

VILNIUS UNIVERSITY

SKIRMANTĖ RUSONIENĖ

**EVALUATION OF DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC BIOMARKERS IN
CHILDREN WITH ACUTE ARTHRITIS**

**Summary of doctoral dissertation
Biomedical Sciences, Medicine (06 B)**

Vilnius, 2014

The dissertation was developed in 2010 - 2014 at the Faculty of medicine of Vilnius University

Head: assoc. prof. Violeta Panavienė (Vilnius University, Biomedical Sciences, Medicine – 06 B)

The dissertation defence is to be held at the Medical Research Council of Vilnius University:

Chairman:

Prof. Dr. Jolanta Dadonienė (Vilnius University Biomedical Sciences, Medicine – 06 B)

Members:

Prof. Dr. Augustina Jankauskienė (Vilnius University, Biomedical Sciences, Medicine – 06 B)

Prof. Dr. Regina Ėmužytė (Vilnius University, Biomedical Sciences, Medicine – 06 B)

Prof. Dr. Tadej Avcin (University of Ljubljana (Slovenia), Biomedical Sciences, Medicine – 06 B)

Prof. Dr. Ingrida Rumba – Rozenfelde (University of Latvia, Biomedical Sciences, Medicine – 06 B)

The public defence of the dissertation will take place at an open session of the Medical Research Council of Vilnius University at 14.00 on 18 December 2014 in Big Auditorium A 101 at Children's Hospital, an affiliate of Vilnius University Hospital Santariskiu Klinikos. Address: Santariskiu St. 7, LT-01513 Vilnius, Lithuania.

VILNIAUS UNIVERSITETAS

SKIRMANTĖ RUSONIENĖ

VAIKŲ ŪMINIŲ ARTRITŲ DIAGNOSTINIŲ IR PROGNOZINIŲ BIOŽYMENU
VERTINIMAS

Daktaro disertacija
Biomedicinos mokslai, medicina (06 B)

Vilnius, 2014

Disertacija rengta 2010 – 2014 metais Vilniaus universiteto Medicinos fakultete

Mokslinė vadovė: doc. dr. Violeta Panavienė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B)

Disertacija ginama Vilniaus universiteto Medicinos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkas:

Prof. dr. Jolanta Dadonienė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B)

Nariai:

Prof. dr. Augustina Jankauskienė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B)

Prof. dr. Regina Ėmužytė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B)

Prof. dr. Tadej Avcin (Lublijanos universitetas (Slovėnija), biomedicinos mokslai, medicina – 06 B)

Prof. dr. Ingrida Rumba – Rozenfelde (Latvijos universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06 B)

Disertacija ginama viešame Medicinos mokslo krypties tarybos posėdyje 2014 metų gruodžio 18 d. 14 val. Vaikų ligoninės VšĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų filialo didžiojoje A 101 auditorijoje.

Adresas: Santariškių g. 7, LT-08406 Vilnius, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2014 m. lapkričio 18 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje. Adresas: Universiteto g. 3, LT-01513 Vilnius, Lietuva ir VU interneto svetainėje adresu:

www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius.

CONTENTS

ABBREVIATIONS	6
1. INTRODUCTION	7
1.1. Background	7
1.2. Aim and objectives of the study.....	8
1.3. Scientific novelty	9
2. PATIENTS AND METHODS	10
2.1. First study stage – investigation of acute arthritis.....	10
2.2. The assessment of functional status and quality of life	11
2.3. The second stage – follow-up study.....	12
2.4. Statistical analysis	14
3. RESULTS	15
4. CONCLUSIONS	27
5. PRACTICAL CLINICAL RECOMMENDATIONS	28
6. PUBLICATIONS AND SCIENTIFIC CONFERENCE REPORTS	29
7. SUMMARY IN LITHUANIAN	30
8. BIOGRAPHY	51

ABBREVIATIONS

ACR/PRINTO	-American Coleague of Rheumatology/ Pediatric Rheumatology International Trials Organisation
ANA	- Antinuclear antibodies
ASL	- Antistreptolysin titer
CHAQ	- Children Health Assessment Questionnaire
CRP	- C reactive protein
DMARD	- Disease modifying antirheumatic drug
ESR	- Erythrocyte sedimentation rate
HLA B27	- Human leukocyte antigen B27
IL	- Interleukin
ILAR	- International League Against Rheumatism
JAMAR	- Juvenile arthritis Multidimensional Assessment Report
JIA	- Juvenile idiopathic arthritis
MRP	- Myeloid related protein
PGA	- Physician global assessment
TNF- α	- Tumor necrosis factor

1. INTRODUCTION

1.1. Background

Arthritis is a chronic disease that affects not only the system of functional movement, but also other organs or their groups restricting a child's development. Nearly 10 children in 100000 get arthritis over the year and it is usually juvenile idiopathic arthritis. The course of the disease is variable; the active disease is changed by remissions and vice versa. Earlier studies proved that nearly 70% of children reach adulthood with a certain level of disability and restriction of daily activities. Therefore it is very important to analyse the causes of arthritis and prognostic factors in the early stages of the disease.

It is difficult to compare the data of the studies described in the literature assessing the outcomes of the disease because there are several classifications of children's chronic arthritis, study designs are different and treatment options change over time. During the current treatment era when the new effective drugs are no longer aggressive, the disease outcomes of many patients' improved and previous findings of the researches of children with arthritis are not so relevant.

So far there are no reliable assessment methods for joint disease activity and functional ability of paediatric patients with arthritis. There is a huge choice of questionnaires in the literature helping to assess the functional status of a child. These questionnaires assess the various aspects of child health status, but they are long and non-informative.

There is not enough data in the literature on acute arthritis and its courses. So far it is unclear what factors are important in predicting the development of chronic disease during its acute stage.

In recent years during the research of JIA etiopathogenesis, there appeared to be more data on interleukins 1 and 6 (IL-1, IL-6) and tumour necrosis factor α (TNF- α) as the most important mediators in inflammation. However, there is lack of data on their significance to disease progression and outcome in the literature.

According to the literature, S100 proteins are the most informative biomarkers of chronic arthritis appearing in blood serum and discovered over the past 20 years. They are already applied in clinical practice as indicators of effective arthritis treatments and biomarkers of disease relapses. However, we did not find any data in the literature on the significance of these proteins during the prognosis of chronic arthritis development.

There are no scientific researches in Lithuania exploring the prognostic markers of children arthritis, the criteria of disease activity and the outcomes of chronic disease. There are no studies in the world researching the acute children arthritis and its outcomes over the past 20 years. So far many clinical researches focus on diagnosed juvenile idiopathic arthritis and aim to identify the factor of poor JIA prognosis on the basis of physical disability, radiological changes and arthritis progression.

1.2. Aim and objectives of the study

The aim of the study was to investigate whether the changes of laboratory, immunological and interleukins (MRP8/14 (calprotectin), IL-6, IL-33) assays at baseline, assessment of functional ability and disease activity may predict a chronic joint disease of children.

Objectives

1. To assess disease activity for children with acute arthritis on the basis of clinical and laboratory assays, as well as assessment of functional status;
2. To determine the informativeness of Juvenile arthritis multidimensional assessment report (JAMAR) newly introduced in Lithuania when assessing the status of child's health and compare it with other so far used child's health assessment questionnaire (CHAQ) and disease activity;
3. To analyse the concentrations of early biomarkers (calprotectin (MRP8/14), IL-6, IL-33) in serum and joint fluid at the stage of acute arthritis of children and compare with disease activity, disease course and outcome.

4. To assess the significance of biomarkers (MRP8/14, IL-6, IL-33) during the prognosis of a child's chronic joint disease.
5. To determine the most significant clinical and biomarkers sets at baseline that may predict the course of chronic joint disease.

1.3. Scientific novelty

There are no other studies in Lithuania, which analyse the prognostic factors of children arthritis, the criteria of disease activity and the outcomes of chronic diseases.

Changes in concentrations of calprotectin (MRP 8/14), IL-6 and IL-33 in blood serum and joint fluid were measured for the first time in children with acute arthritis. The link between these biomarkers and reactive arthritis, various JIA forms, acute arthritis activity and children's functional status was analysed. IL-33 was studied for the first time in children with arthritis.

The collected data allowed determining specific prognostic signs of chronic joint disease during the periods of follow-up (6 months, 1 and 2 years from the onset of the acute disease). From the specific markers of the chronic disease, determined in the acute arthritis patients, complexes (models) of the most significant markers were constructed which allow us to predict the course of the chronic disease.

For the first time in Lithuania functional status and life quality of children with acute arthritis were evaluated using the Juvenile Arthritis Multidimensional Assessment Report (JAMAR), which is newly introduced not only in Lithuania but also worldwide and the data was compared to the Child Health Assessment Questionnaire (CHAQ), which has always been used in Lithuania.

2. PATIENTS AND METHODS

The study was approved of by the Vilnius Regional Biomedical Ethics Committee (Registry Number 158200-01-444-125). Participation in the study was voluntary, and the subjects agreed to participate after receiving written and oral information.

The study population consisted of consecutive patients followed at the Department of Pediatrics of the Children's Hospital, Affiliate of Vilnius University Hospital Santariskiu Klinikos in 2009-2014 years.

2.1. First study stage – investigation of acute arthritis

The all participants consisted of 188 children aged from 1 to 16 years, who were investigated and treated at the Department of Pediatrics of the Children's Hospital, Affiliate of Vilnius University Hospital Santariskiu Klinikos during 2009–2014. The choice of age was made because of the definition of chronic arthritis (ILAR, 1995), according to which JIA was diagnosed to children in the Children's Hospital, an affiliate of Vilnius University Hospital Santariskiu Klinikos, if arthritis begins until the age of 16.

The patients group consisted of 115 children with acute arthritis. Inclusion criteria were arthritis persisting to 6 weeks, with onset before 16th birthday, no treated with DMARD, steroids or biologics. The control group consisted of 73 children aged 1-16 years referred to our Department of Paediatrics and Department of Orthopaedics for the diseases other than acute arthritis had no evidence of acute or chronic inflammatory diseases, as well as the diseases of joints and connective tissues. They were hospitalized because of fainting, cardiac arrhythmias, arterial hypertension, short stature and arthroscopy procedures.

All children with acute arthritis symptoms were investigated at baseline by standardized system – patient survey made of separate parts: history of family and disease, rheumatological examination, evaluation of disease activity and laboratory analysis. The patients' functional ability and quality of life were assessed by two questionnaires: long used child's health assessment questionnaire (CHAQ) and newer Juvenile arthritis

multidimensional assessment report (JAMAR). The data of questionnaires were compared between each other.

Blood samples were collected from all patients at inclusion in the study. Synovial fluid samples were obtained at the time of a therapeutic joint aspiration from 47 patients and at the time of diagnostic arthroscopy from 17 controls patients. Cell-free plasma and synovial fluid samples were stored frozen at -80°C until analysis at the Department of Laboratory Diagnostics of the Children Hospital, Affiliate of Vilnius University Hospital Santariškiu Klinikos (from 2009 to 2014).

Calprotectin, IL-6 and IL-33 concentrations in blood serum and joint fluid were measured with immunoassay methods commercial LEGEND MAX Human MRP8/14 (*Calprotectin*), IL-6 and IL-33 ELISA kits (*BioLegendInc, San Diego, USA*) following kits' techniques. MRP 8/14, IL-6, IL-33 assays were performed in Vilnius Innovative Medicine Center.

Laboratory evaluation of ESR, CRP, ASL titer, ANA, HLA B27, serology of *Salmonella spp.* and *Yersinia spp.* were analyzed following usual standard methods within an hour after collecting the blood sample at Department of Laboratory Diagnostics of Children Hospital, Affiliate of Vilnius University Hospital Santariskiu Klinikos.

Patients with acute arthritis were divided into groups based on the age, durations of symptoms (from the time of disease presentation to the first visit, to 1 week/1 - 4 weeks/ more than 4 weeks), number of affected joints (oligoarthritis/polyarthritis), presence of morning stiffness (no/more than 15 min).

2.2. The assessment of functional status and quality of life

Children's functional ability and quality of life were assessed by Childhood Health Assessment Questionnaire (CHAQ), which has been used since 1998 worldwide, and by Juvenile Arthritis Multidimensional Assessment Report (JAMAR), which is being used for the first time in Lithuania. These two questionnaires were filled out by the patients or

parents of patients. The data were compared between separate scales of these two questionnaires and with the physician global assessment of disease activity.

During first visit the disease activity was evaluated by swollen and tender joint counts, patients global assessment scale, pain measures, functional ability questionnaire (CHAQ), acute-phase reactants (according to proposed ACR/PRINTO criteria). Physician global assessment of disease activity was measured on a 10-cm visual analog scale (VAS), where 0 = no activity and 10 = maximum activity. This is a subjective measure, which is determined by the examiner, according to the criteria of disease activity.

2.3. The second stage – follow-up study

During the first stage (examination of patients with acute arthritis at baseline) according to clinical and laboratory criteria 115 children with acute arthritis were classified as probable JIA (probable was because of arthritis lasted < 6 weeks), reactive arthritis or undifferentiated arthritis. 6 patients with other diagnoses - systemic lupus erythematosus, leukemia, sarcoma, dissecting osteochondritis (2), Henoch Schonlein purpura were excluded from the study.

