

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛОВДИВ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО ПРОПЕДЕВТИКА НА ВЪТРЕШНИТЕ БОЛЕСТИ



д-р Павел Титов Селимов

**РОЛЯТА НА АНТИТЕЛАТА СРЕЩУ
МОДИФИЦИРАН ЦИТРУЛИНИРАН ВИМЕНТИН В
КЛИНИЧНАТА ПРАКТИКА ПРИ ПАЦИЕНТИ С
РЕВМАТОИДЕН АРТРИТ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен

„Доктор“

Научни ръководители: проф. д-р Анастас Згуров Баталов, дм

проф. Ана Манева, дбн

Шифър на специалността програма Ревматология: 03.01.18

ПЛОВДИВ 2020

Дисертационният труд е написан на 218 стандартни машинописни страници, илюстриран е с 17 фигури и 32 таблици. В библиографския списък са цитирани 208 източника, от които 13 на кирилица и 195 на латиница.

Във връзка с дисертационния труд са отпечатани 1 статия в чуждестранно списание, 2 в българско списание, реализирани са 2 участия в български форуми, 1 участие в университетски проект.

Дисертационният труд е обсъден на 10.01.2019 год. на заседание на разширен Катедрен съвет на Катедра по Пропедевтика на вътрешните болести при Медицински факултет, Медицински университет – Пловдив и е насочен за защита към Научно жури в състав:

1. Проф. д-р Анастас Згуров Баталов, дм
МУ – Пловдив, Катедра „Пропедевтика на вътрешните болести“
Клиника по ревматология, УМБАЛ „Каспела“
2. Проф. д-р Мария Стоянова Панчовска-Мочева, дм
МУ – Пловдив, Катедра „Пропедевтика на вътрешните болести“
3. Проф. д-р Йордан Вълков Иванов, дмн
МБАЛ „Св. Мина“ Пловдив
4. Проф. д-р Доброслав Станимиров Кюркчиев, дмн
МУ – София, Катедра клинична лаборатория и клинична имунология,
Лаборатория по клинична имунология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“
5. Доц. д-р Николай Георгиев Николов, дм
МУ – Плевен, Катедра „Кардиология, пулмология, ендокринология“,
Клиника по ревматология, УМБАЛ „Георги Странски“

Резервни членове

1. Доц. д-р Кирил Надков Яблански, дм
МБАЛ „Св. Пантелеймон“ Клиника по ревматология – Плевен
2. Доц. Мария Велинова Казакова, дб
МУ – Пловдив, Катедра „Медицинска биология“

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на,
в часа, в аудитория на Аудиторен комплекс на МУ – Пловдив.
Материалите по защитата на дисертационния труд са на разположение в Научен
отдел на МУ – Пловдив.

СЪДЪРЖАНИЕ:

ВЪВЕДЕНИЕ	5
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	6
Цел.....	6
Задачи	6
МЕТОДИ И МАТЕРИАЛИ	7
Пациенти	7
Включващи и изключващи критерии	8
Методи.....	9
РЕЗУЛТАТИ	13
Задача 1: Да се изследва ролята на автоантителата анти-ССР и анти-МСV в диагностичен аспект при РА.	13
Задача 2: Да се изследва наличие на връзка между серумните нива на анти- ССР и анти-МСV антителата, като изява на имунологична активност с ултрасонографския индекс за синовит US7 при пациенти с РА.	22
Задача 3: Да се изследва и оцени наличието на връзка между анти-CarP антителата с анти-МСV, анти-ССР и РФ при пациенти с РА и връзката между тютюнопушенето и позитивирание на анти-CarP антителата.	25
Задача 4: Да се изследва наличието на връзка между РG и РА, между РG и анти-МСV и анти-ССР антитела в серум на пациенти с РА, както между и РG и тютюнопушене при пациенти с РА.	35
Задача 5: Да се изследва наличието на връзка между серумните нива на възпалителния медиатор IL-17 и антителата анти-ССР, анти-МСV и анти- CarP при болни с РА.....	41
Задача 6: Да се изследват родственици на пациенти с РА за наличие на серопозитивност по отношение на анти-ССР, анти-МСV и анти-CarP антителата.....	43
ОБСЪЖДАНЕ	47
ИЗВОДИ	65
ПРИНОСИ	67
ПУБЛИКАЦИИ, НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ	68

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

Анти-CarP антитела - антитела към карбамилирани протени

Анти-МСV антитела - антитела към модифициран/мутирал цитрулиниран виментин

Анти-ССР антитела - антитела към циклични цитрулинирани протеини

ПД - Пародонтит

РА - Ревматоиден артрит

РФ - ревматоидни фактори

АСРА - антитела-антицитрулинирани пептидни антитела

ACR - American College of Rheumatology

CDAI - Clinical Disease Activity Index

CIA - collagen-induced arthritis

DAS - Disease Activity Score

FDRs - първостепенни роднини

HLA - human leukocyte antigen

LPS - липополизахарид

MHC - major histocompatibility complex

MPO - миелопероксидазата

MRI - Magnetic resonance imaging

OPG - остеопротегерин

PAD - пептидил аргинин деиминаза

PCR - полимеразна верижна реакция

PG - Porphyromonas gingivalis

PTM - пост-транслационна модификация

RANK - рецепторен агонист на NK-kB

RANKL - RANK лиганд

RAPID 3 - Routine Assessment of Patient Index Data 3

SDAI - Simplified Disease Activity Index

SE - Shared epitope

SLE - системен лупус еритематозус

US - Ultrasonography

ВЪВЕДЕНИЕ

Ревматоидният артрит (РА) е хронично системно възпалително заболяване с основна клинична проява симетричен прогресиращ ерозивен полиартрит, който води до разрушаване на хрущяла и костта и прогресивна необратима ставна деструкция. Клиничните манифестации включват и редица извънставни прояви.

РА е най-често срещаната автоимунна ставна болест и най-често срещаният вид възпалителна артропатия. Разпространен е по целия свят, засяга всички раси, като според различни данни боледуват приблизително 0,5%-1% от населението в Европа и Северна Америка, среща се при 4,5% от хората над 55 години.

Счита се, че в България честотата на заболяването е между 1,31% за жените и 0,46% за мъжете - близка до честотата в световен мащаб. По данни към 2002 год. у нас боледуващите са били между 50 хил. и 60 хил. души от населението.

Клиничната картина и протичане показват изразен полиморфизъм и вариабилност – наблюдават се както варианти с бавна прогресия, така и бързопрогресиращи, агресивни, тежки форми с висока възпалителна активност. РА е заболяване с голяма социална значимост. Освен негативното отражение върху качеството на живот поради прогресиращата инвалидизация при болните, заболяването дава отражение и върху продължителността на живота, води до преждевременна смъртност. При мъжете, засегнати от РА продължителността на живота намалява средно с около 4 години, а при жените с около 10 години. Причина за това са най-често усложнения като инфекции, сърдечно-съдови, бъбречни, стомашно-чревни компликации, по-често изявени при ранно поражение върху двигателната функция, при случаите с остро протичане, висцерално засягане и съпътстващи заболявания. Развиващата се анемия при болни с РА може да е причина за акцелерация на други симптоми и влошаване на придружаващи заболявания. Според статистически доклади за 1994 г. в САЩ стойността на преките разходи, свързани с РА възлизат на стойност между 4 и 5 милиарда долара, а непреки разходи, свързани с последиците от заболяването по отношение на изплащане на заплати и повлияващи производителността се приближават до 20 милиарда долара годишно.

Изследователския интерес, свързан със заболяването се фокусира върху характеризиране на патогенните събития, настъпващи в ранния период на РА преди неговото начало, очертаващи „терапевтичен прозорец на възможност“ - кратък период от време за започване на ефикасна терапевтична интервенция, целяща трайна ремисия и изпреварваща дефинитивно структурно увреждане.

Етиологията на заболяването остава неизвестна, но е актуална тезата, която разглежда РА като автоимуно полигенно заболяване, в чиято патогенезата участват както генетични фактори, така и фактори на околната среда, включително и инфекциозни агенти.

Израз на автоимунния характер на РА е наличието на автоантитела, които имат стойност на диагностични маркери и индикатори, свързани с прогнозата на заболяването. Такива са антителата от групата на АСРА – анти-цитрулинирани пептидни антитела. Откриването им в серума на болните предхожда клиничния дебют на болестта и играе значителна роля за ранно диагностициране на РА. Оценката на потенциалните възможности на всички отделни представители от тази група, каквито са анти-МСV антителата е допълнителна приложна възможност в ревматологичната практика. Настоящото проучване е фокусирано върху изследване и анализ на ролята на тези антитела при болни с РА и потенциални фактори, свързани с тяхната продукция.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛ

Да се проучи значението на анти-МСV антителата и свързани с тях фактори при пациенти с РА.

За реализиране на посочената цел, при стартиране на изследването бяха обособени следните задачи:

ЗАДАЧИ:

Задача 1: Да се изследва ролята на автоантителата анти-ССР и анти-МСV в диагностичен аспект при РА.

- Да се определят специфичност, чувствителност, положителна и отрицателна предиктивна стойност на анти-ССР и анти-МСV антителата при болни с РА.

- Да се изследва и съпостави титъра на анти-ССР и анти-МСV антителата в серум и синовиална течност при болни с РА.

- Да се изследва и оцени връзката между екзогенния фактор тютюнопушене и позитивирането на автоантителата анти-МСV и анти-ССР в серум на пациенти с РА.

Задача 2: Да се изследва наличие на връзка между серумните нива на анти-ССР и анти-МСV антителата, като изява на имунологична активност с ултрасонографския индекс за синовит US7 при пациенти с РА.

Задача 3: Да се изследва и оцени наличието на връзка между анти-CarP антителата с анти-МСV, анти-ССР и РФ при пациенти с РА и връзката между тютюнопушенето и позитивиране на анти-CarP антителата.

Задача 4: Да се изследва наличието на връзка между РG и РА, между РG и анти-MCV и анти-ССР антитела в серум на пациенти с РА, както между и РG и тютюнопушене при пациенти с РА.

Задача 5: Да се изследва наличието на връзка между серумните нива на възпалителния медиатор IL-17 и антителата анти-ССР, анти-MCV и анти-CarP при болни с РА.

Задача 6: Да се изследват родственици на пациенти с РА за наличие на серопозитивност по отношение на анти-ССР, анти-MCV и анти-CarP антителата.

МЕТОДИ И МАТЕРИАЛИ

ПАЦИЕНТИ

В изследването бяха включени 218 участници, от които:

1) 83 болни с установен РА със средна възраст 60,02 ($\pm 12,49$), от които 45% мъже и 55% жени, преминали през стационарно лечение в Клиника по Ревматология на УМБАЛ „Каспела“ и Ревматологично отделение на МБАЛ „ЦОХ“.

2) 35 болни с остеоартроза (ОА) със средна възраст 62,53 ($\pm 11,39$), от които 31% мъже и 69% жени, преминали през стационарно лечение в Клиника по Ревматология на УМБАЛ „Каспела“ и Ревматологично отделение на МБАЛ „ЦОХ“.

3) 20 болни със СЛЕ със средна възраст 58.23 (± 10.98) - 100% жени, преминали през стационарно лечение в Ревматологично отделение на МБАЛ „ЦОХ“.

4) 62 здрави контроли със средна възраст 45,39 ($\pm 12,84$) години, от които 28 мъже (45%) и 34 жени (55%).

5) 18 роднини от първа степен на болните от групата с РА.

Включените в групата с РА пациенти изпълват критериите за РА от 1987 год на ACR и/или критериите от 2010 год на ACR/ EULAR.

Изследванията са извършени съобразно изискванията на добрата клинична практика (Good Clinical Practice) и при спазване на декларацията от Хелзинки за правата на изследваните лица. Всички участници писмено са декларирали съгласието за участие в изследването, отразено в подписано информирано съгласие преди извършване на изследването. Проучването е одобрено от МЕК (Местната Етична Комисия).

ВКЛЮЧВАЩИ И ИЗКЛЮЧВАЩИ КРИТЕРИИ

Включващи критерии за за групата участници с РА:

- Възраст ≥ 18 години при включване;
- Установена диагноза РА, съгласно критерии от 1987 год на ACR и/или критерии от 2010 год на ACR/ EULAR.

Изключващи критерии за групата участници с РА:

- Тежки хронични чернодробни, бъбречни, белодробни и сърдечни заболявания

Включващи критерии за пациенти с ОА:

- Възраст ≥ 18 години при включване;
- Диагноза ОА според класификационните критерии на ACR за идиопатична гонартроза, коксартроза и ОА на ръцете.

Изключващи критерии за пациенти с ОА:

- Тежки хронични чернодробни, бъбречни, белодробни и сърдечни заболявания

Включващи критерии за пациенти със СЛЕ:

- Възраст ≥ 18 години при включване
- Диагноза СЛЕ въз основа на общоприети критерии на ACR (1997)

Изключващи критерии за пациенти със СЛЕ:

- Ревматологични заболявания, различни от СЛЕ;
- Тежки хронични чернодробни, бъбречни, белодробни и сърдечни заболявания.

Включващи критерии за контролна група от здрави лица:

- Възраст над 18 год.
- Липса на диагностицирано възпалително ставно заболяване и СЗСТ към момента на изследването.

Изключващи критерии за контролна група от здрави лица:

- Тежки хронични чернодробни, бъбречни, белодробни и сърдечни заболявания.

Включващи критерии за роднини от първа степен от групата на болни от РА:

- Възраст над 18 год.
- Липса на диагностицирано възпалително ставно заболяване и СЗСТ към момента на изследването.

Изключващи критерии за роднини от първа степен от групата на болни от РА:

- Тежки хронични чернодробни, бъбречни, белодробни и сърдечни заболявания.

МЕТОДИ

Клинични методи - беше извършен стандартен физикален преглед, беше направена оценка на локален ревматологичен статус.

Лабораторни и имунологични методи – хематологични, биохимични и имунологични показатели – анти-CCP, анти-MCV, анти-CarP антитела, IL-17, РФ, острофазови показатели – CRP, СУЕ.

Биологичен материал

За извършване на клинично-лабораторните и имунологичните изследвания, посредством венепункция беше взета периферна венозна кръв, а при терапевтични индикации за артроцентеза при болните с РА беше получен ставен пунктат.

Имунологични изследвания

Имунологичните изследвания бяха извършени в Катедра по биохимия на ФФ към МУ – Пловдив.

На участниците в изследването се взема венозна кръв (до 5 мл). Кръвта се събира в моновети без антикоагулант. Тридесет минути след вземането на кръв епруветките се центрофугират при 3000 об/мин. в продължение на 10 мин. Серумът се съхранява при - 20°C преди анализа.

Измерванията са направени на апарат ELISA - HumaReader HS, HUMAN (Wiesbaden, Germany). Имунологичните изследвания бяха извършени по инструкциите на фирмите производители.

Анти-MCV антитела - Anti - MCV Antibody

За изследване на автоантитела от IgG клас срещу mutated citrullinated vimentin(MCV), бяха използвани ELISA Kit на ORGENTEC Diagnostika, Mainz – Germany. Интерпретация на резултатите < 20 U/ml - негативни, ≥ 20 U/ml - позитивни.

Анти-CCP антитела- Anti- CCP Antibody

За изследване на автоантитела срещу cyclic citrullinated peptides (CCP)IgG клас бяха използвани anti-CCPhs(highsensitive) на ORGENTEC Diagnostika, Mainz – Germany.

Интерпретацията на получените резултати съответно отрицателна е стойност < 20 U/ml, а положителна ≥ 20 U/ml.

Human IL-17A

За изследване на човешки IL-17A беше използван комплект човешки IL-17A ELISA KIT, Diaclone, France. Чувствителност на метода по данни от фирмата производител - минималната откриваема доза от IL-17A, използвайки този диапазон IL-17A ELISA кит <2.3 pg / ml. По данни на фирмата производител при изследване на панел от 20 серума, от здрави кръводарители при всички нивата на тестван за IL-17A са били под ниво на откриване <3 pg / ml.

Анти-CarP антитела - Anti-carbamylated Protein Antibody

За изследване на анти-карбамилирани антитела се използваха Human anti-carbamylated Protein Antibody (ACPAb) ELISA Kit, Sincere Biotech, China.

Анализът на данните за определяне на референтни граници на анти-CarP е направен чрез програмата RefVAL версия 4.11 (Solberg, 2006), която е специализирана за изчисление на референтни граници съобразно с указанията на Международната Федерация по Клинична Химия (1987). Версия 4.11 е подобрена и усъвършенствана в сравнение с предходните. Използвана е също статистическата програма за социалните науки IBM SPSS версия 25 (2017). Долната референтна граница на анти-CarP има стойност 30,68U/ml, а горната референтна граница е със стойност 58,06 U/ml. В контекста на настоящото изследване, от интерес е само горната референтна стойност, която е използвана като граница за анти-CarP серопозитивност.

Генетично детекция за Porphyromonas gingivalis

Генетичните тестове бяха извършени в генетична и медикодиагностична лаборатория „Геника“ по следната методика:

За провеждане на генетичния анализ за наличието на Porphyromonas gingivalis, е необходима ДНК, която се изолира от подвенечна проба и букална лигавица. Материал беше получен по следната методика - след изолирането и подсушаването на гингивата (за минимизиране на крос-контаминацията), в най-дълбоката точка на пародонталния джоб (с дълбочина между 4 и 8 мм), до дъното се въвежда хартиения щифт, като се внимава да не се предизвика кървене, който след 1 минута се изважда и се поставя в контейнер. Взетите проби се транспортират в стерилни пластмасови контейнери, тип „Eppendorf“ 1,5 ml за анализ на пародонтопатогените от субгингивалната плака. Събирането на бактериалните проби се извършва по стандартния метод със стерилни ендодонтски хартиени щифтове (ISO40). Пробовземането се прави след нормалната сутрешна орална хигиена и закуска за всеки участник (между 9 и 11.30 часа).

Инструментални методи – за ултрасонография на стави

Ултрасонографската оценка на стави се извърши с УС апарат Esaote My Lab 7 и линеен трансдюсер с висока честота (10 – 18 MHz).

Оценка за синовит/теносиновит – посредством B-Mode/Gray scale (полуколичествена скала на OMERACT в степени 0 – 3), Power Doppler – техника (полуколичествена скала на OMERACT в степени 0 – 3).

Статистически Методи

Изборът на статистическите методи е съобразен с вида на данните - дали те са измерени по продължителни, ординални или дохотомни скали и тяхното разпределението (Kirk, 1995; Ганева 2016).

Продължителните величини (напр. възраст, анти-CarP) в настоящото проучване са изследвани относно симетричност и нормалност на дисперсиите чрез теста на Колмогоров-Смирнов (Kolmogorov-Smirnov), кутийни графики и дескриптивна статистика за стойностите на асиметричност. При тези величини, които според теста на Колмогоров-Смирнов е изпълнено изискването за нормално разпределение ($p > 0.05$) със стойности за асиметричност (*skewness*) в рамките на допустимия диапазон (-1/+1) (George & Mallery, 2009), анализите са направени чрез параметрични методи. От друга страна, при нарушение на изискването за нормално разпределение, в повечето случаи са използвани непараметрични методи и по-рядко е направена логаритмична трансформация за придобиване на нормално разпределение, което позволява провеждането на параметрични анализи. В случаите на дихотомни или ординални скали са приложени непараметрични статистически методи.

Предвид предварителния оглед на данните са подбрани подходящи статистически методи, които са обобщени в Таблица 1. Статистическа значимост е отчетена при допустимо ниво на грешка *алфа* (*alpha*) = .05. Данните от анализите са обобщени в таблици, а най-важните тенденции и находки са илюстрирани графично. Анализът на данните е извършен със статистическата програма IBM SPSS, версия 24 (2016), специализираната програма за медицински анализи MedCalc версия 18.5, 2018 MedCalc Software и програмата RefVAL версия 4.11 (Solberg, 2006), която е специализирана за изчисление на референтни граници съобразно с указанията на Международната Федерация по Клинична Химия (1987). Версия 4.11 е подобрена и усъвършенствана сравнение с предходните.

Таблица 1. Статистически методи при отделните задачи

Задачи	Статистически методи
Демографски Данни	<p>Продължителни величини (възраст)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Средна стойност (Mean) ○ Стандартно отклонение (SD) ○ еднофакторен дисперсионен анализ (one-way ANOVA) <p>Дихотомни величини (пол)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Честота (Frequency) ○ Проценти (%) ○ Теста Хи-квадрат (Chi-square)

<p>Първа Задача</p>	<p>Диагностична стойност на автоантителата анти-МСУ и анти-ССР, нива в серум и синовиална течност и връзка с тютюнопушене</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Честота (Frequency) ○ Проценти (%) ○ Чувствителност, специфичност, положителна предиктивна стойност, отрицателна предиктивна стойност ○ Кръстосана таблица и теста Хи-квадрат (Chi-square) ○ Съотношение на шанса (Odds Ratio) ○ Графики
<p>Втора Задача</p>	<p>Връзка между анти-МСУ и анти-ССР положителни находки и сонографския индекс US7 при пациенти с РА</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Корелационен анализ на Спирмън (Spearman rho correlation) ○ ROC крива ○ Чувствителност и специфичност ○ Графики
<p>Трета Задача</p>	<p>Антикарбамилирани протеинови антитела (анти-CarP) при пациенти с РА и здрави контроли, връзка с анти-МСУ, анти-ССР, РФ и тютюнопушене</p> <p>Обединена диагностична функция на анти-ССР, анти-МСУ, анти-CarP и РФ</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Средна стойност (Mean) ○ Стандартно отклонение (SD) ○ Медиана ○ Коефициент на асиметричност и ексес ○ Тест за нормално разпределение на Колмогоров-Смирнов Anderson-Darling, Cramér-von Mises и Kolmogorov-Smirnov. ○ Референтни стойности ○ т-тест за две независими извадки (independent samples t-test) ○ т-тест за една извадка (one-sample t-test) ○ Тест Хи-квадрат (Chi-square) ○ Съотношение на шанса (Odds Ratio) ○ Графики ○ Честота на <i>тройна</i> (анти-ССР+анти-CarP+РФ) серопозитивност (Frequency) ○ Проценти на <i>тройна</i> серопозитивност (%) ○ Чувствителност, специфичност, положителна предиктивна стойност, отрицателна предиктивна стойност на <i>тройна</i> серопозитивност <p style="text-align: center;">****</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Честота на <i>четворна</i> (анти-ССР+анти-CarP+РФ+ анти-МСУ) серопозитивност (Frequency) ○ Проценти на <i>четворна</i> серопозитивност (%) ○ Чувствителност, специфичност, положителна предиктивна стойност, отрицателна предиктивна стойност на <i>четворна</i> серопозитивност

Четвърта Задача	<p><i>Връзка между PG и RA. Връзка между анти-ССР и анти-MCV, тютюнопушене и PG при пациенти с RA</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Честота (Frequency) ○ Проценти (%) ○ Теста Хи-квадрат (Chi-square) за съпоставка на пропорции ○ Графики ○ Съотношение на шанса (Odds Ratio)
Пета Задача	<p><i>IL-17 при RA болни и здрави контроли и връзка между IL-17, анти-ССР, анти-MCV и анти-CarP</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Средна стойност (Mean) ○ Стандартно отклонение (SD) ○ t-тест за две независими извадки (independent samples t-test) ○ Корелационен анализ на Спирман ○ Графики
Шеста Задача	<p><i>Положителни и отрицателни находки на анти-ССР, анти-MCV и анти-CarP при родственици на RA пациенти. Връзката с начален RA.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Честота (Frequency) ○ Проценти (%) ○ Теста Хи-квадрат (Chi-square) за съпоставка на пропорции ○ Корелационен анализ на Спирман ○ Съотношение на шанса (Odds Ratio)

РЕЗУЛТАТИ

В тази глава се предоставя подробно описание на резултатите от настоящото научно проучване. Представянето на резултатите е организирано спрямо научните произтичащите от целта задачи на изследването.

