach MIZS były podstawą do wprowadzenia leków biologicznych w leczeniu MIZS [87,88,89]. W Polsce stosowane są dwa leki biologiczne blokujące TNF α : etanercept oraz adalimumab. Leczeni są pacjenci z postacią wielostawową oraz systemową w ramach programu terapeutycznego finansowanego przez NFZ. Leczenie biologiczne stosowane jest u tych pacjentów, u których leczenie LMPCh było nieskuteczne, a także gdy nastąpił nawrót choroby [107].

Przedmiotem badań niniejszej pracy byli pacjenci z młodzieńczym idiopatycznym zapaleniem stawów, spośród których wyselekcjonowano 2 podgrupy: I (n=24) pacjenci nowo zdiagnozowani, dotychczas nie leczeni, którym włączono leczenie LMPCh oraz podgrupa II (n=19), którą stanowili pacjenci zakwalifikowani do leczenia etanerceptem z powodu braku uzyskania poprawy pod wpływem LMPCh.

Zarówno obraz kliniczny, jak i wyniki badań laboratoryjnych oraz wskaźników aktywności choroby wśród pacjentów badanej grupy nie różniły się od podanych w piśmiennictwie [2,4,5]. Stan zapalny najczęściej obejmował stawy kolanowe, skokowe i nadgarstkowe w obu badanych podgrupach. Podobny obraz zajęcia stawów opisano we wcześniejszych badaniach [109].

Wśród pacjentów stanowiących badaną grupę przewagę stanowiły dziewczynki (2,6:1). Wyższa proporcja płci żeńskiej nad męską wynika z tego, że do

badania włączono pacjentów z postacią wielostawową i skąpostawą, gdzie jest wyraźna przewaga zachorowań wśród dziewcząt. W tych postaciach choroby przewaga płci żeńskiej wg Macaubasa i wsp. [11] oraz Ramana i wsp. [38], jest dwu- do trzykrotnie większa niż płci męskiej. Nieco niższą przewagę dziewcząt nad chłopcami podają prace analizujące dane epidemiologiczne zachorowalności wszystkich podtypów MIZS (2:1), w których proporcje zachorowalności wśród dziewcząt i chłopców są różne [15,16].

Analizując wiek zachorowania, współwystępowanie zapalenia błony naczyniowej oka wśród pacjentów przedstawianej pracy zaobserwowano, że choroba dotyczy głównie dziewczynek. W podgrupie I 43% dziewczynek oraz 37% chłopców zachorowało przed ukończeniem 6 r.ż. Z kolei w podgrupie II 93% dziewczynek zachorowało przed ukończeniem 6 r.ż. natomiast wśród chłopców wczesny początek choroby odnotowano u 25%. Dodatkowo miano ANA przeważało w grupie dzieci z wczesnym początkiem choroby (66%), wśród których dominowały dziewczynki. Zapalenie błony naczyniowej oka w ogółem wystąpiło u 4 dzieci, spośród których u 3 MIZS rozwinęło się przed 6 r.ż.

Wczesny wiek zachorowania głównie w podgrupie II pozwala wysunąć hipotezę, że może on być czynnikiem wpływającym na przebieg choroby. Wcześniejsze prace wskazują, że występują uwarunkowania genetyczne do rozwinięcia choroby we wczesnym wieku [27,28], ponadto pacjenci ci częściej mają dodatkowo miano ANA [109] oraz charakteryzują się zwiększoną ekspresją genów kodujących immunoglobuliny, markery powierzchniowe i czynniki transkrypcyjne limfocytów B [108].

Obecność dodatniego miana ANA wiąże się ze zwiększonym ryzykiem rozwoju zapalenia błony naczyniowej oka [110], bardziej agresywnym przebiegiem choroby [93] oraz progresją choroby w postaci wielostawową u chorych, którzy początkowo prezentowali postać skąpo stawową [109]. Ravelli i wsp. analizując grupę 971 pacjentów z MIZS, z czego 711 miało dodatkowo miano ANA i prezentowało różny podtyp choroby, wysunął hipotezę, że pacjenci ANA-dodatni stanowią odrębną grupę niezależną od klasyfikacji ILAR. Grupa ta charakteryzuje się młodszym wiekiem zachorowania, przewagą płci żeńskiej, zwiększonym ryzykiem rozwoju zapalenia błony naczyniowej oka, małą liczbą zajętych stawów [112]. Podobny obraz prezentowali pacjenci z badań własnych jedynie w podgrupie II.

Według definicji MIZS przyjętej przez ILAR czas trwania objawów zapalenia stawów powinien wynosić 6 tygodni. Jest to okres, w którym u dziecka z objawami zapalenia stawów pod nadzorem specjalisty reumatologa powinna zostać przeprowadzona diagnostyka różnicowa oraz wdrożone leczenie. W analizowanej grupie pacjentów średni czas jaki upłynął od wystąpienia objawów do rozpoznania i wdrożenia leczenia wyniósł 4,6 miesiąca w podgrupie I i 5,53 miesiąca w podgrupie II. W grupie 507 chorych, których przebieg choroby przeanalizowali Adib i wsp. [113], średni czas jaki upłynął od wystąpienia objawów do postawienia diagnozy wynosił 4,6 miesiąca. Diagnoza najszybciej została postawiona w grupie pacjentów z systemową postacią choroby (1,6 miesiąca), najdłuższy czas do postawienia rozpoznania upłynął w grupie chorych na łuszczycowe zapalenie stawów (8,6 miesiąca). Według autorów pracy na czas jaki upłynął do postawienia rozpoznania wpływ miały takie parametry jak występowanie objawów ogólnych, ilość zajętych stawów, nasilenie objawów zapalenia stawów, a także wiedza lekarzy o chorobach reumatycznych wieku dziecięcego. Podobne wyniki uzyskali Tzaribachev [114] oraz Foster [115]. Według Fantini i wsp. [124] opóźnienie w rozpoznaniu i zbyt późne rozpoczęcie leczenia w specjalistycznym ośrodku znacząco obniża szansę uzyskania remisji, a co za tym idzie prowadzi do wystąpienia powikłań.

W obu badanych podgrupach obserwowano nieznacznie podwyższone średnie wartości wskaźników zapalenia, prawidłową średnią liczbę krwinek białych i płytek krwi oraz prawidłową wartość hemoglobiny. Obserwowane wartości wynikają z przewagi postaci skąpostawowej w podgrupie I oraz podgrupie II i nie różnią się od opisywanych w literaturze [2,6,8,11]. Analizując podgrupę II po podziale w zależności od podtypu choroby wyższe wartości liczby krwinek białych oraz płytek krwi oraz obniżenie wartości hemoglobiny uzyskano w przypadku postaci wielostawowej, podobnie jak w danych z piśmiennictwa [2,6,8,11]. Ze względu na małą liczebność grup różnice nie były istotne statystycznie. Stopień niepełnosprawności w obu badanych podgrupach według kwestionariusza CHAQ na podstawie interpretacji Dempstera [125] określono jako łagodny. Analizując grupę chorych w zależności od podtypu choroby w przypadku postaci wielostawowej stopień niepełnosprawności był wyższy niż w postaci skąpostawowej i określany wg Dempstera jako łagodny do umiarkowanego. Wyższy wskaźnik niepełnosprawności dla postaci wielostawowej opisywany jest także we wcześniejszych doniesieniach [116,117]. Pomimo, że stopień niepełnosprawności był podobny w obu badanych podgrupach, czynniki

determinujące go mogły być inne. Palmisani i wsp zwrócili uwagę, że w zależności od czasu trwania choroby na stopień niepełnosprawności wpływ mają inne czynniki. W okresie początkowym główną przyczyną ograniczenia niepełnosprawności są ból, obrzęki stawów, natomiast w miarę upływu czasu trwania choroby główną przyczyną niepełnosprawności są nieodwracalne zmiany jakie zachodzą w obrębie narządu ruchu [118]. Oceniając wskaźnik niepełnosprawności po 12 miesiącach leczenia w obu podgrupach uległ on poprawie o 0,13, co wg Dempstera oznacza znaczącą poprawę. W wcześniejszych badaniach także uzyskano poprawę stanu funkcjonalnego pod wpływem leczenia zarówno LMPCh jak i lekami biologicznymi [119,120]. Poprawę kliniczną wg kryteriów Gianniniego wśród pacjentów analizowanej pracy osiągnęło 90% podgrupy I, 55% pacjentów tej podgrupy osiągnęło całkowitą poprawę. W podgrupie II poprawę osiągnęła mniejsza liczba pacjentów (84%), całkowita poprawa wystąpiła u 47% pacjentów. Porównywalny odsetek dzieci z całkowitą poprawą po 12 miesiącach leczenia przedstawił Papsdorf i wsp. [120] z kolei w pracy prezentowanej przez Lovell i wsp całkowitą poprawę osiągnęło mniej niż 40% [123].