All (109) patients were followed-up for at least 2 years, except for the patients with other diagnoses and control group of children. At the 6 month, 1- and 2 – year follow-up, the patients were evaluated by a same investigator, who performed physical examination and measurement of disease activity. Follow-up study model is shown in Figure 1.

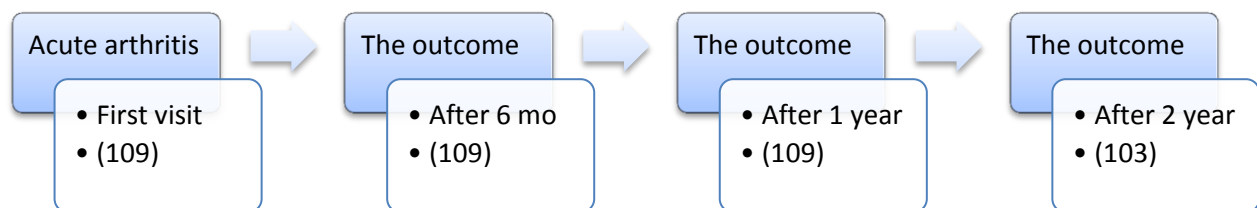


Figure 1. The follow-up study model

Follow-up study model

In the follow-up model we distinguished 2 groups of patients with different disease outcomes: inactive disease or remission and chronic arthritis. Although JIA is divided to 7 different forms, 3 main groups of arthritis are often distinguished: oligoarthritis, polyarthritis and arthritis with systemic onset. Whatever the disease of arthritis is, the tactics and strategy of chronic arthritis treatment is the same, unless it is related to a very serious course of JIA when the therapy of several preparations or other specific therapy should be applied. Therefore the groups of our observational research model is consisted by the fact whether the arthritis persist, e.g. becomes chronic or the patient recovers after the short-term symptomatic treatment which is made for all children with any arthritis, e.g. the disease becomes inactive – the remission of disease begins.

The periods of our observational research were also chosen in accordance to assessment guidelines of chronic arthritis course. According to ACR/PRINTO recommendations, the clinical remission shall be assessed after the 6 months of medication use or after 1 year without the use of medication, therefore the patients were observed after 6 months and after 1 and 2 years. The appropriate diagnostic criteria were formulated and definitions were defined to separate the inactive arthritis from constant chronic arthritis during the first visit.

Thus, the follow-up model was made in order to identify the risk factors during the acute stage of the disease helping to predict the course of disease, e.g. to separate the arthritis of chronic course from fast and inactive arthritis. If the arthritis is suspected on the early onset of the disease, it is possible to start the treatment immediately and thus avoid the serious consequences of the disease.

After the assessment of clinical, laboratory and new biomarkers variables during the first visit (at the first stage of acute arthritis study), we have chosen the following key features helping to predict and determine the development of chronic disease:

- Clinical features: age, sex, duration of symptoms, number of affected joints, extra-articular symptoms, physician global assessment of disease activity score.

- Laboratory features: ESR, CRP, ANA, HLA B27, MRP8/14, IL-6, IL-33.

It is believed these diagnostic variables have an impact in prediction of chronic arthritis.

2.4. Statistical analysis

The details of each patient are entered into specially designed *Microsoft Excel* database. Statistical analysis is performed by using the package of statistical program SPSS (*Statistical Package for Social Science*) (version 20.0.1, SPSS Inc., Chicago, USA).

The characteristics of the researched sample of quantitative variables (biomarkers) were calculated by using the averages. Nominal variables were presented in absolute numbers or percentage. Kolmogorov-Smirnov test was performed to check the distributions of quantitative variables. At $p < 0,05$ – distribution of variables is significantly deviated from the normal value.

Crosstabs were created to compare the different groups of nominal variables or values of ordinal variables. A nonparametric criterion Chi-square test (χ^2) was used to check the independence of two variables. The averages of quantitative variables in groups were compared by a one-way dispersive analysis (*one-way ANOVA*). The parametric *Student's t* and nonparametric Mann-Whitney tests were applied to compare the quantitative variables of two independent groups. A parametric dispersive analysis and Kruskal-Wallis test were applied to compare the quantitative variables of more than two groups. Cronbach α coefficient was used to check the internal reliability of individual questionnaire parts.

Diagnostic and selective properties of biomarkers and other indications were assessed by using the method of ROC curves. The method of ROC curves helped to calculate the area below the curve (AUC), showing the accuracy of researched biomarker or other risk factors. Biomarker accuracy was assessed by the numerical value of AUC (the closer AUC is to one, the more accurate the biomarker is; if the value is $\leq 0,5$, the biomarker or other factors do not have the diagnostic, selective and monitoring properties). A binary logistic regression analysis was applied during the assessment of how the dependant variables (chronic disease)

correlate with independent quantitative variables (numerical values of biomarkers). The obtained results of regression models were compared with each other by using ROC curves.

The suitability of models were assessed by Nagelkerke coefficient of determination (normal value $> 0,25$). Statistical connection between the variables and the strength of correlation were assessed by using Pearson's linear correlation coefficient. Spearman correlative analysis was applied to variables that did not satisfy the condition of distribution normality or to ordinal variables, and the data was transformed to the logarithmic scale. The level of significance 0,05 was chosen by checking the statistical hypothesis.

3. RESULTS

One hundred eighty-eight patients (1-16 years of age) were enrolled in this study. We examined 115 children with acute arthritis (1 - 16 years of age) during 2009-2013 years. The mean age during the diagnosis was 9.44 ± 4.53 years. The patients group consisted of 65 girls (56.5%) and 50 boys (43.5%). Healthy control group consisted of 73 children with a mean age of 8.09 ± 4.87 years (49 girls (67.1%) and 24 boys (32.9%)). There were no significant differences in mean age ($p = 0.058$) and gender distribution ($p = 0.191$), when comparing all patients with acute arthritis and controls.

We found that the most often acute arthritis affected children under the age of 4 years (33.9%). Dividing the patients to larger groups (1-4, 5-8, 9-12 and 13-16 years), there were no significant differences of patients in any group, and there were no significant differences in gender ($p = 0.056$).

ESR and CRP in the serum were significantly higher among the patient group compared to the healthy control group - it met the inclusion criteria in both groups.

We found that children were normally seen by a rheumatologist within 1-4 weeks after the onset of the symptoms of arthritis. To analyse the causes during the early (within 1 week) referral to the Children's Hospital, we examined the pain and disease global assessment defined by the patients or their parents. We found a weak but statistically significant

negative correlation ($r = -0.218$, $p = 0.027$) between the patient age and pain defined by the parents (Fig. 2).

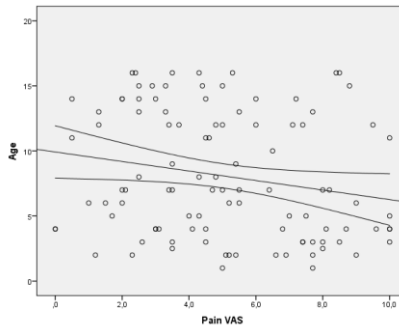


Figure 2. Pain and children age correlation in patients with acute arthritis ($r = -0,218$, $p = 0,027$)

We found that patients with acute arthritis during very early referral to the Children’s Hospital (up to 1 week) had significantly smaller number of affected joints (oligoarthritis) (63.3%) ($p < 0,05$).

Compared to the physician assessment of disease activity (PGA) with other clinical features of the patients, we found a statistically significant relationship with a higher number of affected joints ($r = 0.509$, $p = 0.0001$) and ESR ($r = 0.430$, $p < 0,01$) (Figure 3).

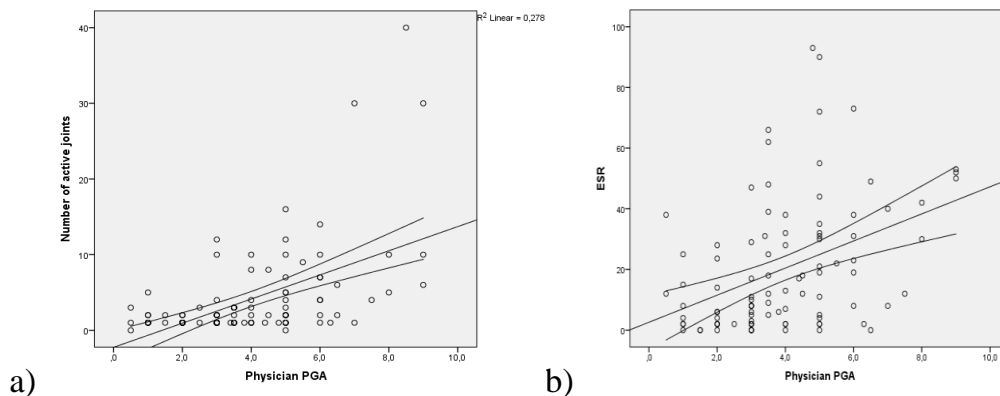


Figure 3. Physician PGA correlation: with number of affected joints (a) ($r = 0,509$, $p = 0,0001$) and ESR (b) ($r = 0,430$, $p = 0,0001$).

The assessment of functional status and quality of life

JAMAR functional ability scale is very similar to CHAQ. We compared JAMAR functional ability with the CHAQ and physician PGA. We found a strong correlation with CHAQ ($r =$

0.631, $p = 0.00001$) (Fig. 4) and weaker, but statistically significant correlation with the physician PGA ($r = 0.364$, $p = 0.001$) (Fig. 5).

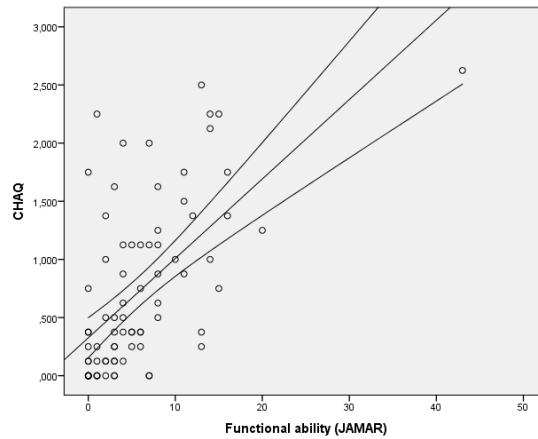


Figure 4. JAMAR functional ability scale's correlation with CHAQ ($r = 0,631$, $p < 0,00001$)

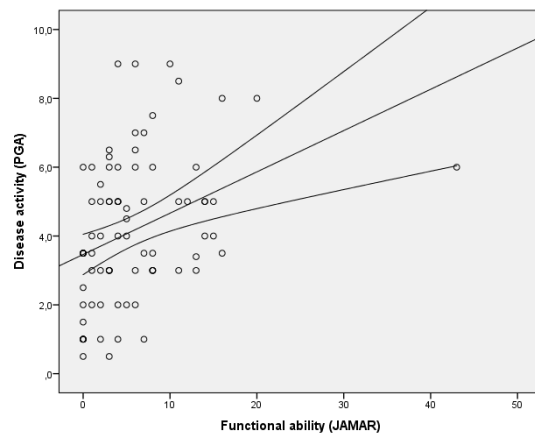


Figure 5. JAMAR functional ability scale's correlation with disease activity (PGA) ($r = 0.364$, $p = 0.001$)

As physician PGA is a significant measure of disease activity, we can suggest that JAMAR functional ability scale is more significant than the CHAQ.

Our data showed that these two questionnaire (JAMAR and CHAQ) scales are significantly correlated with each other (correlation coefficient ranges from 0.295 to 0.677) ($p < 0.01$) (Table 1).

Table 1. JAMAR separate scales correlation with CHAQ, children age and disease activity CHAQ skalėmis, amžiumi ir gydytojo PGA

			CHAQ			JAMAR			
	Age	Physician PGA	Pain VAS	Well-being VAS	CHAQ	Functional ability	Pain VAS	Disease activity VAS	Well-being VAS
Physician PGA	-0,147								
Pain VAS (CHAQ)	-0,220*	0,341**							
Well-being VAS (CHAQ)	0,019	0,271**	0,486**						
CHAQ	-0,140	0,424**	0,446**	0,407**					
Functional ability (JAMAR)	-0,211	0,404**	0,478**	0,381**	0,616**				
Pain VAS (JAMAR)	-0,181	0,306**	0,677**	0,419**	0,489**	0,551**			
Disease activity VAS (JAMAR)	-0,249*	0,419**	0,357**	0,295**	0,393**	0,474**	0,615**		
Well-being VAS (JAMAR)	0,062	0,313**	0,353**	0,360**	0,330**	0,445**	0,448**	0,339**	
Health related quality of life (JAMAR)	-0,047	0,325**	0,337**	0,491**	0,295*	0,310**	0,370**	0,437**	0,438**

*p < 0,05, **p < 0,01

Analysis of calprotectin (MRP-8/14), IL-6 and IL-33 concentrations on serum and synovial fluid

Calprotectin concentrations in the serum and synovial fluid of children with acute arthritis were significantly higher than the control group's (p < 0.05) (Table 2). We found that MRP 8/14 concentrations in the synovial fluid were hundreds of times higher (Table 2). We also found that concentrations of calprotectin in synovial fluid and serum correlated significantly (r = 0.598, p < 0.001)

Table 2. Calprotectin in patients with acute arthritis and healthy controls

	Acute arthritis (mean ± SD)	Healthy controls (mean± SD)	p
MRP 8/14 in serum, µg/ml	8,40 ± 7,51	4,76 ± 2,74	0,0005
MRP 8/14 in synovial fluid µg/ml	44,82 ± 112,44	0,016 ± 0,012)	0,006

Our data showed that calprotectin (MRP 8/14) was significantly correlated with acute inflammation indicators: the ESR ($r = 0.538$, $p < 0.0001$) and CRP ($r = 0.418$, $p = 0.0001$).