Задача 1: Да се изследва ролята на автоантителата анти-ССР и анти-MCV в диагностичен аспект при RA.

В анализа са включени 173 участници, разделени в следните групи: 1) 83 болни с доказан RA, средна възраст 60.02 (± 12.49), 45% мъже и 55% жени; 2) 35 болни с остеоартроза (OA), средна възраст 62.53 (± 11.39), 31% мъже и 69% жени; 3) 20 болни с лупус, средна възраст 58.23 (± 10.98), 100% жени; 4) 35 здрави контроли, средна възраст 44.62 (± 5.26), 29% мъже, 71% жени. Демографските данни за участниците са обобщени на Таблица 2.

Таблица 2. Демографски данни за групите

Данни		РА	ОА	Лупус	Здрави контроли
Възраст X̄(±SD)		60.02 (±12.49)	62.53 (±11.39)	58.23 (±10.98)	44.62 (±5.26)
Пол	Мъже N, %	37 (45%)	11 (31%)	0 (0%)	10 (29%)
	Жени, N, %	46 (55%)	24 (69%)	20 (100%)	25 (71%)

Анализът на данните е извършен чрез програмата MedCalc версия 18.5, 2018 MedCalc Software. Използвани са 2x2 кръстосана таблица и тест за сензитивност и специфичност. Изчислени са също положителната и отрицателна предиктивна стойност (PPV и NPV). PPV показва вероятността да има наличие на заболяване при положителен тест, докато NPV означава вероятността да няма заболяване при отрицателен тест. (MedCalc Manual).

1.1 Резултати относно диагностичната стойност на анти-ССР.

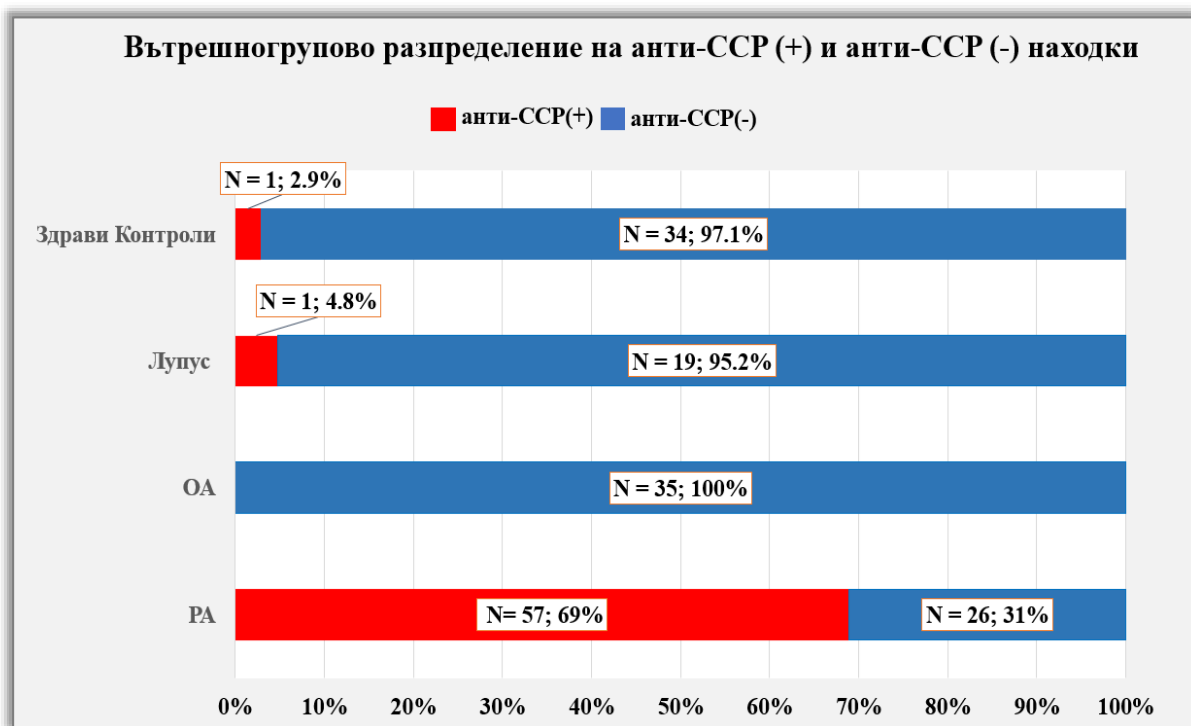
В настоящия анализ са включени всички 173 участници, като тези с установена диагноза РА (N= 83) са кодирани като положителни (1), а всички останали (N = 90) като отрицателни(0). Дихотомна скала е също използвана за разпределение на анти-ССР положителни (1) и отрицателни (0) находки. Резултатите от статистическия анализ са обобщени на Таблица 3. Установява се 33% съгласуваност между анти-ССР положителни и РА положителни находки и 51% съгласуваност относно отрицателни находки. Има 1% разминаване по отношение на анти-ССР положителни и 15% относно анти-ССР отрицателни находки. Чувствителността на анти-ССР възлиза на 68.67%, а специфичността на 97.78%. Положителната предиктивна стойност е 96.61%, а отрицателната 77.19%.

Таблица 3. Диагностични стойности на анти-ССР

	РА +	РА –	Чувствителност (Sensitivity)	Специфичност (Specificity)
анти-ССР +	57 (33%)	2 (1%)	68.67% 95% CI: 57.56% до 78.41%	97.78% 95% CI: 92.20 до 99.73%
анти-ССР -	26 (15%)	88 (51%)		
Общо	83	90		
Положителна предиктивна стойност (PPV)			96.61% 95% CI: 87.78 % до 99.11%	
Отрицателна предиктивна стойност (NPV)			77.19% 95% CI: 71.08% до 82.34%	

Относителният дял на положителни и отрицателни находки в отделните групи е обобщен на Фигура 1. При РА групата, 57 пациенти (69%) са серопозитивни

(анти-ССР +), а останалите 26 (31%) са отрицателни (анти-ССР -). При пациентите с ОА всички 35 (100%) са анти-ССР отрицателни. При пациентите с лупус 19 (95.2%) са анти-ССР отрицателни и само 1 пациент (4.8%) е серопозитивен (анти-ССР +). Същият резултат се отчита при здравите контроли, където 34 (97.1%) са анти-ССР отрицателни и 1 пациент (2.9%) е серопозитивен (анти-ССР +). В обобщение, анализът на вътрешногруповото разпределение на анти-ССР (+) и анти-ССР (-) находки, показва, че най-големите разминавания са в групата на РА пациентите, където 26 пациенти с РА са анти-ССР отрицателни, което обяснява и по-ниската чувствителност на анти-ССР в сравнение със специфичността.



Фигура 1. Вътрешногрупово разпределение на анти-ССР (+) и анти-ССР (-) находки

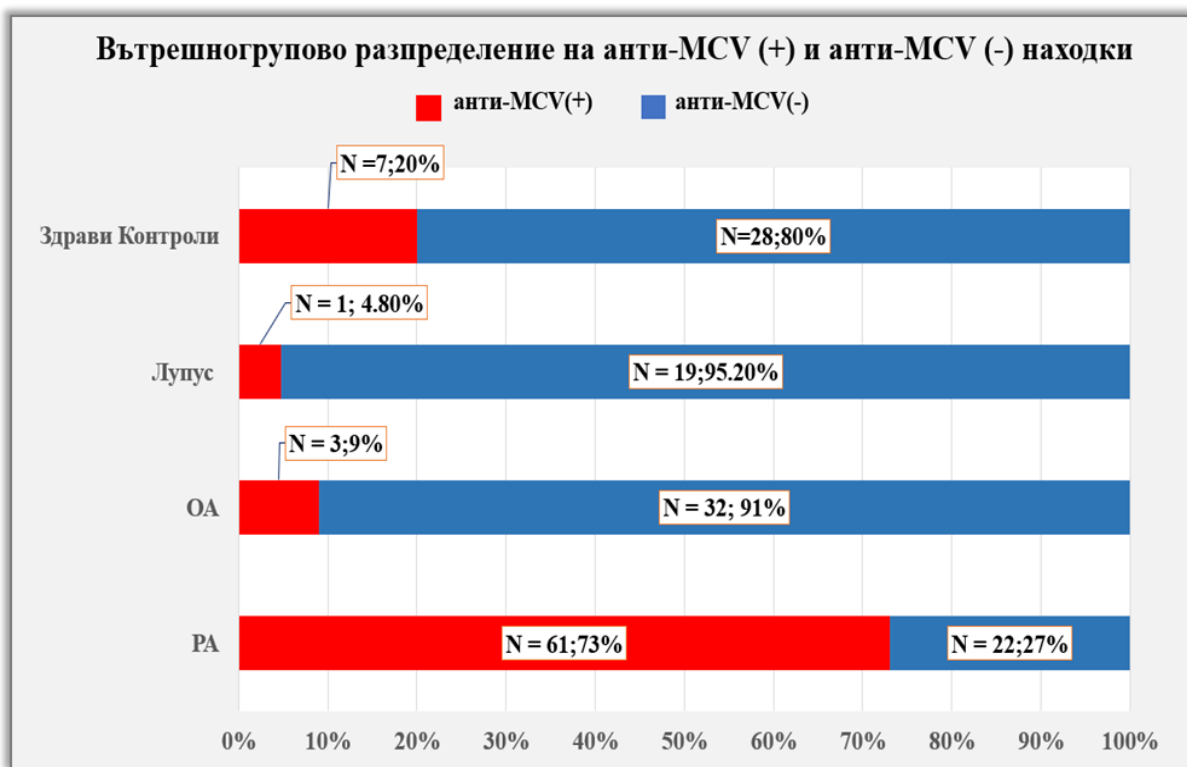
1.2 Резултати относно диагностичната стойност на анти-MCV.

За установяване на диагностичната стойност на анти-MCV е използвана същата извадка от 173 участника. Пациентите с установена диагноза РА (N= 83) са кодирани като положителни (1), а всички останали (N = 90) като отрицателни (0). По същия начин са разграничени анти-ССР положителни (1) и отрицателни (0) находки. Резултатите са представени на Таблица 4. Между анти-MCV положителни и РА положителни находки се отчита 35% съгласуваност и 46% по отношение на отрицателни находки. Разминаване по отношение на анти-MCV положителни находки се наблюдава при 11 участника (6%). Разминавания относно анти-MCV отрицателни находки се установява при 22 участника (13%). Чувствителността възлиза на 73.49%, а специфичността на 87.78%. Положителната предиктивна стойност е 84.72%, а отрицателната 78.22%.

Таблица 4. Диагностични стойности на анти-MCV.

	РА +	РА –	Чувствителност (Sensitivity)	Специфичност (Specificity)
анти-MCV +	61 (35%)	11 (6%)	73.49% 95% CI: 62.66% до 82.58%	87.78% 95% CI: 79.18% до 93.74%
анти-MCV -	22 (13%)	79 (46%)		
Общо	83	90		
Положителна предиктивна стойност (PPV)			84.72% 95% CI: 75.85 до 90.73%	
Отрицателна предиктивна стойност (NPV)			78.22% 95% CI: 71.34 % до 83.82%	

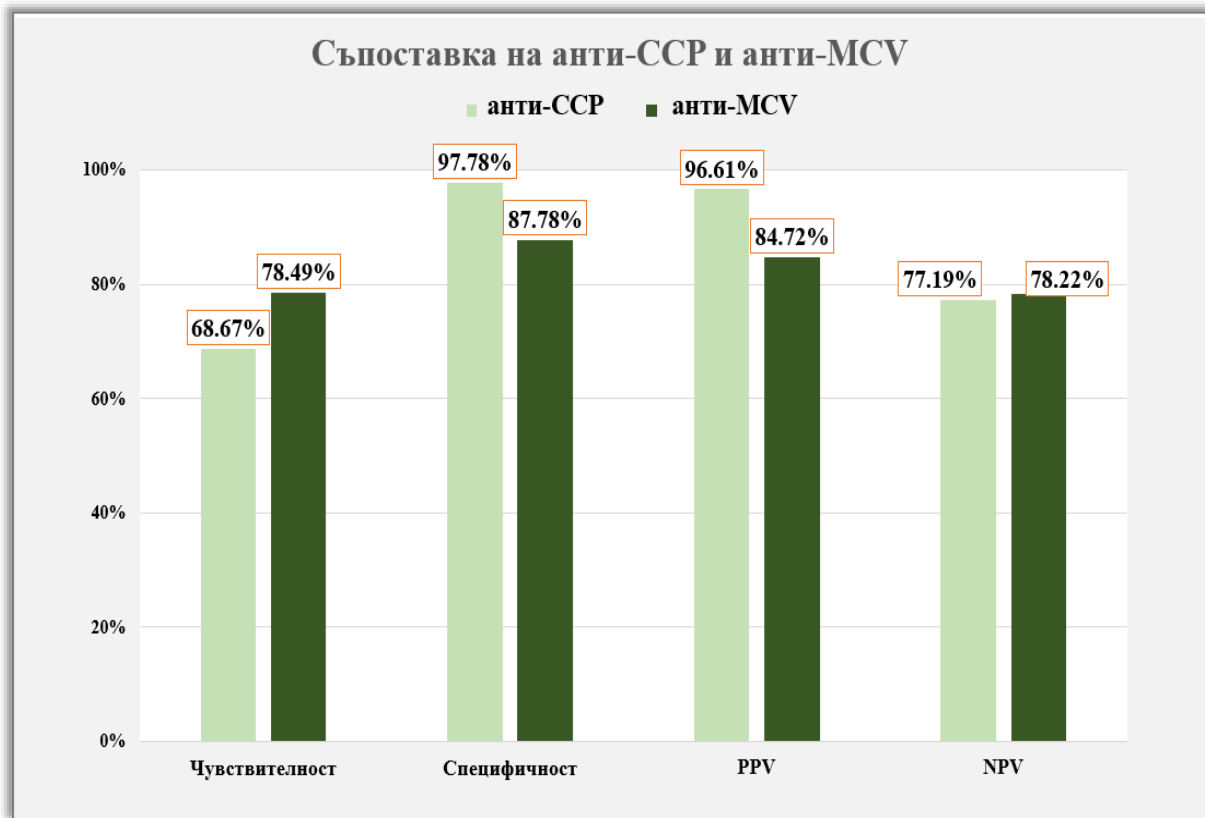
На Фигура 2 е показано разпределението на положителни и отрицателни групи при отделните групи участници. Относителният дял на положителни и отрицателни находки в отделните групи показва, че при групата с РА, 61 пациенти (73%) са анти-MCV серопозитивни и 22-ма (27%) са анти-MCV отрицателни. При пациентите с ОА 32 (91%) са анти-MCV отрицателни, а 3-ма (9%) са серопозитивни. В групата с лупус 19 (95.2%) са анти-MCV отрицателни и само 1 пациент (4.8%) е серопозитивен. При здравите контроли, 28 (80%) са с отрицателни анти-MCV показатели, а останалите 7 (20%) са с положителни анти-MCV показатели.



Фигура 2. Вътрешногрупово разпределение на анти-MCV (+) и анти-MCV (-) находки

1.3 Обобщение на резултати относно диагностичната стойност на анти-ССР и анти-MCV.

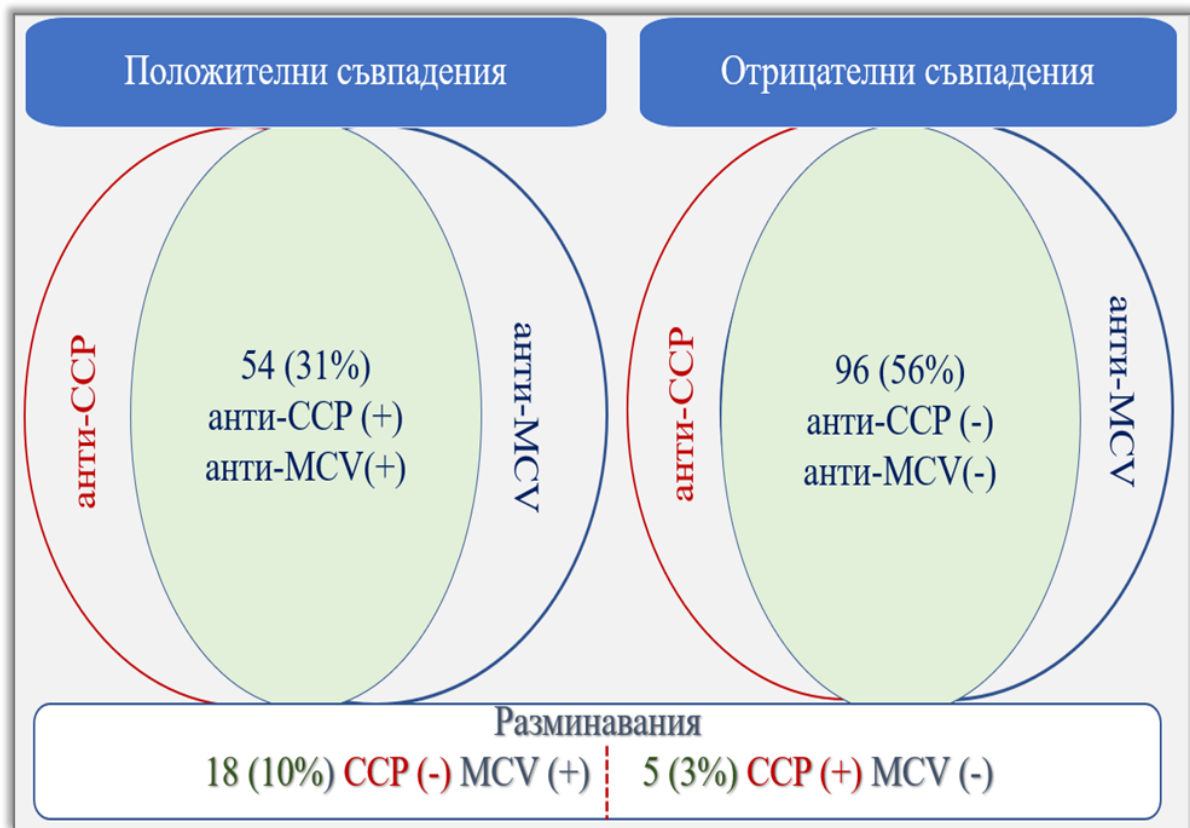
В рамките на настоящото изследване от двата вида автоантитела анти-MCV показват по-висока степен на чувствителност (78.49%) в сравнение с анти-ССР (68.67%). Относно специфичността, по-висока стойност се наблюдава при анти-ССР (97.78%) в сравнение с анти-MCV (87.78%). PPV има по-висока стойност при анти-ССР (96.61) в сравнение с PPV на анти-MCV (84.72%). Това означава, че вероятността да има РА заболяване е по-висока при положителен анти-ССР, отколкото при положителен анти-MCV. Обратно, NPV е малко по-високо при анти-MCV (78.22%) от това на анти-ССР (77.19%) или вероятността да няма РА заболяване е по-голяма при отрицателен анти-MCV тест отколкото при отрицателен анти-ССР тест. Обобщението на описаните в този сектор тенденции е представено на Фигура 3.



Фигура 3. Обобщение на резултатите относно диагностичната стойност на анти-ССР и анти-MCV

Съвпаденията и разминаванията между анти-ССР и анти-MCV са илюстрирани на Фигура 4. Двата теста съвпадат по положителни находки при 54 участника (31%) и по отрицателни при 96 (56%). Разминаванията са общо 23, като от тях 18 (10%) са отрицателни по анти-ССР, а положителни по анти-MCV. Останалите 5 (3%) са положителни по анти-ССР и отрицателни по анти-MCV.

Като цяло с анти-MCV се отчитат повече положителни резултати отколкото с анти-ССР.



Фигура 4. Съвпадения и разминавания между анти-ССР и анти-MCV положителни и отрицателни находки.

1.4 Съпоставка на стойностите на анти-ССР и анти-MCV в серум и синовиална течност.

Анализът в този сектор е базиран на данни от 20 пациенти с РА, при които нивата на анти-ССР и анти-MCV са измерени в серум и в синовиална течност. Целта на анализа е да се съпоставят нивата в серум и синовиална течност при двете антители.

Предварителният оглед на разпределението на данните показва липса на нормално разпределение според теста на Колмогоров-Смирнов ($p < 0.05$) при всички четири измерения. Това обоснова използването на непараметричния тест на Уилкоксън (Wilcoxon signed rank test) за съпоставка на нивата в серум и синовиална течност. На Таблица 5 са обобщени резултатите от анализа. Средната стойност на анти-ССР в серум (502.30) и медианата (118.68) са с по-ниски нива от тези в синовиална течност: средна стойност 1071.18; медиана 445.84. Разликата е статистически значима, $p = 0.001$. Подобна е тенденцията при анти-MCV стойностите. Отчитат се по-ниски стойности в серум (средна стойност 295.81;

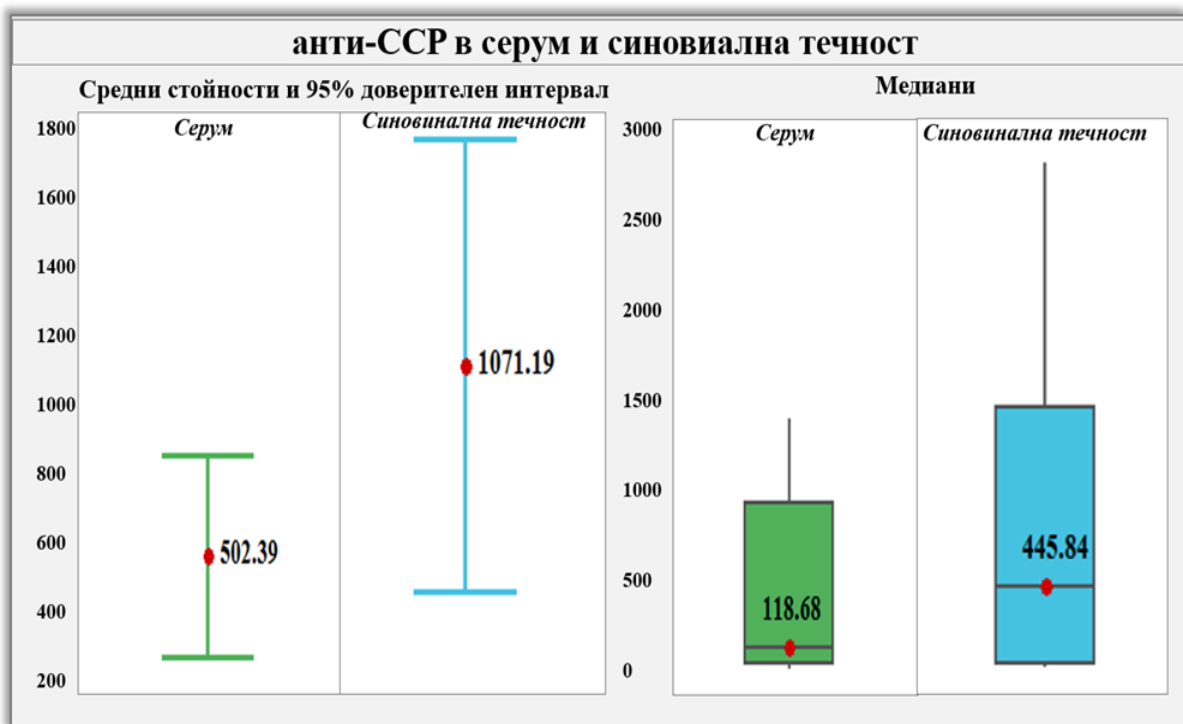
медиана 97.64) отколкото в синовиална течност (средна стойност 461.96; медиана 422.16), със статистически значима разлика ($p < 0.001$).