Proces zapalny poprzez prozapalne cytokiny oraz aktywne limfocyty T zaburza równowagę pomiędzy OPG a RANKL/RANK, białkami wpływającymi na homeostazę kostną. Jednym z głównych powikłań MIZS są zmiany strukturalne stawu upośledzające jego funkcję oraz osteoporoza. Utrata masy kostnej dotyczy wszystkich pacjentów chorujących na MIZS, ale stopień zaburzeń jest różny [124]. Największe ryzyko utraty masy kostnej występuje u dzieci z postacią wielostawową i systemową, a także u dzieci z wysoką aktywnością choroby [127]. Według Zak i wsp. [128] chorzy z MIZS osiągają niższą szczytową masę kostną w porównaniu ze zdrową populacją. Autorzy zbadali grupę 65 dorosłych chorujących okresie młodzieńczym na MIZS. Obniżoną masę kostną w odcinku lędźwiowym oraz w kości udowej stwierdzono u 40-52% badanych [128]. Oprócz zapalenia do zaburzeń kostnych przyczyniają się: unieruchomienie, niedożywienie, utrata masy mięśniowej, zaburzenia wzrastania (w tym potencjalne ryzyko niedoboru hormonu wzrostu), zaburzenia hormonalne, farmakoterapia, w tym glikokortykosteroidy [127,129].

Utrata masy kostnej wynika z przewagi resorpcji kostnej nad procesem tworzenia tkanki kostnej. Według Górskiej i wsp. [130] największą aktywność markerów resorpcji kostnej oraz zmniejszoną aktywność markerów kościotworzenia

występuje u dzieci z wielostawową postacią choroby, długim okresem trwania choroby oraz u pacjentów z nadżerkami kostnymi.

Proces zapalny poprzez prozapalne cytokiny wpływa pośrednio na homeostazę kostną: TNF α nasila resorpcję kostną, hamuje osteoblastogenezę, IL-1 przyspiesza dojrzewanie osteoklastów, IL-17 zwiększa ekspresję RANKL na osteoblastach, fibroblastach błony maziowej, limfocytach T, hamuje także ekspresję osteoprotegeryny [35,131,132]. Układ RANKL/RANK/OPG bezpośrednio reguluje dojrzewanie, aktywację osteoklastów, wpływa na czas ich przeżycia, reguluje także aktywność limfocytów T i B, komórek dendrytycznych [54,55,56,67,71]. Dotychczas ukazało się niewiele prac oceniających stężenie OPG i RANKL wśród chorych z młodzieńczym idiopatycznym zapaleniem stawów. Dane literaturowe dotyczą głównie chorych z reumatoidalnym zapaleniem stawów. Zwiększone stężenie RANKL oraz OPG w surowicy oraz płynie stawowym chorych na RZS stwierdzili w swych badaniach Ziółkowska i wsp. [133] oraz Vanderborought i wsp. [134]. Zwiększoną ekspresję RANKL w tkance sąsiadującej z obszarem, który uległ erozji kostnej stwierdzili w swej pracy Haynes i wsp. [135].

W związku z rolą jaką odgrywa układ OPG/RANKL w procesie resorpcji kostnej oraz ze względu na zaburzenia równowagi pomiędzy tymi cytokinami pod wpływem procesu zapalnego zaczęto poszukiwać, czy stężenie tych cytokin u chorych na RZS może mieć wartość predykcyjną co do stopnia resorpcji kostnej i przebiegu choroby. W pracy Geuneses i wsp. oceniającej stężenie OPG i RANKL w surowicy chorych na RZS przed włączeniem leczenia modyfikującego stwierdzono, że chorzy z wysokim stężeniem RANKL i niskim stężeniem OPG są bardziej narażeni na nasilone zmiany kostne w okresie 5 kolejnych lat [136]. Podobne wyniki uzyskali Tuyl i wsp., którzy oceniali wartość predykcyjną stężenia RANKL i OPG na stopień degradacji tkanki kostnej w okresie kolejnych 11 lat w grupie chorych na RZS we wczesnym okresie choroby [137]. Lien i wsp. badając grupę 90 pacjentów ze świeżo rozpoznany MIZS oraz po 2 latach, wykazali mniejszy przyrost mineralizacji kostnej w grupie chorych w porównaniu z grupą kontrolną [138]. Jak wykazał Geuneses i wsp [136] zwiększone stężenie RANKL i obniżone OPG w surowicy chorych nie korelowało z wysokim OB, jednym z parametrów, na podstawie którego oceniane jest nasilenie procesu zapalnego. Ponadto Kirwan i wsp. zauważył, że u części chorych, u których aktywność zapalna była na niskim poziomie dochodziło pomimo tego do destrukcji kostnej [140]. Podobne wyniki uzyskali Molenaar i wsp. [141,142], którzy

zaobserwowali progresję zmian kostnych oraz podwyższenie markerów obrotu kostnego u chorych z RZS spełniających kryteria remisji choroby. Z kolei Brown i wsp. [143] wykazali, że ocena aktywności choroby w oparciu o ocenę kliniczną oraz wykładniki biochemiczne zapalenia jest niewystarczająca. Wykonane badania obrazowe (rezonans magnetyczny oraz usg Doppler) w grupie pacjentów z RZS spełniających kryteria choroby nieaktywnej wykazały obecność zmian zapalnych w błonie maziowej, co prowadziło do progresji uszkodzenia struktur stawowych [143].

W mojej pracy stężenie OPG w chwili włączenia do badania zarówno w podgrupie chorych ze świeżym rozpoznaniem (podgrupa I) jak i w podgrupie chorych zakwalifikowanych do leczenia biologicznego (podgrupa II) było porównywalne z grupą kontrolną. Porównywalne stężenia OPG pomiędzy chorymi z MIZS a grupą kontrolną uzyskali także Spelling i wsp. badając grupę 30 dziewcząt w okresie pokwitania z wielostawową postacią MIZS [144] oraz Sarma i wsp. [145] w grupie 70 chorych z MIZS. W badaniach tych uzyskano także istotnie podwyższone stężenia RANKL w grupie chorych w porównaniu z grupą kontrolną. Wyższe stężenia RANKL obserwowano także w analizowanej pracy, w obu podgrupach, ale nie uzyskano istotnej różnicy statystycznej, co może wynikać z mniejszej liczebności podgrup w porównaniu z cytowanymi. W pracy Lien i wsp. [138], podobnie jak w pracach Sarma i Spelling, uzyskali podwyższone stężenia RANKL w grupie 90 chorych z MIZS, natomiast w przeciwieństwie do poprzednich cytowań stężenie OPG było niższe w grupie chorych w porównaniu z grupą kontrolną. We wszystkich 3 cytowanych badaniach stężenia OPG i RANKL analizowano u chorych z aktywną postacią MIZS, podobnie jak w przedstawianej pracy. Odmienne wyniki uzyskali Masi i wsp. [146], którzy ocenili stężenie OPG i RANKL w grupie 86 pacjentów z postacią skąpostawową i wielostawową MIZS. W przeciwieństwie do wcześniejszych cytowań oraz wyników analizowanej pracy uzyskali oni wyższe stężenia OPG i niższe RANKL w porównaniu z grupą kontrolną.

Analizując stężenia OPG i RANKL po 6 i 12 miesiącach leczenia w obu podgrupach stężenia RANKL i OPG uległy obniżeniu. Pomimo braku uzyskania istotnej statystycznie różnicy w stężeniu OPG pomiędzy kolejnymi badaniami oraz w porównaniu z grupą kontrolną, zaobserwowano, że stężenie OPG w trakcie leczenia zarówno LMPCH jak i etanerceptem obniżyło się i po 12 miesiącach leczenia osiągnęło wartości niższe niż w grupie kontrolnej. Stężenia RANKL w obu podgrupach również uległy obniżeniu po 6 i 12 miesiącach obserwacji. W podgrupie I

uzyskano istotne obniżenie stężenia RANKL pomiędzy badaniem początkowym, a pierwszym badaniem kontrolnym wykonanym po 6 miesiącach, natomiast w drugim badaniu kontrolnym zaobserwowano wzrost stężenia RANKL, przy czym nie osiągnął on wartości porównywalnych z grupą kontrolną. Może być on spowodowany istotnym obniżeniem stosowanej dawki MTX w stosunku do dawki stosowanej na początku terapii. Wpływ LMPCh na stężenie OPG i RANKL wykazali Haynes i wsp. [147] oraz Lee i wsp. [148]. Haynes wykazał wzrost stężenia OPG oraz obniżenie stężenia RANKL w płynie stawowym chorych z RZS leczonych LMPCh. Podobnie jak w przedstawianej pracy obniżenie RANKL pod wpływem terapii anty-TNF α uzyskali też Ziółkowska i wsp [131] oraz Lee i wsp. [146]. Z kolei Catrina i wsp. zaobserwowali wzrost ekspresji OPG, przy braku zmian w ekspresji RANKL w błonie maziowej chorych z RZS leczonych etanerceptem oraz infliximabem [148]. Uzyskane wyniki pozwalają wysunąć hipotezę, że LMPCh oraz etanercept redukują nie tylko proces zapalny, ale wpływają także na zahamowanie destrukcji kostnej.