IL-6 concentrations in the serum and synovial fluid of children with acute arthritis were also significantly higher than the control group's ($p < 0.05$). Like calprotectin, IL-6 concentrations in the synovial fluid were hundreds of times higher than in the serum (Table 3).

Table 3. IL-6 in patients with acute arthritis and healthy controls

	Acute arthritis (mean ± SD)	Healthy controls (mean ± SD)	p
IL-6 in serum, pg/ml	8,40 ± 7,51	4,76 ± 2,74	0,0005
IL-6 in synovial fluid, pg/ml	36 917,98 (60 643)	108,22 (261,60)	0,001

We found strong correlation between calprotectin and IL-6 concentrations in the serum ($r = 0.652$, $p = 0.001$).

Also our data showed that increased calprotectin and IL-6 concentrations correlated well with a higher number of affected joints (both $p < 0.01$).

In the present study, the IL-33 data differed from the data of calprotectin and IL-6. When comparing patients that have acute arthritis with the healthy control groups, we also found higher IL-33 levels in the serum and the synovial fluid, but they were significantly higher only in the serum ($p < 0.01$). We found that IL-33 serum levels were slightly, yet significantly negatively correlated with the patients age ($r = - 0.335$, $p = 0.001$). According

to the literature, we found evidence that IL-33 concentrations correlate between the serum and the patient's age, but studies have only been performed in adults. By comparing the IL-33 concentrations in patients with clinical signs, we found only weak correlations with ANA ($r = 0.230$, $p = 0.03$)

Follow-up study analysis

To develop the diagnostic criteria for chronic disease in children with acute arthritis, an outcome is recorded during a 2 year follow-up. 109 patients were included in an acute arthritis cohort if a rheumatologist confirmed the presence of arthritis in at least 1 joint and if the symptoms lasted < 6 weeks. The outcome is recorded after a 6 month, 1 and 2 year follow-up period. After 6 months, the chronic disease developed in 51 patients (46.8%) and remission was achieved in 58 patients (53.2%). After 1 year, chronic disease developed in 41 patients (37.6%) and remission was achieved in 68 patients (62.4%). After 2 years, chronic disease developed in 33 patients (38.7%) and remission was achieved in 68 patients (61.3%). After 1 year, 6 patients were lost before the follow-up.

The diagnostic variables recorded during the first visit were included in the logistic regression model. The model was developed in a few steps. Firstly, the diagnostic variables with evidence of statistical significance to predict chronic arthritis (clinical, laboratory, biomarkers and functional ability) were included in the analysis. Secondly, a stepwise multiple logistic regression model was used in finding relevant independent prognostic variables and identifying the most statistically significant variable combination that could be used to predict chronic arthritis after a 6 month, 1 and 2 year follow-up period. The prognostic variables included in the multivariate model were selected by using a univariate analysis. The significance level was set at 0.05.

The accuracy of the variables was assessed using the ROC curve method and the calculation of the area under the curve (AUC).

The baseline characteristics of patients are shown in Table 4.

Table 4. Patients with chronic disease and remission (determined after 6 month) characteristic

Baseline variable	Chronic arthritis (n = 51)	Remission (n = 58)	p
Age, years \pm SD	7,47 (\pm 4,92)	8,55 (\pm 4,72)	0,245
Sex (G/B)	31/20	28/30	0,194
Symptoms duration (to 1 week) (n, %)	11,8 %	37,9 %	0,006
Patients with morning stiffness, %	54,9	22	0,001
Affected joints, mean (min.–max.)	5,53 (1–40)	2,72 (1–14)	0,015
ANA positive patients, %	47,8	4,2	0,001
HLA B27 positive patients, %	38,6	27,3	0,262
ESR, mm/h \pm SD	25,0 \pm 23,1	16,21 \pm 18,45	0,039
CRP, mg/l \pm SD	18,10 \pm 29,62	10,37 \pm 19,66	0,115
Calprotectin in serum, μ g/ml (\pm SD)	9,65 \pm 8,33	7,22 \pm 6,71	0,095
IL-6 in serum, pg/ml (\pm SD)	23,44 \pm 52,17	9,12 \pm 30,32	0,08
IL-33 in serum, pg/ml (\pm SD)	820,91 \pm 649,41	622,7 \pm 566,78	0,105
Pain, cm \pm SD	4,84 \pm 2,41	5,24 \pm 2,88	0,445
Patients PGA, cm \pm SD	4,30 \pm 2,57	3,85 \pm 2,97	0,416
CHAQ \pm SD	0,76 \pm 0,66	0,67 \pm 0,74	0,537
Physician PGA, cm \pm SD	4,67 \pm 2,06	3,28 \pm 1,73	0,001

The presence of morning stiffness, disease of more than 5 joints (polyarthritis), elevated ESR and the presence of ANAs were all significantly associated with the chronic disease defined after 6 month of follow-up after first visit ($p < 0,05$).

Predictive variables were identified by the univariate analysis. The results of all the studied baseline variables obtained through the univariate analysis are presented in Table 5.

Table 5. Predictive factors of chronic disease (n = 51) after 6 month (univariate analysis)

Baseline variables	Chronic disease n (%)	OR [95 % CI]	p
Arthritis symptoms durations * >4 weeks	25 (49,0)	4,4 (1,5–12,8)	0,007
Arthritis symptoms durations > 6 weeks	20 (39,2)	4,9 (1,6–15)	0,006
Affected joints, mean	5,53	1,1 (1,1–1,2)	0,033
Morning stiffness > 15 min.	39 (76,5)	3,9 (1,6–9,4)	0,003
ESR > 22 mm/val.*	23 (48,9)	2,5 (1,1–5,9)	0,03
IL-6 > 5,5 pg/ml*	26 (51,0)	2,7 (1,2–5,9)	0,016
ANA positive patients (> 1:200)	22 (47,8)	21,1 (4,6–97,3)	0,0001

95 % CI – 95 % confidence interval, OR – odds ratio

* Laboratory parameters and biomarkers values were received with ROC test.

Antinuclear antibodies and symptom duration which is more than 4 weeks before the first visit were the best predictive factors of chronic arthritis after 6 month ($p < 0,05$). The higher number of affected joints, morning stiffness, elevated ESR and IL-6 were also significantly correlated with the chronic arthritis outcome ($p < 0,05$).

Laboratory parameters and biomarker values (ESR > 22 mm / h. IL-6 > 5.5 pg / ml) were received with the ROC test. The area under the ROC curve (ROC AUC) provides a measure of the overall discriminative ability of a variable.

A Spearman's correlation analysis was performed in order to check the predictive factors' multicollinearity. After it, two different models or clinical and biomarkers sets were developed (Tables 6 and 7).

Table 6. Predictive clinical and biomarkers factors of chronic disease after 6 month (model 1)

Predictive factors	Chronic disease after 6 month	
	OR (95 % CI)	p
Symptoms duration > 4 weeks	7,97(1,95–32,64)	0,004
IL-6 in serum > 5,5 pg/ml	4,08 (1,16–14,36)	0,029
ANA positivity	20,61 (3,73–113,94)	0,001
Coefficient -2,635, p < 0,001, Nagelkerke coefficient 0,503		

Table 7. Predictive clinical and biomarkers factors of chronic disease after 6 month (model 2)

Predictive factors	Chronic disease after 6 month	
	OR (95 % CI)	p
Symptoms duration > 4 weeks	9,94 (2,33–42,4)	0,002
Morning stiffness (> 15 min)	3,82 (1,12–13,02)	0,032
IL-6 in serum > 5,5 pg/ml	6,2 (1,67–22,93)	0,006
ANA positivity	20,88 (3,71–117,6)	0,001
Coefficient -2,635, p < 0,001, Nagelkerke coefficient 0,518		

Factors significant for the chronic disease (after 6 month) were identified by univariate analysis were examined together in a forward stepwise logistic regression model. Tables 6 and 7 give the most important sets of predictive factors: arthritis symptoms duration more than 4 weeks, elevated IL-6 concentration in serum (>5,5 pg/ml) and positive ANA (Table 6, model 1). The results of the second analysis were similar to those to the first, the presence of morning stiffness also became a significant predictor (Table 7). Both models statistically significant (p < 0.001) predicts the development of chronic arthritis in 6 months of follow-up period. The determination coefficients (0.503 and 0.518, respectively) of both Nagelkerke models indicate that these models are made well (must be > than 0.25) and correctly predict 79.5% of chronic disease cases.

The prognostic factors of chronic arthritis after a 1 year follow-up were developed the same way. The baseline characteristics of patients are shown in Table 8.

Table 8. Patients with chronic disease and remission (determined after 1 year) characteristic

Baseline variables	Chronic disease (n = 41)	Remission (n = 68)	P
Age, year \pm SD	7,90 (\pm 5,11)	8,13 (\pm 4,68)	0,648
Sex (G/B)	27/14	32/36	0,058
Symptoms duration (to 1 week) (n, %)	17,1 %	45,6 %	0,001
Patients with morning stiffness, %	53,7	27,9	0,007
Affected joint, mean (min.–max.)	6,39 (1–40)	2,62 (1–14)	0,001
ANA positive patients, %	47,4	10,7	0,001
HLA B27 positive patients, %	38,9	28,8	0,330
ESR, mm/h \pm SD	25,78 \pm 23,45	17,32 \pm 19,24	0,056
CRP, mg/l \pm SD	19,10 \pm 31,31	10,82 \pm 19,72	0,099
Calprotectin in serum, μ g/ml (\pm SD)	10,66 \pm 8,40	6,96 \pm 6,72	0,013
IL-6 in serum, pg/ml (\pm SD)	26,72 \pm 57,33	9,25 \pm 28,57	0,037
IL-33 in serum, pg/ml (\pm SD)	801,67 \pm 654,96	666,77 \pm 585,07	0,284
Pain, cm \pm SD	5,03 \pm 2,42	5,06 \pm 2,82	0,965
Patients PGA, cm \pm SD	4,36 \pm 2,47	3,88 \pm 2,98	0,400
CHAQ \pm SD	0,78 \pm 0,64	0,66 \pm 0,73	0,412
Physician PGA, cm \pm SD	4,62 \pm 2,33	3,50 \pm 1,65	0,005

Patients with chronic arthritis (defined after 1 year) at the baseline felt significantly more joint stiffness, had more affected joints, positive ANA and a higher calprotectin and IL-6 concentration in the serum ($p < 0,05$).

Predictive variables were identified by the univariate analysis. The results obtained by the univariate analysis of all the studied baseline variables are presented in Table 9.

Table 9. Predictive factors of chronic disease after 1 year (univariate analysis)

Baseline variables	Chronic disease n (%)	OR (95 % CI)	p
Affected joints $> 5^*$, n (%)	15 (36,6)	5,03 (1,84 – 13,77)	0,002
Polyarthritis	16 (61,5)	3,58 (1,42– 8,99)	0,007
Morning stiffness > 15 min. n (%)	33 (51,6)	4,92 (1,99 – 12,21)	0,001
ESR $> 4,5$ mm/val.*	31 (44,3)	3,66 (1,25 – 10,72)	0,018
IL-6 in serum $> 6,2$ pg/ml*	26 (51,0)	3,41 (1,49 – 7,77)	0,004
Calprotectin in serum $> 5,785$ μ g/ml *	28 (50)	3,08 (1,36 – 6,96)	0,007

95 % CI – 95 % confidence interval, OR – odds ratio

* Laboratory parameters and biomarkers values were received with ROC test.

Polyarthritis and the presence of morning stiffness were the best predictive factors of chronic arthritis after 1 year ($p < 0,05$). The elevated calprotectin, IL-6 concentrations in serum, elevated ESR were also significantly correlated with the chronic arthritis outcome ($p < 0,05$).

Laboratory parameters and biomarker values (calprotectin $> 5,785 \mu\text{g/ml}$, ESR $> 4,5 \text{ mm/h}$, IL-6 $> 6,2 \text{ pg/ml}$) were received with the ROC test. The area under the ROC curve (ROC AUC) provides a measure of the overall discriminative ability of a variable.

A Spearman's correlation analysis was performed in order to check the predictive factors' multicollinearity. After it, two different models or clinical and biomarkers sets were developed (Table 10 and 11).