Таблица 5. Съпоставка между нивата на анти-ССР и анти-МСV в серум и синовиална течност при пациенти с РА.

	Брой (N)	Средна Стойност	Стандартно Отклонение (SD)	Медиана	Уилкоксън (Z)	Значимост (p)
анти-ССР серум	20	502.30	620.84	118.68	-3.211	.001**
анти-ССР синовиална течност	20	1071.19	1415.74	445.84		
анти-МСV серум	20	295.81	341.79	97.64	-3.921	.000**
анти-МСV синовиална течност	20	461.96	405.06	422.16		

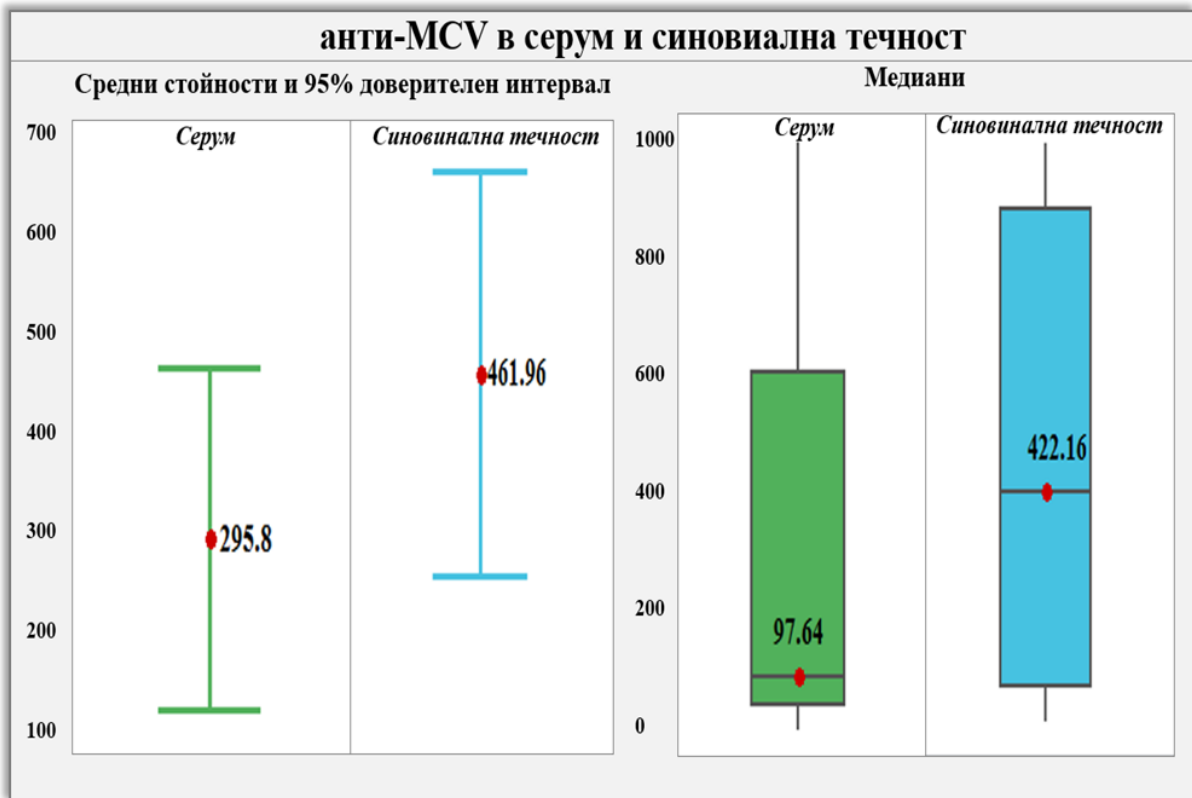
*Статистическа значимост, $p \leq 0.05$; ** Статистическа значимост, $p \leq 0.01$.

На Фигура 5 е илюстрирана разликата в нивата на анти-ССР в серум и синовиална течност. Интервалната графиката от ляво е базирана на средните стойности и 95% ДИ, а кутийната графика в дясно отразява стойностите на медианата.



Фигура 5. Стойности и медиани на анти-ССР в серум и синовиална течност.

По аналогичен начин, на Фигура 6 е илюстрирана разликата в нивата на анти-МСV в серум и синовиална течност. Интервалната графиката от ляво е базирана на средните стойности и 95% ДИ, а кутийната графика в дясно отразява стойностите на медианата.



Фигура 6. Средни стойности и медиани на анти-МСV в серум и синовиална течност

На основа на гореизнесените резултати се очертава тенденция на значимо по-високи стойности на анти-ССР и анти-МСV в синовиална течност в сравнение със серумните нива. Тъй като извадката от пациентите с РА, при които бяха направени измерения на анти-ССР и анти-МСV е сравнително малка (N = 20), тази тенденция подлежи на по-нататъчни изследвания с по-големи извадки.

1.5 Изследване на връзката между тютюнопушене и автоантителата анти-МСV и анти-ССР.

В изследването са включени 73 пациенти с РА, при които са събрани данни за тютюнопушене. Броят на пушачите е 36, а на непушачите 37. Връзката е разгледана относно процентното разпределение на анти-МСV (+) и анти-ССР (+) пациенти в групите на пушачи и непушачи. Използвана е кръстосана таблица и е изчислено съотношението на шанса (Odds Ratio или OR). В контекста на настоящия анализ OR показва връзката между тютюнопушене и серопозитивност. Стойности по-високи от 1 (> 1) означават по-висока вероятност за серопозитив-

ност при пушачи с РА заболяване. Колкото по-голяма от 1 е стойността на OR толкова по-голяма е зависимостта (Gossal & Gossal 2015). За да се отчете статистически значима зависимост, стойността на грешката трябва да е равна или по-малка от 0.05 ($p \leq 0.05$). В групата на пациентите с РА пушачи, 25 от 36 (69%) са категоризирани като анти-ССР (+), докато в групата на непушачите 11 от 37 (30%) са анти-ССР (-). Разликата от 39% е статистически значима, $\chi^2 = 10.952$, $p < 0.001$. Съотношението на шанса OR = 5.37 е статистически значимо, $p = 0.001$ (Таблица 6). Този резултат позволява да се направи заключение, че вероятността за анти-ССР серопозитивност е значимо по-голяма при пушачи с РА в сравнение с непушачи с РА.

Таблица 6. Резултати относно връзката между тютюнопушене и анти-ССР

Тютюнопушене	анти-ССР		Съотношение на Шанса 95% Доверителен Интервал			
	(+) Брой (%)	(-) Брой (%)	OR	Долна Граница	Горна Граница	p
	Да	25 (69%)	11 (31%)	5.37	1.97	14.60
Не	11 (30%)	26 (60%)				

*Статистическа значимост, $p \leq 0.05$; ** Статистическа значимост, $p \leq 0.01$.

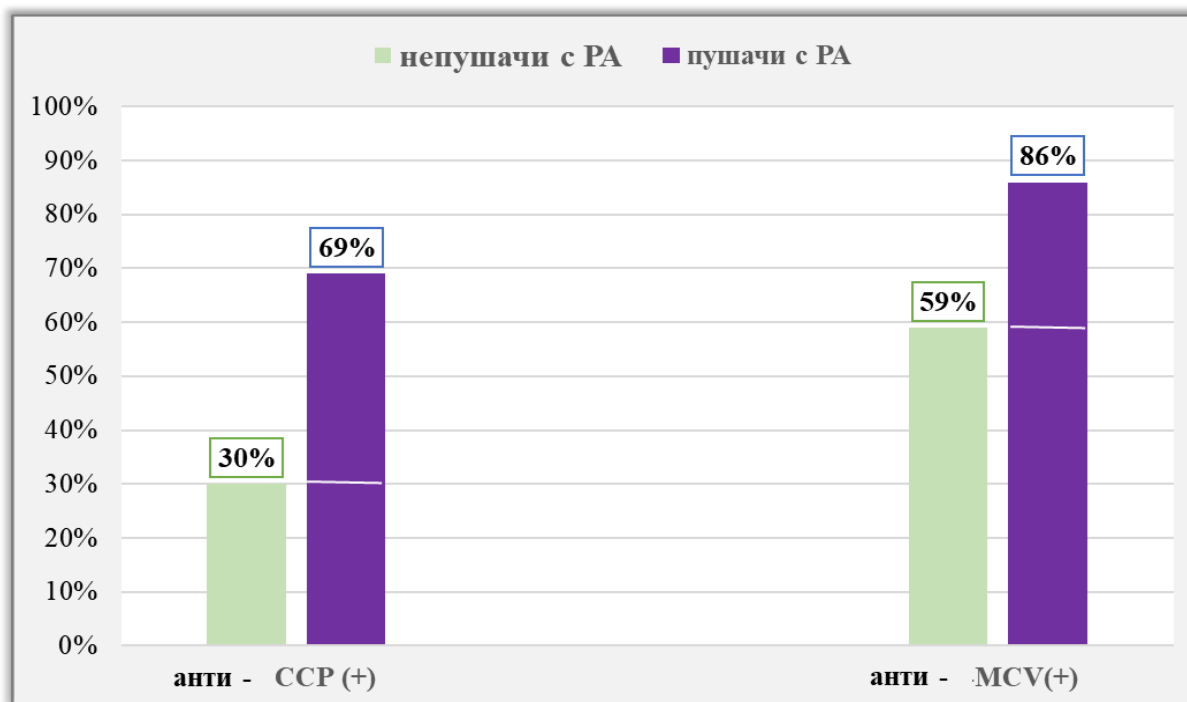
Аналогично е направен анализът за връзката между тютюнопушене и анти-MCV (Таблица 7). При болни с РА пушачи, 31 от 36 (86%) са категоризирани като анти-MCV (+), докато в групата на непушачите 22 от 37 (59%) са анти-MCV (-). Разликата от 27% е статистически значима, $\chi^2 = 6.55$, $p = 0.01$. Съотношението на шанса (OR = 4.22; $p = 0.01$) дава основание да се направи извод, че тютюнопушенето е фактор, който увеличава вероятността за анти-MCV серопозитивност при РА.

Таблица 7. Резултати относно връзката между тютюнопушене и анти-MCV

Тютюнопушене	анти-MCV		Съотношение на Шанса 95% Доверителен Интервал			
	(+) Брой (%)	(-) Брой (%)	OR	Долна Граница	Горна Граница	p
	Да	31 (86%)	5 (14%)	4.22	1.33	13.35
Не	22 (59%)	15 (41%)				

*Статистическа значимост, $p \leq 0.05$; ** Статистическа значимост, $p \leq 0.01$.

Обобщение: В рамките на настоящото изследване може да се направи извод, че тютюнопушенето при РА болни увеличава риска от серопозитивност по отношение на автоантителата анти-ССР и анти-МСV. На Фигура 7 са илюстрирани значително по-високите проценти на анти-ССР (+) и анти-МСV (+) находки сред пушачи с РА заболяване в сравнение с непушачи със същото заболяване.



Фигура 7. Тютюнопушене и серопозитивност за анти-ССР и анти-МСV

Задача 2: Да се изследва наличие на връзка между серумните нива на анти-ССР и анти-МСV антителата, като изява на имунологична активност с ултрасонографския индекс за синовит US7 при пациенти с РА.

В настоящия сектор са представени резултати относно връзката между анти-ССР и анти-МСV положителни находки и US7 сонографски находки при пациенти с установена диагноза РА. Извадката включва 30 пациенти с РА, при които освен изследване на анти-ССР и анти-МСV автоантителата са направени също и сонографски изследвания. Тези пациенти са част от по-голямата извадка представена в предишния сектор; между тях 10 мъже (33%) и 20 жени (67%), на средна възраст 52.07 (± 12.26) години.

Връзката между сонографския индекс US7 и автоантителата е изследвана чрез корелационен анализ, ROC крива и тест за чувствителност и специфичност. Корелационният анализ включва теста на Спирмън (*Spearman Rho correlation*) поради това, че клиничните индекси са измерени по дихотомна скала

(1 = положителен; 0 = отрицателен). Интерпретацията на корелационните коефициенти е направена спрямо референтните стойности на Коен (Cohen, 1988):

- много голяма/висока корелация: $\pm (0.70 - 1)$
- голяма/висока корелация: $\pm(0.50 - 0.69)$
- средна/умерена корелация: $\pm (0.30 - 0.49)$
- слаба/ниска корелация: $\pm (0.10 - 0.29)$

Положителни стойности обозначават положителна линейна корелация. Отрицателни стойности се свързват с отрицателна линейна корелация, която се наблюдава, когато стойностите на едната величина нарастват, а тези на другата намаляват.

Анализът с ROC крива е използван, за да се изследва диагностичната стойност на US7 индекса спрямо тази на анти-CCP и анти-MCV, които имат доказана висока прецизност в диагностиката и проследяването на РА. Изчислени са стойностите на AUC (площ под кривата), чувствителността и специфичността спрямо оптималната критериална стойност на US7. Стойностите на AUC са интерпретирани съгласно следните референтни стойности: 0.90-1 = висока съгласуваност; 0.80-0.90 = добра съгласуваност; 0.70-0.80 = приемлива съгласуваност; 0.60-0.70 = ниска съгласуваност; 0,50-0.60 = липсва съгласуваност.

От резултатите (Таблица 8) се вижда, че между сонографския индекс US7 и анти-CCP съществува значима корелация, която според Коен (1988) е от голяма величина, $r^s = 0.520$, $p = 0.002$. Корелацията между US7 и анти-MCV е също значима и е с още по-висок коефициент, $r^s = 0.539$, $p = 0.031$. Това означава, че по-високи стойности на US7 се срещат при серопозитивни анти-CCP и анти-MCV пациенти.

Таблица 8. Резултати от теста на Спирмън относно връзката между US7 и автоантителата анти-CCP и анти-MCV

Тест на Спирмън		анти-CCP	анти-MCV
US7 score	Корелационен коефициент	.520**	.539**
	Значимост (p)	.002	.001
	Брой (N)	30	30

*Статистическа значимост, $p \leq 0.05$; ** Статистическа значимост, $p \leq 0.01$.

Резултатите от анализа с ROC крива (Таблица 9) показват висока степен на съгласуваност между серопозитивни анти-CCP находки и сонографския индекс US7, със стойност на $AUC = 0.908$, $p > 0.001$. Изчислена е оптималната стойност на $US7 > 7$, при която чувствителността достига 96.15%, а специфичността 80%.

Още по-висока степен на съгласуваност се отчита между анти-MCV серопозитивни находки и сонографския индекс US7, $AUC = 0.963$, $p > 0.001$. Оптималната стойност на $US7 > 7$ се свързва с чувствителност 96.30% и специфичност 100%.

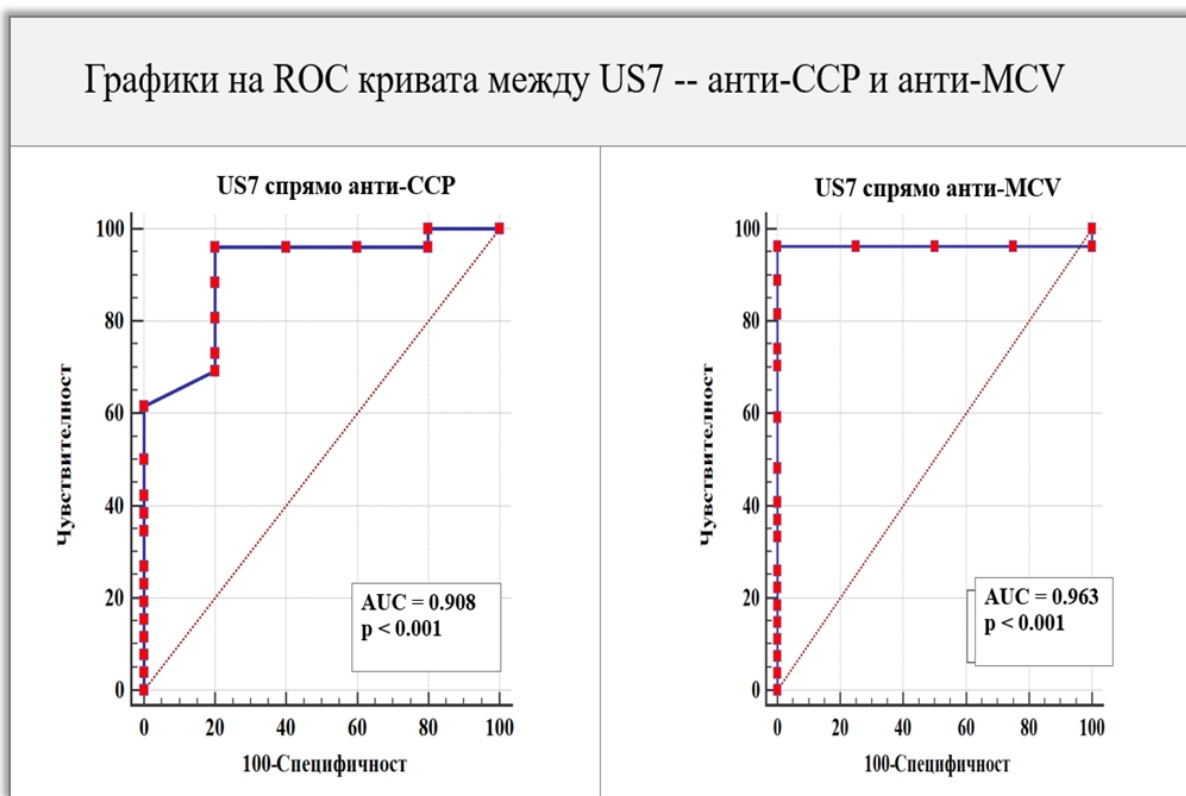
Таблица 9. Резултати от анализа с ROC крива

Площ под Кривата					Оптимална критериална стойност, чувствителност и специфичност		
Величини	Площ (AUC)	p	95% Доверителен Интервал		US7 критериална стойност	Чувствителност	Специфичност
			Долна Граница	Горна Граница			
US7 анти-ССР	.908 (±.0064)	.000**	.748	.982	> 7	96.15%	80%
US7 анти-MCV	.963 (±.0036)	.000**	.826	.999	> 7	96.30%	100%

Нулева Хипотеза = AUC = 0.5; *Статистическа значимост, $p \leq 0.05$;

** Статистическа значимост, $p \leq 0.01$.

Графиките на ROC кривата са представени на Фигура 8. Въпреки, че съгласуваността е висока и при двете съпоставки, по-високата степен на съвпадения се очертава между US 7 и анти-MCV серопозитивни находки.



Фигура 8. Графики на ROC кривата. Установена е висока степен на съгласуваност между сонографския индекс US7 и анти-ССР и анти-MCV серопозитивни находки

Задача 3: Да се изследва и оцени наличието на връзка между анти-CarP антителата с анти-MCV, анти-CCP и РФ при пациенти с РА и връзката между тютюнопушенето и позитивиране на анти-CarP антителата.

Както вече стана ясно в литературния обзор, антикарбамилираните протеинови антитела (анти-CarP) представляват интерес за настоящото изследване, като потенциална ролята в диагнозата и проследяването на РА. Резултатите в научната литература варират както по отчетена стойност, така и като мерни единици по отношение на анти-CarP, което прави приложението им върху други извадки невъзможно. Тези фактори обуславят включване в проучването на нивата на анти-CarP за да се съпоставят при пациенти с РА със здрави контроли и да се изследва връзката с анти-MCV, анти-CCP, РФ и тютюнопушене

3.1 Определяне на референтни стойности на анти-CarP при здравите контроли.

За осъществяване на тази цел е използвана извадка от 62 здрави контроли, между които 28 мъже (45%) и 34 жени (55%), без значима разлика в относителния дял на двата пола, $p = 0.26$. В извадката са включени представители на възраст между 25 и 70 години, със средна възраст $45.39(\pm 12.84)$ години. Между мъжете и жените не се установи значима възрастова разлика, $p = 0.714$. Средната стойности на анти-CarP показва сходни стойности при двата пола, без значима разлика, $p = 0.427$. Липсата на значими разлики между половете по отношение на основния параметър (анти-CarP) и възрастта е основание да се използва цялата извадка в изчислението на референтни стойности на анти-CarP, без да се правят отделни изчисления при мъжете и жените.

Анализът на данните за определяне на референтни граници на анти-CarP е направен чрез програмата RefVAL версия 4.11 (Solberg, 2006), която е специализирана за изчисление на референтни граници съобразно с указанията на Международната Федерация по Клинична Химия (1987). Версия 4.11 е подобрена и усъвършенствана в сравнение с предходните. Използвана е също статистическата програма за социалните науки IBM SPSS версия 25 (2017). Извършени са следните статистически анализи:

- Проверено е разпределението на анти-CarP а да се установи дали отговаря на условията за нормалност. За тази цел RefVAL версия 4.11 използва следните тестове: Anderson-Darling, Cramér-von Mises и Kolmogorov-Smirnov.
- Изчислени са стойностите на асиметрия и ексцес.
- Данните са проверени за екстремни стойности (outliers) чрез алгоритъма на Horn (2001).

- Определянето на референтни интервали е съобразено с това дали разпределението е нормално или асиметрично.
- Използван е метода на двойна трансформация, който се препоръчва, когато контролната извадка е по-малка от 120 субекта. Първо е използвана експоненциална трансформация, а после обратна трансформация на данните.

Резултатите от предварителния оглед на данните са обобщени на Таблица 10. За да е изпълнено условието за нормално разпределение, коефициентите на асиметричност и ексцес, както и резултатите от тестовете на Anderson-Darling, Cramer-von Mises и Kolmogorov-Smirnov трябва да *не* бъдат статистически значими, с *p*-стойности по-високи от 0.05. От изнесените данни се вижда, че разпределението на стойностите на анти-CarP е нормално, тъй като всички показатели *не* са статистически значими: Асиметричност = -0.154, *p* = 0.589; Ексцес = -0.472, *p* = 0.479; Anderson-Darling = 0.295, *p* = 1; Cramer-von Mises = 0.047, *p* = 1; Kolmogorov-Smirnov = 0.511, *p* = 1. Според алгоритъма на Horn (2001) *не* се установяват екстремни стойности (outliers) в извадката от клинично здрави лица.

Таблица 10. Резултати от предварителния оглед на данните за нормално разпределение.

Величина	Стойност
Брой на здравите контроли	62
Най-ниска стойност на анти-CarP	28.78
Най-висока стойност на анти-CarP	60.15
Средноаритметична стойност \bar{X}	45.03
Медиана	45.53
Стандартно отклонение	7.29
Коефициент на асиметричност	-0.154, <i>p</i> = 0.589
Коефициент на ексцес	-0.472, <i>p</i> = 0.479
Тест на Anderson-Darling	0.295, <i>p</i> = 1
Тест на Cramer-von Mises	0.047, <i>p</i> = 1
Тест на Kolmogorov-Smirnov	0.511, <i>p</i> = 1
Анормални стойности (outliers) според Horn	Няма

Бележка: Стойностите на анти-CarP са в U/ml

След като са изпълнени всички изисквания (Solberg, 2006), са изчислени референтните стойности, включващи долна и горна граница и техните 95%-ви

доверителни интервали. Резултатите са обобщени на Таблица 11. Долната референтна граница на анти-CarP има стойност 30.68U/ml, а горната референтна граница е със стойност 58.06 U/ml. В контекста на настоящото изследване, от интерес е само горната референтна стойност, която е използвана като граница за анти-CarP серопозитвност. Този анализ е представен в подраздел 3.3.