Oceniając stężenia RANKL i OPG w zależności od czasu jaki upłynął od rozpoznania do włączenia leczenia wyższe stężenia RANKL prezentowali pacjenci, u których proces diagnostyki trwał dłużej. Zwiększone stężenie RANKL u tych pacjentów wynika m.in. z dłuższego działania prozapalnych cytokin stymulujących ekspresję RANKL na komórkach biorących udział w procesie zapalnym. Podwyższone stężenie RANKL u tych pacjentów sprawia, że mają oni większe ryzyko nasilonych zmian kostnych w przebiegu choroby i mogą wymagać bardziej agresywnego leczenia.

Analizując uzyskane wyniki w zależności od aktywności choroby zaobserwowano tendencję do wyższego stężenia RANKL na początku terapii etanerceptem wśród pacjentów, którzy prezentowali aktywną fazę choroby po 12 miesiącach leczenia. Podobne wyniki uzyskali Gonzales-Alvaro i wsp., którzy ocenili stężenie OPG i RANKL w grupie chorych z RZS na początku i w trakcie terapii infliximabem [139]. Według Gonzales-Alvaro wysokie stężenie RANKL u chorych, którzy nie uzyskali poprawy pod wpływem leczenia anty-TNF α , jest wynikiem działania nie tylko TNF α , ale również innych cytokin, a więc zablokowanie TNF α prowadzi jedynie do częściowego obniżenia RANKL. Otrzymane wyniki pozwalają wysunąć hipotezę, że RANKL może być pomocny w ocenie ryzyka niepowodzenia leczeniem etanerceptem w ciągu 12 miesięcy terapii, ale wymaga to dalszych badań. W przypadku OPG wykazano istotne obniżenie stężenia w trakcie trwania badań w

podgrupie I u pacjentów z aktywną postacią choroby. Monitorowanie stężenia OPG w czasie terapii może być pomocne w ocenie aktywności choroby oraz w podejmowaniu decyzji co do dalszego leczenia.

TRAIL jest cytokiną należącą do rodziny TNF indukującą apoptozę poprzez połączenie z receptorami TRAIL zawierającymi wewnątrzkomórkową domenę śmierci. Możliwość apoptozy indukowanej przez TRAIL posiadają przede wszystkim komórki nowotworowe. Ekspresja na ich powierzchni zarówno receptorów zawierających wewnątrzkomórkową domenę aktywującą kaskadę kaspaz jak również receptorów nieaktywnych oraz wytwarzanie OPG - receptora wiążącego TRAIL, co prowadzi do jego inaktywacji, sprawia że komórki nowotworowe stają się odporne na apoptozę. Badania ostatnich lat wykazały, że apoptozie TRAIL-zależnej mogą podlegać także fibroblasty błony maziowej chorych na reumatoidalne zapalenie stawów. Cytokina ta wywiera także wpływ na proces różnicowania osteoklastów oraz może regulować odpowiedź układu immunologicznego poprzez wpływ na aktywność komórek dendrytycznych oraz aktywację limfocytów T. Wobec możliwego wpływu TRAIL na przebieg zapalenia zaczęto prowadzić badania nad możliwością wykorzystania TRAIL w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów, a także jako czynnika prognostycznego w przebiegu choroby i odpowiedzi na leczenie. Większość dostępnych prac oparta była na badaniu modeli zwierzęcych zapalenia stawów. Brak jest danych literaturowych opisujących TRAIL w młodzieńczym idiopatycznym zapaleniu stawów. Song i wsp. [97] ocenili wpływ TRAIL na przebieg procesu zapalnego w stawach na modelu zwierzęcym. Grupie myszy, u których wyindukowano zapalenie stawów podano rekombinowany receptor TRAIL-R1 (DR5) pozbawiony wewnątrzkomórkowej domeny śmierci, a następnie oceniono stopień zapalenia stawów. Stwierdzono bardziej nasilone zmiany zapalne i znaczne uszkodzenie stawów w grupie, którym podano rekombinowany receptor DR5, niż tym u których receptora nie podano. Oceniając stopień apoptozy limfocytów T i komórek dendrytycznych w obu grupach myszy zaobserwowano, że działanie TRAIL na komórki układu immunologicznego odbywa się nie poprzez indukcję apoptozy, ale poprzez zahamowanie cyklu komórkowego limfocytów T, co hamuje ich proliferację [94]. Podobne wyniki uzyskał Lamhamedi-Cherradi i wsp [98]. Z kolei Yao i wsp. ocenili wpływ rekombinowanego TRAIL podanego bezpośrednio do zapalnie zmienionego stawu królika. Uzyskali zwiększenie apoptozy fibroblastów błony

maziowej oraz zmniejszenie nacieku leukocyтарnego w zapalnie zmienionym stawie [99].

Wrażliwość fibroblastów błony maziowej na TRAIL-zależną apoptozę u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów jest różna. Audo i wsp. wykazali, że u chorych ze znaczną aktywnością choroby fibroblasty są bardziej odporne na apoptozę [100]. Oceniając ekspresję receptorów TRAIL na fibroblastach stwierdzono zwiększoną ekspresję TRAIL-R2 oraz TRAIL-R4 w grupie chorych, u których apoptoza fibroblastów była mniejsza. Sugeruje to, że pod wpływem prozapalnych cytokin następuje wzrost ekspresji TRAIL-R2 oraz TRAIL-R4 na fibroblastach, przez co stają się one mniej wrażliwe na TRAIL-zależną apoptozę. Z kolei zwiększona ekspresja TRAIL-R1 prowadzi do zwiększonej wrażliwości na apoptozę [100]. Podobne wnioski wysunęli Torzioglu i wsp. [101]. Audo i wsp. porównali także stężenie TRAIL w surowicy u chorych ze świeżo zdiagnozowanym reumatoidalnym zapaleniem stawów w odstępie 6 miesięcy. Stwierdzono wyższe stężenie TRAIL na początku choroby u chorych, którzy po 6 miesiącach leczenia uzyskali poprawę kliniczną. Z kolei u pacjentów, u których podwyższone stężenie TRAIL stwierdzono po 6 miesiącach leczenia doszło do znacznego uszkodzenia stawów. Pacjenci ci wyjściowo prezentowali niższe stężenie TRAIL w porównaniu z grupą chorych, u których nastąpiła poprawa kliniczna po 6 miesiącach leczenia. Pod wpływem prozapalnych cytokin, głównie IL-1 oraz TNF α , następuje wzrost ekspresji TRAIL [98,100]. W miarę trwania procesu zapalnego TRAIL będący początkowo czynnikiem chroniącym przed progresją choroby i zniszczeniem struktur stawowych pod wpływem prozapalnych cytokin przekształca się w czynnik promujący proliferację osteoklastów i uszkodzenie stawów.

W materiale własnym, w grupie dzieci ze świeżo rozpoznany młodzięcym idiopatycznym zapaleniem stawów (podgrupa I) stężenie TRAIL na początku choroby było porównywalne z grupą kontrolną. Po 6 miesiącach obserwacji stężenie TRAIL znacząco obniżyło się. W tym czasie obserwowano także obniżenie biochemicznych wskaźników zapalenia (OB, CRP) oraz poprawę w zakresie stanu funkcjonalnego pacjentów. Podobnie jak w przypadku stężenia RANKL zaobserwowano ponowny wzrost TRAIL po 12 miesiącach leczenia. Może to wynikać z obniżenia dawki MTX w przeliczeniu na m² w stosunku do dawki wyjściowej, a także wpływu prozapalnych cytokin na ekspresję TRAIL w fibroblastach błony maziowej w grupie chorych, którzy prezentowali słabszą poprawę kliniczną w czasie 1 badania klinicznego. Należy

zwrócić uwagę, że biochemiczne wskaźniki zapalenia oraz stanu funkcjonalnego nie uległy pogorszeniu w 12 miesiącu obserwacji. Zmiana w stężeniu TRAIL w trakcie terapii może być pomocna w ocenie przebiegu choroby, zwłaszcza, gdy pozostałe wskaźniki aktywności choroby nie odbiegają od normy.

Oceniając wyjściowe stężenie TRAIL w zależności od czasu, od wystąpienia objawów choroby do czasu rozpoznania w grupie chorych, u których czas trwania objawów był dłuższy stwierdzono wyższe stężenie TRAIL niż w grupie chorych z krótszym wywiadem chorobowym, ale różnica ta nie była znamienna statystycznie. Wyższe stężenie TRAIL w grupie chorych z dłużej trwającym reumatoidalnym zapaleniem stawów stwierdzili Audo i WSP. [100].