Table 10. Stepwise logistic regression of predictive factors of chronic disease after 1 year (first model)

Predictive factors	Chronic disease after 1 year	
	OR (95 % CI)	P
Affected joints > 5	8,68 (2,15–35,04)	0,002
Morning stiffness	6,3 (1,2–19,88)	0,002
Calprotectin in serum $> 5,785 \mu\text{g/ml}$	4,37 (1,59–12,02)	0,004
Coefficient $-2,903$, $p < 0,001$, Nagelkerke coefficient 0,380		

Table 11. Stepwise logistic regression of predictive factors of chronic disease after 1 year (second model).

Predictive factors	Chronic disease after 1 year	
	OR (95 % CI)	P
Polyarthritis	3,88 (1,28–11,76)	0,017
Morning stiffness	3,82 (1,12–13,02)	0,032
IL-6 serum $> 6,2 \text{ pg/ml}$	3,17 (1,21–8,26)	0,019
Coefficient $-2,438$, $p < 0,001$, Nagelkerke coefficient 0,343		

Factors significant for the chronic disease (after 1 year) were identified by univariate analysis were examined together in a forward stepwise logistic regression model. Tables 10 and 11 give the most important sets of predictive factors: polyarthritis, morning stiffness

and elevated calprotectin concentration in serum ($>5,785 \mu\text{g/ml}$) (Table 10, model 1). The results of the second analysis were similar to those to the first, the elevated IL-6 concentration in serum ($>6,2 \text{ pg/ml}$) also became a significant predictor (Table 11). Both models statistically significant ($p < 0.001$) predicts the development of chronic arthritis in 6 months of follow-up period.

We investigated predictive factors of chronic disease after 2 years of follow-up period. The baseline characteristics of the patients are shown in Table 12.

Table 12. Patients with chronic disease and remission (determined after 2 year) characteristics

Baseline variables	Chronic disease (n = 33)	Remission (n = 70)	p
Age, years \pm SD	7,73 \pm 5,37	8,14 \pm 4,65	0,688
Sex (G/B)	22/11	36/34	0,068
Symptoms duration (to 1 week) (n, %)	12,1 %	31,4 %	0,161
Patients with morning stiffness, %	57,6	28,6	0,0001
Affected joint, mean (min.–max.)	6,70 (1–40)	2,79 (1–16)	0,002
ANA positive patients, %	48,4	15,5	0,001
HLA B27 positive patients %	50	25	0,022
ESR, mm/h \pm SD	28,37 \pm 24,61	16,76 \pm 18,65	0,013
CRP, mg/l \pm SD	22,39 \pm 33,70	9,76 \pm 19,35	0,020
Calprotectin in serum, $\mu\text{g/ml}$ (\pm SD)	11,22 \pm 8,31	6,23 \pm 5,57	0,001
IL-6 in serum, pg/ml (\pm SD)	30,75 \pm 62,69	8,89 \pm 28,20	0,017
IL-33 in serum, pg/ml (\pm SD)	812,56 \pm 653,09	710,08 \pm 601,74	0,451
Pain, cm \pm SD	5,03 \pm 2,27	4,98 \pm 2,81	0,924
Patients PGA, cm \pm SD	4,6 \pm 2,47	3,81 \pm 2,98	0,197
CHAQ \pm SD	0,80 \pm 0,65	0,66 \pm 0,73	0,349
Physician PGA, cm \pm SD	4,81 \pm 2,26	3,46 \pm 1,68	0,001

We found that patients with chronic arthritis (defined after 2 year) at the baseline felt significantly more joint stiffness, had more affected joints, positive ANA and higher ESR, calprotectin and IL-6 concentrations in the serum ($p < 0,05$). According to this, we can state that prognostic factors of chronic arthritis after 1 and 2 year remained the same.

4. CONCLUSIONS

1. The disease activity best reflected by a physician's global assessment (PGA) which has significantly correlated to ESR and the number of affected joints. CRP was a less informative indicator of disease activity.

2. Juvenile arthritis multidimensional assessment report (JAMAR) allows comprehensively assessing the condition of the child suffering from arthritis better than earlier used child health assessment questionnaire (CHAQ) and is informative when determining the activity of joint disease.

3. MRP8/14 (calprotectin) and IL-6 concentrations in the serum and the synovial fluid of children with arthritis are significantly higher than the healthy control group's ($p < 0,01$). Calprotectin and IL-6 strongly correlate with disease activity indices (ESR, CRP, polyarthritis, morning joint stiffness) at the acute stage of the disease.

4. High concentrations of calprotectin ($> 5785\text{ng/ml}$) and IL-6 ($> 5,5\text{ pg/ml}$) at the acute stage of arthritis were the significant criteria of chronic joint disease. IL-33 was not significant for the prognosis of chronic disease.

5. Physician's PGA was a significant prognostic factor of chronic disease during all the observation periods, therefore this indicator shall be always assessed.

5.1. Important prognostic biomarkers: high concentrations of IL-6 in the serum, ANA determination and longer duration of arthritis until the first inspection of a rheumatologist predict the chronic disease after 6 months from its beginning.

5.2. Important prognostic biomarkers: higher concentrations of calprotectin and IL-6 in the serum, a high number of damaged joints and morning stiffness predict the chronic disease after 1 year from its beginning.

5.3. Prognosis after 1 and 2 years does not change for chronic disease.

5. PRACTICAL CLINICAL RECOMMENDATIONS

1. Calprotectin shall be included in the algorithm research of children with acute arthritis as an indicator that may predict the risk of chronic arthritis. High concentrations of calprotectin in blood serum may possibly be one of the indicators to begin a specific therapy earlier through disease-modifying treatments or biological preparations.

2. Juvenile arthritis multidimensional assessment report will be widely used in international clinical researches, because Lithuania is a member of PRINTO (Paediatric Rheumatology International Trials Organisation). We will assess the activity of the patient's disease, treatment efficiency and effect in the social activity of children by using this report in Lithuanian clinical practice. We will aim to legalize this report by addressing the issues on the need of rehabilitation treatments and social integration, as well as determining a child's disability.

3. We will submit the algorithm of chronic disease prognosis of children with acute arthritis to the practice on the basis of these results.

6. PUBLICATIONS AND SCIENTIFIC CONFERENCE REPORTS

- Rusonienė, V. Panavienė. S100 proteins in inflammatory arthritis. *Health Sciences* 2012; 6(22):194-199.
- A new assessment to clinical care of juvenile arthritis: the Juvenile Arthritis Multidimensional Assessment Report. „*Reumatologija*“, 2012.
- S. Rusonienė, V. Panaviene, M. Jakutovic, A. Eidukaite. Proinflammatory S100 proteins as clinical markers of juvenile idiopathic arthritis. *Acta Medica Lituanica*, 2014; 3.
- S. Rusonienė, V. Panaviene. Can routine clinical and laboratory data predict JIA diagnosis and disease course in acute arthritis? *Pediatric Rheumatology* 2013, 11(Suppl 2):P117 (thesis)
- S. Rusonienė, V. Panaviene, A. Eidukaite, M. Jakutovic. Prognostic factors for chronic arthritis in children with acute joint swelling. *Pediatric Rheumatology* 2014, 12 (Suppl 1):P51. (thesis)

Oral presentation

- „Proinflammatory S100 proteins as clinical markers of juvenile idiopathic arthritis“, international conference „Evolutionary medicine: perspectives in understanding health and disease“. 2014 year.
- „Clinical assessment of juvenile idiopathic arthritis“. Annual conference of Lithuanian Pediatric Society, Kaunas, 2014.
- „Evaluation of diagnostic and prognostic biomarkers in children with acute arthritis“. Annual conference of Lithuanian Pediatric Society, Kaunas, 2014.

Poster presentation:

- S. Rusonienė, V. Panavienė. A follow-up study of patients with early arthritis. *Baltic Pediatric Congress*, Vilnius, 2011.
- S. Rusonienė, V. Panaviene „Can routine clinical and laboratory data predict JIA diagnosis and disease course in acute arthritis?“ Annual PRES meeting, Ljubljana, Slovenia, 2013.
- S. Rusonienė, V. Panaviene, A. Eidukaite, M. Jakutovic. Prognostic factors for chronic arthritis in children with acute joint swelling. Annual PRES meeting, Belgrad, Serbia, 2014.

7. SUMMARY IN LITHUANIAN

Darbo aktualumas

Artritas yra lėtinė liga, pažeidžianti ne tik atramos – judėjimo sistemą, bet ir kitus organus ar jų grupes, ribojanti vaiko vystymąsi. Per metus artritais susergera apie 10 vaikų iš 100000, ir dažniausiai tai yra jaunatvinis idiopatinis artritas. Ligos eiga yra labai įvairi, aktyvią ligą keičia remisijos ir atvirkščiai. Ankstesnės studijos įrodė, kad apie 70% vaikų suaugusiųjų amžių pasiekia su tam tikru negalios lygiu ir kasdienės veiklos apribojimu. Todėl ypač aktualu nagrinėti lėtinių artritų priežastis, prognostinius veiksnius ankstyvose ligos stadijose.

Lyginti literatūroje nurodomų studijų, vertinančių ligos išeitį, duomenis yra sudėtinga, nes yra kelios lėtinių vaikų artritų klasifikacijos, skiriasi studijų modeliai bei, bėgant laikui, keičiasi gydymo galimybės. Dabartinėje gydymo eroje, kuomet nauji efektyvūs vaistai nebėra tokie agresyvūs, pagerėjo daugelio ligonių ligos išeitys, ankstesnių tyrimų išvados vaikams, sergantiems artritu, nebėra tokios aktualios.

Ligoniui susirgus artritu, iki šiol nėra patikimų sąnarių ligos aktyvumo ir funkcinės būklės vertinimo metodų. Įvertinti vaiko funkcinę būklę, literatūroje nurodomas gausus klausimynų pasirinkimas, kurie vertina įvairius vaiko sveikatos būklės aspektus, yra ilgi ir neinformatyvūs.

Išnagrinėtoje literatūroje nepakanka duomenų apie ūminius artritus bei jų eigą. Iki šiol išlieka neaišku, kokie veiksniai yra svarbūs prognozuojant lėtinės ligos vystymąsi ūminėje ligos stadijoje.

Pastaraisiais metais, tiriant JIA etiopatogenezę, atsirado daugiau duomenų apie interleukinus 1 ir 6 (IL-1, IL-6), tumoro nekrozės faktorių α (TNF- α), kaip vienus svarbiausių uždegimo mediatorių, tačiau literatūroje tūksta duomenų apie jų reikšmę ligos progresavimui ir išeičiai.

Literatūros duomenimis, S100 baltymai yra informatyviausi per pastaruosius 20 metų atrasti anksti atsirandantys kraujo serume lėtinių artritų biožmenys, jau pritaikyti klinikinėje praktikoje, kaip efektyvaus artritų gydymo rodikliai ir ligos atkryčių biožmenys. Tačiau

literatūroje neradome duomenų apie šių baltymų reikšmę prognozuojant lėtinio artrito vystymąsi.

Mokslinių darbų, tiriančių prognostinius vaikų artritų žymenis, ligos aktyvumo kriterijus, lėtinės ligos išėtis Lietuvoje nėra atlikta. Pasaulyje per pastaruosius 20 metų taip pat neatlikta jokių darbų nagrinėjančių ūminius vaikų artritus ir jų išėtis. Iki šiol daugelis klinikinių studijų orientuojasi į diagnozuotus jaunatvinius idiopatinius artritus, siekia nustatyti blogos JIA prognozės veiksnius remiantis fizine negalia, radiologiniais pokyčiais, artrito progresavimu.

Darbo tikslas

Šio darbo tikslas - nustatyti ar ūminėje ligos fazėje nustatomų laboratorinių, imunologinių ir interleukinų (MRP8/14 (kalprotektinas), IL-6, IL-33) rodiklių pokyčiai, funkcinės būklės vertinimas bei ligos aktyvumas gali prognozuoti vaikams lėtinę sąnarių ligą.

Darbo uždaviniai

1. Įvertinti vaikams, susirgusiems ūminiu artritu, sąnarių ligos aktyvumą, remiantis klinikinių, laboratorinių rodiklių ir funkcinio būklės vertinimų požymių pokyčiais;
2. Nustatyti naujai įdiegiamo Lietuvoje įvairiapusio jaunatvinių artritų vertinimo klausimyno (orig. JAMAR) informatyvumą vertinant vaiko sveikatos būklę ir palyginti jį su kitu iki šiol naudojamu vaiko sveikatos vertinimo klausimynu (orig. CHAQ) bei ligos aktyvumu;
3. Iširti ankstyvų biožymenų (MRP8/14 (kalprotektino), IL-6, IL-33) koncentracijas serume ir sąnariniam skystyje vaikams ūminėje sąnarių ligos stadijoje, ir nustatyti ryšį su ligos aktyvumu, ligos eiga ir išėtimi.
4. Įvertinti biožymenų (MRP8/14, IL-6, IL-33) reikšmę prognozuojant vaikams lėtinę sąnarių ligą.
5. Nustatyti reikšmingiausius požymių kompleksus ūminėje artrito stadijoje galinčius prognozuoti lėtinę sąnarių ligos eigą.