Таблица 11. Референтни граници и съответстващи 90% доверителни интервали на анти-CarP.

Долна Референтна Граница (90% ДИ)	Горна Референтна Граница (90% ДИ)
30.68 (27.74 – 33.70)	58.06 (55.68 – 60.27)

3.2 Съпоставка на средната стойност на анти-CarP при пациенти с РА със средната и референтна стойност при здравите контроли.

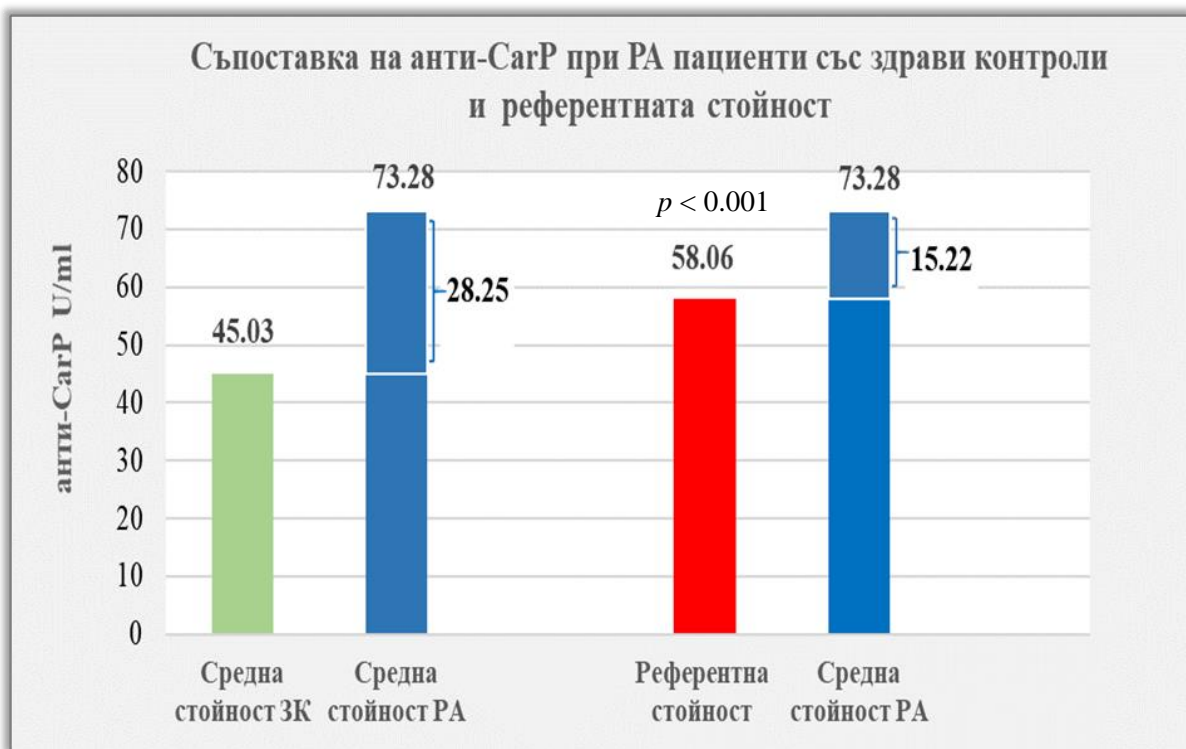
Настоящият анализ включва данни от 83-мата РА пациенти, описани в сектор 1.1 и 62-мата клинично здрави контроли от сектор 3.1. Средната стойност на анти-CarP в извадка от пациентите с РА е съпоставена със средната стойност на здравите контроли чрез т-тест за независими извадки. Направена е също съпоставка с референтната стойност = 58.06 U/ml чрез т-тест за една извадка. Резултатите са обобщени на Таблица 12. Средната стойност на анти-CarP при пациентите с РА (73.28 U/ml) е по-висока от тази на здравите контроли (45.03 U/ml) с 28.25 U/ml и разликата е статистически значима, $p < 0.001$. Спрямо референтната стойност (58.06 U/ml) разликата е 15.22 U/ml и също е статистически значима, $p < 0.001$.

Таблица 12. Съпоставка на анти-CarP стойностите при пациенти с РА и здрави контроли.

РА Пациенти (N= 83)	Здрави Контроли (N = 62)					
	Спрямо средната стойност			Спрямо референтната стойност (РС)		
Средна стойност (±SD)	Средна стойност (±SD)	Разлика	р	Референтна стойност	Разлика	р
73.28 (±27.37)	45.03 (±7.29)	28.25	.000**	58.06	15.22	.000**

*Статистическа значимост, $p \leq 0.05$; ** Статистическа значимост, $p \leq 0.01$.

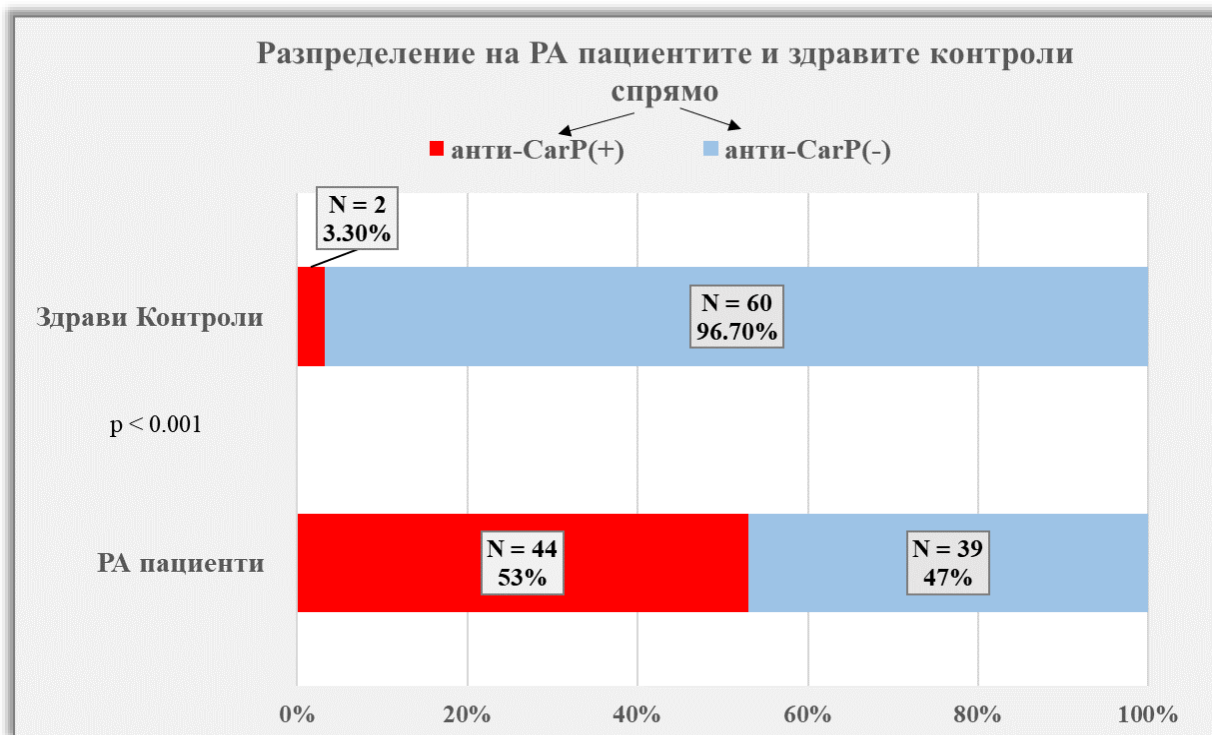
Разликата между средната стойност на анти-CarP при пациентите с РА и средната стойност при здравите контроли, както и разликата с установената горна референтна граница са илюстрирани на Фигура 9.



Фигура 9. Съпоставка на анти-CarP при РА пациенти със здрави контроли и референтната стойност. Значимо по-висока стойност се установява при РА пациентите.

3.3 Приложение на горната референтна стойност на анти-CarP за определяне на серопозитивност спрямо стойностите на анти-CarP.

Горната референтна граница на анти-CarP (58.06 U/ml) е приложена за определяне процента на анти-CarP серопозитивност сред РА пациенти (N = 83) и здрави контроли (N = 62). Лицата със стойност на анти-CarP < 58.06 са категоризирани като анти-CarP (-), а тези със стойност на анти-CarP ≥ 58.06 като анти-CarP(+). Процентното разпределение на положителни и отрицателни находки в двете изследователски групи е обобщено на Фигура 10. При пациентите с РА 44 (53%) са серопозитивни за анти-CarP, а останалите 39 (47%) са серонегативни. При здравите контроли само 2-ма (3.3%) са анти-CarP серопозитивни, а останалите 60 (96.7%) са негативни. Трябва да се отбележи, че двата случая на анти-CarP серопозитивност при здравите контроли - съответно 59.05 U/ml и 60.15 U/ml с много малко надвишават горната референтна граница (58.06 U/ml). Разликата в разпределението на анти-CarP серопозитивни и негативни лица при пациентите с РА и здравите контроли е статистически значима, $\chi^2 = 40.176$, $p < 0.001$.



Фигура 10. Процентно разпределение на анти-CarP (+) и анти-CarP (-) РА пациенти и здрави контроли

3.4 Изследване на връзката между анти-CarP и анти-ССР, анти-MCV и РФ в извадката от пациенти с РА.

Редица проучвания са изследвали връзката между анти-CarP и други показатели свързани с РА, като например автоантителата анти-ССР, анти-MCV и РФ. В някои случаи се установява връзка между серопозитивност по един или повече от гореупоменатите показатели и анти-CarP, докато в други се наблюдават сходни нива на анти-CarP при серопозитивни и серонегативни пациенти с РА. Разногласието в съществуващите публикации поражда интерес и налага допълнителни проучвания с различни популации от пациенти с РА. Целта на настоящият анализ е да проследи връзката между автоантителата анти-ССР, анти-MCV, РФ и анти-CarP при извадката от български пациенти с РА (N = 83). По отношение на изследваните антитела от АСРА групата е изчислен процента на анти-CarP (+) находки при АСРА (+) и АСРА (-) пациенти и пропорциите са съпоставени чрез теста Хи-квадрат. Резултатите са обобщени на Таблица 13.

От общо 57 анти-ССР (+) пациенти, 32-ма (56%) са анти-CarP (+), а от 26-те пациенти, които са анти-ССР (-), 12 (46%) са анти-CarP (+). Процентната разлика на анти-CarP (+) в двете групи е 10% и не е статистически значима, $\chi^2 = 0.780$, $p = 0.40$.

Процентът на анти-CarP (+) в анти-MCV (+) групата е 54%, а при анти-MCV (-) групата е 50%. Разликата от 4% не е статистически значима, $\chi^2 = 0.103$, $p = 0.74$.

Тенденцията е различна само по отношение на РФ, където процентът на анти-CarP (+) е значимо по-висок в групата на РФ (+) пациенти както следва: 57% сред РФ (+); 27% сред РФ(-) пациенти; $\chi^2 = 4.375$, $p = 0.03$.

Таблица 13. Връзка/съгласуваност между анти-CarP, анти-CCP, анти-MCV и РФ

	анти-CarP (+)	Хи-квадрат	p
анти-CCP (+)	32 /57 (56%)	.780	.40
анти-CCP (-)	12 /26 (46%)		
анти-MCV (+)	33 /61 (54%)	.103	.74
анти-MCV (-)	11 /22 (50%)		
РФ(+)	39 /68 (57%)	4.375	0.03*
РФ (-)	4/15 (27%)		

*Статистическа значимост, $p \leq 0.05$; ** Статистическа значимост, $p \leq 0.01$.

Връзката между анти-CarP и анти-CCP, анти-MCV и РФ е също разгледана по отношение на средната стойност на анти-CarP при пациенти с РА. Съпоставките са направени чрез т-тест за независими извадки след логаритмична трансформация на стойностите на анти-CarP, за да се постигне нормално разпределение. Резултатите са обобщени на Таблица 14. Средната стойност на анти-CarP при анти-CCP (-) пациенти е 71.25 U/ml, а в групата на анти-CCP (+) пациенти е 75.30 U/ml. Разликата от 4.04 U/ml не е статистически значима, $p = 0.816$. Подобна тенденция се наблюдава относно анти-MCV: Средната стойност на анти-CarP при анти-MCV (-) пациенти е 70.05 U/ml, а в групата на анти-MCV (+) пациенти е 76.50 U/ml. Разликата от 6.45 U/ml не е статистически значима, $p = 0.485$. Тенденцията е различна относно РФ, където средната стойност на анти-CarP при РФ (+) пациенти (80.36 U/ml) е значимо по-висока от тази при РФ(-) (66.20 U/ml), $p = 0.028$.

В обобщение на резултатите от този сектор, могат да се изведат следните изводи:

1) Между анти-CarP, анти-CCP и анти-MCV не се установява значима връзка. Процентът на

анти-CarP (+) е много сходен при АСРА (+) и АСРА (-) пациенти. Тази тенденция се потвърждава относно средните стойности на анти-CarP, които също са сходни при АСРА (+) и АСРА (-) пациенти.

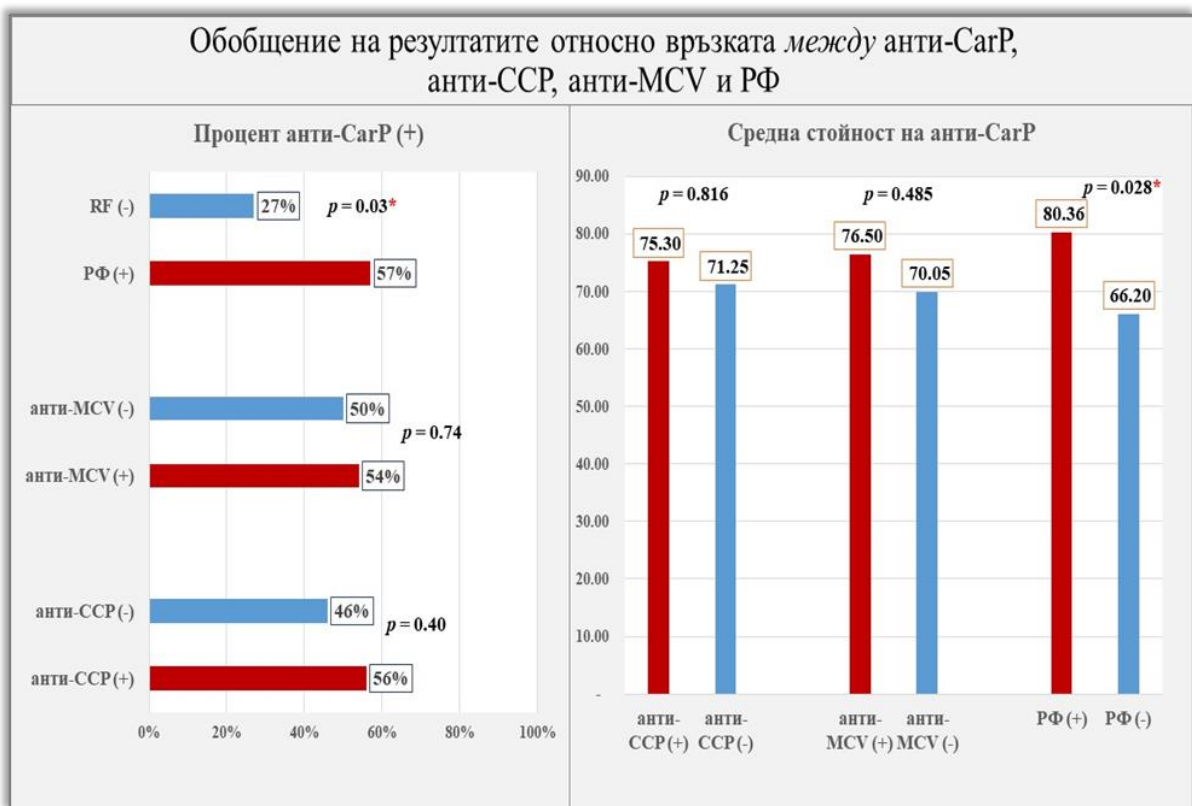
2) Между анти-CarP и РФ се установява значима връзка. Процентът на анти-CarP (+) е значимо по-висок при РФ (+) пациенти от този в групата на РФ (-). Същото е валидно и за средната стойност на анти-CarP, която е значимо по-висока

при при РФ (+) пациенти. Обобщена илюстрация на двата извода е представена на Фигура 11.

Таблица 14. Съпоставка на средната стойност на анти-CarP при серопозитивни и серонегативни РА пациенти.

	анти-CarP			т-тест		
	Брой (N)	Средна Стойност \bar{X}	SD	Разлика	t	p
анти-ССР (-)	57	71.25	24.74	4.04	-.234	.816
анти-ССР (+)	26	75.30	29.64			
анти-MCV (-)	61	70.05	16.75	6.45	-.702	.485
анти-MCV (+)	22	76.50	31.98			
РФ (-)	68	66.20	14.13	14.16	-2.27	.028*
РФ (+)	15	80.36	30.115			

*Статистическа значимост, $p \leq 0.05$; ** Статистическа значимост, $p \leq 0.01$.



Фигура 11. Обобщителна графика на връзката на анти-CarP с РФ и липсата на връзка с анти-ССР и анти-MCV.

3.5 Изследване на връзката между тютюнопушене и анти-CarP.

Данни за тютюнопушене са събрани от общо 111 участника в изследването, между които 73 пациенти с РА и 38 здрави контроли. Съпоставена е средната стойност на анти-CarP при пушачи и непушачи в цялата извадка от 111 лица и само в групата на пациенти с РА. Използван е т-тест за независими извадки. Резултатите са изнесени на Таблица 15.

В цялата извадка, включваща пациенти с РА и здрави контроли, пушачите (N = 49) имат средна стойност на анти-CarP = 69.39 U/ml, докато при непушачите (N = 62) средната стойност на анти-CarP = 55.81 U/ml. Разликата от 13.58 U/ml е статистически значима, $p = 0.008$. Трябва да се отбележи, че при непушачите средната стойност е с 2.25 U/ml по-ниска от горната референтна стойност = 58.06 U/ml, докато при пушачите е с 10.33 U/ml по-висока от референтната стойност.

Само в групата на пациентите с РА, пушачите (N = 36) имат средна стойност на анти-CarP = 78.92 U/ml, а при непушачите (N = 37) средна стойност на анти-CarP = 62.69 U/ml. Разликата от 16.23 U/ml е статистически значима, $p = 0.01$. В този случай и при пушачите и при непушачите средната стойност е по-висока от референтната, но при пушачите стойността е с 20.86 U/ml по-висока от референтната, докато при непушачите средната стойност надвишава референтната с 4.63 U/ml.

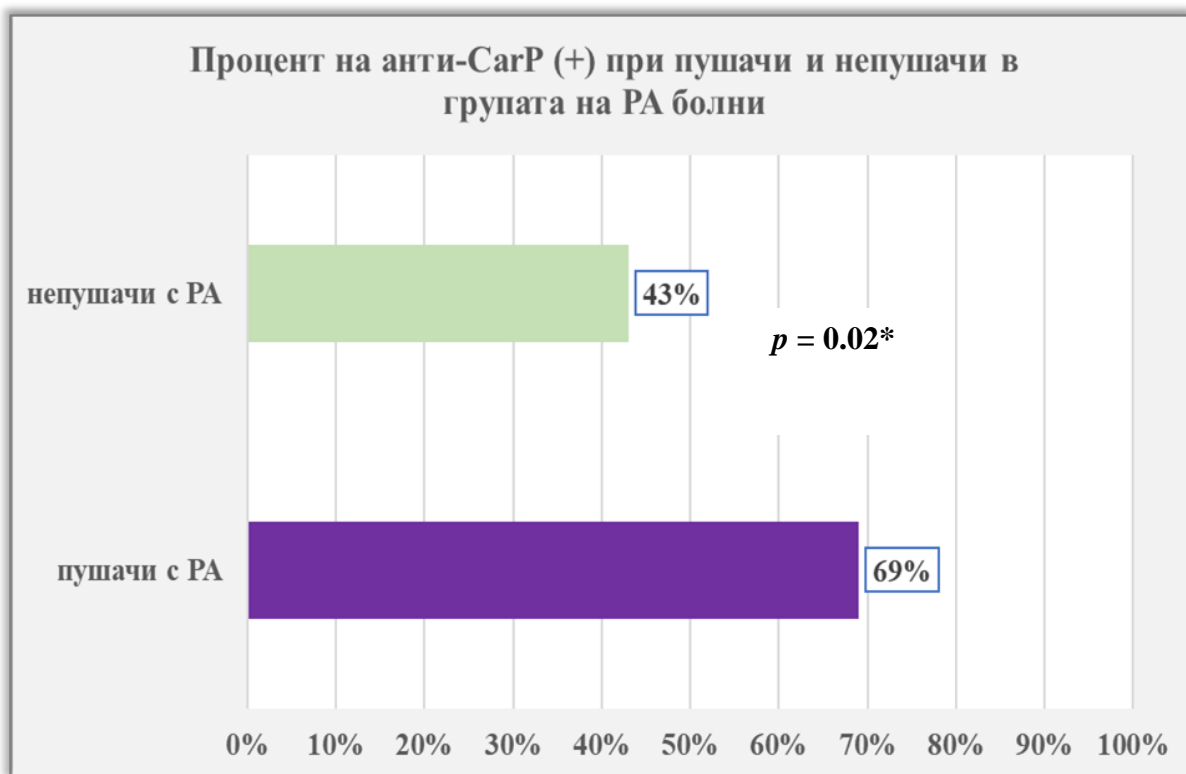
Таблица 15. Средни стойности на анти-CarP при пушачи и непушачи.

	анти-CarP				т-тест	
	Брой (N)	Средна Стойност	SD	Разлика	t	p
пушачи	49	69.39	32.03	13.58	2.671	.008**
непушачи	62	55.81	21.36			
пушачи с РА	36	78.92	33.20	16.230	2.423	.01**
непушачи с РА	37	62.69	23.99			

*Статистическа значимост, $p \leq 0.05$; ** Статистическа значимост, $p \leq 0.01$.

Връзката между анти-CarP и тютюнопушене също е разгледана относно процентното разпределение на анти-CarP (+) пациенти в групите на пушачи и непушачи. Използвана е кръстосана таблица и е изчислено съотношението на шанса (OR). Стойности по-високи от 1 (> 1) означават по-висока вероятност за анти-CarP серопозитивност при пушачи с РА. Колкото по-голяма от 1 е стойността на OR толкова по-голяма е зависимостта (Gossal & Gossal 2015).

На Фигура 12 е илюстрирано процентното разпределение на анти-CarP (+) находки при пациенти с РА пушачи и непушачи. В групата на пациентите с РА пушачи, 25 от 36 (69%) са категоризирани като анти-CarP (+), докато в групата на непушачите 16 от 37 (43%) са анти-CarP (+). Разликата от 26% е статистически значима, $\chi^2 = 4.858$, $p = 0.02$.



Фигура 12. Процент на анти-CarP(+) при пушачи и непушачи в групата на РА болни.

Съотношението на шанса ($OR = 2.863$, $p = 0.03$) показва, че вероятността за анти-CarP серопозитивност е значимо по-голяма при пушачи с РА в сравнение с непушачи с РА (Таблица 16).

Таблица 16. Резултати относно връзката между тютюнопушене и анти-CarP.

Тютюнопушене	анти-CarP		Съотношение на Шанса 95% Доверителен Интервал			
	(+) Брой (%)	(-) Брой (%)	OR	Долна Граница	Горна Граница	p
	Да	25 (69%)	11 (41.5%)	2.86	1.09	7.52
Не	16 (43%)	21 (57%)				

*Статистическа значимост, $p \leq 0.05$; ** Статистическа значимост, $p \leq 0.01$.