Oceniając stężenie TRAIL w zależności od osiągniętej remisji klinicznej w podgrupie I nie wykazano różnicy w stężeniu w czasie 0 pomiędzy grupą chorych z aktywną i nieaktywną postacią choroby. Po 12 miesiącach stężenie TRAIL w grupie chorych z aktywną postacią choroby było niższe niż w grupie chorych z nieaktywną postacią choroby, ale różnica ta nie była znamienna statystycznie. Odmienne wyniki uzyskał Audo i wsp [100]. W pracy Secchiero i wsp. oceniającej zmianę stężenia TRAIL u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów w odpowiedzi na leczenie LMPCh stwierdzono porównywalne stężenie z grupą kontrolną w chwili włączenia do leczenia, natomiast po 12 miesiącach terapii stężenie to znacząco wzrosło powyżej wartości wyjściowej w grupie chorych, którzy osiągnęli poprawę kliniczną [103]. W obrębie podgrupy II wyjściowe stężenie TRAIL było niższe w porównaniu z grupą kontrolną. Nie obserwowano zmiany w stężeniu po 6 miesiącach, natomiast po 12 miesiącach stężenie TRAIL wzrosło do poziomu obserwowanego w grupie kontrolnej.

Oceniając stężenie TRAIL w zależności od uzyskanej poprawy klinicznej w grupie chorych leczonych etanerceptem stężenie TRAIL w czasie 0 było wyższe w grupie chorych, którzy osiągnęli remisję po 12 miesiącach leczenia w porównaniu z grupą chorych, u których utrzymała się znaczna aktywność choroby (u tych pacjentów stężenie TRAIL było podobne do stężenia TRAIL u chorych z podgrupy 1, u których aktywność choroby utrzymywała się po 12 miesiącach leczenia), przy czym różnica ta nie była znamienna statystycznie. Po 12 miesiącach leczenia stężenia TRAIL były porównywalne. Podobne wyniki uzyskali w swej pracy Secchiero i wsp. przy czym oceniano stężenie TRAIL u chorych leczonych LMPCh [103]. Według Song i wsp. jedną z przyczyn różnej odpowiedzi na leczenie anty-TNF α może być

polimorfizm genu receptora TRAIL-R1. Obecność argininy w DNA genu receptora TRAIL-R1 związana była z lepszą odpowiedzią na terapię anty-TNF alfa [82].

Analizując stężenia badanych cytokin (OPG, RANKL, TRAIL) po podziale podgrupy II na pacjentów z postacią skąpostawową i wielostawową nie zaobserwowano różnic w stężeniu pomiędzy obiema postaciami choroby oraz grupą kontrolną. Wcześniejsze doniesienia oceniające stężenia RANKL i OPG u dzieci z MIZS pokazują, że wyższe stężenia RANKL prezentują pacjenci z postacią wielostawową [138,144]. Z kolei w pracy prezentowanej przez Masi i wsp [146] stężenia RANKL pomiędzy podtypami MIZS nie różniły się, natomiast stężenie OPG było wyższe w postaci wielostawowej niż skąpostawowej. W przypadku TRAIL brak jest danych z piśmiennictwa.

Porównując stężenie OPG, RANKL i TRAIL pomiędzy surowicą, a płynem stawowym uzyskano wyższe stężenia OPG i TRAIL w surowicy, natomiast stężenie RANKL było wyższe w płynie stawowym. Podobne wyniki uzyskał Skoumal i wsp, którzy porównywali stężenia OPG i RANKL w grupie chorych z RZS. Brak wzrostu TRAIL i OPG w płynie stawowym przy wzroście RANKL wskazuje, że proces hamowania proliferacji fibroblastów oraz nadmiernej aktywacji limfocytów T poprzez TRAIL oraz hamowanie nadmiernej aktywacji osteoklastów jest nieefektywny. Lokalnie zwiększony wzrost stężenia RANKL następujący pod wpływem nasilonej infiltracji błony maziowej przez limfocyty T, monocyty i makrofagi, prowadzi do nasilenia procesu zapalnego w stawie i jego destrukcji.

W oparciu o wyniki własnych badań oraz danych z piśmiennictwa uważam, że ocena stężeń RANKL oraz TRAIL w surowicy krwi pacjentów z MIZS może być pomocna w ocenie zwiększonego ryzyka niepomyślnego przebiegu choroby oraz może mieć wartość predykcyjną skuteczności zastosowanego leczenia.

Monitorowanie stężenia OPG w surowicy chorych leczonych LMPCh może być dodatkowym czynnikiem, który pozwoli na szybszą identyfikację pacjentów będących w grupie ryzyka braku uzyskania poprawy i modyfikację dotychczasowej strategii leczenia.

VII. WNIOSKI

1. Dziewczynki z postacią skąpostawową młodzieńczego idiopatycznego zapalenia stawów, z dodatnim mianem przeciwciał przeciwjądrowych oraz początkiem choroby przed 6 r.ż., stanowiły grupę zwiększonego ryzyka niepomyślnego przebiegu choroby.
2. Ocena dynamiki zmian stężenia OPG może być pomocna w monitorowaniu przebiegu choroby oraz w ocenie zwiększonego ryzyka niepowodzenia, w leczeniu lekami modyfikującymi przebieg choroby.
3. Chorzy, u których proces diagnostyczny trwał powyżej 8 tygodni stanowią grupę zwiększonego ryzyka wystąpienia bardziej nasilonych zmian destrukcyjnych w stawach co jest związane z wyższym stężeniem RANKL.
4. Ocena stężeń RANKL i TRAIL może służyć jako biomarker aktywności choroby oraz może mieć wartość predykcyjną odpowiedzi na zastosowane leczenie.
5. Różnice w stężeniu RANKL, OPG oraz TRAIL pomiędzy płynem stawowym, a surowicą wskazują na lokalnie zaburzoną równowagę pomiędzy czynnikami stymulującymi i hamującymi osteoklastogenezę oraz proliferację fibroblastów.
6. Porównawcza ocena stężenia RANKL, OPG i TRAIL pomiędzy płynem stawowym oraz surowicą może być pomocna w podjęciu decyzji o włączeniu dodatkowego, miejscowego leczenia hamującego proces zapalny.

VIII. STRESZCZENIE

Młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów jest najczęstszą artropatią występującą w wieku rozwojowym. Ze względu na różnorodny obraz kliniczny oraz wyniki badań dodatkowych The International League of Associations for Rheumatology (ILAR) wyróżnia 7 podtypów choroby. W rozwoju choroby biorą udział czynniki genetyczne oraz środowiskowe. Przebieg choroby jest przewlekły, występują okresy zaostrzeń i remisji, stąd choroba wymaga długotrwałego leczenia. Niejednokrotnie pomimo leczenia kilkoma lekami trudno jest uzyskać remisję choroby. W leczeniu MIZS stosowane są leki modyfikujące przebieg choroby (metotrexat, cyklosporyna A), często pacjenci wymagają także zastosowania glikokortykosteroidoterapii. W przypadkach braku uzyskania efektu leczniczego lub nawrotu choroby trudnego do opanowania stosowane są leki biologiczne hamujące TNF α (etanercept, adalimumab). Dotyczy to głównie pacjentów z wielostawową i systemową postacią MIZS. Długotrwanie utrzymujący się stan zapalny prowadzi do nieodwracalnych zmian destrukcyjnych w stawach oraz zaburzeń mineralizacji tkanki kostnej. W patogenezie choroby główną rolę odgrywają limfocyty T, które poprzez wydzielane prozapalne cytokiny stymulują migrację monocytów i makrofagów do błony maziowej oraz zaburzają równowagę w pomiędzy białkami bezpośrednio regulującymi homeostazę kostną: OPG/RANKL. Charakterystyczna jest także nadmierna proliferacja fibroblastów wynikająca m.in. z zahamowania TRAIL-zależnej apoptozy.

Cele pracy obejmowały: a. wyselekcjonowanie spośród chorych z zapaleniem stawów pacjentów z nowo zdiagnozowanym MIZS, u których rozpoczęto leczenie LMPCh oraz grupę zakwalifikowanych do leczenia etanerceptem ze względu na brak uzyskania poprawy pod wpływem standardowego leczenia, b. ocenę kliniczną, c. ocenę biochemiczną oraz d. ocenę stężeń OPG, RANKL i TRAIL w surowicy w odstępach sześciomiesięcznych przez okres 12 miesięcy. Ponadto od pacjentów, u których były wskazania kliniczne do punkcji stawu zaplanowano pobranie płynu stawowego dla porównania stężeń badanych cytokin pomiędzy płynem stawowym a surowicą. Cele pracy obejmowały także ocenę wartości diagnostycznej badanych cytokin w monitorowaniu przebiegu MIZS.