Darbo mokslinis naujumas

Mokslinių darbų, tiriančių prognostinius vaikų artritų žymenis, ligos aktyvumo kriterijus, lėtinės ligos išėtis Lietuvoje nėra atlikta.

Kalprotektino (MRP 8/14), IL-6 ir IL-33 koncentracijų pokyčiai kraujo serume ir sąnariame skystyje vaikams su ūminiais artritais tirti pirmą kartą. Analizuotos šių biožymenų sąsajos su infekcija susijusiais artritais bei skirtingomis JIA formomis, ūminių artritų ligos aktyvumu, vaikų funkcinio pajėgumu. IL-33 pirmą kartą tirtas vaikams su artritu.

Gauti duomenys leido išskirti reikšmingus lėtinės sąnarių prognostinius ligos požymius ligonių stebėjimo periodais (po 6 mėnesių, po 1 ir 2 metų nuo ūminės ligos pradžios). Pagal ūminėje artrito stadijoje nustatytus reikšmingus lėtinei ligai požymius, buvo sudaryti reikšmingiausių požymių kompleksai (modeliai), galintys prognozuoti lėtinę sąnarių ligos eigą.

Sergančių artritų vaikų funkcinė būklė ir vaiko gyvenimo kokybė pirmą kartą Lietuvoje buvo įvertinta naujai įdiegiamu ne tik Lietuvoje, bet ir pasaulyje, įvairiapusiu jaunatvinių artritų vertinimo klausimynu JAMAR, bei duomenys palyginti su seniau Lietuvoje naudojamu vaiko sveikatos būklės vertinimo klausimynu CHAQ.

Tiriamieji ir tyrimo metodika

Vaikų ūminių artritų diagnostinių ir prognostinių biožymenų vertinimo tyrimas atliktas 2009–2014 metais VšĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų (VUL SK) filialo Vaikų ligoninės Pediatrijos skyriuje.

Tyrimui atlikti gautas Lietuvos bioetikos komiteto 2012-01-11 leidimas Nr. 158200-01-444-125. Pacientus tyrimui pasirinkome pagal nustatytus įtraukimo ir neįtraukimo į tyrimą kriterijus.

Pirmas tyrimo etapas – ūminių artritų ištyrimas

Tiriamąjį kontingentą sudarė 188 vaikai nuo 1 iki 16 metų, kurie 2009–2014 metais buvo tiriami ir gydomi Vaikų ligoninėje, VUL SK filiale.

Tiriamąją grupę sudarė 115 vaikų, susirgusių ūminiu artritu. Kontrolinę grupę sudarė 73 ūminėmis ir lėtinėmis uždegiminėmis, bei sąnarių ir jungiamojo audinio ligomis nesergantys vaikai. Jie buvo atsitiktinai hospitalizuoti dėl alpimo, širdies ritmo sutrikimo, arterinės hipertenzijos, mažo ūgio.

Visi vaikai su ūminio artrito simptomais buvo tiriami pagal standartizuotą schemą –ligonio tyrimo anketą (specialiai sukurtą šiam tyrimui), sudarytą iš atskirų dalių: anamnezė, reumatologinis ištyrimas (ribotos funkcijos ir su aktyviu uždegimu sąnarių skaičius, rytinio sustingimo trukmė, bėrimų ir entezito lokalizacija, artrito simptomų trukmė iki pirmos reumatologo apžiūros) sąnarių ligos aktyvumo nustatymas, laboratoriniai tyrimai (ENG, CRB, ASL, RF, ANA, HLA B27). Vaikų funkcinė būklė ir gyvenimo kokybė įvertinta pagal du savo paties ligos vertinimo klausimynus: jau seniau naudojamą Vaikų sveikatos vertinimo klausimyną (CHAQ) ir naujesnį Jaunatvinio artrito įvairiapusio vertinimo klausimyną (JAMAR). Klausimynų duomenys palyginti tarpusavyje.

Pirmo vizito metu buvo imami kraujo serumo ir sąnarinio skysčio mėginiai sąnario uždegiminio pažeidimo biožymenims nustatyti (MRP 8/14, IL-6, IL-33). Serumo ir sąnarinio skysčio mėginiai iki tyrimų atlikimo dienos buvo saugomi VUL SK filialo Vaikų liginės Laboratorinės diagnostikos skyriuje (nuo 2009 iki 2014 metų). Kalprotektino, IL-6 ir IL-33 kraujo serume ir sąnariame skystyje koncentracijos buvo nustatytos imunofermeniniais metodais komerciniais LEGEND MAX Human MRP8/14 (*Calprotectin*), IL-6 ir IL-33 ELISA rinkiniais (*BioLegendInc, San Diego, JAV*) pagal rinkinių metodikas. MRP 8/14, IL-6, IL-33 tyrimai atlikti Inovatyvios medicinos centre (tyrimus atliko VULSK filialo Vaikų liginės laboratorijos mikrobiologė Svetlana Skaržinskienė).

Kraujo rodikliai buvo tiriami vadovaujantis įprastine standartine metodika per valandą nuo kraujo paėmimo VUL SK filialo Vaikų liginės Laboratorinės diagnostikos skyriuje.

Vaikai su ūminiu artritu buvo suskirstyti į grupes pagal amžių ir klinikinius duomenis (pažeistų sąnarių skaičių (olgo/poli), rytinio sąnarių sustingimo trukmę, artrito trukmę iki pirmos apžiūros).

Funkcinės būklės ir gyvenimo kokybės vertinimas

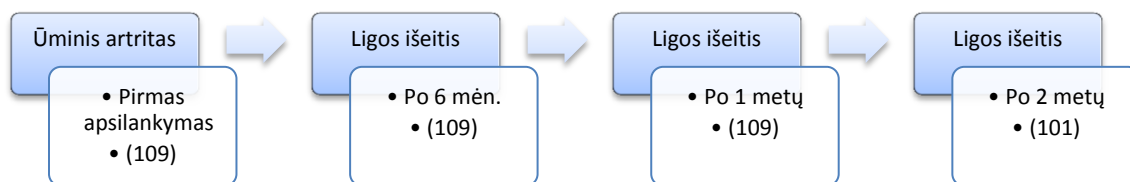
Vaikų funkcinė būklė ir gyvenimo kokybė buvo įvertinta pagal Vaikų sveikatos vertinimo klausimyną (CHAQ), kuris pasaulyje naudojamas nuo 1998 metų bei pagal naujai Lietuvoje įdiegiamą pirmą kartą naudojamą jaunatvinių artritų įvairiapusio vertinimo klausimyną (JAMAR). Duomenys palyginti tarp šių klausimynų bei su pacientų ligos aktyvumu.

Pirmo vizito metu atlikus reumatologinį ištyrimą, įvertinus ekstrasąnarinčius klinikinius simptomus, nustatytas ligos aktyvumas, remiantis ACR/PRINTO kriterijais (*JIA core set*). Įvertinus šiuos kriterijus gydytojo bendras ligos aktyvumas pažymėtas VAS skalėje. Tai subjektyvus vertinimo matas, kurį savo nuožiūra nustatė tyrėjas, atsižvelgdamas į ligos aktyvumo vertinimo kriterijus.

Antras tyrimo etapas – ligonių stebėjimas

Pirmame (ūminių artritų ištyrimo) etape 115-ai vaikų, sergančių ūminiu artritu, pagal klinikinius ir laboratorinius kriterijus nustatytos pirminės diagnozės: JIA, artritas, susijęs su infekcija, ir nediferencijuotas artritas. Antrame (ligonių stebėjimo) etape dalyvavo 109 vaikai, sergantys ūminiu artritu, kuriems buvo diagnozuotas JIA, artritas, susijęs su infekcija, ir nediferencijuotas artritas. Toliau nestebėjome kontrolinės vaikų grupės ir tų ūminių artritų ligonių, kuriems buvo nustatytos kitos diagnozės (sisteminė raudonoji vilkligė, leukemija, sarkoma, disekuojantis osteochondritas, Henoch-Schönleino purpura (HSP)).

Stebėjimo tyrime dalyvaujantys 109 vaikai buvo stebimi 2 metus tam tikrais periodais: po pirmo apsilankymo praėjus 6 mėnesiams, 1 ir 2 metams. Stebėjimo tyrimo modelis pavaizduotas 1 paveiksle.



1 pav. Ligonų stebėjimo tyrimo schema

Stebėjimo tyrimo modelyje išskyrėme 2 ligonių grupes su skirtingomis ligos išėjimais: neaktyvios ligos arba remisijos ir lėtinio artrito. Nors JIA skirstomas į 7 formas, vis tik dažniausiai išskiriamos 3 pagrindinės artritų grupės: oligoartritas, poliartritas ir artritas su sisteminė pradžia. Koks bebūtų artritas, lėtinių artritų gydymo taktika ir strategija yra vienoda, nebent būtų kalbama apie labai sunkios eigos JIA, kada reikėtų taikyti kelių preparatų ar kitą specifinę terapiją. Todėl mūsų stebėjimo modelio grupės sudarytos pagal tai, ar artritas persistuoja, t.y. įgauna lėtinę eigą, ar po trumpalaikio simptominio gydymo, kuris pradamas visiems vaikams, susirgusiems bet koku artritu, ligonis pasveiksta, t.y. liga tampa neaktyvi – pasiekama ligos remisija.

Mūsų stebėjimo tyrimo laikotarpiai taip pat pasirinkti pagal lėtinių artritų eigos vertinimo gaires. Pagal ACR/PRINTO rekomendacijas klinikinė remisija vertinama po 6 mėnesių vartojant medikamentus arba po 1 metų nevartojant medikamentų, todėl tiriami pacientai buvo stebėti po 6 mėnesių, po 1 ir 2 metų. Tam, kad pirmo vizito metu būtų galima atskirti neaktyvų artritą nuo pastovaus lėtinio artrito, suformuoti atitinkami diagnostiniai kriterijai ir apibrėžtos sąvokos

Neaktyvi liga - būklė su natūralia ligos remisija, vertinta periodais po 6 mėnesių, po 1 ir 2 metų. Natūrali remisija - būklė be artrito simptomų, t.y. sąnariai nepatinę, neskausmingi, normalios judesių amplitudės, nenaudojami vaistai artritui gydyti (ligą modifikuojantys, gliukokortikoidai, biologiniai vaistai), kuri tęsiasi metus.

Pastovus lėtinis artritas - būklė, kurios metu yra bent vieno sąnario artritas arba ligonis 2 stebėjimo metus gydomas ligą modifikuojančiais, gliukokortikoidais ar biologiniais vaistais.

Taigi, stebėjimo tyrimo modelis sudarytas siekiant ūminėje ligos stadijoje nustatyti rizikos veiksnius, kurie padėtų prognozuoti ligos eigą, t. y. atskirti lėtinės eigos artritą nuo greitai praeinančio, neaktyvaus artrito. Ankstyvoje ligos pradžioje įtarus lėtinės eigos artritą, galima būtų kuo anksčiau pradėti gydymą ir taip išvengti sunkių ligos pasekmių.

Pirmo vizito metu (pirmame ūminių artritų ištyrimo etape), įvertinę klinikinius, laboratorinius ir naujų biožymenų rodiklius, išskyrėme šiuos svarbius požymius, galinčius prognozuoti ir lemti lėtinės ligos vystymąsi:

- Klinikiniai požymiai: amžius, lytis, simptomų trukmė, pažeistų sąnarių skaičius, ekstrasąnariniai simptomai, ligos aktyvumo rodikliai.
- Laboratoriniai požymiai: ENG, CRB, ANA, HLA B27, MRP8/14, IL-6, IL-33.

Manytina, kad šie diagnostiniai kintamieji turi reikšmės prognozuojant lėtinį artritą.

Statistinė analizė

Kiekvieno paciento duomenys įvesti į specialiai sukurtą *Microsoft Excel* duomenų bazę. Statistinė analizė atlikta naudojant statistinės programos paketą SPSS (*Statistica I Package for Social Science*) (versija 20.0.1, SPSS Inc., Čikaga, JAV).

Tirtos imties kiekybinių kintamųjų (biožymenų) charakteristikos buvo skaičiuojamos naudojant vidurkius. Nominalieji kintamieji buvo pateikiami absoliučiais skaičiais ar procentine išraiška. Kiekybinių kintamųjų skirstiniams patikrinti atliktas Kolmogorovo-Smirnovo testas. Esant $p < 0,05$ – kintamojo skirstinys reikšmingai nukrypęs nuo normalaus.

Lyginant skirtingas nominaliųjų kintamųjų arba ranginių kintamųjų reikšmių grupes, buvo sudaromos požymių dažnių lentelės (angl. *crosstabs*). Dviejų kintamųjų nepriklausomumui tikrinti buvo naudojamas neparametrinis kriterijus – Chi kvadrato testas (χ^2 , angl. *Chi-Square*). Kiekybinių kintamųjų vidurkiai grupėse palyginti pagal vienfaktorinę dispersinę analizę (angl. *one-way ANOVA*). Dviejų nepriklausomų grupių kiekybiniais kintamiesiems palyginti taikytas parametrinis *Student's t* ir neparametrinis Manno-Whitney testas, o daugiau nei dviejų grupių – parametrinė dispersinė analizė ir Kruskalio-Wallis testas.