Заклучение: В контекста на настоящото изследване се установи значима връзка между тютюнопушене и анти-CarP антителата. При пушачите нивото на анти-CarP е значимо по-високо в цялата извадка и при пациентите с РА. Освен това, сред пушачите с РА процентът на серопозитивни случаи според анти-CarP е значимо по-висок от този при непушачите с РА. Тютюнопушенето увеличава вероятността за анти-CarP серопозитивност при пациенти с РА.

3.6 Определяне на обединената диагностична функция на анти-ССР, анти-МСV, анти-CarP и РФ.

Първоначално оценихме диагностичната функция на тройна серопозитивност по РФ, анти-ССР и анти-CarP. След това добавихме серопозитивност по анти-МСV и оценихме диагностичната функция на четворна серопозитивност. Анализът е направен с общо 173 участници, между които 83 с установена диагноза на РА и 90 участници, неболедуващи от РА.

При тройна серопозитивност (анти-ССР, анти-CarP и РФ), специфичността на диагнозата е 100%, а чувствителността 38.55%. Положителната предиктивна стойност е 100%, а отрицателната 62.50% (Таблица 17).

Таблица 17. Тройна серопозитивност и диагностика на РА.

Серопозитивност	РА +	РА –	Чувствителност (Sensitivity)	Специфичност (Specificity)
анти-ССР + анти-CarP+ РФ+	32 (18%)	0 (0%)	38.55% 95% CI: 28.07 до 49.88%	100% 95% CI: 95.98 до 100%%
анти-ССР - анти-CarP- РФ-	51 (30%)	90 (52%)		
Общо	83	90		
Положителна предиктивна стойност (PPV)			100% 95% CI: 87.78 % до 99.11%	
Отрицателна предиктивна стойност (NPV)			68.83% 95% CI: 59.81% до 67.66%	

При четворна серопозитивност (анти-ССР, анти-МСV, анти-CarP и РФ), специфичността отново е 100%, докато чувствителността е малко по-ниска – 34.94%. Положителната и отрицателна предиктивна стойност са същите както и при тройна серопозитивност - 100% PPV и 62.50% NPV. (Таблица 18)

Таблица 18. Четворна серопозитивност и диагностика на РА.

Серопозитивност	РА +	РА –	Чувствителност (Sensitivity)	Специфичност (Specificity)
анти-ССР + анти-МСV+ анти-CarP+ РФ+	29 (17%)	0 (0%)	34.94% 95% CI: 24.80% to 46.19%	100% 95% CI: 95.98 до 100%%
анти-ССР – анти-МСV- анти-CarP- РФ-	54 (31%)	90 (52%)		
Общо	83	90		
Положителна предиктивна стойност (PPV)			100%	
Отрицателна предиктивна стойност (NPV)			62.50% 95% CI: 58.74% до 66.12%	

Обобщение на резултатите

При тройна (РФ, анти-ССР и анти-CarP) и четворна серопозитивност (анти-ССР, анти-МСУ, анти-CarP и РФ), се постига 100% специфичност в диагнозата на РА, но чувствителността намалява до 38.55% при тройна серопозитивност и 34.94% при четворна серопозитивност.

Задача 4: Да се изследва наличието на връзка между РG и РА, между РG и анти-МСУ и анти-ССР антитела в серум на пациенти с РА, както между и РG и тютюнопушене при пациенти с РА.

4.1 Изследване на връзката между РG и РА.

В този сектор са обобщени резултати от анализа на връзката между РG и РА. За целта е съпоставена извадка от 30 пациенти с РА с две контролни групи, включващи 26 пациенти с остеоартроза (ОА) и 24 здрави контроли. Пациентите с РА и здравите контроли са част от по-големите извадки представени в предходните сектори. По-малкият размер на извадките в този сектор се определя от ограничения брой на изследователски материали.

Съпоставката на групите относно средна възраст е направена чрез еднофакторен дисперсионен анализ (one-way ANOVA) и *постхок* теста на Туки (Tukey's multiple comparison test). Половото разпределение е установено чрез теста Хи-квадрат (Chi-square).

Връзката между РG и РА е изследвана чрез кръстосана таблица и пропорционални междугрупови съпоставки, базирани на теста Хи-квадрат. Статистическа значимост е отчетена при допустимо ниво на грешка от I-ви тип $\alpha \leq 0.05$.

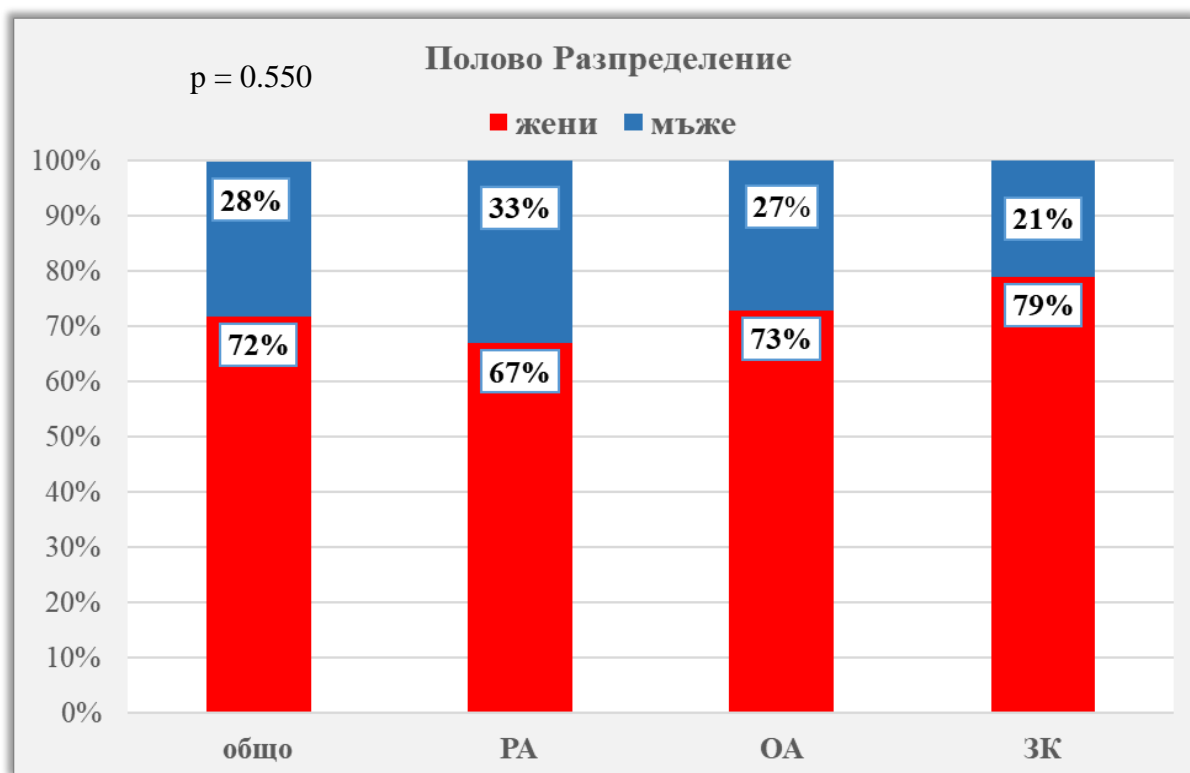
От демографските данни (Таблица 19) се вижда, че средната възраст на 80-те участници в изследването е $51(\pm 12.62)$ години. Групата на пациентите с РА има средна възраст $52.07 (\pm 12.26)$ години и не се различава значимо ($p = 0.255$) от групата на пациенти с ОА, при които средната възраст е $58.92(\pm 12.25)$. При здравите контроли средната възраст е $43.72(\pm 2.26)$, без значима разлика с тази на пациентите с РА ($p = 0.064$), но е значимо по-ниска от групата на болни с ОА ($p = 0.002$). Половото разпределение в цялата извадка от 80 участника и отделните групи е сходно, с по-висок относителен дял на участници от женски пол: цяла извадка (72% жени), РА (67% жени), ОА (73% жени), ЗК (79% жени). Между групите не се установи значима разлика в половото разпределение, $p = 0.550$.

Разпределението на пациентите по пол е илюстрирано на Фигура 13.

Таблица 19. Демографски данни на участниците в изследването

Демографски Данни		Общо (N = 80)	Групи			Значимост (p)
			РА (N = 30)	ОА (N = 26)	Здрави Контроли (N = 24)	
Възраст Mean (\pm SD)		51 (\pm 12.62)	52.07 (\pm 12.26)	58.92 (\pm 12.25)	43.72 (\pm 2.26)	РА→ОА (0.255) РА→ЗК (0.064) ОА→ЗК (0.002**)
Пол (N,%)	Мъже	22 (28%)	10 (33%)	7 (27%)	5 (21%)	0.550
	Жени	58 (72%)	20 (67%)	19 (73%)	19 (79%)	

*Статистическа значимост, $p \leq 0.05$; ** Статистическа значимост, $p \leq 0.01$.



Фигура 13. Разпределение на пациентите по пол. В цялата извадка и отделните групи преобладават жените, *без* значима разлика между групите.

Величината PG е кодирана по дихотомна скала както следва: 1 = PG положителен; 0 = PG отрицателен. Разпределението на положителни и отрицателни находки в изследователските групи е представено на Таблица 20. Процентът на PG положителни е най-висок при РА пациентите (80%), следван от ОА пациентите (35%) и здравите контроли (29%). Тестът Хи-квадрат показва, че разпределението на положителни находки се различава значимо ($p = 0.001$), но не определя точно при кои групови съпоставки има статистически значима разлика.

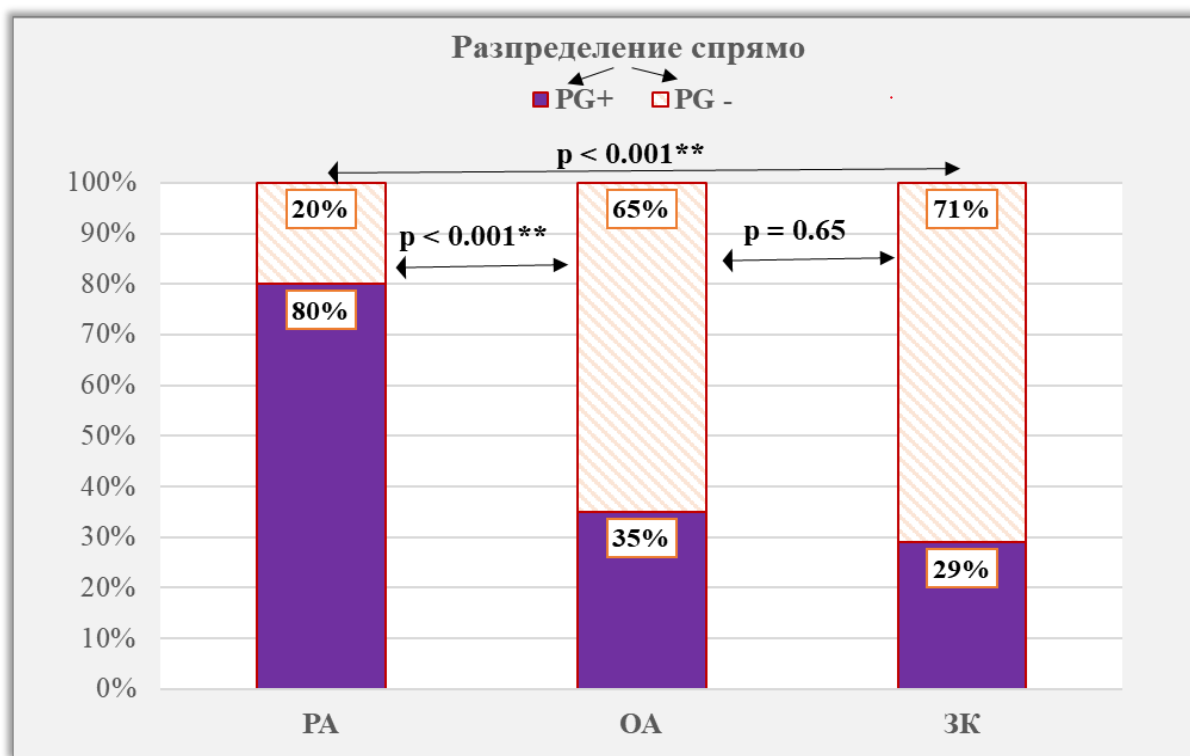
Тази информация е допълнена чрез провеждане на пропорционални сравнения по двойки, от които се установи, че процентът на PG положителни находки при пациентите с РА е значимо по-висок от този при пациентите с ОА ($\chi^2 = 11.461$, $p < 0.001$) и от здравите контроли ($\chi^2 = 13.914$, $p < 0.001$). От друга страна, процентът на PG положителни при пациентите с ОА е сходен с този на здравите контроли и не показва значима разлика, $\chi^2 = 0.202$, $p = 0.65$.

Таблица 20. Разпределение на PG положителни (=1) и отрицателни (=0) находки в изследователските извадки

Находки		Група			p	
		РА	ОА	ЗК	Общо	Двойки Съпоставки
PG	0	Брой	6	17	17	0.001** РА→ОА (0.000**) РА→ЗК (0.000**) ОА→ЗК (0.65)
		%	20%	65%	71%	
	1	Брой	24	9	7	
		%	80%	35%	29%	
Общо		Брой	30	26	24	
		%	100%	100%	100%	

*Статистическа значимост, $p \leq 0.05$; ** Статистическа значимост, $p \leq 0.01$.

Пропорционалното разпределение на PG положителни и отрицателни находки в изследователските извадки е обобщено на Фигура 14.



Фигура 14. Пропорционално разпределение на PG положителни и отрицателни находки в изследваните групи. При РА пациентите процентът е значимо по-висок от този при ОА пациентите и здравите контроли.

4.2 Изследване на връзката между PG и серопозитивност по анти-ССР и анти-MCV, както и между тютюнопушене и PG при пациенти с РА.

В този анализ са включени данни от 30-те пациенти с РА, които бяха обект на анализа в предходния сектор. Техният избор се определя от факта, че при тях са направени изследвания за PG, които дават възможност да се анализира връзката с автоантителата анти-ССР и анти-MCV, както и връзката между тютюнопушене и PG. За целта е използвана кръстосана таблица и е изчислено съотношението на шанса (Odds Ratio или OR), което показва степента на зависимост между наличието на дадено заболяване/показател при определени условия. В контекста на настоящото проучване, OR показва връзката между наличие на PG и серопозитивност по анти-ССР и анти-MCV. Стойности = 0 означават липса на зависимост; стойности по-големи от 1 (> 1) се свързват с по-голяма вероятност за анти-ССР и анти-MCV серопозитивност при пациенти с положителни PG показатели, а стойности по-ниски от 1 (< 1) означават по-висока вероятност за серопозитивност при пациенти с отрицателни PG показатели. Подобно е тълкуването на връзката между тютюнопушене и PG. Стойности по-големи от 1 (> 1) се свързват с по-голяма вероятност за положителни PG показатели при пациенти пушачи, докато стойности по-ниски от 1 (< 1) означават по-голяма вероятност за PG положителни резултати при пациенти непушачи. Колкото по-висока е стойността на OR, толкова по-голяма е зависимостта (Gossal & Gossal 2015). Трябва да се има предвид, че за да се отчете статистически значима зависимост, стойността на грешката трябва да е равна или по-малка от 0.05 ($p \leq 0.05$).

4.2.1 Връзка между PG и серопозитивност по анти-ССР.

За да се определи връзката между наличие на PG и анти-ССР серопозитивност 30-те РА пациентите са разделени на две групи, включващи 24 пациенти с положителни PG резултати и 6 пациенти с отрицателни PG показатели. От общо 24 пациенти с РА, които са PG положителни, 20 (83%) са също анти-ССР положителни и 4 (17%) са анти-ССР отрицателни. От останалите 6 PG отрицателни пациенти, 2-ма (33%) са анти-ССР положителни и 4-ма (67%) са анти-ССР отрицателни (Таблица 21).

Таблица 21. Резултати относно връзката между анти-ССР и PG

PG	Анти-ССР		Съотношение на Шанса 95% Доверителен Интервал			
	(+) Брой (%)	(-) Брой (%)	OR	Долна Граница	Горна Граница	p
	(+)	20 (83%)	4 (17%)	25	2.26	205
(-)	2 (33%)	4 (67%)				

*Статистическа значимост $p \leq 0.05$; ** Статистическа значимост $p \leq 0.01$.

Съотношението на шанса има стойност по-голяма от 1 ($OR = 25$) със статистическа значимост ($p = 0.008$). На базата тези резултати, можем да обобщим, че при PG положителни пациенти с РА вероятността за анти-ССР серопозитивност е значимо по-голяма в сравнение с PG отрицателни пациенти с РА.

4.2.2 Връзка между PG и серопозитивност по анти-MCV.

Връзката между PG и анти-MCV серопозитивност е изследвана аналогично, като отново са включени 30-те пациенти с РА, разделени на 24 пациенти с положителни PG резултати и 6 пациенти с отрицателни PG показатели. От резултатите на Таблица 22 се вижда, че 19 (79%) от общо 24 PG положителни пациенти са също и анти-MCV положителни, а останалите пет (21%) PG положителни пациенти са анти-MCV отрицателни.

От общо 6 PG отрицателни пациенти, един (17%) е анти-MCV положителен и пет (83%) са анти-MCV отрицателни. Съотношението на шанса е със стойност по-голяма от 1 ($OR = 19$) и статистически значимо ($p = 0.014$). В обобщение, резултатите показват, че при PG положителни пациенти с РА вероятността за анти-MCV серопозитивност е значимо по-голяма в сравнение с PG отрицателни пациенти с РА.

Таблица 22. Резултати относно връзката между анти-MCV и PG

PG	Анти-MCV		Съотношение на Шанса 95% Доверителен Интервал				
		(+) Брой (%)	(-) Брой (%)	OR	Долна Граница	Горна Граница	p
	(+)	19 (79%)	5 (21%)	19	1.78	201	0.014*
(-)	1 (17%)	5 (83%)					

*Статистическа значимост, $p \leq 0.05$; ** Статистическа значимост, $p \leq 0.01$.

4.2.3 Връзка между тютюнопушене и PG.

Анализът на връзката между тютюнопушене и PG включва 19 РА пациенти пушачи и 11 РА пациенти непушачи. Резултатите (Таблица 23) показват, че от общо 24 PG положителни пациенти, 18 (75%) са пушачи. Останалите 6 (25%) са непушачи. От общо 6 пациенти с PG отрицателни показатели, един (17%) е пушач и останалите пет (83%) са непушачи. Съотношението на шанса $OR = 15$ е със статистическа значимост ($p = 0.023$) и показва, че вероятността за PG положителни находки е по-висока при пациенти с РА, които са пушачи в сравнение с пациенти с РА непушачи.

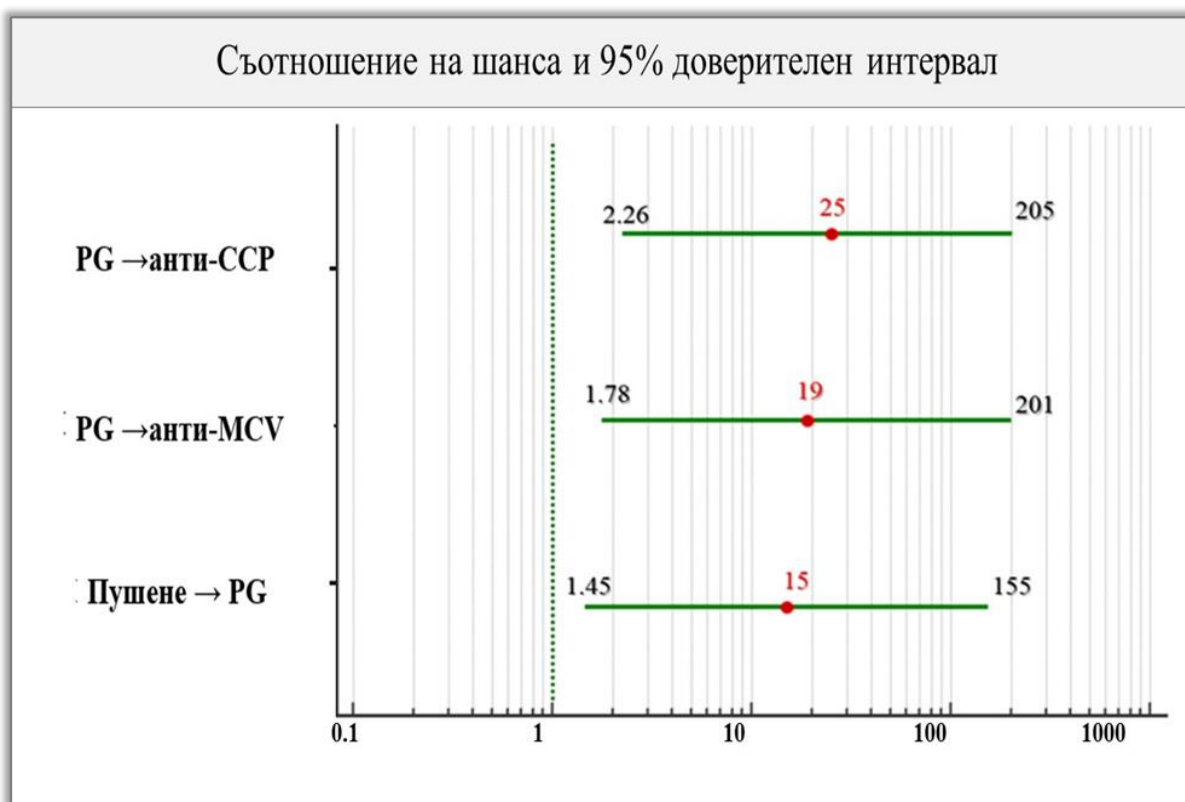
Таблица 23. Резултати относно връзката между тютюнопушене и PG

PG	Тютюнопушене		Съотношение на Шанса 95% Доверителен Интервал			
	(+) Брой (%)	(-) Брой (%)	OR	Долна Граница	Горна Граница	p
	(+)	18 (75%)	6 (25%)	15	1.45	155
(-)	1 (17%)	5 (83%)				

*Статистическа значимост $p \leq 0.05$, ** Статистическа значимост $p \leq 0.01$.

4.2.4 Обобщение на резултатите

Фигура 15 представя графиките на съотношението на шанса (OR) между PG и автоантителата анти-ССР и анти-MCV както и между тютюнопушене и PG.



Фигура 15. Графики на съотношението на шанса. Горните две графики илюстрират връзката между наличие на PG и анти-ССР и анти-MCV положителни резултати. Долната графика илюстрира връзката между тютюнопушене и PG положителни резултати.

Хоризонталните линии обхващат ниската стойност на 95%-я Доверителен Интервал, стойността на OR (в средата) и горната граница на 95%-я Доверителен

Интервал. Прекъснатата вертикална линия отговаря на стойност 1. Горните две графики илюстрират връзката между наличие на РG и анти-ССР и анти-МСV положителни резултати. Долната графика илюстрира връзката между тютюнопушене и РG положителни резултати. Вижда се, че при всички параметри линиите на OR са разположени в дясно на вертикалната линия, отговаряща на стойност 1.

Тъй като всички стойности са по-високи от 1, шансът за серопозитивност по анти-ССР и анти-МСV е по-висок при РА пациенти положителни за РG. От друга страна, при пушачи вероятността за наличие на РG е значително по-голяма отколкото при непушачи.