Badaną grupę stanowiło 43 dzieci, które były pod opieką poradni i oddziału Kliniki Endokrynologii i Reumatologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w

Poznaniu w okresie od marca 2007 do lutego 2009r. W obrębie badanej grupy wyodrębniono 2 podgrupy: podgrupę I (n=24), którą stanowiły dzieci z nowo zdiagnozowanym MIZS dotychczas nie leczone oraz podgrupę 19 pacjentów zakwalifikowanych do leczenia etanerceptem ze względu na brak uzyskanej poprawy pod wpływem standardowego leczenia (podgrupa II). Badania przeprowadzono w odstępach 6 miesięcznych (0-6-12), w trakcie których analizie poddano wywiad rodzinny, wiek w chwili rozpoznania, płeć, obraz kliniczny, wskaźniki biochemiczne procesu zapalnego, wskaźniki stanu funkcjonalnego, sposób leczenia, wskaźniki poprawy klinicznej, stężenia badanych cytokin. Otrzymane wyniki porównano z grupą kontrolną (n=18).

W podgrupie I przewagę stanowiła postać skąpostawowa. W obu podgrupach przewagę stanowiły dziewczynki. 93,3% dziewczynek z podgrupy II, które zostały zakwalifikowane do leczenia biologicznego ze względu na brak uzyskanej poprawy, zachorowało przed 6 r.ż., co może wskazywać, że są one w grupie zwiększonego ryzyka niepowodzenia w leczeniu standardowym.

Analizując stężenia badanych cytokin stwierdzono porównywalne w obu podgrupach z grupą kontrolną stężenie OPG oraz porównywalne z grupą kontrolną stężenie RANKL w badaniu wykonanym w czasie 0. Po 12 miesiącach leczenia zaobserwowano w obu podgrupach obniżenie stężenia RANKL w stosunku do stężenia wyjściowego. W przypadku stężenia TRAIL w chwili włączenia do badania stężenie było porównywalne w podgrupie I i obniżone w podgrupie II w stosunku do stężenia w grupie kontrolnej. Po 12 miesiącach leczenia w podgrupie I stężenie TRAIL uległo obniżeniu w stosunku do stężenia w czasie 0 a w podgrupie II podwyższeniu i było porównywalne ze stężeniem w grupie kontrolnej.

Po wyodrębnieniu w obu podgrupach chorych z aktywną oraz nieaktywną postacią choroby po 12 miesiącach leczenia stwierdzono, że pacjenci z aktywną postacią choroby po 12 miesiącach leczenia etanerceptem wykazują wyższe wyjściowe stężenia RANKL oraz niższe stężenia TRAIL. W przypadku pacjentów podgrupy I z aktywną postacią choroby zaobserwowano istotne obniżenie stężenia OPG w trakcie leczenia w porównaniu z pacjentami, którzy prezentowali postać nieaktywną choroby.

Nie wykazano różnicy w stężeniu OPG, RANKL oraz TRAIL pomiędzy postacią skąpostawową i wielostawową, a także pomiędzy grupą chorych z dodatnimi i ujemnymi przeciwciałami przeciwjądrowymi. Porównując stężenia OPG,

RANKL i TRAIL pomiędzy surowicą a płynem stawowym stwierdzono wyższe stężenie RANKL oraz niższe OPG i TRAIL w płynie stawowym niż w surowicy.

Ocena stężenia RANKL oraz TRAIL może być pomocna w ocenie zwiększonego ryzyka niepomyślnego przebiegu choroby oraz może mieć wartość predykcyjną skuteczności zastosowanego leczenia.

Monitorowanie stężenia OPG w surowicy chorych leczonych LMPCh może być dodatkowym czynnikiem, który pozwoli na szybszą identyfikację pacjentów będących w grupie ryzyka braku uzyskania poprawy i modyfikację dotychczasowej strategii leczenia.

IX. SUMMARY

Juvenile idiopathic arthritis (JIA) is the most frequently seen arthropathy among children. Because of heterogeneity of the disease the International League of Associations for Rheumatology (ILAR) classified JIA into 7 subtypes. Genetic and environmental factors contribute to its pathogenesis. It is a longstanding disease with the incidences of flares and remissions. It requires a prolonged treatment which sometimes is unsuccessful. Disease modifying antirheumatic drugs (DMARDs) such as Methotrexat, Cyclosporin A are the first line therapy of JIA, sometimes in combination with glucocorticosteroids. Biological treatment with anti-TNF α agents is used in a group of patients who has inadequate response to DMARDs. Most of the patients treated by anti-TNF α therapy are those with polyarticular and systemic onset JIA. Longstanding inflammatory process reveals in joint destruction and low bone mineralization. T cells and proinflammatory cytokines are thought to be crucial in the pathogenesis of JIA. Inflammatory cytokines produced by T cells promote proliferation of fibroblast-like synoviocytes, migration of macrophages, dendritic cells, plasma cells to the synovium and cause imbalance in OPG/RANKL system-proteins which are crucial in bone homeostasis. Resistance to TRAIL-mediated apoptosis lead to hiperproliferation of fibroblast-like synoviocytes and promotes osteoclastogenesis.

The aim of the study was: a. selection from a cohort patients with arthritis a group of patients with newly diagnosed JIA and a group of patients who failed the treatment by DMARDs and were qualified to the treatment by etanercept, b. physical examination and functional disability, c. biochemical assessment (ESR, CRP, total blood count and other), d. determination of OPG, RANKL and TRAIL in a 6 month periods during 1 year. Moreover synovial fluid samples were collected from patients required joint puncture and evaluated for the levels of OPG, RANKL, TRAIL. Diagnostic value of OPG, RANKL and TRAIL in follow-up of the treatment was assessed.

43 patients who were attending the Department of Pediatric Endocrinology and Rheumatology Poznan University of Medical Sciences from March 2007 to February 2009 were enrolled to the study. Study group was divided into two subgroups. I (n=24): a group o patients newly diagnosed, not treated so far and a subgroup of 19 patients who were qualified to the treatment by etanercept (subgroup II). The participants were examined at baseline and at 6 and 12 months follow up.

Examination consistent of an interview, family history, sex, age of diagnosing the disease, physical examination, determination of biochemical factors of inflammation, assessment of functional disability, assessment of clinical improvement, evaluation of OPG, RANKL, TRAIL levels. The control group consisted of 18 healthy children.

Oligoarthritis was the main subtype of JIA in subgroup I, in subgroup II was also presented in a high percentage. There was a significant female predominance in both subgroups. 93,3% of girls in subgroup II revealed the disease before the age of six years. It indicates that girls with the beginning of the JIA before 6 years of age is a group of a higher risk of failing the DMARDs therapy.

Serum levels of OPG were comparable between study subgroups and control group at baseline and in the first and second follow up. No differences were observed in the serum levels of RANKL between study subgroups and control group at baseline. After 12 months of treatment RANKL level decreased and was lower than in a control group. TRAIL level did not differ between subgroups and control group at baseline. After 12 months in the subgroup I TRAIL level was lower than at baseline. In subgroup II TRAIL level achieved the level comparable to control group at second follow up. Patients in both subgroups were divided into groups of patients who achieved and did not achieved the improvement after 12 months of treatment. Patients with active disease after 12 months of treatment by etanercept had a higher level of RANKL and lower level of TRAIL at baseline. In subgroup II patients with active disease had a significant decline in OPG level during the treatment. There were no differences in the levels of OPG, RANKL and TRAIL between oligoarticular and polyarticular JIA.

A higher level of RANKL and lower levels of TRAIL and OPG were observed in the synovial fluid than in the serum.

The basal level of RANKL and TRAIL may be helpful to determine the therapeutic response to etanercept. Monitoring the changes in the OPG level may reveal the patient with a higher risk of poor answer to DMARDs therapy.