Diagnostinės, atrankinės biožymenų ir kitų požymių ypatybės buvo vertinamos naudojant ROC kreivių metodą. ROC kreivių metodu buvo apskaičiuotas plotas po kreive (AUC), kuris parodo tiriamo biožymens ar kito rizikos faktoriaus tikslumą (angl. *accuracy*). Biožymens tikslumas buvo vertinamas pagal AUC skaitinę vertę (kuo AUC artimesnis vienetui, tuo biožymuo tikslesnis; jeigu reikšmė $\leq 0,5$, biožymuo ar kiti faktoriai nepasižymi diagnostinėmis, atrankinėmis ir monitoringo savybėmis). Binarinė logistinė regresinė analizė taikyta vertinant, kaip priklausomi kintamieji (lėtinė liga) koreliuoja su nepriklausomais kiekybiniais kintamaisiais (biožymenų skaitinėmis vertėmis). Gauti regresinių modelių rezultatai tarpusavyje lyginami naudojant ROC kreives.

Modelių tinkamumas įvertintas Nagelkerke determinacijos koeficientu (norma > 0,25). Statistinis ryšys tarp kintamųjų ir koreliacijos stiprumas buvo vertinamas naudojant Pearsono tiesinės koreliacijos koeficientą. Kintamiesiems, netenkinusiems skirstinio normališkumo sąlygos, arba ranginiams kintamiesiems taikyta Spearmano koreliacinė analizė, o duomenys transformuoti į logaritminę skalę. Tikrinant statistines hipotezes buvo pasirinktas reikšmingumo lygmuo 0,05.

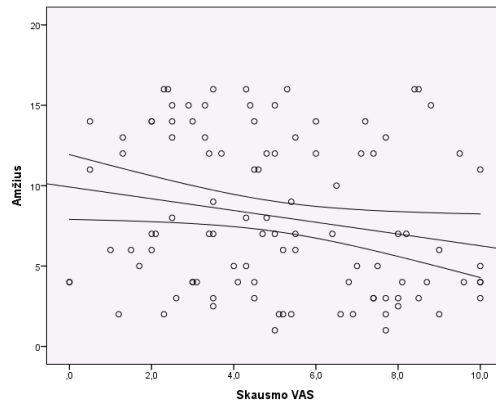
Rezultatai

Ištyrėme 115 vaikų su ūminiu artritu nuo 1 iki 16 metų amžiaus, sirgusių 2009–2013 metais. Vaikų, sergančių ūminiu artritu, vidutinis amžius buvo $9,44 \pm 4,53$ metų. Tiriamąją grupę sudarė 65 mergaitės (56,5 %) ir 50 berniukai (43,5 %). Kontrolinėje grupėje buvo ištirti 73 vaikai, kurių amžiaus vidurkis buvo $8,09 \pm 4,87$ metų. Kontrolinę grupę sudarė 49 mergaitės (67,1 %) ir 24 berniukai (32,9 %). Ūminiu artritu sergančių bei kontrolinės grupės pacientų amžiaus vidurkis ($p = 0,058$) bei pasiskirstymas pagal lytį ($p = 0,191$) statistiškai reikšmingai nesiskyrė.

Nustatėme, kad daugiausiai ūminiu artritu sirgo vaikai iki 4 metų (33,9 %). Suskirsčius ligonius stambesnėmis grupėmis (1–4, 5–8, 9–12 ir 13–16 metų), statistiškai patikimai daugiau vaikų nebuvo nė vienoje grupėje bei nenustatytas reikšmingas lyčių skirtumas ($p = 0,056$).

Padidėję ūminio uždegimo rodikliai (ENG ir CRP) kraujo serume statistiškai reikšmingai buvo didesni tarp tiriamosios grupės vaikų – tai atitiko kontrolės įtraukimo kriterijus.

Mūsų tyrime nauja yra tai, kad dažniausiai vaikai kreipėsi į gydymo įstaigą 1–4 savaitę nuo artrito simptomų pradžios. Norėdami išsiaiškinti labai ankstyvo (per 1 savaitę) kreipimosi į gydymo įstaigą, atsiradus artrito simptomams, priežastis, išnagrinėjome pacientų įvertinto skausmo ir pacientų bendro ligos aktyvumo vertinimo ryšį su simptomų trukme. Nustatėme silpną, bet statistiškai reikšmingą neigiamą koreliaciją ($r = -0,218$, $p = 0,027$) tarp ligonių amžiaus ir jų ar tėvų įvertinto skausmo skalės (2 pav.).

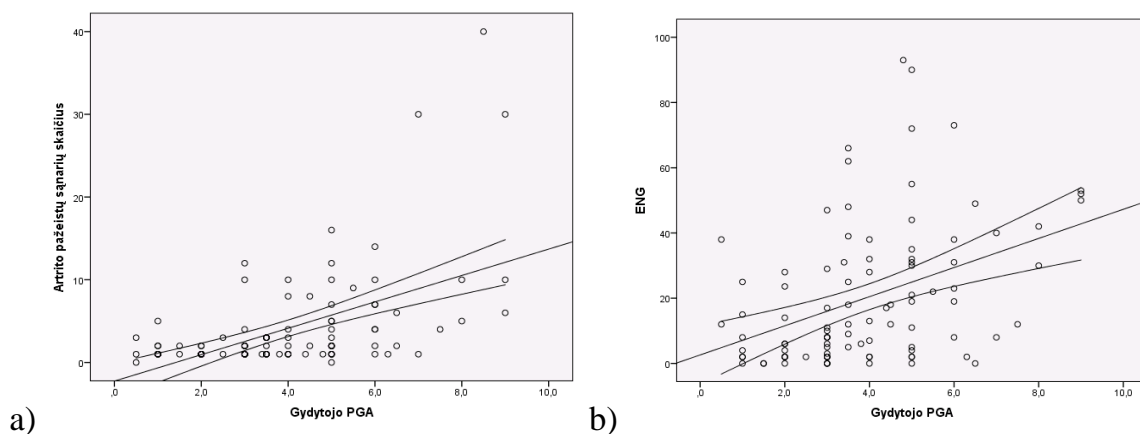


2 pav. Ligonių įvertinto skausmo priklausomybė nuo amžiaus ($r = -0,218$, $p = 0,027$)

Taigi, kuo mažesnis vaikas, tuo stipriau įvertinamas skausmas. Tačiau nereikia pamiršti, kad mažų vaikų skausmą vertina tėvai, o tai ir gali lemti didesnę skausmo įvertinimą.

Palyginę vaikų, susirgusių ūminiu artritu, pažeistų sąnarių skaičių su artrito simptomų trukme, nustatėme, kad per pirmą savaitę nuo artrito pradžios į gydymo įstaigą kreipėsi daugiau ligonių su mažai sąnarių pažeidžiančiu artritu (63,3 %).

Paaikšėjo, kad lyginant gydytojo įvertintą bendrą ligos aktyvumą (PGA) su kitais ligonių klinikiniais požymiais pirmos gydytojo apžiūros metu, radome statistiškai reikšmingą vidutinio stiprumo ryšį su artrito pažeistų sąnarių skaičiumi ($r = 0,509$, $p = 0,0001$) ir ENG ($r = 0,430$, $p = 0,0001$) (3 pav.)

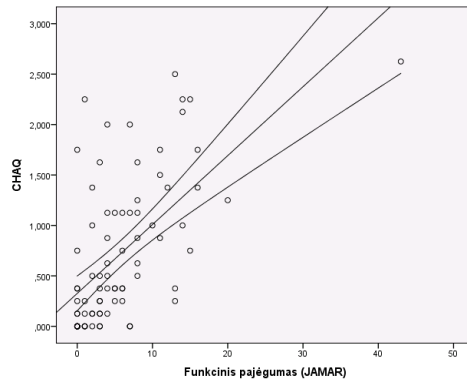


3 pav. Gydytojo PGA ryšys su: a) pažeistų sąnarių skaičiumi ($r = 0,509$, $p = 0,0001$); b) ENG ($r = 0,430$, $p = 0,0001$)

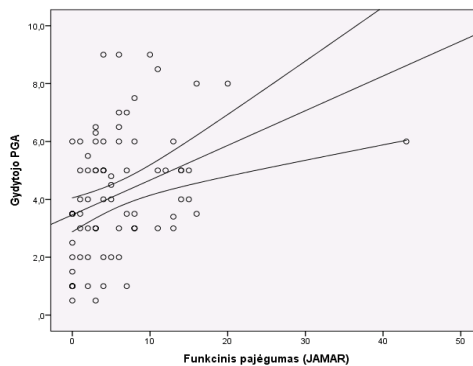
Apibendrinami šiuos duomenis, jog gydytojo PGA reikšmingai koreliavo su ENG, pažeistų sąnarių skaičiumi, pacientų įvertintu skausmu ir ligos aktyvumu, galime teigti, kad subjektyvus gydytojo PGA yra patikimas vaikų artrito klinikinės būklės vertinimo metodas.

Funkcinės būklės įvertinimas pagal CHAQ ir JAMAR klausimynus ir palyginimas su gydytojo PGA

JAMAR funkcinio pajėgumo skalė savo klausimais labai panaši į CHAQ, kuris labiausiai vertina būtent vaiko fizinį gebėjimą. Palyginome JAMAR funkcinio pajėgumo skalę su CHAQ bendru balu ir gydytojo PGA. Nustatėme stiprų ryšį su CHAQ ($r = 0,631$, $p = 0,00001$) (4 pav.) ir silpnesnę, bet statistiškai reikšmingą koreliaciją su gydytojo PGA ($r = 0,364$, $p = 0,001$) (5 pav.).



4 pav. JAMAR funkcinio pajėgumo skalės ryšys su CHAQ ($r = 0,631$, $p < 0,00001$)



5 pav. JAMAR funkcinio pajėgumo skalės ryšys su gydytojo PGA ($r = 0,364$, $p = 0,001$)

Kadangi gydytojo PGA yra reikšmingas ligos aktyvumo matas, galime teigti, kad pagal šio tyrimo duomenis JAMAR funkcinio pajėgumo skalė yra reikšmingesnė nei CHAQ funkcinės būklės vertinimo rezultatai.

1 lentelėje pateiktos kitų JAMAR klausimyno skalių sąsajos su CHAQ klausimyno skalėmis, vaiko amžiumi ir gydytojo PGA. Nustatėme, jog šių abiejų klausimynų skalės tarpusavyje yra reikšmingai susijusios (koreliacijos koeficientas svyruoja 0,295 – 0,677 ribose (vidutinio stiprumo koreliacija), $p < 0,01$).

1 lentelė. JAMAR klausimyno skalių ryšys su CHAQ skalėmis, amžiumi ir gydytojo PGA

						JAMAR			
	Amžius	Gydytojo PGA	Skausmo VAS	Savijautos VAS	CHAQ	Funkcinės būklės vertinimas	Skausmo VAS	Aktyvumo VAS	Savijautos VAS
Gydytojo PGA	-0,147								
Skausmo VAS	-0,220*	0,341**							
Savijautos VAS	0,019	0,271**	0,486**						
CHAQ	-0,140	0,424**	0,446**	0,407**					
Funkcinės būklės vertinimas (JAMAR)	-0,211	0,404**	0,478**	0,381**	0,616**				
Skausmo VAS (JAMAR)	-0,181	0,306**	0,677**	0,419**	0,489**	0,551**			
Ligos aktyvumo VAS (JAMAR)	-0,249*	0,419**	0,357**	0,295**	0,393**	0,474**	0,615**		
Bendros savijautos VAS (JAMAR)	0,062	0,313**	0,353**	0,360**	0,330**	0,445**	0,448**	0,339**	
Gyvenimo kokybės skalė (JAMAR)	-0,047	0,325**	0,337**	0,491**	0,295*	0,310**	0,370**	0,437**	0,438**

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Klausimyno duomenų vidinis patikimumas patikrintas išmatuojant Cronbacho α koeficientą: 0,762 (gero klausimyno rodiklis turi būti $> 0,5$).

Kalprotektino (MRP 8/14), IL-6 ir IL-33 koncentracijų analizė

Kalprotektino koncentracija vaikų, sergančių ūminiu artritu, serume ir sąnariame skystyje buvo daug didesnė nei kontrolinės grupės vaikų ($p < 0,05$) (18 lentelė), MRP 8/14 koncentracija sinoviniame skystyje viršijo koncentraciją serume šimtus kartų dėl vietinio uždegiminio proceso sąnaryje (2 lentelė). Taip pat nustatėme, kad kalprotektino koncentracijos sąnariame skystyje ir serume ūminėje artrito stadijoje stipriai koreliuoja ($r = 0,598$, $p < 0,001$).