Задача 5: Да се изследва наличието на връзка между серумните нива на възпалителния медиатор IL-17 и антителата анти-ССР, анти-МСV и анти-CarP при болни с РА.

5.1 Съпоставка на нивата на IL-17 при РА болни и здрави контроли.

Изследване на интерлевкин IL-17 е направено при 47 болни с РА и 44 здрави контроли. Средните стойности са съпоставени чрез t-тест за независими извадки (Таблица 24). При болните с РА средната стойност е по-висока (12.77) от тази при здравите контроли (7.91), но разликата не е от статистическа значимост, $p = 0.276$.

Таблица 24. Средна стойност на IL-17 при болни с РА и здрави контроли.

Група	Брой (N)	Средна Стойност	SD	Разлика	t	p
Болни с РА	47	12.77	28.62	4.8677	1.097	.276
Здрави контроли	44	7.91	7.03			

5.2 Резултати относно връзката между IL-17, анти-ССР, анти-МСV и анти-CarP в извадката от пациенти с РА.

За целта на този анализ е използван корелационния анализ на Спирмън (Spearman rho), поради това, че се търси асоциация между данни кодирани по дихотомна скала (0-1) - анти-ССР, анти-МСV и анти-CarP и други измерени по продължителна скала - (IL-17).

Корелационните коефициенти са интерпретирани спрямо референтните стойности на Коен (Cohen, 1988) както следва:

- много голяма/висока корелация: $\pm (0.70 - 1)$
- голяма/висока корелация: $\pm(0.50 - 0.69)$

- средна/умерена корелация: $\pm (0.30 - 0.49)$
- слаба/ниска корелация: $\pm (0.10 - 0.29)$

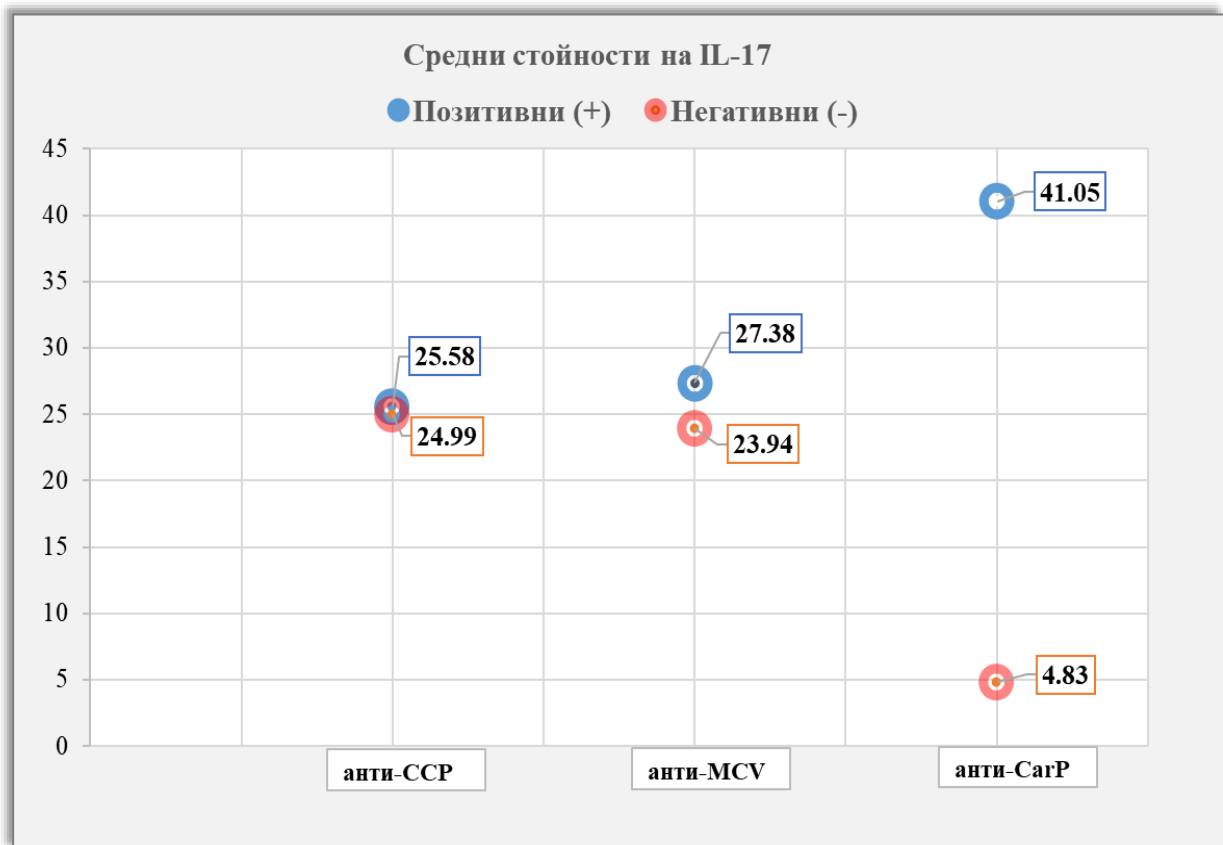
Положителни стойности означават положителна линейна корелация, докато отрицателни стойности обозначават отрицателна линейна корелация, или стойностите на две величини се променят в обратна посока, когато едната нараства, другата намалява.

Корелационните коефициенти са представени на Таблица 25. Между анти-ССР (+/-) и IL-17 не се наблюдава значима корелация, $r_s = 0.162$, $p = 0.380$. Между анти-MCV (+/-) и IL-17 също не се наблюдава значима корелация, $r_s = 0.157$, $p = 0.340$. Единствено между анти-CaP (+/-) и IL-17 се отчита значима положителна корелация от умерена величина, $r_s = 0.388$, $p = 0.015$.

Таблица 25. Резултати от теста на Спирман за връзката между IL-17, анти-ССР, анти-MCV и анти-CaP в извадката от пациенти с РА.

Величина	Статистики	IL-17
анти-ССР (+/-)	Коефициент на Спирман	.162
	Значимост (p)	.380
	N	47
анти-MCV (+/-)	Коефициент на Спирман	.157
	Значимост (p)	.340
	N	47
анти-CaP (+/-)	Коефициент на Спирман	.388
	Значимост (p)	.015*
	N	47

Резултатите от корелационния анализ са илюстрирани със средните стойности на IL-17 при положителни и отрицателни пациенти с РА по трите показателя. Става ясно, че средните стойности на IL-17 при анти-ССР(+) и анти-ССР(-) пациентите са много сходни, затова и не се установява връзка. Същата тенденция е валидна за анти-MCV (+) и анти-MCV (-) пациенти. При тях средните стойности на IL-17 са също много сходни. Единствено при анти-CaP (+) и анти-CaP (-) пациенти се вижда съществена разлика между средните стойности на IL-17 и това обяснява значимата положителна корелация между двете величини.



Фигура 16. Средни стойности на IL-17 при серопозитивни и серонегативни пациенти с РА относно анти-CCP анти-MCV и анти-CarP

Задача 6: Да се изследват родственици на пациенти с РА за наличие на серопозитивност по отношение на анти-CCP, анти-MCV и анти-CarP антителата.

В настоящия анализ са включени 18 родственици на пациенти с РА, със средна възраст 40.44 ± 11.84 , между които 12 жени (66.7%) и 6 мъже (33.3%). Въпреки че извадката е малка, използвахме възможността да направим пилотно изследване относно антителата анти-CCP, анти-MCV и анти-CarP и връзката с начален стадий на РА. Резултатите са информативни, с перспектива за по-мощно бъдещо изследване на проблема.

За целта е изчислен процента на анти-CCP, анти-MCV и анти-CarP положителни находки. Получените резултати са съпоставени с тези на пациенти с РА и здрави контроли чрез теста Хи-квадрат за сравнение на пропорции. За проследяване на връзката между анти-CCP, анти-MCV и анти-CarP положителни находки при родственици на пациенти с РА с начален РА е използван корелационния тест на Спирмън и е изчислено съотношението на шанса (Odds Ratio/OR).

6.1 Съпоставка на родственици на РА пациенти с РА пациенти и здрави контроли по отношение на анти-ССР, анти-МСV и анти-СагР положителни находки.

Резултатите от настоящия анализ са обобщени на Таблица 26. Вижда се, че при роднините не се установяват анти-ССР(+) случаи, докато при РА пациентите 69% са анти-ССР(+), със значима разлика ($p < 0.001$). От друга страна, между роднините и здравите контроли не съществува значима разлика по отношение на анти-ССР(+), $p = 0.46$.

Пет от роднините (27.8%) са анти-МСV(+), но в сравнение с пациентите с РА (73%), процентът на положителни находки е значително по-нисък, $p = 0.01$. Между роднини и здрави контроли разликата в положителни находки не е значима, $p = 0.52$.

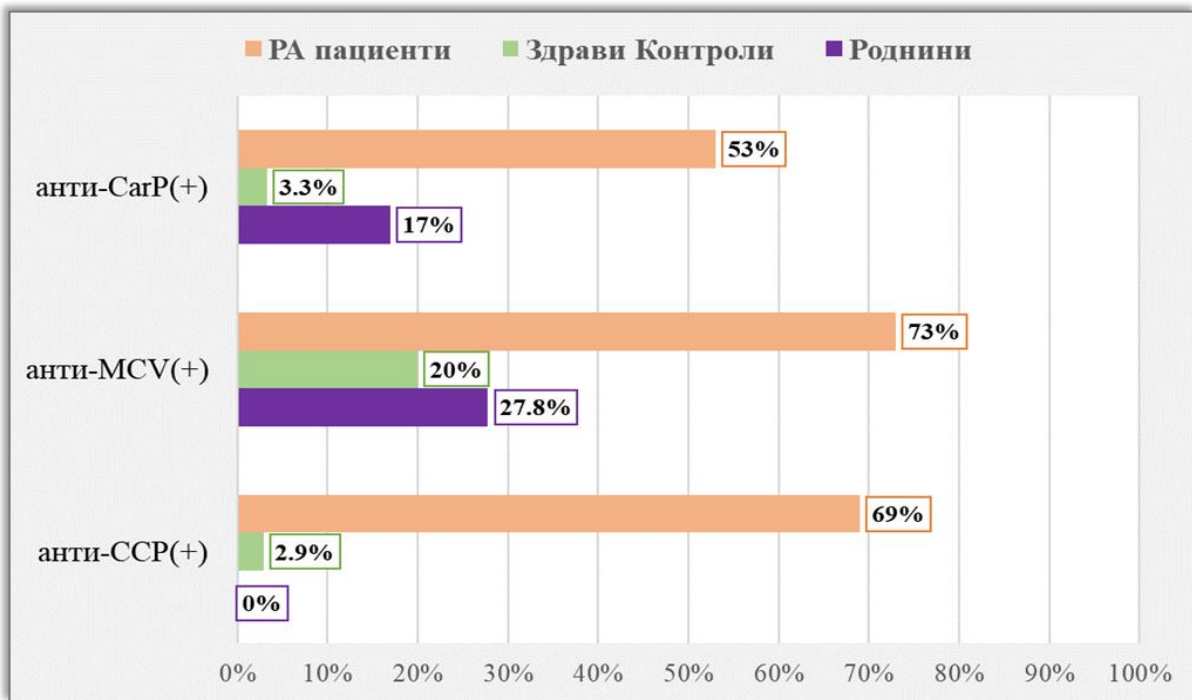
Подобна тенденция съществува по отношение на анти-СагР(+) находки. От роднините 17% са положителни, докато при пациентите с РА процентът (53%) е значимо по-висок, $p = 0.005^{**}$. В сравнение със здравите лица, при роднините процентът положителни находки е с 13.7 % по-висок и разликата е статистически значима ($p = 0.03$).

Таблица 26. Процент на анти-ССР, анти-МСV и анти-СагР положителни находки при родственици на пациенти с РА.

Величина	Роднини	РА пациенти	Здрави Контроли	Значимост (p)
анти-ССР+ N, %	0/18 (0%)	57/83 (69%)	1/35 (2.9%)	Роднини → РА, $p < 0.001^{**}$ Роднини → ЗК, $p = 0.46$
анти-МСV+ N,%	5/18 (27.8%)	61/83 (73%)	7/35 (20%)	Роднини → РА, $p = 0.01^*$ Роднини → ЗК, $p = 0.52$
анти-СагР+ N,%	3/18 (17%)	44/83 (53%)	2/62 (3.3%)	Роднини → РА, $p = 0.005^{**}$ Роднини → ЗК, $p = 0.03^*$

Статистическа значимост, $p \leq 0.05$; ** Статистическа значимост, $p \leq 0.01$.

Процентът на анти-ССР, анти-МСV и анти-СагР положителни находки при пациенти с РА, родственици на пациенти с РА и здрави контроли е представен на Фигура 17. Очертава се преобладаващият процент при пациенти с РА.



Фигура 17. Процент на на анти-ССР, анти-MCV и анти-CarP положителни находи при родственици на РА пациенти, РА пациенти и здрави контроли

6.2 Връзка между анти-ССР, анти-MCV и анти-CarP положителни находи при родственици на пациенти с РА и начален РА.

В процеса на настоящото изследване, в хода на проследяване при трима от 18-те родственици на РА пациенти е установен начален РА. Резултатите от корелационния анализ на Спирмън са изнесени на Таблица 27. Поради това, че всички 18 роднини са анти-ССР(-) не се установява връзка между анти-ССР и начален РА, но с останалите два показателя съществува значима корелация. Между анти-MCV(+) родственици и начален РА се установява много висока корелация ($r^s = 0.721$), която е статистически значима, $p = 0.003$. Подобна е връзката с анти-CarP(+), където между положителни родственици и РА се наблюдава висока корелация със статистическа значимост, $r^s = 0.600$, $p = 0.013$.

Таблица 27. Връзка между анти-ССР, анти-MCV и анти-CarP положителни показатели при роднини на РА пациенти и развитие на РА.

Тест на Спирмън		анти-ССР (+)	анти-MCV(+)	анти-CarP(+)
Начален стадий на РА	Корелационен коефициент	-	.721	.600
	Значимост (p)	-	.003**	.013*
	Брой (N)	18	18	18

Статистическа значимост, $p \leq 0.05$; ** Статистическа значимост, $p \leq 0.01$.

Съотношението на шанса показва значимо по-висок риск от развитие на РА при родственици, които са анти-MCV и анти-CarP положителни (Таблица 28). От 5-мата родственици с положителни анти-MCV показатели, при 3-ма (60%) е установен начален стадий на РА, а 2-ма (40%) са отрицателни за РА. Съотношението на шанса $OR = 37.80$ е по-голямо от 1 (> 1) и статистически значимо, $p = 0.028$.

По отношение на анти-CarP са установени 3 случая с положителни показатели. От тях 2-ма (66%) са с начален РА и 1 (34%) е отрицателен за РА. Съотношението на шанса $OR = 28.00 > 1$ е статистически значимо, $p = 0.037$. И при двете антители, 95%-вият доверителният интервал е с голям диапазон поради малката извадка, но като цяло може да се предположи, че положителни анти-MCV и анти-CarP показатели са индикативни за развитието на РА при родственици на РА пациенти.

Таблица 28. Съотношение на шанса (OR) за връзката между анти-MCV и анти-CarP положителни показатели при роднини на РА пациенти и риск от развитие на РА

РА				Съотношение на Шанса 95% Доверителен Интервал			
	(+)	(-)		OR	Долна Граница	Горна Граница	p
	Брой (%)	Брой (%)					
анти- MCV	(+)	3 (60%)	2 (40%)	37.80	1.45	980.81	.028*
	(-)	0 (0%)	13 (100%)				
анти- CarP	(+)	2 (66%)	1 (34%)	28.00	1.20	648.84	0.037*
	(-)	1 (7%)	14 (93%)				

Статистическа значимост, $p \leq 0.05$; ** Статистическа значимост, $p \leq 0.01$.

ОБСЪЖДАНЕ

Изследване на ролята на автоантителата анти-ССР и анти-МСV в диагностичен аспект при РА. Определяне на специфичност, чувствителност, положителна и отрицателна предиктивна стойност на анти-ССР и анти-МСV антителата при болни с РА.

Както беше посочено наличието на автоантитела е една от основните характеристики на РА и всеки отделен пациент се характеризира със спектър от автоантитела.

Сред различните автоантитела, описани при пациенти с РА, антицитрулинирани протеинови антитела - АСРА са показали най-висока специфичност - 95-98%, като тяхната чувствителност е 70-80%. Модерните АСРА тестове имат висока специфичност за ранен РА достигайки 96%. Относно АСРА са правени редица изследвания, с цел уточняване на техните възможности в диагностичен план, предиктивната им стойност по отношение на последващо развитие на РА при рискови пациенти, като прогностичен критерий по отношение на агресивен и деструктивен ход на заболяването, използването им като мониториращ маркер в хода на провеждана терапия. Изнесените данни посочват определени предимства на едни или други от тях. Високите диагностични възможности в ранен, предклиничен стадий са полезни за обосноваване включване на ранно лечение, преди дефинитивни промени и инвалидизация при рискови контингенти и родственици. Тук е важна диагностичната стойност на всеки отделен маркер или комплексното им използване. Ползите – ранна терапия преди деструктивни промени и модифициране на хода на болестта в етапа на разглеждане на заболяването като недиференциран артрит, а от друга страна избягване на риска от хипердиагностика и провеждане на ненужно агресивно лечение.

Изнесени са значителен брой доклади, отразяващи сравнителен преглед между различни антитела от АСРА групата, правени са метаанализи, оценяващи диагностичните и предиктивни им възможности. Важно е да си подчертае, че като цяло се посочват значителните диагностични възможности на антителата от тази група. При отчитане на наличните разлики от значение е използването на имунологични тестове от различни производители, популационните различия в изследваните групи, предопределящи различия като в генома, така и в екзогенни фактори. Научната литература предоставя различни стойности на чувствителност и специфичност и различни тенденции относно прецизността на двата вида автоантитела в диагнозата и проследяването на РА.

При разглеждане на ролята на антителата срещу цитрулиниран виментин се посочва, че с най-голяма имуногенност е един от биохимичните варианти на цитрулинирания виментин - МСV - модифициран цитрулиниран виментин, в чиято структура има заместване на аминокиселина аргинин с глицин.

В нашето проучване изследвахме и съпоставихме анти-MCV към наложения в практиката като стандарт анти-ССР тест, като разгледахме тяхната чувствителност, специфичност, положителна и отрицателна предиктивна стойност. В различните проучвания двете антитела са съпоставяни и разглеждани при болни с РА и при здрави контроли. В някои изследвания са включени три вида участници – освен болни с РА и здрави контроли е включена и втора контролна група от болни с други заболявания. Настоящото проучване включва болни с РА, здрави контроли, а също и болни с ОА и лупус.

С три групи участници са и анализите на Иванова-Тодорова et al., Bartoloni et al., Roland, представени в Таблица 29. Вижда се, че чувствителността на анти-ССР в настоящото изследване е близка до тази в изследванията на Bartoloni et al. (2012) и Иванова-Тодорова et al. (2012). По-ниска стойност се отчита от Roland (2008). Чувствителността на анти-MCV показва по-големи различия, като най-висока е в изследването на Иванова-Тодорова et al. Специфичността на анти-ССР също е в диапазона на две от предишните проучвания (Bartoloni et al. и Roland) и се различава от тази на Иванова-Тодорова et al., които отчитат много ниска стойност на специфичност (33.33). По-висока степен на съгласие има относно специфичността на анти-MCV и нашият резултат е много близък до този на Bartoloni et al. и Roland.

Таблица 29. Съпоставяне на резултатите на настоящото проучване с предишни изследвания

Научни изследвания	Брой Участници			Чувствителност		Специфичност	
	РА	Други Заболявания	Здрави	анти-ССР	анти-MCV	анти-ССР	анти-MCV
Настоящо 2018	83	55	35	68.67	73.49	97.78	87.78
Bartoloni et al., 2012	285	136	91	77	59	96	92
Иванова-Тодорова et al., 2012	42	23	20	73.81	92.86	33.33	100
Roland 2008	156	158	50	51	57	95	91

В доста други проучвания се посочват резултати, касаещи същите характеристики на двете антитела, а освен това са разглеждани също и допълнителни насоки, касаещи връзката с последваща рентгенографска прогресия, активност на заболяването, мониториране на ефекта от прилаганото лечение и риск от рецидив след постигната ремисия.

Sghiri et al. са провели изследване, с цел оценка на диагностичната стойност на анти- MCV антителата, при което са направили сравнение с анти-ССР антителата, с IgA, IgM и IgG РФ. Установяват, че чувствителността и специфичността на анти-MCV са съответно 74,1% и 79%, а 21 % от контролите са били анти-MCV положителни. Чувствителността и специфичността на анти-ССР са отчетени съответно 72,4% и 96,1%, като едва 3.9% от контролите са били анти-ССР положителни. Заклучават, че анти-MCV показва сравнима чувствителност, но по-ниска специфичност от тази на анти-ССР.

Dejaco et al. са провели изследване с цел оценка на диагностичната стойност на анти-MCV в сравнение с второ поколение анти-ССР- анти-ССР2 ELISA тестове. В заключение, Dejaco et al. приемат, че и както анти-MCV, така и анти-ССР-2 антителата се представят сравнително добре при диагностицирането на РА, като в диапазона на висока специфичност, анти-ССР2 анализът изглежда по-добър от анти-MCV теста.

Yousefghahari et al. провеждат проучване с цел сравняване на анти- ССР2 и анти- MCV в иранска група пациенти с РА. Yousefghahari et al. не откриват значими разлики между чувствителността и специфичността на анти-ССР и анти-MCV - чувствителност съответно 85% и 81%, а специфичност - 96% и 95%. Те приемат, че и двата теста имат сходна стойност и позитивирането на анти-ССР и анти-MCV обикновено съвпада.

Damjanovska et al. са направили извод, че диагностичната ефективност на анти-MCV в диференциалната диагноза на ранния артрит е по-ниска от тази на анти-ССР антителата.

Maraina et al. стигат до заключението, че анти-ССР антителата имат по-висока диагностична специфичност и положителна предиктивна стойност, отколкото РФ и анти-MCV антителата, а РФ е показал най-висока чувствителност при съпоставка с анти-ССР и анти-MCV антителата.

Soós et al. приемат, че ефективността на анти-MCV е подобна на тази на анти-ССР2 при диагностициране на РА, а комбинираното прилагане на двата теста може да подобри лабораторната диагностика на РА.

Mansour et al. са установили, че анти-MCV антителата са с висока чувствителност - 79,6% и специфичност - 96,6% при диагностициране на РА.

Някои наблюдения установяват диагностични възможности на анти-MCV антитела, при анти-ССР-негативни и РФ-негативни пациенти с РА.

Poulsom и Charles приемат, че анти- MCV антителата са специфичен и чувствителен маркер за РА, за които в свое изследване те отчитат специфичност 96%.

В някои проучвания се приема, че за клиничната практика, изследването само на един от тези тестове е достатъчен за оценка на риска от развитие на РА, но като цяло се налага становището, че съвместното изследване на анти-MCV и

анти-ССР антитела, значително повишава диагностичното им значение, като се отчита по-висока специфичност и положителна предиктивна стойност.

Сравнителна оценка на анти-ССР и анти-MCV е правена и в метаанализи.

Luime et al. разглеждат 14 изследвания, от които 11 включват диагностични данни и 3 включват прогностични данни, като целят да направят преглед на диагностичната и прогностичната стойност на анти-MCV антителата при РА. Luime et al. стигат до извода, че анти-MCV теста може да се използва като алтернатива на анти-ССР.