X. PIŚMIENNICTWO

1. Petty RE, Southwood TR, Baum J i wsp. Revision of the proposed classification for juvenile idiopathic arthritis: Durban 1997. *J Rheumatol* 1998; 25: 1991-1994.
2. Rostropowicz-Denisiewicz K. Młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów. W: Rostropowicz-Denisiewicz K, Romicka AM (red.). *Zapalne choroby reumatyczne w wieku rozwojowym*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2005; 71-87.
3. Petty RE, Southwood TR, Manners P, Baum J i wsp. International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001. *J Rheumatol* 2004; 31: 390-392.
4. Davidson J. Juvenile idiopathic arthritis: a clinical overview. *Eur J Radiol*. 2000; 33(2): 128-34.
5. Romicka A.M. Młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów – obraz kliniczny. *Standardy Medyczne-Pediatrics* 2010; 7: 189-193.
6. Adams A, Lehman TJ Update on the pathogenesis and treatment of systemic onset juvenile rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2005; 17: 612-616.
7. Żuber Z Młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów. *Pediatrics po Dyplomie* 2012; 16: 23-32.
8. Pilch B Młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów. W: Pietrzyk J. *Wybrane zagadnienia z pediatrii tom II* Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2004; 331-338.
9. Martini A Are the number of joint involved or the presence of psoriasis still useful tools to identify homogenous disease entities in juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol*. 2003;30(9):1900-3.
10. Rutkowska-Sak L, Gietka P *Reumatologia wieku rozwojowego*. *Reumatologia* 2012; 50: 142-161.
11. Macaubas C, Nguyen K, Milojevic D i wsp. Oligoarticular and polyarticular JIA: epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol*. 2009; 5: 616-26.
12. Manners PJ, Bower C Worldwide prevalence of juvenile idiopathic arthritis why does it vary so much. *J. Rheumatol* 2002; 29: 1520-1530.
13. Oen K, Fast M, Postl B Epidemiology of juvenile idiopathic arthritis in Manitoba, Canada 1975-1992, cycles in incidence. *J Rheumatol* 1995; 22: 745-750.

14. Peterson LS, Mason T, Nelson AM i wsp. Juvenile rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota 1960-1993. Is the Epidemiology Changing? *Arthritis Rheum* 1996; 39: 1385-1390.
15. Berntson L, Andersson GB, Fasth A i wsp. Incidence of juvenile idiopathic arthritis in the Nordic countries. A population based study with special reference to the validity of the ILAR and EULAR criteria. *J Rheumatol* 2003; 30: 2275-2282.
16. Von Koskull S, Truckenbrodt H, Holle R i wsp. Incidence and prevalence of juvenile arthritis in an urban population of southern Germany: a prospective study. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 940-945.
17. Hanova P, Pavelka K, Dostal C i wsp. Epidemiology of rheumatoid arthritis, juvenile idiopathic arthritis and gout in two regions of the Czech Republic in a descriptive population-based survey in 2002-2003. *Clin Exp Rheumatol* 2006; 24: 499-507.
18. Danner S, Sordet C, Terzic J i wsp. Epidemiology of juvenile idiopathic arthritis in Alsace, France. *J Rheumatol* 2006; 33: 1377-1381.
19. Symmons DP, Jones M, Osborne J i wsp. Pediatric rheumatology in the United Kingdom: data from the British Pediatric Rheumatology Group National Diagnostic Register. *J Rheumatol* 1996; 23: 1975-1980.
20. Rutkowska-Sak L, Tuszkiewicz-Misztal E, Brózik H i wsp. Stanowisko Zespołu Ekspertów ds. Reumatologii Dziecięcej przy Konsultancie Krajowym w Dziedzinie Reumatologii dotyczące terapii biologicznej w leczeniu młodzieńczego idiopatycznego zapalenia stawów. *Reumatologia* 2009; 47: 111-115.
21. Zygmunt A, Biernacka-Zielinska M, Brózik H i wsp. Choroby reumatyczne w populacji dzieci i młodzieży z regionu łódzkiego. *Pediatrics Polska* 2005; 80: 995-1001.
22. Wolny-Niedzielska A Choroby układu ruchu u dzieci kierowanych do Poradni Reumatologicznej w Kielcach w latach 1999–2003. *Reumatologia* 2005; 43: 265-273.
23. Lin YT, Wang CT, Gershwin ME, Chiang BL The pathogenesis of oligoarticular/polyarticular vs systemic juvenile idiopathic arthritis. *Autoimmunity Reviews* 2011; 10: 482-489.
24. Prahalad S Genetics of juvenile idiopathic arthritis an update. *Curr Opin Rheumatol*. 2004 Sep; 16: 588-94.

25. Thomson W, Barrett JH, Donn R i wsp. British Paediatric Rheumatology Study Group. Juvenile idiopathic arthritis classified by the ILAR criteria: HLA associations in UK patients. *Rheumatology (Oxford)*. 2002 ; 41: 1183-9.
26. Prahalad S, Glass D A comprehensive review of the genetics of juvenile idiopathic arthritis. *Pediatr Rheumatol Online J*.2008; 21: 6-11.
27. Murray KJ, Moroldo MB, Donnelly P i wsp. Age-specific effects of juvenile rheumatoid arthritis-associated HLA alleles. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1843-1853.
28. Hollenbach J, Bugawan TL, Erlich HA Juvenile idiopathic Arthritis and HLA class I and class II interaction and age of onset effects. *Arthritis Rheum*. 2010; 62: 1781-1791.
29. Berkun Y, Padeh S Environmental factors and the geoepidemiology of juvenile idiopathic arthritis. *Autoimmun Rev* 2010; 9: A319-24.
30. Barash J, Goldzweig O Possible role of streptococcal infection in flares of juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2007; 57:877-880.
31. Carlens C, Jacobsson L, Brandt L Perinatal characteristics, early life infections and later risk of rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010; 9: 399-324.
32. Korematsu S, Miyahara H, Kawano T i wsp. A relapse of systemic type juvenile idiopathic arthritis after a rubella vaccination in a patient during a long-term remission period. *Vaccine* 2009; 5041-5042.
33. Hermann M, Schölmerich J, Straub R H Stress and rheumatic diseases *Rheum Dis Clin North Am* 2000; 26: 737-763.
34. Hahn YS, Kim J-G Pathogenesis and clinical manifestation of juvenile idiopathic arthritis *Korean J Pediatr* 2010; 53: 921-930.
35. Miossec P Interleukin-17 and Th17 cells: from adult to juvenile arthritis--now it is serious! *Arthritis Rheum* 2011; 63: 2168-71.
36. McInnse I, Schett G Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2005; 7: 612-616.
37. Adams A, Lehman TJ Update on the pathogenesis and treatment of systemic onset juvenile idiopathic arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2005; 7: 612-616.
38. Ramanan AV, Grom AA Does systemic-onset juvenile idiopathic arthritis belong under juvenile idiopathic arthritis? *Rheumatol* 2005; 44: 1350-1353.
39. Brochers AT, Selmi C, Cheema G Juvenile idiopathic arthritis. *Autoimmunity Rev* 2006; 5: 279-298.

40. Cohen PA, Job-Deslandre CH, Lalande G Overview of the radiology of juvenile idiopathic arthritis *Eur J Radiol* 2000; 3: 94-101.
41. Hashkes PJ, Laxer RM Medical treatment of juvenile idiopathic arthritis *JAMA* 2005; 294: 1671-1684.
42. Boisser MC, Semerano L, Challal S Rheumatoid arthritis: from autoimmunity to synovitis and joint destruction. *J Autoimmun* 2012; 39 :222-228
43. Cantley MD, Smith MD, Haynes DR Pathogenic bone loss in rheumatoid arthritis: mechanism and therapeutic approaches. *Int J Clin Rheumatol* 2009; 4: 561-582.
44. Robinson LJ, Borysenko CW, Blair HC Tumor Necrosis Factor Family Receptors Regulating Bone Turnover *Ann N Y Ac Sc* 2007; 1116: 432-443.
45. Bu R, Borysenko CW, Li Y i wsp. Expression of TNF-family proteins and receptors in human osteoblasts. *Bone* 2003, 33: 760-770.
46. Blair HC, Athanasou NA Recent advances in osteoclasts biology and pathological bone resorption. *Histol Histopathol* 2004, 19: 189-199.
47. Blair HC, Robinson LJ Osteoclasts signaling pathways. *Biochem Biophys Res Comm* 2005, 328: 728-738.
48. Boyce BF, Lianping X Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys* 2008; 473 :139-146.
49. Manolagas S Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine Rev* 2000; 21: 115-137.
50. Nakashima T, Takayanagi H The dynamic interplay between osteoclasts and the immune system. *Arch Bioch Bioph*2008; 473: 166-171.
51. Robling A, Castillo AB, Turner CH Biochemical and molecular regulation of bone remodeling. *Ann Rev Biomed Eng* 2006; 8: 455-498
52. Lacey DL Timms E, Tan HL i wsp. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 93: 165-176.
53. Wong BR, Rho J, Arron J i wsp. TRANCE is a novel ligand for tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T-cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 25190-25194.
54. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N i wsp. Identity of osteoclastogenesis inhibitor factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 1998; 139: 1329-1337.