2 lentelė. Kalprotektino koncentracijų palyginimas tiriamųjų ir kontrolinės grupės kraujo serume ir sinoviniame skystyje

	Ūminiai artritai (vidurkis ± SN)	Kontrolė (vidurkis ± SN)	p
MRP 8/14 serume, µg/ml	8,40 ± 7,51	4,76 ± 2,74	0,0005
MRP 8/14 sinoviniame skystyje, µg/ml	44,82 ± 112,44	0,016 ± 0,012	0,006

Mūsų duomenimis, kalprotektinas (MRP 8/14) reikšmingai koreliavo su ūminio uždegimo rodikliais: su ENG ($r = 0,538$, $p < 0,0001$) ir su CRB ($r = 0,418$, $p = 0,0001$).

IL-6 koncentracija vaikų, sergančių ūminiu artritu, serume ir sąnariame skystyje statistiškai patikimai buvo didesnė nei kontrolinės grupės vaikų ($p < 0,05$). Kaip ir kalprotektino, IL-6 koncentracija sinoviniame skystyje viršijo koncentracijas serume šimtus kartų dėl vietinio uždegiminio proceso sąnaryje (3 lentelė).

3 lentelė. IL-6 koncentracijų palyginimas tiriamųjų ir kontrolinės grupės kraujo serume ir sinoviniame skystyje

	Ūminiai artritai (vidurkis ± SN)	Kontrolė (vidurkis ± SN)	p
IL-6 serume, pg/ml	8,40 ± 7,51	4,76 ± 2,74	0,0005
IL-6 sinoviniame skystyje, pg/ml	36 917,98 ± 60643,98	108,22 ± 261,60	0,001

Nustatėme kalprotektino ir IL-6 stiprią koreliaciją kraujo serume ($r = 0,652$, $p = 0,001$).

Taip pat paaiškėjo, kad reikšmingai didesnės kalprotektino ir IL-6 koncentracijos koreliavo su didesniu pažeistų sąnarių skaičiumi (poliartritu) (abiem atvejais $p < 0,01$).

Mūsų tyrimo duomenimis, IL-33 skyrėsi nuo kalprotektino ir IL-6. Palyginus pacientų su ūminiais artritais grupę su kontroline sveikų vaikų grupe, nustatytos taip pat didesnės IL-33 koncentracijos tiek serume, tiek sąnariniam skystyje, tačiau reikšmingai koncentracijos skyrėsi tik pacientų kraujo serume ($p < 0,01$). Nustatėme, kad IL-33 koncentracija serume nestipriai, bet statistiškai patikimai neigiamai koreliuoja su vaiko amžiumi. Kuo mažesnis vaikas, tuo IL-33 koncentracija serume didesnė ($r = -0,335$, $p = 0,001$). Literatūroje yra duomenų, įrodančių IL-33 koreliaciją serume su ligonio amžiumi, bet tyrimai atlikti tik su suaugusiais. Lygindami IL-33 koncentracijas su ligonių klinikiniais požymiais, nustatėme vienintelę reikšmingą silpną sąsają su ANA ($r = 0,230$, $p = 0,03$).

Ligonių ilgalaikio stebėjimo duomenys

Siekdami ūminėje ligos stadijoje nustatyti reikšmingus lėtinės ligos prognostnius biožymenis, dvejus metus stebėjome 109 ligonius. Išėjis vertinome po 6 mėnesių, 1 ir 2 metų. Po 6 mėnesių remisiją pasiekė apie pusė ligonių, lėtinę ligą turėjo 51 (46,8 %), neaktyvią ligą arba remisiją 58 ligoniai (53,2 %). Po 1 metų lėtinė liga nustatyta 41 ligoniui (37,6 %), neaktyvi – 68 ligoniams (62,4 %). Po 2 metų įvertintos 103 vaikų ligos išėjys (6 ligoniams nesuėjo 2 metų stebėjimo laikotarpis), iš jų lėtine liga sirgo 33 (38,7 %), remisija tęsėsi 68 ligoniams (61,3 %).

Ligonių, susirgusių ūminiu artritu, lėtinės sąnarių ligos progresavimui prognozuoti sudaryti logistinės regresijos modeliai. Jais remiantis prognozuota lėtinio artrito atsiradimo per 2 metus tikimybė. Pirmuoju logistinės regresijos etapu tirtas atskirų nagrinėjamų klinikinių ir laboratorinių požymių statistinis reikšmingumas. Antruoju etapu, naudojant pažingsnio procedūras, nustatyti statistiškai reikšmingi lėtinės sąnarių ligos po 6 mėnesių, 1 ir 2 metų prognostiniai požymiai.

Į binarinės logistinės regresinės analizės pažingsnio (angl. *Enter*) modelį buvo įtraukti visi kintamieji, kurie vienaveiksmėje prognozėje turėjo reikšmingą įtaką lėtinei ligai mūsų

numatytais periodais. Kintamųjų tikslumas (angl. *accuracy*) buvo vertinamas taikant ROC kreivių metodą ir apskaičiuojant plotą po kreive (AUC).

Lėtinės ligos ir remisijos grupių (įvertinus po 6 mėn.) vaikų klinikiniai, funkcinės būklės, laboratoriniai ir biožymenų rodikliai palyginami 4 lentelėje.

4 lentelė. Vaikų su lėtiniu artritu ir remisija, konstatuotais po 6 mėnesių nuo ligos pradžios, klinikiniai, funkcinės būklės, laboratorinių ir biožymenų rodiklių duomenys

Rodiklis	Lėtinė liga (n = 51)	Remisija (n = 58)	p reikšmė
Amžius, metai ± SN	7,47 (± 4,92)	8,55 (± 4,72)	0,245
Lytis (M/B)	31/20	28/30	0,194
Simptomų trukmė iki 1 savaitės (n, %)	11,8 %	37,9 %	0,006
Rytinį sąnarių sustingimą juto, %	54,9	22	0,001
Pažeistų sąnarių skaičius, vidurkis (min.–maks.)	5,53 (1–40)	2,72 (1–14)	0,015
Teigiami ANA, %	47,8	4,2	0,001
Teigiamas HLA B27, %	38,6	27,3	0,262
ENG, mm/val. ± SN	25,0 ± 23,1	16,21 ± 18,45	0,039
CRB, mg/l ± SN	18,10 ± 29,62	10,37 ± 19,66	0,115
Kalprotektinas serume, µg/ml (± SN)	9,65 ± 8,33	7,22 ± 6,71	0,095
IL-6 serume, pg/ml (± SN)	23,44 ± 52,17	9,12 ± 30,32	0,08
IL-33 serume, pg/ml (± SN)	820,91 ± 649,41	622,7 ± 566,78	0,105
Skausmas, cm ± SN	4,84 ± 2,41	5,24 ± 2,88	0,445
Paciento / tėvų PGA, cm ± SN	4,30 ± 2,57	3,85 ± 2,97	0,416
CHAQ ± SN	0,76 ± 0,66	0,67 ± 0,74	0,537
Gydytojo PGA, cm ± SN	4,67 ± 2,06	3,28 ± 1,73	0,001

Ligoniai, kuriems nustatyta lėtinė sąnarių liga po 6 mėnesių, pirmo vizito metu reikšmingai labiau jautė stipresnį rytinį sąnarių sustingimą, turėjo daugiau pažeistų sąnarių, dažniau nustatyti teigiami ANA ir nustatytas didesnis ENG.

Vienmate analize nustatyta lėtinio artrito išsivystymo koreliacija su tyrimo pradžioje nustatytais klinikiniais ir laboratoriniais požymiais. Požymiai apibūdinti šansų santykiu ir jų pasikliautiniais intervalais, o jų priklausomybė – reikšmingumo lygmeniu p (5 lentelė).

5 lentelė. Tiriamųjų, sergančių lėtine sąnarių liga (n = 41), pirmo vizito metu nustatytų nagrinėjamų požymių ryšys su lėtinės ligos raida po 6 mėn. (vienmatė analizė)

Požymiai	Lėtinė sąnarių liga	ŠS (ŠS 95 % PI)	P
Artrito trukmė > 4 savaitės, n (%)	25 (49,0)	4,37 (1,49–12,77)	0,007
Artrito trukmė > 6 savaitės, n (%)	20 (39,2)	4,89 (1,59–15,04)	0,006
Pažeistų sąnarių skaičius, vidurkis	5,53	1,12 (1,01–1,24)	0,033
Juto rytinį sustingimą > 15 min., n (%)	39 (76,5)	3,88 (1,61–9,39)	0,003
ENG > 22 mm/val.*	23 (48,9)	2,53 (1,09–5,87)	0,03
IL-6 > 5,5 pg/ml*	26 (51,0)	2,67 (1,2–5,91)	0,016
Teigiami ANA (> 1:200)	22 (47,8)	21,08 (4,57–97,30)	0,0001

PI – pasikliautinis intervalas. *ROC testu nustatytos slenkstinės ENG ir IL-6 reikšmės

Laboratorinių ir biožymenų rodiklių reikšmingos skaitmeninės reikšmės (ENG > 22 mm/val., IL-6 > 5,5 pg/ml) nustatytos ROC testu. Tai yra slenkstinės reikšmės, kai sirgusiųjų ir nesirgusiųjų grupės skiriasi didžiausiu tikslumu, t. y. minimalus klaidingai neigiamas ir klaidingai teigiamas rezultatas.

Ryšio tarp nagrinėjamųjų požymių nepriklausomumui įvertinti sudaryta Spearmano koreliacinė analizė. Norint sumažinti koreliaciją arba išvengti multikolinearumo, buvo sudaryti mažiausiai koreliuojančių požymių deriniai ir jie toliau tirti logistinės regresijos metodu. Tolesnės statistinės analizės pažingsnio procedūros parodė statistiškai reikšmingas tiriamų galimai prognostinių veiksnių sąsajas (pirmas ir antras modeliai) su lėtinio artrito progresavimu per pirmus 6 mėnesius nuo ligos pradžios (6 ir 7 lentelės).

6 lentelė. Tiriamųjų, sergančių lėtiniu artritu, konstatuotu po 6 mėnesių nuo ligos pradžios, logistine regresine analize nustatyto požymių derinio ryšys su lėtinės ligos progresavimu (pirmas modelis)

Analizuojami požymiai	Lėtinė liga po 6 mėnesių	
	šansų santykis (95 % PI)	P
Ligos simptomų trukmė > nei 4 savaitės	7,97 (1,95–32,64)	0,004
IL-6 serume > 5,5 pg/ml	4,08 (1,16–14,36)	0,029
ANA nustatymas	20,61 (3,73–113,94)	0,001
Konstanta –2,635, p < 0,001, Nagelkerke determinacijos koeficientas 0,503		

7 lentelė. Tiriamųjų, sergančių lėtiniu artritu, konstatuotu po 6 mėnesių nuo ligos pradžios, logistine regresine analize nustatyto požymių derinio ryšys su lėtinės ligos progresavimu (antras modelis)

Analizuojami požymiai	Lėtinė liga po 6 mėnesių	
	šansų santykis (95 % PI)	p
Ligos simptomų trukmė > nei 4 savaitės	9,94 (2,33–42,4)	0,002
Rytinis sąnarių sustingimas	3,82 (1,12–13,02)	0,032
IL-6 serume > 5,5 pg/ml	6,18 (1,67–22,93)	0,006
ANA nustatymas	20,88 (3,71–117,58)	0,001
Konstanta -2,635, p < 0,001, Nagelkerke determinacijos koeficientas 0,518		

Taigi įrodėme, kad kartu nustatomi ANA su didesne nei 5,5 pg/ml IL-6 koncentracija serume ir artrito simptomais, užsitęsusiais ilgiau nei 4 savaitės, su rytiniu sąnarių sustingimu statistiškai reikšmingai ($p < 0,001$) prognozuoja lėtinio artrito išsivystymą per 6 mėnesius nuo ligos pradžios vaikams, susirgusiems ūminiu artritu. Abiejų modelių Nagelkerke determinacijos koeficientai (atitinkamai 0,503 ir 0,518) rodo, kad modeliai sudaryti gerai (turi būti > nei 0,25) ir teisingai prognozuoja 79,5 % lėtinės ligos atvejų.

Tokiu pačiu principu buvo tirti lėtinės ligos, įvertintos po 1 metų, prognostiniai veiksniai. Lėtinės ligos ir remisijos grupės vaikų klinikiniai, funkcinės būklės, laboratoriniai ir biožymenų rodikliai palyginti 8 lentelėje.