Qin et al. са провели метаанализ на 16 проучвания, с цел идентифициране на диагностичната стойност на анти-MCV антителата при болни с РА. Данните от метаанализа са показали, че точността на MCV анализа при диагностицирането на РА е висока, но в крайна сметка клиницистът трябва да вземе под внимание резултатите от анти-MCV тестовете в комбинация с други конвенционални изследвания и клиничната характеристика.

Lee et al. провеждат два мета анализа, използвайки библиотечните бази данни Medline, Embase и Cochrane, касаещи диагностичната точност на анти-MCV и анти-ССР при пациенти с РА в сравнение със здрави контроли. Стигат до извода, че чувствителността на анти-MCV е значително по-висока от тази на анти-ССР при диагностициране на РА, но специфичността на анти-MCV е по-ниска от тази на анти-ССР, анти-MCV има по-ниска диагностична точност от анти-ССР при РА, въпреки че и анти-MCV и анти-ССР показват сравнимо високи PLR.

Във връзка с участието на PAD в каскадата от процеси, водещи до образуване на АСРА, то същите ензими се разглеждат и като таргет за насочено лечение на РА.

Изследване и съпоставка на титъра на анти-ССР и анти-MCV антителата в серум и синовиална течност при болни с РА

Остава открит въпросът, касаещ първичното органно огнище на белтъчно цитрулиниране и продукция на АСРА. Изнесени са доклади за връзка с дихателната система, посочва се възможното локално въздействие на екзогенни фактори. Подобни анализи в бъдещи проучвания могат да очертаят допълнителен таргет за превенция и въздействие. Нашите данни, подобно на други изследвания показват по-висок титър на анти-ССР и анти-MCV антитела в синовиална течност при АСРА позитивни пациенти.

Цитрулинираните антигени, свързани с АСРА изобилстват във възпалената синовия и освен, че присъстват в серум на болни с РА, АСРА се установяват и в синовиалната течност. Snir et al. съпоставят нивото им както в серум, така и в ставен пунктат на болни с РА. Значително по-високи нива на анти-ССР и анти-MCV те намират в синовиална течност на болни с РА в сравнение с нивото им в серума на същите болни. За по-високите нива на АСРА в синовиалната течност,

авторите предполагат, че е налице локална продукция и / или задържането им в мястото на възпаление, регулирано от предразполагащи към РА гени.

Изследване и оценка на връзката между екзогенния фактор тютюнопушене и позитивирането на автоантителата анти-МСV и анти-ССР в серум на пациенти с РА

РА се разглежда като имунно-медирано заболяване със силно генетично влияние и неговият произход може да включва взаимодействие между външните влияния и имунната система, проявяваща се особено върху мукозните повърхности. В тази връзка три локуса се свързват особено с РА: белите дробове, устната лигавица и стомашно-чревния тракт. Преди повече от 20 години в тази връзка като екзогенен фактор се идентифицира тютюнопушенето, като се посочва ролята на биологията на белодробната лигавица в етиологията на заболяването. Количеството и продължителността на тютюнопушенето са важни, като най-високият риск се наблюдава при повече от 20-годишни експозиции. Рискът бавно се понижава до нормалното в рамките на 10 години от спиране на тютюнопушенето, което предполага, че ефектите не са само зависими от токсини, но могат да възникнат и чрез промяна на имунологичната функция.

Тютюнопушенето може да увеличи образуването на цитрулинирани протеини и да стимулира активирането на имунната система. Наночастиците, инкорпорирани в тютюнев дим, могат да доведат до активиране на PAD2 и PAD4 вътре в клетките, да повлияят регулирането на PAD2 експресията с последващо цитрулиниране. Въз основа на наблюденията, направени в няколко популации, се предполага, че връзката между пушенето и АСРА може да се дължи на повишената експресия на цитрулинираните антигени в белите дробове на пушачите. На базата на направен метаанализ Sugiyama et al. правят извод, че тютюнопушенето е рисков фактор за РА, особено при мъжете, които са РФ позитивни

В рамките на настоящото изследване се установи, че вероятността за анти-ССР и анти-МСV серопозитивност е значимо по-голяма при пушачи с РА в сравнение с непушачи болни от РА. Превантивните мерки за намаляване на тютюнопушенето са от съществено значение и могат да доведат до намаляване на честотата на РА.

Изследване на налична връзка между серумните нива на анти-ССР и анти-МСV антителата, като изява на имунологична активност с ултрасонографски индекс за синовит US7 при пациенти с РА

По отношение на болестна и възпалителна активност на РА се прилагат различни скали. Публикувани са резултати, относно налична връзка между скали за оценка на болестната активност и наличен синовит, обективизиран

посредством US. В настоящето изследване беше изследвана връзка между наличие на имунологична активност по отношение на анти-CCP и анти-MCV антителата и US7 скор.

Основната цел при проследяване на РА е предотвратяване и / или редуциране на степента на физически функционален дефицит, посредством агресивен контрол на активността на заболяването и по този начин предотвратяване на деструктивната прогресия, която е следствие от комбинирания ефект на потенциално обратима възпалителна активност и необратими деструктивни ставни и периставни увреждания. Актуалните препоръчвани стратегии за контрол и лечение на РА се основават на акуратно проследяване на активността на заболяването. Болестната активност може да варира широко, а нейното определяне е важен компонент при контролирането на болестта. Индексите за определяне на активността на заболяването се основават на различни клинични, лабораторни и физикални показатели. Повечето от тях, включително показателя Disease Activity Score - DAS, модифициран DAS в 28 стави - DAS28, Simplified Disease Activity Index (SDAI), Clinical Disease Activity Index (CDAI) и Routine Assessment of Patient Index Data 3 (RAPID 3) се основават на количествени стойности и резултати, на докладвани от пациентите резултати, или и на двете. Клиничните показатели за активността на заболяването обаче също са лимитирани - клиничното изследване може да бъде трудно приложимо, възможно е пропускане на субклиничен синовит, свързан с прогресиращо увреждане на ставите, пациенти с фибромиалгия могат да дадат погрешни данни за активността на заболяването. Тези затруднения могат да бъдат преодоляни чрез допълване на клиничния преглед с мускулно-скелетен ултразвук - Ultrasonography (US), който е по-чувствителен и надежден от физикалния преглед. В това отношение немският резултат US7 е осъществим, надежден и чувствителен метод за US верифициране на възпалителната активност при РА. US е сензитивен метод, с изразена информативна стойност по отношение на меките тъкани, хиалинния хрущял, костната повърхност и ставния излив. Екссесивната синовиална васкуларизация може да бъде представена както с цветен, така и PD US, като установеният посредством PD US пролиферативен синовит, корелира с хистологично потвърден синовит. Полуколичествена система за оценяване на US, ултразвуков резултат 7 (US7 резултат), е предложен за оценка на установен РА. Той е разработен за да стандартизира US изследване в ежедневната ревматологична практика и в многоцентровите проучвания. US7 включва ставите, които е най-вероятно да бъдат засегнати от РА.

Резултатите от настоящето изследване показват, че между сонографския индекс US7 и анти-CCP и анти-MCV съществува значима корелация. Това означава, че по-високи стойности на US7 се срещат при серопозитивни анти-CCP и анти-MCV пациенти. Между сонографският скор и изследваните две антитела

съгласуваността е висока, като по-високата степен на съвпадения се очертава между US 7 и анти-MCV серопозитивни находки.

Тъй като по-високото ниво на анти-ССР и анти-MCV в синовиална течност вероятно е свързано с налично възпаление или последваща локална продукция на тези антитела в синовиата, а US7 е чувствителен образен метод за оценка на степента на синовиално възпаление, то високото ниво на тези антитела при активен РА предполага и висока ставна възпалителна активност. С приложна цел е обосновано последващо проучване, оценяващо ролята им на допълнителен индиректен маркер за мониториране на наличен синовит.

Изследване и оценка наличието на връзка между анти-CarP антителата с анти-MCV, анти-ССР и РФ при пациенти с РА и връзката между тютюнопушенето и позитивиране на анти-CarP антителата.

Карбамилирането, посредством миелопероксидаза е част от естествения защитен механизъм, осъществяващ се при възпалителни състояния и е предполагаема връзка между тютюнопушенето, уремията, възпалението и атерогенезата.

Анти-CarP автоантитела могат да бъдат открити при около 45% от пациентите с ранен артрит - както при АСРА позитивни, така и при АСРА негативни пациенти. Те могат да реагират кръстосано с АСРА, което затруднява характеристиките на тяхната имунореактивност, но въпреки това, сега се приема, че анти-CarP антителата и АСРА представляват два отделни класа автоантитела при РА. Анти-CarP антителата могат да бъдат предиктор на рентгенографската прогресия. Установяването на анти-CarP антитела в ранен стадий на артрит, може да има голямо клинично значение, тъй като се свързва с по-тежък ход на болестта, а включването на ранна агресивна терапия потенциално би предотвратило тези увреждания.

В настоящето проучване, след като беше определена референтна стойност за анти-CarP антителата при здрави контроли, наличието на същите беше изследвано при групата болни с РА. Беше изследвана също връзката между анти-CarP антителата с анти-ССР, анти-MCV антителата и РФ при болните с РА, както и връзката между анти-CarP антителата и тютюнопушенето.

От настоящите изследвания при пациентите с РА 53% бяха серопозитивни за анти-CarP, а останалите 47% са серонегативни. От здравите контроли само 2-ма от 62-ма(3.3%) бяха анти-CarP серопозитивни, а останалите 60 (96.7%) бяха негативни. Трябва да се отбележи, че двата случая на анти-CarP серопозитивност при здравите контроли с много малко надвишават определената горна референтна граница. От получените резултати не се установи значима връзка между анти-CarP и анти-ССР и анти-MCV, като обаче между анти-CarP и РФ се установи значима връзка.

В контекста на настоящото изследване се установи значима връзка между анти-CarP антителата и тютюнопушенето. При пушачите нивото на анти-CarP е значимо по-високо както при всички изследвани участници от цялата извадка, така и само в групата на пациентите с РА. Освен това, сред пушачите с РА процентът на позитивиране на анти-CarP антителата е значимо по-висок от този при непушачите с РА. От получените резултати може да се заключи, че тютюнопушенето увеличава вероятността за анти-CarP позитивиране при пациенти с РА.

Редица проучвания са изследвали връзката между анти-CarP и други свързани с РА показатели, включително автоантителата анти-CCP, анти-MSV и РФ. В някои случаи се установява връзка между серопозитивност по един или повече от гореупоменатите показатели и анти-CarP, докато в други се наблюдават сходни нива на анти-CarP при серопозитивни и серонегативни пациенти с РА. Разногласието в съществуващите публикации поражда интерес и налага допълнителни проучвания с различни популации от пациенти с РА.

Настоящият извод потвърждава резултатите на Challener et al., 2016 и Othman et al, 2017, които отчитат липса на значима асоциация между анти-CarP и анти-CCP. От друга страна, съществува противоречие с резултатите на Xia Jiang, et al. 2017, при които процентът на анти-CarP (+) е значимо по-висок при анти-CCP (+) от този при анти-CCP (-). Получените резултати от проучване на Othman et al, 2017, които също отчитат значима връзка между анти-CarP и РФ.

Подобно на други автори Shi et al. изказват тезата, че при идентифицирането на лица в предклиничната фаза на РА, биомаркерите ще имат по-значима стойност. Figueiredo et al. в рамките на проекта RETRO (Reducing therapy in rheumatoid arthritis patients in ongoing remission) установяват, че анти-CarP антителата се откриват при около 45% от пациентите с РА и предхождат неговото начало. Pescani et al. в стигат до извода, че от диагностичните показатели, анти-CarP антителата имат малко по-висока специфичност, но относително по-ниска чувствителност в сравнение с АСРА и IgM-РФ и предполагат допълнителна роля на анти-CarP антителата при диагностицирането на РА, тъй като диагнозата на РА е предимно клинична и се подкрепя от серологични данни. Биомаркерите биха могли да помогнат при стратифицирането на индивиди, изложени на риск от развитие на заболяване дори в предклинични фази във връзка със стремежа за идентифицирането на РА в ранните фази. При разглеждането на анти-CarP антителата като биомаркер Humphreys et al. изследват връзката им в дългосрочен аспект с инвалидизация и болестната активност в кохорта пациенти с възпалителен полиартрит. Направен е извод, че анти-CarP антителата са свързани с повишена инвалидност и по-висока активност на заболяването при пациенти с възпалителен полиартрит, а измерването на анти-CarP антителата може да бъде полезно при идентифицирането на АСРА отрицателни пациенти с по-лоши дългосрочни резултати.

Охарактеризирането на реактивността на автоантитела при РА може да бъде полезно за идентифициране на различни групи пациенти с идентичен профил по отношение на автоантителата и по този начин с отношение към клиничната характеристика на болестта, да изясни по-добре ролята на анти-CarP антителата в патогенезата на РА, както и да бъде използвано като допълнителен диагностичен маркер. Ясно е, че трябва да се извършат повече изследвания на анти-CarP автоантителата, за да се разбере по-добре както имунореактивността им, така също и тяхната функция, тъй като все още не е известно дали те играят патогенетична роля при РА.

От различните докладвани резултати липсва единно становище относно връзката между анти-CarP антителата и АСРА, както и налична връзка с тютюнопушене. В много от проучванията резултатите се отнасят към индивидуални референтни стандарти, поради липса на стандартизирани от фирмите производители, което е фактор за наличие на несъответствие. Вероятно са необходими допълнителни проучвания при различни популации, с цел изясняване на ролята на анти-CarP антителата при болни с РА, както и връзката им с АСРА и в частност с анти-MCV антителата.

Оценяване на обединената диагностична стойност на анти-ССР, анти-MCV, анти-CarP РФ.

Както и редица други автоимунни ревматологични заболявания и РА се характеризира с наличие на антитела от различни групи. Изследването на всяко едно от тях има различна стойност, но в някои проучвания се разглежда и тяхното обединено изследване. В настоящето проучване беше оценена обединената диагностична стойност на анти-ССР, анти-MCV, анти-CarP и РФ при болни с РА.

Първоначално оценихме диагностичната функция на тройна серопозитивност по РФ, анти-ССР и анти-CarP. След това добавихме серопозитивност по анти-MCV и оценихме диагностичната функция на четворна серопозитивност. При тройна серопозитивност (анти-ССР, анти-CarP и РФ), специфичността на диагнозата е 100%, а чувствителността 38.55%. Положителната предиктивна стойност е 100%, а отрицателната 62.50%. При четворна серопозитивност (анти-ССР, анти-MCV, анти-CarP и РФ), специфичността отново е 100%, докато чувствителността е малко по-ниска – 34.94%. Положителната и отрицателна предиктивна стойност са същите както и при тройна серопозитивност - 100% PPV и 62.50% NPV. От резултатите може да се направи извод, че при тройна (РФ, анти-ССР и анти-CarP) и четворна серопозитивност (анти-ССР, анти-MCV, анти-CarP и РФ), се постига висока специфичност - 100% в диагнозата на РА, но чувствителността намалява.

В различни проучвания се анализира обединена стойност на различни антитела от АСРА групата, РФ, както и в съчетание с анти-CarP антитела.

Verheul et al. провеждат метаанализ, целящ оценка на стойността на едновременно тестване на повече серологични маркери за РА. Разглеждат 12 проучвания, включващи повече от 5000 индивиди, обособени в подгрупи, а именно пациенти с РА, пациенти с РА преди развитие на заболяването (pre-РА) индивиди, контроли на заболяването, здрави роднини от първа степен на РА пациенти и здрави контроли, при които са представени данни за РФ, АСРА и анти-CarP антитела. От констатациите от метаанализа Verheul et al. правят заключение, че изследването на всичките 3 антитела намалява шансовете за неправилно класифициране на контролите без РА, но може да не подобри диагностиката на РА. Комбинацията от анти-CarP антитела, АСРА и РФ може да доведе до подобрене на ранната идентификация от лицата, изложени на риск от последващо развиване на РА, но същевременно ще бъдат идентифицирани по-малко от 50% от бъдещи РА пациенти, тъй като другите групи са отрицателни за тези биомаркери. Ранното идентифициране на пациентите с РА или идентифицирането на пациенти с артралгия, които са с висок риск от развиване на РА е важно за ефективното лечение на заболяването, а комбинацията от тези 3 автоантитела може да помогне за идентифицирането на тези високорискови пациенти. В заключение Verheul et al. подчертават, че комбинацията от анти-CarP антитела, АСРА и РФ има много висока специфичност за идентифициране на пациенти с ранен РА в сравнение с различни контроли.

Изследване наличието на връзка между PG и РА, между PG и анти-MCV и анти-ССР антитела в серум на пациенти с РА, както между и PG и тютюнопушене при пациенти с РА

Взаимодействието между човешката микробиота и околната среда е динамично. Колонизиралите човешкото тяло микробните общности, оказват значително въздействие върху него, като участват както в процеси, поддържащи състоянието здраве, така и в такива, включени в генезата на заболявания. Това именно дава основание на някои автори в много отношения да оприличават тези микробни общности на обособен допълнителен орган на тялото. През 2007 г. стартира проект изучаващ човешкия Microbiome - Human Microbiom project (HMP) - касаещ по-добро разбиране на сложните биологични взаимодействия между хората и микроорганизмите с две основни цели: характеризиране на микробните общности, в различни части на човешкото тяло и анализиране на ролята на тези микроби за човека при здраве и болест. В тази връзка през 2008 г. the National Institutes of Health Human Microbiome Project стига до становището, че не може да бъде постигната пълнота в разбирането за човешкото здраве и болести, ако не бъде по-добре проучен и дефиниран комплексно човешко-микробиомния „суперорганизъм“.

Изследванията върху животински модели подкрепят схващането, че оралната, белодробната или чревната микробиота или комбинация от тяхното взаимодействие са необходими за развитие на възпалителен артрит.

Изказва се хипотеза, че въздействието върху микробните общности, участващи в болестните механизми би повлияло и самите заболявания.

Сред бактериите, спрягани като участие в разпространението на РА е и пародонтопатогенът *Porphyromonas gingivalis* (PG), който при хомеостатични условия представлява част от оралната микробиота. Неотдавна е установено, че PG съучаства в нарушението на чревната бариера, което води до системна транслокация на бактериите и повишена тежест на заболяването.

Преди повече от десетилетие е изказано предположението, че специфичен хуморален имунен отговор към PG е действителният стимул за развитието на РА. Последвалите проучвания използват серологични методи в опит да съпоставят генерирането на антитела към PG с автоимунинен отговор - т. е. АСРА антитела и клинично изявен РА. Това обаче носи определени специфики. На първо място методологията и антигените, използвани за количествено определяне на анти-PG антитела, са хетерогенни. Предварителните проучвания използват антитела срещу цяла клетка, бактериален липополизахарид или специфичен протеин на PG. Чувствителността и специфичността на всяко едно от тези антитела и тяхното измерване в различните фази на заболяването са фактор, който затруднява обсъжданото корелиране на серологичните отговори към PG с патогенезата на РА. За обективизиране и научната валидация са необходими съгласуваност и стандартизация на използваните методики. На Второ място, много малко проучвания съобщават за реалното пряко присъствие на PG в субгингивални биофилми на пациенти с РА. Понастоящем това може да бъде постигнато без необходимост от трудоемки, класически микробиологични техники за култивиране. Изолирането на високоспецифична, бактериална ДНК последователност позволява таксономична класификация на многобройни бактериални видове - т.е. микробиомен анализ.

Идентифицирането на PG в редица проучвания, оценяващи връзката му с РА се основава на позитивиране на специфични антитела, насочени към PG антигени, често към LPS. В настоящето проучване PG беше идентифициран, посредством генетичен метод, използвайки PCR. беше съпоставено наличието на PG при група болни с РА, контролна група от здрави участници и втора контролна група от болни с ОА. Резултатите показват, че процентът на позитивен резултат за PG при пациентите с РА е значимо по-висок от този при пациентите с ОА и от здравите контроли.

Необходимо условие за получаване на материал за генетична детекция на PG по използваната технология е наличието на запазени зъби, в съседство с които при наличен пародонтален джоб се получава материал за изследване. В хода на провеждане на проучването от предварително обхванатите пациенти с РА висок

процент бяха с напреднал ПД и пълна загуба на зъби, което ги изключи от настоящето представяне. При болни с РА се установи също и висок процент на частична загуба на зъби.

Като автоимунно заболяване РА е свързан с гама от автоантитела, някои от които са в етап на уточняване и определяне на отношението им към РА. Класификационните критерии на ACR/EULAR от 2010 г, включват РФ и автоантитела от АСРА групата. В настоящето проучване беше изследвана връзка между РG с два серологични маркера от АСРА групата - анти-ССР и анти-MCV при болни с РА. Съпоставихме също и честотата на позитивиране на РG в извадката на болните с РА при пушачи и непушачи.

Нашите резултати показват, че позитивирането на анти-ССР и анти-MCV е сигнификантно по-често при пациентите с РА, положителни за РG, а от друга страна, при пушачите вероятността за наличие на РG е значително по-голяма отколкото при непушачи.

Редица проучвания се фокусират върху връзката между РG и анти-ССР и други антитела срещу цитрулинирани пептиди.

При свое изследване Mikuls et al. са установили, че титрите на антителата към РG са най-високи при ПД, най-ниски при здрави контроли и междинни при РА, като високите титри били установени по-често при РА и ПД- 67% и 77%, в сравнение с контролите - 40%. Mikuls et al. правят извод, че антителата към РG са по-чести при пациенти с РА, отколкото при контролите, макар и по-ниски от тези при ПД. Освен това приемат, че инфекцията с този организъм играе роля за риска и прогресията на РА, поради откритата асоциация между РG титрите и свързаните с РА автоантитела и концентрациите CRP.

Hitchon et al. в свое проучване са потърсили асоциация между антителата към РG и АСРА при група пациенти с РА и техните роднини. Те изследвали пациенти с РА и техни роднини от северноамериканска популация - North American Native (NAN), заедно с NAN контроли и други контроли, които не са от NAN популацията. Hitchon et al. стигат до извода, че при генетично предразположена популация от NAN пациенти с РА и техните роднини, антителата към РG са свързани с АСРА и предполагат, че имунните отговори към РG могат да играят роля при нарушаването на имунния толеранс към цитрулинирани антигени.

Arvikar et al. също намират значително по-високо средно ниво на титъра на антителата към РG при болни с РА, като те съпоставят нивото им както при здрави контроли, така и при болни с лупус и други съединително-тъканни заболявания.

Тютюнопушенето и ПД, се разглеждат като рискови фактори за РА, стимулиращи цитрулирането на протеини и продукцията на АСРА. Докладват се резултати от проучвания, показващи епидемиологични връзки между наличието на ПД и РА. Лансира се идеята, че възможно свързващо звено между двете заболявания би могъл да бъде РG, участващ в развитието на ПД, като в същото време се

предполага и негово участие в процеса цитрулиниране на пептиди, индуциране на продукцията на автоантитела и възпаление.

PG е единственият известен прокариот, който експресира функционална форма на PAD – PPAD - ензимъм, участващ в конвертирането на аргининови остатъци в цитрулинови, към които са насочени високоспецифичните за РА антитела от АСРА групата. Този факт е основание някои автори да предположат потенциална етиологична роля на PG в развитието на РА чрез генерирането на цитрулини антигени. Проучванията са потвърдили, че PAD на PG – PPAD може да предизвика цитрулиниране в човешки пептиди. Цитрулинирането на протеини и пептиди от PPAD - бактериални и на гостоприемника би могло да създаде нови епитопи, към които не съществува имунологична толерантност и при предразположени индивиди да предизвика реактивна продукция на антитела към тези цитрулинирани протеини. Предполага се молекулярна мимикрия между епитопи на бактериални и човешки протеини. Допуска се, че PG, може да участва в първоначалното нарушаване на имунната толерантност, посредством способността си да цитрулинира ендогенни антигени. Посочва се, че значителни количества ДНК от орални бактерии като PG са установени както във венеца на пациенти с ПД, така и в синовиалната мембрана на пациенти с РА. PG може да напусне биофилма и чрез бактериемия е в състояние да се разпространи извън пределите на устната кухина, да проникне в клетките на гостоприемника и в тези локуси да допринесе за инфекция и съответно влошаване на системни заболявания. Установено е, че PG може да проникне и оцелее в тъкани извън устната кухина, като например коронарните ендотелни клетки и плацентата, в които би могъл да допринесе за локални възпалителни реакции. Освен че причинява хронична орална инфекция PG участва в активирането на имунната система, вероятно свързан и със системни заболявания, а посредством Th17 клетъчни отговори също улеснява развитието и прогресирането на CIA.