55. Saldenbergh N, Bessis N Osteoprotegerin and inflammation Eur Cyt Network 2002; 13: 144-153.
56. Theil L RANKL and RANK T-cell, bone loss and mammalian evolution. Ann Rev Immunol 2004; 20: 795-823.
57. Daugall WC, Glaccum M, Charrier K i wsp. RANK is essential for osteoclasts and lymph node development. Genes Dev 1999; 13: 2412-2424.
58. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I i wsp. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis lymphocyte development and lymph-node organogenesis. Nature 1999; 397: 315-323.
59. Bezerra MC, Carvalho JF, Prokopowitsch AS i wsp. RANKL, RANK and osteoprotegerin in arthritic bone loss. Braz J Med Biol Res 2005; 38: 161-170.
60. Jones DH, Kong YY, Penninger JM Role of RANKL and RANK in bone loss and arthritis. Ann Rheum Dis 2002; 61: ii32-ii39.
61. Li J, Serosi I, Yan XO i wsp. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97: 1566-71.
62. Nakashima T, Hayashi M, Takayanagi H i wsp. New insights into osteoclastogenic signaling mechanisms. Trends Endocrinol Metab. 2012 Nov; 23: 582-590.
63. Boyce BF, Xing L I wsp. Biology of RANK, RANKL and osteoprotegerin. Arthritis Res Ther 2007; 9 Suppl 1: S1.
64. Kong YY, Boyle WJ, Penninger JM Osteoprotegerin ligand: a common link between osteoclastogenesis, lymph node formation and lymphocyte development. Immunol Cell Biol 1999; 77: 188-93.
65. Anderson DM, Moraskowsky E, Billingsley WL i wsp. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. Nature 1997; 390: 175-179.
66. Dougall WC, Galaccum M, Charrier K RANK is essential for osteoclast and lymph node development. Genes Dev 1999, 13: 2412.
67. Pasparakis M, Alexopoulou L, Episkopou V i wsp. Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. J Exp Med 1996; 184: 1397-1411.

68. Aubin J, Bonnelye E i wsp. Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Osteoporos Int* 2000; 11: 905-913.
69. Udugawa N, Takahash N, Yasuda H i wsp. Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology* 2000; 141: 3478-84.
70. Goldring SR Pathogenesis of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2003, 42 (suppl 2): ii11-ii16.
71. Reid P, Holen I i wsp. Pathological role of osteoprotegerin. *Eur J Cell Biol* 2009; 88: 1-17.
72. Collin-Osdoby P, Rother L, Anderson F i wsp. Receptor activator of NF-kappa B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis *J Biol Chem* 2001; 276: 20659-20672.
73. Emery J, McDonnell P, Burke MB i wsp. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 1998; 273: 14363-14367.
74. Okamoto K, Takayanagi H Regulation of bone by the adaptive immune system in arthritis. *Arthritis Res Ther* 2011; 27: 219.
75. Okamoto K, Takayanagi H Osteoclasts in arthritis and Th17 cell development. *Int Immunopharmacol* 2011; 11: 543-548.
76. Kong YY, Feige U, Sarosi I i wsp. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 1999, 402: 304.
77. Kotake S, Udagawa N, Hajoka M i wsp. Activated human T cells directly induces osteoclastogenesis from human monocytes: possibile role of T cells In bone destruction In rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.* 2001, 44: 1003.
78. Komatsu N, Takayanagi H Inflammation and bone destruction in arthritis: synergistic activity of immune and mesenchymal cells in joints. *Front Immunol* 2012; 13: 77.
79. Neve A, Corrado A, Contatore FP TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in rheumatoid arthritis: what's new? *Clin Exp Med* 2012.
80. Zauli G, Rimondi E, Nicolini V i wsp. TNF-related apoptosis – inducing ligand (TRAIL) blocks osteoclastic differentiation induced by RANKL plus M-CSF. *Blood* 2004, 104: 2044-2050.

81. Roux S, Lambert-Comeau P, Saint-Pierre C i wsp. Death receptors, Fas and TRAIL receptors are involved in human osteoclasts apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 333: 3849-3858.
82. Song BK, Chen Y, Göke R Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is an inhibitor of autoimmune inflammation and cell cycle progression. *J Exp Med* 2000; 191: 195-114.
83. Ichikawa K, Lin ., Fleck M i wsp. TRAIL-R2 (DR5) mediates apoptosis of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2003; 111: 1061-1069.
84. Yao Q, Seo DW, Mi Z i wsp. Intra-articular injection of recombinant TRAIL induces synovial apoptosis and reduces inflammation in a rabbit knee model of arthritis. *Arthritis Res Ther* 2006; 8: R16.
85. Colucci S, Brunetti G, Cantatore FP i wsp. The death receptor DR5 is involved in TRAIL-mediated human osteoclasts apoptosis. *Apoptosis* 2007, 12: 23-3730.
86. Chamoux E, Honde N, L'Eiger Osteoprotegerin decreases human osteoclasts apoptosis by inhibiting the TRAIL pathway. *J Cell Physiol* 2008; 216: 536-542.
87. Giannini EH, Iowite NT, Lovell J, Effects of long-term etanercept treatment on growth in children with selected categories of juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis and Rheum* 2010; 62: 3259–3264.
88. Giannini EH, Iowite NT, Lovell J Long-term Safety and effectiveness of etanercept in children with selected categories of juvenile idiopathic arthritis *Arthritis Rheum* 2009; 60: 2794–2804.
89. Załącznik nr 6 do Zarządzenia Nr 3/2011/DGL Prezesa NFZ z dnia 20 stycznia 2011 roku. Terapeutyczne Programy Zdrowotne 2011 .
90. Charakterystyka produktu leczniczego – Humira. [Online] http://www.emea.europa.eu/docs/pl_PL/document_library/EPAR__Product_Information/human/000481/WC500050870.pdf.
91. Yokota S, Imagawa T, Mori M i wsp. Efficacy and safety of tocilizumab in patients with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, withdrawal phase III trial. *Lancet* 2008; 371: 998-1006.
92. De Benedetti F, Brunner HI, Ruperto N i wsp. Randomized trial of tocilizumab in systemic juvenile idiopathic arthritis. *N Engl J Med* 2012; 367: 2385-2395.
93. Nigrovic P, Mannion M, Prince F i wsp. Anakinra as first-line disease-modifying therapy in systemic juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 545-555.

94. Quartier P, Allantaz F, Cimaz R i wsp. A multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial with the interleukin-1 receptor antagonist anakinra in patients with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis (ANAJIS trial) *Ann Rheum Dis* 2011; 70: 747–754.
95. Giannini EH, Ruperto N, Ravelli A i wsp. Preliminary definition of improvement in juvenile arthritis. *Arthritis rheum* 1997; 40: 1202-1209.
96. Wallace CA, Giannini EH, Huang B i wsp. American College of Rheumatology provisional criteria for defining clinical inactive disease in select categories of juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Care Res* 2011; 63: 929-936
97. Song BK, Chen Y, Goke R i wsp. Tumor necrosis factor –related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL) Is an Inhibitor of Autoimmune Inflammation and Cell Cycle Progression. *J Exp Med* 2000; 191: 1095-1103.
98. Lamhamedi-Cherradi SE, Zheng SJ, Maguchak KA i wsp. Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune disease in TRAIL -/- mice. *Nat Immunol* 2003; 4: 255-260.
99. Yao C, Seol DW, Mi Z i wsp. Intra-articular injection of recombinant TRAIL induces synovial apoptosis and reduces inflammation in a rabbit knee model of arthritis. *Arth Res Ther* 2006; 8: R16.
100. Audo R, Calmon-Hamaty F, Baeten D i wsp. Mechanism and clinical relevance of TRAIL-triggered responses in the synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis *Arth Rheum* 2011; 63: 904-913.
101. Trezioglou E, Bisgin A, Sanlioglu AD i wsp. Concurrent gene therapy strategies effectively destroy synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2007; 46: 783-789.
102. Morel J, Audo R, Hahne M, i wsp. Tumor necrosis factor-related apoptosis ligand (TRAIL) induces rheumatoid arthritis synovial fibroblasts proliferation through mitogen activated protein kinases and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt” *J Biol Chem* 2005; 280: 15709-15718.
103. Secchiero P, Corallini F, Castellino G i wsp. Baseline serum concentrations of TRAIL in early rheumatoid arthritis: relationship with response to disease-modifying antirheumatic drugs. *J Rheumatol* 2010;37: 1461-1466.
104. Cimaz R, Moretti D, Marino A. What do cytokines profiles tell us about subsets of juvenile idiopathic arthritis? *Curr Rheumatol Rep* 2012; 14: 150-154.