8 lentelė. Vaikų su lėtiniu artritu ir remisija, konstatuotais po 1 metų nuo ligos pradžios, klinikinių, funkcinės būklės, laboratorinių ir biožymenų rodiklių duomenys

Rodiklis	Lėtinė liga (n = 41)	Remisija (n = 68)	p reikšmė
Amžius, metai ± SN	7,90 (± 5,11)	8,13 (± 4,68)	0,648
Lytis (M/B)	27/14	32/36	0,058
Simptomų trukmė iki 1 savaitės (n, %)	17,1 %	45,6 %	0,001
Rytinį sąnarių sustingimą juto, %	53,7	27,9	0,007
Pažeistų sąnarių skaičius, vidurkis (min.–maks.)	6,39 (1–40)	2,62 (1–14)	0,001
Teigiami ANA, %	47,4	10,7	0,001
Teigiamas HLA B27, %	38,9	28,8	0,330

8 lentelės tęsinys

ENG, mm/val. ± SN	25,78 ± 23,45	17,32 ± 19,24	0,056
CRB, mg/l ± SN	19,10 ± 31,31	10,82 ± 19,72	0,099
Kalprotektinas serume, µg/ml (± SN)	10,66 ± 8,40	6,96 ± 6,72	0,013
IL-6 serume, pg/ml (± SN)	26,72 ± 57,33	9,25 ± 28,57	0,037
IL-33 serume, pg/ml (± SN)	801,67 ± 654,96	666,77 ± 585,07	0,284
Skausmas, cm ± SN	5,03 ± 2,42	5,06 ± 2,82	0,965
Paciento / tėvų PGA, cm ± SN	4,36 ± 2,47	3,88 ± 2,98	0,400
CHAQ ± SN	0,78 ± 0,64	0,66 ± 0,73	0,412
Gydytojo PGA, cm ± SN	4,62 ± 2,33	3,50 ± 1,65	0,005

Skirtingai nei po 6 mėnesių, vaikams, kuriems po 1 metų konstatuotas lėtinis artritas, nustatytos reikšmingai didesnės kalprotektino ($p = 0,013$) ir IL-6 ($p = 0,037$) koncentracijos. Vienmatė klinikinių ir laboratorinių požymių, turinčių reikšmingą įtaką lėtinio artrito vystymuisi per 1 metus, analizė vykdyta tuo pačiu principu, kaip ir 6 mėnesių stebėjimo laikotarpiu. Vienmatės analizės rezultatai pateikti 9 lentelėje.

9 lentelė. Tiriamųjų, sergančių lėtine sąnarių liga ($n = 41$), pirmo vizito metu nustatytų nagrinėjamų požymių ryšys su lėtinės ligos raida po 1 metų (vienmatė analizė)

Požymiai (pirmo vizito metu)	Lėtinė sąnarių liga	Šansų santykis (ŠS 95 % PI)	p
Pažeistų sąnarių skaičius > 5* n (%)	15 (36,6)	5,03 (1,84 – 13,77)	0,002
Poliartritas n (%)	16 (61,5)	3,58 (1,43 – 8,99)	0,007
Juto rytinį sustingimą > 15 min., n (%)	33 (51,6)	4,92 (1,99 – 12,2)	0,001
ENG > 4,5 mm/val.* n(%)	31 (44,3)	3,66 (1,25 – 10,72)	0,018
IL-6 serume > 6,2 pg/ml* n(%)	26 (51,0)	3,41 (1,49 – 7,77)	0,004
Kalprotektinas serume > 5,785 µg/ml *	28 (50)	3,08 (1,36 – 6,96)	0,007

PI – pasikliautinis intervalas.

*ROC testu nustatytos slenksinės pažeistų sąnarių skaičiaus, ENG, IL-6 ir kalprotektino reikšmės

Ryšio tarp nagrinėjamųjų požymių nepriklausomumui įvertinti sudaryta Spearmano koreliacinė analizė. Siekiant išvengti multikolinearumo, taip pat buvo sudaryti mažiausiai koreliuojančių požymių deriniai ir jie toliau tirti logistinės regresijos metodu. Tolesnės

statistinės analizės pažingsnio procedūros parodė statistiškai reikšmingas tiriamų galimai prognostinių veiksnių sąsajas (pirmas ir antras modeliai) su lėtinio artrito progresavimu per pirmus 6 mėnesius nuo ligos pradžios (10 ir 11 lentelės).

10 lentelė. Tiriamųjų, sergančių lėtiniu artritu, konstatuotu po 1 metų nuo ligos pradžios, logistine regresine analize nustatyto požymių derinio ryšys su lėtinės ligos progresavimu (pirmas modelis)

Analizuojami požymiai	Lėtinė liga po 1 metų	
	šansų santykis (95 % PI)	p
Sąnarių skaičius > nei 5	8,68 (2,15–35,04)	0,002
Rytinis sąnarių sustingimas	6,3 (1,2–19,88)	0,002
Kalprotektinas serume > 5,785 µg/ml	4,37 (1,59–12,02)	0,004
Konstanta –2,903, p < 0,001, Nagelkerke determinacijos koeficientas 0,380		

11 lentelė. Tiriamųjų, sergančių lėtiniu artritu, konstatuotu po 1 metų nuo ligos pradžios, logistine regresine analize nustatyto požymių derinio ryšys su lėtinės ligos progresavimu (antras modelis)

Analizuojami požymiai	Lėtinė liga po 1 metų	
	šansų santykis (95 % PI)	p
Poliartritas	3,88 (1,28–11,76)	0,017
Rytinis sąnarių sustingimas	3,82 (1,12–13,02)	0,032
IL-6 serume > 6,2 pg/ml	3,17 (1,21–8,26)	0,019
Konstanta –2,438, p < 0,001, Nagelkerke determinacijos koeficientas 0,343		

Taigi, remdamiesi logistinės regresinės analizės metodu, įrodėme, kad pirmo modelio požymių kompleksas (pirmos apžiūros metu kartu nustatyti daugiau nei 5 artrito pažeisti sąnariai kartu su RS ir padidėjusia kalprotektino koncentracija serume (µg/ml)) reikšmingai prognozuoja lėtinės ligos vystymąsi per 1 metus. Pirmo modelio bendras teisingai klasifikuotų stebėjimų procentas yra 73,7 %. Antro modelio požymių kompleksas (kartu nustatytas poliartritas su RS ir didesne nei 6,2 pg/ml IL-6 koncentracija) taip pat statistiškai reikšmingai didina galutinio lėtinio artrito atsiradimo riziką. Antro modelio bendras teisingai klasifikuotų stebėjimų procentas yra toks pat – 73,7 %.

Tyrėme prognostinius lėtinės ligos, įvertintos po 2 metų, veiksnius. Lėtinės ligos ir remisijos (įvertintos po 2 metų) vaikų grupės klinikiniai ir laboratoriniai rodikliai palyginti 12 lentelėje.

12 lentelė. Vaikų su lėtiniu artritu ir remisija, konstatuotais po 2 metų nuo ligos pradžios, klinikinių ir laboratorinių rodiklių duomenys

Rodiklis	Lėtinė liga (n = 33)	Remisija (n = 70)	p reikšmė
Amžius, metai ± SN	7,73 ± 5,37	8,14 ± 4,65	0,688
Lytis (M/B)	22/11	36/34	0,068
Simptomų trukmė iki 1 savaitės (n, %)	12,1 %	31,4 %	0,161
Rytinį sąnarių sustingimą juto, %	57,6	28,6	0,0001
Pažeistų sąnarių skaičius, vidurkis (min.– maks.)	6,70 (1–40)	2,79 (1–16)	0,002
Teigiami ANA, %	48,4	15,5	0,001
Teigiamas HLA B27, %	50	25	0,022
ENG, mm/val. ± SN	28,37 ± 24,61	16,76 ± 18,65	0,013
CRB, mg/l ± SN	22,39 ± 33,70	9,76 ± 19,35	0,020
Kalprotektinas serume, µg/ml (± SN)	11,22 ± 8,31	6,23 ± 5,57	0,001
IL-6 serume, pg/ml (± SN)	30,75 ± 62,69	8,89 ± 28,20	0,017
IL-33 serume, pg/ml (± SN)	812,56 ± 653,09	710,08 ± 601,74	0,451
Skausmas, cm ± SN	5,03 ± 2,27	4,98 ± 2,81	0,924
Paciento / tėvų PGA, cm ± SN	4,6 ± 2,47	3,81 ± 2,98	0,197
CHAQ ± SN	0,80 ± 0,65	0,66 ± 0,73	0,349
Gydytojo PGA, cm ± SN	4,81 ± 2,26	3,46 ± 1,68	0,001

Iš 13 lentelės matome, kad lėtinei ligai prognozuoti po 2 metų logistinės regresinės analizės metu išskirti tie patys reikšmingi kriterijai. Todėl teigiame, kad ūminėje artrito stadijoje nustatčius reikšmingus požymius: rytinį sąnarių sustingimą, daugiau pažeistų sąnarių

(poliartritas), padidėjusį ENG ir dideles kalprotektino bei IL-6 koncentracijas kraujo serume, lėtinės ligos prognozė po 1 po 2 metų nesikeičia.

Išvados

1. Ligos aktyvumą geriausiai atspindi gydytojo bendras ligos aktyvumo nustatymas (PGA), kuris reikšmingai koreliavo su ENG, pažeistų sąnarių skaičiumi. CRB - mažiau informatyvus ligos aktyvumo rodiklis.

2. Naujas jaunatvinių artritų vertinimo klausimynas (orig. JAMAR) geriau nei anksčiau naudotas vaiko sveikatos vertinimo klausimynas (orig. CHAQ) leidžia visapusiškai įvertinti artritu sergančio vaiko būklę ir yra informatyvus nustatant sąnarių ligos aktyvumą.

3. Artritu susirgusiems vaikams MRP8/14 (kalprotektino) ir IL-6 koncentracijos reikšmingai didesnės nei kontrolinės grupės vaikams tiek serume, tiek sinoviniame skystyje ($p < 0,01$). Kalprotektinas ir IL-6 ūminėje ligos stadijoje stipriai koreliuoja su ligos aktyvumo rodikliais (ENG, CRB, sąnarių pobūdžiu (poliartritu), rytiniu sąnarių sustingimu).

4. Didelės kalprotektino ($> 5785\text{ng/ml}$) ir IL-6 ($> 5,5\text{ pg/ml}$) koncentracijos ūminėje artrito stadijoje buvo reikšmingi lėtinės sąnarių ligos kriterijai. IL-33 nebuvo reikšmingas lėtinės ligos prognozei.

5. Gydytojo PGA reikšmingas lėtinės ligos prognostinis veiksnys visais stebėjimo periodais, todėl šis rodiklis turi būti vertinamas nuolat.

5.1. Prognostiškai svarbūs biožymenys: padidėjusi IL-6 koncentracija serume, ANA nustatymas, ilgesnė artrito trukmė iki pirmos reumatologo apžiūros, prognozuoja lėtinę ligą po 6 mėnesių nuo ligos pradžios.

5.2. Prognostiškai svarbūs biožymenys: padidėjusios kalprotektino ir IL-6 koncentracijos serume, didelis pažeistų sąnarių skaičius, rytinis sustingimas prognozuoja lėtinę ligą po 1 metų nuo ligos pradžios.

5.3. Prognozė po 1 ir 2 metų lėtinei ligai nesikeičia.

PRAKTINĖS KLINIKINĖS REKOMENDACIJOS

1. Kalprotektinas turi būti įtraukiamas į ūminiu artritu susirgusių vaikų tyrimų algoritmą, kaip rodiklis galintis prognozuoti lėtinio artrito riziką. Didelė kalprotektino koncentracija kraujo serume galėtų būti vienas iš rodiklių anksčiau pradėti specifinę terapiją ligą modifikuojančiais ar biologiniais preparatais.
2. Jaunatvinio artrito įvairiapusio vertinimo klausimynas yra ir bus plačiai naudojamas tarptautiniuose klinikiniuose tyrimuose (Lietuva - PRINTO narys). Sieksime įteisinti JAMAR spręsti reabilitacinio gydymo, socialinės integracijos reikalingumo, vaiko neįgalumo nustatymo klausimus.
3. Remiantis darbo rezultatais pateiktas projektas SAM - “Vaikų ūminių artritų diagnostikos ir gydymo algoritmas” (V. Panavienė, S. Rusonienė, E. Landzbergytė, 2014)

8. BIOGRAPHY

Name: Skirmantė Rusonienė

Date of birth: 26 of December 1977

Address: Department of Pediatrics, Children's Hospital, Affiliate of Vilnius University Hospital Santariskiu Klinikos, Santariskiu str. 7,
LT-08406 Vilnius, Lithuania

Phone (work): +37052720431

E-mail: skirmante.rusoniene@vuvl.lt

Languages: Lithuanian – native, English, Russian

Medical education:

1995 – 2002 Faculty of Medicine of Vilnius University, program of Therapeutic Studies

2002 – 2004 Internship in Medical Doctors, Faculty of Medicine of Vilnius University

2004 – 2008 Residentsip in Pediatrics, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine of Vilnius University

2008 – 2010 Residentsip in Pediatric Cardiology, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine of Vilnius University

2010 – 2014 Doctoral study program in Pediatric Rheumatology field, Faculty of Medicine of Vilnius University

Work experience:

2002 – 2004	Ukmerge Hospital
2010-2012	Children's Hospital, Affiliate of Vilnius University Hospital Santariskiu Klinikos, Emergency Department
Since 2012	Children's Hospital, Affiliate of Vilnius University Hospital Santariskiu Klinikos, Department of Pediatrics

Courses and training:

2009	First European Pediatric Rheumatology Fellow Course, Antalya, Turkey
2009	Intensive Course in Applied Epidemiology, Aberdeen, Scotland, UK