Общи характеристики между ПД и РА са били открити от Snyderman и McCarty, посочващи, че и при двете заболявания се касае за „самоподдържащо се възпаление в отделение, пълно с течност и в непосредствена близост до костта“, а също, че възпалителните пътища и при двете заболявания водят до болка, подуване и ерозивна деструкция на съседна кост. ПД се характеризира с деструкция на тъканите около зъбите, което в крайна сметка води до загуба на зъби, докато РА се характеризира с разрушаване на хрущяла и костите в ставите, медирано от подобни костно-резорбтивни цитокини и протеинази. През ноември 2012 г. е проведен съвместен семинар на European Federation of Periodontology и American Academy of Periodontology относно ПД и неговата връзка със системните заболявания, включително РА.

Дискутират се обаче и други възможни механизми, посредством които PG би могъл да участва в генезата на РА, освен възможната роля при цитрулиниране на протеини. Marchesan et al. при експериментални модели на CIA при мишки стигат

до извода, че хроничната инфекция с PG предизвиква активирането на имунната система, благоприятствайки Th17 клетъчните отговори и в крайна сметка ускорява развитието на артрит. Въз основа на това те предполагат, че хроничната орална инфекция може да повлияе развитието на РА главно чрез активиране на свързани с Th17 пътища.

Приема се, че повишеният риск от различни заболявания, с които се свързва PG е медиран поне отчасти от промяна в метаболитните им профили. Kato et al. приемат, че пероралното приложение на PG може да промени състава на чревната микробиота, като дисбиозата е свързана с нарушена бариерна функция на червата, водеща до ендотоксинемия, последващо възпаление на черния дроб и мастната тъкан и до влошаване на CIA чрез дисбиоза на червата и повишаване на Th17 отговора в червата. Демонстрирано е, че PG е в състояние да обостри артрит, като предизвиква дисфункция на чревната бариера.

Скорешни проучвания на механизмите, регулиращи подтискане на възпалението, разкриха временно контролиран превключвател от клас липидни медиатори (LM), водещ до образуването на мощни медиатори, произведени чрез стереоселективна конверсия на есенциални мастни киселини, включително омега-3 мастни киселини докозахексанова киселина (DHA) и n-3 докозапентаенова киселина (DPA), които активно участват в развитието на възпалението.

Неотдавна е открита хомеостатична роля на RvD5_{n-3} DPA в регулирането на функцията на чревната епителна бариера, при което понижените нива на този медиатор по време на възпалителен артрит са свързани с повишена пропускливост на чревната бариера и възпаление на ставите. Flak et al. са установили е, че чревните липидни медиаторни профили са променени при мишки с индуциран артрит в сравнение с наивни (неартритни) мишки, като мишките с артрит имат намалени концентрации на няколко specialized proresolving mediators (SPM), включително на протективна чревна защитна докозапентаенова киселина - n-3 docosapentaenoic acid (n-3 DPA) - derived resolving - RvD5_{n-3} DPA. Един от ензимите, отговорни за инактивирането на SPMs, е 15-prostaglandin dehydrogenase (15-PGDH), който окислява вторичните алкохоли до кетони, при което получения продукт губи протективните си свойства. Експериментално е установено, че инактивирането на RvD5_{n-3} DPA по време на възпалителен артрит нараства чрез регулиране на инактивиращия SPM ензим 15-PGDH и повишен метаболизъм на RvD5_{n-3} DPA до неговия неактивен метаболит 17-oxo- RvD5_{n-3} DPA. При възпалителен артрит обаче, имунните комплекси нарушават продукцията на RvD5_{n-3} DPA. Инокулирането с PG води до намаляване на продукцията на RvD5_{n-3} DPA и IL-10 в lamina propria и акцелерира артритното възпаление. Докладва се, че след лечение на PG - инокулирани артритни мишки чрез приложение на RvD5_{n-3} DPA се възстановява чревно-бариерната функция, като се коригират имунните реакции на гостоприемника и се редуцира степента на ставното възпаление. Възстановяването на функцията на чревната бариера след приложение на

RvD5_{n-3} DPA се съпътства от редуциране на ставното възпаление и оточност, намалява левкоцитната инфилтрация в артритните стави.

Изказва се становище, че новите терапевтични средства, базирани се на RvD5_{n-3} DPA, също могат да бъдат потенциални терапевтични възможности при РА, тъй като те регулират както чревната бариера, така и възпалението на ставите и би било възможно разработване на персонализирани терапевтични стратегии след стратифицирането на пациентите с РА въз основа на наличието ПД и повишени нива на РG.

Някои автори предполагат, че бъдещи изследвания, фокусирани върху връзката и възможните механизми на въздействие на РG биха могли да бъдат основа за ефективно лечение и дори предотвратяване на РА, посредством интервенции насочени към ПД и изкореняването на инфекцията иницирана от РG.

Съответната препоръка при тежко засягане на отделни зъби или при тежък ПД е да се пристъпва към лечение на зъбите, като конвенционалната терапия е основно механична и се изразява в почистване на зъбен камък, почистване и пародонтално коренно остъргване за отстраняване на биофилмът на плаките. Контрол се препоръчва след 1-3 месеца като се оценява дълбочина на сондиране на джоба. Подходът е различен според тежестта на промените – при леки форми са достатъчни превантивни грижи – редовно почистване с четка, регулярно проследяване от стоматолог, препоръчва се спиране на тютюнопушенето, докато при тежки форми може да са необходими също прилагане на резекция и присаждане. При допълнителни рискови фактори и съпътстващи системни заболявания, корелиращи с повишена честота на ПД както при болни с РА се налага препоръчителен контрол през 1 до 3 месеца. С цел намаляване на дълбочината на джоба и оптимизиране на достъпа понякога се прилага и оперативно лечение, а също и използването на антибиотици и антимикробни средства. В случай на значителна загуба на поддържащи зъбите тъкани, понякога се извършват хирургични процедури за възстановяване на пародонталната архитектура и стимулиране на регенерацията на поддържащите тъкани. Ползите на лечението на ПД произтичат от редуциране на хроничното възпаление и рисковете, свързани с потенциалния инфекциозен фокус в устната кухина. Резултатите от лечението обаче са променливи, зависими от спазването на адекватен режим от пациента, но дори при своевременна, редовна и професионална интервенция промените могат да персистират и да се стигне до загуба на зъби.

Установените роля и въздействие на ПД по отношение развитието и протичането на редица системни заболявания налагат по-комплексен поглед върху терапевтичните възможности за неговото повлияване и контрол, включително и разработване и приложение на ваксини. Предполага се, че освен използването на конвенционалната терапия приложението на ваксина при болни с ПД би допринесло за предотвратяване на дисбиозата и прогресията на заболяването, чрез недопускане на повторна поява на РG в субгингивалната плака.

Предлага се ваксинация, насочена прицелно към гингипаини на PG с генериране на антитела, неутрализираци гингипаините, с последване на по-слабо изразен възпалителен Th2 отговор. Въздействието върху ПД, посредством ваксинация би повлияло благоприятно и РА, а също и другите заболявания и компликации, за които оралната инфекция е рисков фактор. Прилагането на моноклонални антитела, насочени към антигени на PG е потенциален метод за имунотерапия. Повечето ваксини са насочени към един или множество антигенни компоненти на моноинфектиращи бактерии или вируси, въпреки че се касае за пилимикробен биофилм. Повечето имунизационни подходи, както активни, така и пасивни, срещу ПД са насочени към ограничен брой антигенни компоненти на един специфичен патоген, най-често PG и *A. actinomycetemcomitans*. Препоръчва се комбинирана стратегия, насочена както към специфични патогенни видове, така и към имунния отговор на гостоприемника.

Изследванията върху животински модели подкрепят схващането, че оралната, белодробната или чревната микробиота или комбинация от тяхното взаимодействие са необходими за развитие на възпалителен артрит. Това се основава на факта, че наблюдавани гризачи, отглеждани в условия, осигуряващи елиминиране на микробите или лекувани с антибиотици не развиват възпаление на ставите. Следователно е правдоподобна тезата, че е необходима промяна в бактериалните таксони в няколко мукозни локуса - включително орален, белодробен и чревен микробиом за инициране на прехода от предклинична, автоимунна фаза на РА към клинично класифицирано заболяване.

В ревматологичната практика са познати заболявания, при които са установени етиологични причинители, както и предразполагащия генетичен терен. Примери за това са Синдром на Райтер, Ревматизъм – Ревматична треска. Генетичните проучвания идентифицират свързаните с РА генетични варианти. Продължава търсенето на инфекциозен причинител или причинители, които могат да участват в генезата на заболяването. Независимо от опосредстваният механизъм на участие, като такъв възможен причинител се посочва пародонтопатогена PG. В съгласие с нашите резултати са налице доклади откриващи връзка между наличието на позитивни тестове за АСРА в серум на пациенти с РА, като в същото време се посочват и други възможни патогенетични механизми, опосредстващи участието на PG в развитието на РА, включително и посредством повлияване на чревна дисбиоза. Възможно е всъщност и неговата роля да е последством повече от един механизъм. Подобно на включените медикаментозни средства за ерадикация на етиологичните причинители при Ревматизъм и Синдром на Райтер, в комплексното лечение на РА е целесъобразно да бъдат разгледани и способности за повлияване на PG и индуцирания от него ПД.

Тютюнопушенето беше посочено като рисков фактор особено при РА серопозитивен за АСРА. Нашите резултати посочват връзка по отношение на тютюнопушенето с анти-ССР, анти-MCV, анти-CarP антитела, но също и с

наличие на РG при болни с РА. По отношение на АСРА тютюнопушенето корелира с определени генетични вариации, разглеждани като рискови за РА. Във връзка с анти-CarP тютюнопушенето осигурява прекурсорен субстрат за процеса карбамилране, въпреки че бяха посочени резултати от проучвания, които не откриват налична връзка с тютюнопушене. В настоящето изследване не са включени участници с тежки функционални бъбречни увреждания и уремия. Освен това резултатите показват връзка и между тютюнопушене и откриване на РG. Както беше посочено генетичните фактори не са достатъчни за развитие на РА. В този смисъл повлияемите фактори, какъвто е тютюнопушенето са възможност за ограничаване на РА. В този аспект преустановяването на тютюнопушенето е потенциална възможност за превенция и профилактика на РА.

Изследване наличието на връзка между серумните нива на възпалителния медиатор IL-17 и антителата анти-ССР, анти-МСV и анти-CarP при болни с РА

При пациентите с РА е установен дефект във функцията на циркулиращите Treg клетки, повишено ниво на Th17 клетки и техния цитокин, IL-17 както в плазмата, така и в синовиума. Експериментално се установява, че IL-17 и IL-22 могат да индуцират експресията на RANKL в човешки синовиални фибробласти, което води до загуба на баланса между RANKL/OPG и впоследствие се стига до повишена остеокластогенеза и костна ерозия при автоимунни артрити. IL-17 може да увеличи производството на съдов ендотелен растежен фактор в ревматоидни фибробласти като синовиоцити, допринасяйки за ангиогенезата в ревматоидния синовиум. Освен това, IL-17 може да стимулира експресията на различни провъзпалителни цитокини, напр. IL-1 β , TNF- α , IL-6 и ензими, които разграждат матрикса - например матриксни metalloпротеинази в цялата синовиална тъкан, синовиалните фибробласти и хрущяла, като по този начин потенцират възпалението и разрушаването на хрущяла в хода на развитието на РА.

В настоящето изследване беше потърсена връзка между РА и серумните стойности на IL-17. Беше изследвана и връзката между серумните стойности на възпалителния медиатор IL-17 и серумните стойности на анти-ССР, анти-МСV и анти-CarP. При болните с РА се установи по-висока средна стойност в сравнение с тази при здравите контроли, но разликата не е от статистическа значимост. Не се установи значима корелация и между позитивирането на анти-ССР и анти МСV с IL-17. Средните стойности на IL-17 при анти-ССР и анти-МСV положителни и отрицателни резултати са сходни.

Положителна корелация от умерена величина беше установена между анти-CarP антителата и IL-17 – средните стойности на IL-17 показват съществена разлика при анти-CarP положителни и отрицателни резултати. Както беше посочена зависимостта от МРО карбамилране, корелира с процеса възпаление. В тази връзка допълнително изследване при по-голяма група участници на

лабораторна възпалителна активност, съпоставена с двете величини би дала допълнителна информация.

Изследване на родственици на пациенти с РА за наличие на серопозитивност по отношение на анти-ССР, анти-МСV и анти-CarP антителата

Както беше посочено унаследяемите генетични фактори са един от рисковите фактори за развитие на РА. В същото време близко-битови контакти са предпоставка за общи екзогенни фактори – като например сходства в микробиота. В тази връзка се приема, че РG може да бъде предаван от по-възрастни на по-млади членове на семейството.

В настоящето проучване бяха изследвани анти-ССР, анти-МСV и анти-CarP в серум на родственици с първа степен на родство на болни с РА. При родствениците не се установи позитивиране на анти-ССР антитела. Беше установено обаче позитивиране на анти-МСV и анти-CarP антитела.

Във фамилия с болна от РА майка при изследване на нейните три деца, установихме позитивни анти-МСV при две от тях. В други 2 отделни случая при здрави към момента на изследването родственици на болни с РА, при които получихме положителни резултати при стартиране на проучването в рамките на 2 години след това изявиха симптоми на артрит. При позитивните за анти-CarP родственици на болни с РА, както и при самите болни с РА се установи сходен титър на позитивиране. Отчетен е факта, че обхванатата група от родственици е с не голям брой представители и значителна част от тях са от един регион.

Факт е, че поставянето на диагнозата РА понякога се забавя поради различни причини, което отлага и стартиране на модифицираща заболяването терапия. Първостепенните родственици на болни с РА са рисков контингент за развитие на РА. Проследяването на имунологичните показатели за РА при тях при наличие на неясни артралгии е възможност за изпреварваща диагноза и поведение с цел предотвратяване разгръщане на заболяването и оформяне на дефинитивни, инвалидизиращи структурни промени.

Във връзка с проучване на етиологичните механизми при РА е бил стартиран проект „SERA - Studies of the Etiology of RA”, който оценява проспективно първостепенни родственици - first-degree relatives (FDR) на пациенти с РА, като се приема, че тези FDRs са изложени на повишен риск от развитие на бъдещ РА предвид тяхната фамилна анамнеза и обосновано ги превръща в прицелна група за проучване, с цел оценка на най-ранните стадии на РА.

Young et al. са изследвали реактивността на АСРА антитела, както и връзката им с други автоантитела, свързани с РА при първа степен роднини на пациенти с РА, които не са засегнати от заболяването, като същевременно са оценили корелацията по отношение наличието на ставна оточност или чувствителност. Понятието роднини първа степен включва родители, братя и сестри или потомство на боледуващите. Роднините с първа степен родство на болни с РА,

дори и отрицателните по отношение на РФ и анти-ССР-2 при това изследване са показали реактивност към множество АСРА. Авторите приемат, че наличието и нарастването на броя АСРА може да бъде свързано със симптоми на възпаление на ставите. Те заключават, че родствениците от първа степен на пациенти с РА имат повишен риск от развитие на това заболяване. Проведени проучвания на АСРА в незасегнати членове на семейство на болни, са показали по-висока честота на позитивиране на АСРА в сравнение със здрави контроли. При роднини от първа степен на болни с РА било установено, че рискът за развитие на РА нараства 3-9 пъти в сравнение с общата популация.

Alessandri et al. са изследвали анти-CarP IgG, анти-ССР IgG и РФ изотипове IgG, IgA, IgM чрез ELISA при здрави роднини от първа степен на пациенти с РА, пациенти с РА и здрави контроли, съответстващи по пол и възраст. Авторите стигат до извода, че anti-CarP антителата могат да се намерят в серумите на здрави роднини от първа степен на пациенти с РА и тяхното разпространение е значително по-високо, отколкото при здрави контроли, като не установяват корелация на анти-CarP с анти-ССР и РФ антитела при РА и здрави роднини от първа степен на пациенти с РА.

Ramos-Remus et al. (Мексико) са провели проучване за оценка на 5 годишната положителна предиктивна стойност- positive predictive value (PPV) на серумния IgM-РФ и анти-ССР за развитието на РА сред здравите роднини на болни с РА. Въз основа на резултатите те приемат, че степента на риска от развитие на РА при здрави роднини на пациенти с РА може да бъде оценена чрез обикновени рутинни лабораторни тестове.

Ioan-Facsinay et al. изследват IgA, IgM и IgG АСРА, както и IgM и IgA РФ в серумни проби, получени от пациенти с РА от популация на Cree и Ojibway в централна Канада, техни роднини, които нямат РА, а също и здрави контроли от същите популации. Резултатите от изследването на Ioan-Facsinay et al. са показали висока степен на разпространение на АСРА при незасегнатите роднини на пациенти с РА от тази популация.

ИЗВОДИ

1. Анти-MCV антителата са полезен диагностичен маркер при РА и е обосновано използването им в диагностичния алгоритъм при ранен РА, както и при недиференциран артрит. Съпоставени анти-ССР антителата имат по-висока степен на чувствителност и по-ниска степен на специфичност.
2. Серумните нива на анти-MCV и анти-ССР са по-ниски от нивото им в синовиална течност, което е основание да се предположи, че възпалената

синовия е локус с повишена концентрация на тези антитела или мястото на тяхната продукция.

3. Тютюнопушенето е повлияем, екзогенен фактор, свързан със серумните нива на анти-ССР и анти-MCV при болни с РА. Следователно преустановяването на тютюнопушенето е допълнителен способ за въздействие върху продукцията на тези антитела.
4. Съществува връзка между нивото на анти-MCV и анти-ССР в серум на пациенти с РА и наличен синовит, обективизиран последством US7 скор. Това предполага оценка на ролята им като допълнителен индиректен маркер за мониториране на наличен синовит.
5. Анти-CarP антителата са потенциален допълнителен маркер в диагностичен и диференциално-диагностичен план при болни с РА.
6. Серумното ниво на анти-CarP антителата показва връзка с фактора тютюнопушене.
7. При обединеното изследване на анти-ССР, анти-MCV, анти-CarP и РФ, се постига 100% специфичност по отношение на РА, за сметка на значително намаляване на чувствителността.
8. Съществува връзка между наличието на РG и развитие на РА. Съществува връзка между наличието на РG и серопозитивност за анти-ССР и анти-MCV антителата. Следователно РG е потенциален таргет за допълнително въздействие при болни с РА. Обоснована е скринингова оценка на пародонтален статус при болните с РА и комплексно лечение съвместно с пародонтолог.
9. Не се установява връзка между серумните нива на проинфламаторния цитокин IL-17 и серопозитивност по отношение на анти-ССР и анти-MCV при болни с РА.
10. Първостепенните родственици на болни с РА са рисков контингент за развитие на РА. Скрининговото изследване на анти-ССР, анти-MCV, анти-CarP антитела е възможност за ранно установяване на начален РА при тази категория.

ПРИНОСИ

ПРИНОСИ С ПРИЛОЖЕН ХАРАКТЕР

Изграждането на комплексен алгоритъм, изразяващ се в преустановяване на тютюнопушенето, адекватна орална хигиена и съвместно лечение с пародонтолог на РG инфекцията е приложимо допълнително средство при изграждането на стратегия за режим, обучение и лечение на болните с РА.

ПРИНОСИ С ОРИГИНАЛЕН ХАРАКТЕР

1. Беше изследвана връзка и съгласуваност между US7 score за синовит и анти-ССР и анти-MCV антитела в серума на болни с РА.
2. Беше изследвана връзката между серумните нива на IL-17 и анти-ССР, анти-MCV антитела и РФ при болни с РА.

ЗА СТРАНАТА ЗА ПЪРВИ ПЪТ:

1. Направи се оценка на диагностичната стойност при обединеното изследване на анти-ССР, анти-MCV, анти-CarP антитела и РФ при РА.
2. При здрави родственици от първа степен на болни с РА бяха изследвани анти-ССР, анти-MCV и анти-CarP антитела в серум и се направи съпоставка на същите със стойностите им в серум на болни с РА и здрави контроли.
3. Направи се сравнителна оценка на нивата на анти-ССР и анти-MCV антитела в серум и синовиална течност при болни с РА.
4. Изследва се връзката между РG и РА.
5. Изследва се връзката между РG и серопозитивност по отношение на антителата анти-ССР и анти-MCV при болни с РА.
6. Оцени се връзката между тютюнопушенето и РG при болни с РА.
7. Изследва се връзка между тютюнопушене и позитивиране на анти-ССР, анти-MCV, анти-CarP антитела в серума на пациенти с РА.
8. Направи се оценка на диагностичната стойност на анти-CarP антителата при болни с РА.

ПРИНОСИ С ПОТВЪРДИТЕЛЕН ХАРАКТЕР

Настоящото изследване намира висока диагностична стойност на анти-MCV антителата, съизмерима с тази на анти-ССР антителата при РА.

ПУБЛИКАЦИИ, НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ

ПУБЛИКАЦИИ:

1. Pavel Titov Selimov, Ekaterina Ivanova-Todorova and Anastas Zgurov Batalov. Citrullination, autoantibodies against citrullinated proteins and Porphyromonas gingivalis infection in patients with Rheumatoid Arthritis, Macedonian medical review, 2018;72(1).
2. Павел Селимов, А. Баталов, Е. Фиркова-Бернард, Р. Каралилова, В. Попова, М. Казакова, Н. Радева, Д. Ганичев, М. Ахмедов, Ревматоиден артрит, орален микробиом и пародонтит, Ревматология, Vol. XXIV, №2/2016.
3. П. Селимов, Е. Фиркова, Л. Дамјановска, Р. Каралилова, Т. Станкова, К. Стефанова, Г. Делчева, А. Манева, А. Баталов, Ролята на орални и чревни микробни общности при болни с ревматоиден артрит, Medical magazine, брой 53/5.2018.

НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ:

1. П. Селимов, Е. Фиркова, Л. Дамяновска, Р. Каралилова, А. Баталов, Porphyromonas gingivalis – пародонтопатоген с потенциална роля при болни с РА, Национална конференция по ревматология 30 май -2 юни 2019, хотел „Интернационал“, Ревматология XXVII, 2019, №2
2. П. Селимов, Л. Дамяновска, Р. Каралилова, А. Баталов, Антитела срещу карбамилирани протеини при болни с РА, Национална конференция по ревматология 30 май -2 юни 2019, хотел „Интернационал“, Ревматология XXVII, 2019, №2

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД:

СДП, МУ-Пловдив

Антитела срещу модифициран цитрулиниран виментин – диагностични и прогностични възможности при болни с Ревматоиден артрит и потенциалната роля на Porphyromonas gingivalis за тяхната продукция

Водещ изследовател: Павел Титов Селимов

Научни ръководители:

1. професор д-р Анастас Згуров Баталов, дм
2. доцент д-р Елена Фиркова, дм