105. Yilmaz M, Kendirli G, Altintas D i wsp. Cytokines levels in serum of patients with juvenile rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2001; 20: 30-35.
106. De Benedetti F, Ravelli A, Martini A. Cytokines in juvenile rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 1997; 9: 428-433.
107. Żuber Z, Rutkowska-Sak L, Postępski J i wsp. Długoterminowa ocena bezpieczeństwa i skuteczności leczenia biologicznego młodzieńczego idiopatycznego zapalenia stawów – prezentacja polskiego rejestru elektronicznego. *Reumatologia* 2011; 49: 10-15.
108. Barnes MG, Grom AA, Thompson SD, Griffin TA i wsp. Biologic similarities based on age at onset in oligoarticular and polyarticular subtypes of juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 3249-3258.
109. Felici E, Novarini C, Magni-Manzoni S i wsp. Course of joint disease in patients with antinuclear antibody-positive juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol* 2005; 32: 1805-1810.
110. Angeles-Han ST, Pelajo CF, Vogler LB Risk markers of juvenile idiopathic arthritis-associated uveitis in the Childhood Arthritis and Rheumatology Research Alliance (CARRA) Registry. *J Rheumatol* 2013; 13: 2088-2096.
111. Shin JI, Kim KH, Lee TJ i wsp. Prevalence and patterns of anti-nuclear antibodies in Korean children with juvenile idiopathic arthritis according to ILAR criteria. *Scand J Rheumatol* 2008; 37: 348-351.
112. Ravelli A, Varnier GC, Oliveira S i wsp. Antinuclear antibody-positive patients should be grouped as a separate category in the classification of juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 267-275.
113. Adib N, Hyrich K, Thornton J I wsp. Association between duration of symptoms and severity of disease at first presentation to paediatric rheumatology: results from the Childhood Arthritis Prospective Study. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47: 991-995.
114. Tzaribachev N, Benseler SM, Tyrrell PN i wsp. Predictors of delayed referral to a pediatric rheumatology center. *Arthritis Rheum* 2009; 61: 1367-1372.
115. Foster HE, Eltringham MS, Kay LJ i wsp. Delay in access to appropriate care for children presenting with musculoskeletal symptoms and ultimately diagnosed with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2007; 57: 921-927.
116. Oliviera S, Ravelli A, Pistorio A Proxy-Reported Health-Related Quality of Life of patients with juvenile idiopathic arthritis: the Pediatric Rheumatology International

Trials Organization Multinational Quality of Life Cohort Study. *Arthritis Rheum* 2007; 15: 35-43.

117. Oen K, Malleson PN, Cabral DA i wsp. Disease course and outcome of juvenile rheumatoid arthritis in a multicenter cohort. *J Rheumatol* 2002; 29: 1989-1999.

118. Palmisani E, Solari N, Magni-Manzoni S i wsp. Correlation between juvenile idiopathic arthritis activity and damage measures in early, advanced, and longstanding disease. *Arthritis Rheum* 2006; 55: 843-849.

119. Halbig M, Horneff G Improvement of functional ability in children with juvenile idiopathic arthritis by treatment with etanercept. *Rheumatol Int* 2009; 30: 229-238.

120. Prince FH, Geerdink LM, Borsboom GJ Major improvements in health-related quality of life during the use of etanercept in patients with previously refractory juvenile idiopathic arthritis *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 138-142.

121. Hyrich KL, Lal SD, Foster HE i wsp. Disease activity and disability in children with juvenile idiopathic arthritis one year following presentation to paediatric rheumatology. Results from the Childhood Arthritis Prospective Study. *Rheumatology (Oxford)* 2010; 49: 116-122.

122. Papsdorf V, Horneff G Complete control of disease activity and remission induced by treatment with etanercept in juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology* 2011; 50: 214-221.

123. Lovell DJ, Reiff A, Jones OY i wsp. Long-term safety and efficacy of etanercept in children with polyarticular-course juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 1987-1994.

124. Fantini F, Gerloni V, Gatinara M i wsp. Remission in juvenile chronic arthritis: a cohort study of 683 consecutive cases with a mean 10 year follow up. *J Rheumatol* 2003; 30: 579-584.

125. Dempster H, Porepa M, Young N i wsp. The Clinical Meaning of Functional Outcome Scores in Children With Juvenile Arthritis. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1768–1774.

126. Celiker R, Bal S, Bakkaloglu A i wsp. Factors playing a role in the development of decreasing bone mineral density in juvenile chronic arthritis. *Rheumatol Int* 2003; 23: 127-129.

127. Roth J, Bechtold S, Borte G i wsp. Osteoporosis in juvenile idiopathic arthritis-a practical approach to diagnosis and therapy. *Eur J Pediatr* 2007; 166: 775-784.

128. Zak M, Hassager C, Lovell DJ i wsp. Assessment of bone mineral density in adults with the history of juvenile chronic arthritis: a cross-sectional long-term follow up study. *Arthritis Rheumat* 2000; 5: 1504-1510.
129. Maresova KB Secondary osteoporosis in patients with juvenile idiopathic arthritis. *J Osteopor* 2011; 2011: 569417.
130. Górska A, Urban M, Bartnicka M i wsp. Bone mineral metabolism in children with juvenile idiopathic arthritis. *Ortop Traumat Rehab* 2008; 10: 54-62.
131. Redlich K, Hayer S, Maier A i wsp. Tumor necrosis factor α mediated joint destruction is inhibited by targeting osteoclasts with osteoprotegerin. *Arthritis Rheumat* 202, 46: 785-792.
132. Strand V, Kavanaugh AF The role of interleukin-1 in bone resorption in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2004; 43, supl 3: 10-16.
133. Ziółkowska M, Kurowska M, Radzikowska A i wsp. High levels of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor κ B ligand in serum of rheumatoid arthritis patients and their normalization after anti-tumor necrosis factor α treatment. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 1744-1753.
134. Vanderborght A, Linsen L, Thewissen M i wsp. Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor κ B ligand mRNA expression in patients with rheumatoid arthritis and healthy controls. *J Rheumatol* 2004; 31: 1483-1490.
135. Haynes DR, Crotti TN, Loric M, i wsp. Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) regulate osteoclast formation by cells in the human rheumatoid arthritic joint. *Rheumatology* 2001; 40: 623–630.
136. Geusens PP, Landewe RB, Garnero P i wsp. The ratio of circulating osteoprotegerin to RANKL in early rheumatoid arthritis predicts later joint destruction. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 1772-1777.
137. van Tuyl L, Voskuyl A, Boers M i wsp. Baseline RANKL:OPG ratio markers of bone and cartilage degradation predict annual radiological progression over 11 years in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 1623-1628.
138. Lien G, Ueland T, Godang K i wsp. Serum levels of osteoprotegerin and receptor of nuclear factor κ B ligand in children with early juvenile idiopathic arthritis: a 2-year prospective controlled study. *Pediatr Rheumatol Online J.* 2010; 8: 30
139. González-Alvaro I, Ortiz AM, Tomero EG i wsp. Baseline serum RANKL levels may serve to predict remission in rheumatoid arthritis patients treated with TNF antagonists. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 1675–1678.

140. Kirwan JR The synovium in rheumatoid arthritis: evidence for (at least) two pathologies. *Arthritis Rheum.* 2004; 50: 1-4.
141. Molenaar ET, Voskuyl AE, Dinant HJ i wsp. Progression of radiologic damage in patients with rheumatoid arthritis in clinical remission. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 36-42.
142. Molenaar ET, Lems WF, Dijkmans BA i wsp. Levels of markers of bone resorption are moderately increased in patients with inactive rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2000 Jul;39(7):742-4.
143. Brown AK, Quinn MA, Karim Z i wsp. Presence of significant synovitis in rheumatoid arthritis patients with disease-modifying antirheumatic drug-induced clinical remission: evidence from an imaging study may explain structural progression. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 3761-73.
144. Spelling P, Bonfa E, Caparbo VF i wsp. Osteoprotegerin/RANKL system imbalance in active polyarticular onset juvenile idiopathic arthritis: a bone damage biomarker. *Scand. J. Rheumatol* 2008; 37: 439-444.
145. Sarma PK, Misra R, Aggarwal A Elevated serum receptor activator of NF kappaB ligand (RANKL), osteoprotegerin (OPG), matrix metalloproteinase(MMP)3 and proMMP1 in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Clin Rheumatol* 2008; 27 : 284-294.
146. Masi L, Simonini G, Piscitelli E Osteoprotegerin (OPG)/RANK-L system in juvenile idiopathic arthritis: is there a potential modulating role for OPG/RANK-L in bone injury? *J Rheumtol* 2004; 31: 986-981.
147. Haynes D, Crotti T, Weedon H i wsp. Modulation of RANKL and osteoprotegerin expression in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis in response to disease-modifying antirheumatic drug treatment and correlation with radiologic outcome. *Arthritis Rheum.* 2008; 59: 911-20.
148. Lee CK, Lee EY, Chung SM i wsp. Effects of diseases- modifying atirheumatic drugs and anti-inflammatory cytokines on human osteoclastogenesis through interaction with receptor activator of nuclear factor κ B, osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor κ B ligand. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 3831-3843.
149. Catrina AI, Klint E, Ernestam S i wsp. Anti-tumor necrosis factor therapy increases synovial osteoprotegerin expression in rheumatoid arthritis. *Arthris Rheum* 2006; 54: 76-81.

150. Takahashi N, Udagawa N, Suda T Vitamin D endocrine system and osteoclasts. Bonekey Rep. 2014 ;3: 495.