

STRESZCZENIE

Serologiczne markery angiogenezy u dzieci chorych na młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów - korelacja z obrazem klinicznym i ultrasonograficznym

MIZS to najczęstsza przewlekła artropatia zapalna wieku rozwojowego. Stanowi heterogenną grupę chorób o nieznanym etiologii, charakteryzuje się wystąpieniem objawów przed 16 rokiem życia pod postacią zapalenia stawów trwającego powyżej 6 tygodni. Proces zapalny w stawach przejawia się nadmierną proliferacją synowocytów, co wiąże się ze wzmożonym unaczynieniem w błonie maziowej. Dzięki nowym technikom obrazowania w postaci ultrasonografii o wysokiej rozdzielczości z trybem Power Doppler możliwa jest zarówno ocena nadmiernej proliferacji błony maziowej jak i wykrycie wolnego przepływu w powstałych naczyniach zajętego w procesie zapalnym *synovium*.

Zgodnie z definicją, angiogeneza to proces, który polega na tworzeniu nowych naczyń krwionośnych powstających na bazie już istniejących. Obserwuje się go zarówno w stanach fizjologicznych jak i patologicznych, jednak szczególne znaczenie odgrywa w chorobach nowotworowych. Proces angiogenezy obserwuje się również w układowych zapalnych chorobach tkanki łącznej – w tym w stanach zapalnych stawów, gdzie nowo wytworzone naczynia odżywiają przerosniętą błonę maziową. Neowaskularyzacja jest złożona i angażuje szereg czynników serologicznych. Szczególną rolę pełnią czynniki proangiogenne, przede wszystkim naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF), który odpowiada nie tylko za pobudzenie komórek śródbłonka i wazodylatację, ale również za proliferację oraz adhezję komórek endotelialnych w przestrzeni okołonaczyniowej. Aktywność biologiczna VEGF jest regulowana przez 2 różne receptory: VEGFR-2 i VEGFR-1. Rozpuszczalna forma receptora VEGF - sVEGFR-1, pełni rolę „receptora – pułapki”, zaś fizjologiczna rola sVEGFR-2 pozostaje wciąż niejasna. VEGF działając synergistycznie z Ang-1 oraz Ang-2 tworzy i stabilizuje nowe naczynia.

Ocena aktywności choroby u dzieci z MIZS jest fundamentalną składową badania klinicznego, ponieważ przetrwała, aktywna choroba odgrywa kluczową rolę w uszkodzeniu stawów prowadząc do niepełnosprawności pacjenta. Obecnie badanie USG uważane jest za „złoty standard” w metodach obrazowania niezbędnych do oceny stawów obwodowych.

USG Power Doppler jest użytecznym narzędziem pozwalającym na uwidocznienie wzmożonego przepływu naczyniowego w *synovium* będącego skutkiem zapalenia.

Biorąc powyższe pod uwagę sformułowano następujące cele pracy:

1. Jakie jest stężenie czynników proangiogennych i ich receptorów (VEGF, sVEGR-R1, sVEGF-R2, Ang-1, Ang-2) u dzieci ze świeżo rozpoznanym MIZS, przed włączeniem leczenia, w porównaniu do zdrowych rówieśników?
2. Czy istnieje różnica pomiędzy rozmieszczeniem tych czynników we krwi obwodowej i płynie stawowym?
3. Czy są różnice w stężeniu tych czynników w zależności od aktywności procesu chorobowego?
4. Czy stężenie tych czynników pozostaje w korelacji ze stopniem unaczynienia przerośniętej błony maziowej ocenianym za pomocą badania USG z trybem obrazowania *power Doppler* PDUS?
5. Czy ewentualne zmiany w obrazie USG pozostają w korelacji z aktywnością choroby ocenianą na podstawie wykładników zapalnych?

Badaniem objęto 63 dzieci z MIZS, które były hospitalizowane w Klinice Kardiologii i Reumatologii Dziecięcej II Katedry Pediatrii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w latach 2013-2015 (46 dziewcząt i 17 chłopców) w wieku 1,5-17 lat, ze świeżo ustalonym rozpoznaniem MIZS. Grupę kontrolną stanowiło 32 zdrowych dzieci odpowiednio dobranych pod względem płci i wieku, hospitalizowanych w Klinice z powodu czynnościowych zaburzeń układu krążenia. Dzieci z MIZS podzielono w zależności od postaci choroby. U 68,2% pacjentów stwierdzono postać nielicznostawową. Aktywność procesu chorobowego ustalono na podstawie kryteriów JADAS-27, wyróżniając trzy stopnie aktywności: niski, średni i wysoki. Największą grupę stanowiły dzieci z niską aktywnością (59%).

U wszystkich dzieci we krwi obwodowej oznaczono stężenia cytokin proangiogennych: VEGF, Ang-1, Ang-2 oraz rozpuszczalnych receptorów sVEGF-R1 i sVEGF-R2 metodą ELISA. U 18 dzieci z MIZS, u których stwierdzono wysięk do stawów kolanowych, pobrano płyn stawowy podczas punkcji diagnostycznej jako materiał do oznaczeń powyższych markerów angiogenezy.

Ponadto, u wszystkich chorych dzieci, wykonano następujące badania laboratoryjne: morfologia z leukocytozą (WBC) i liczbą płytek (PLT), wskaźniki ostrej fazy: OB, CRP, badania immunologiczne: ANA i RF. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej.

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że stężenia VEGF oraz jego rozpuszczalnych receptorów sVEGFR-1 i sVEGFR-2 były znacząco wyższe w porównaniu ze stężeniem tych czynników w surowicy dzieci zdrowych. Stężenia Ang-1 i Ang-2 w surowicy dzieci z MIZS były wyższe w porównaniu z grupą kontrolną, jednak nie obserwowano zależności statystycznej. W grupie badanej dzieci z MIZS odnotowano istotnie wyższe stężenia VEGF oraz jego badanych receptorów w płynie stawowym niż we krwi obwodowej. Odwrotnie – stężenia Ang-1 i Ang-2 były niższe w płynie stawowym w porównaniu do ich stężeń w surowicy.

Dokonano również oceny czynników angiogennych w zależności od aktywności choroby stwierdzając istotny związek pomiędzy stężeniem VEGF w surowicy a niską i średnią aktywnością MIZS. Związek ten wykazano również dla wysokiej aktywności choroby, nie był on jednak znaczący statystycznie. Stężenia pozostałych czynników angiogennych nie różniły się istotnie we wszystkich stopniach aktywności choroby. W płynie stawowym wykazano jedynie znaczącą zależność pomiędzy stężeniem Ang-2 a wysoką aktywnością procesu chorobowego, zaś stężenia pozostałych oznaczanych markerów angiogenezy nie pozostawały w związku z aktywnością MIZS. U dzieci chorych dodatkowo dokonano analizy korelacji czynników angiogennych z podstawowymi laboratoryjnymi wskaźnikami procesu zapalnego jak WBC, PLT, OB, CRP. We krwi obwodowej zaobserwowano istotny związek między stężeniem VEGF a wszystkimi badanymi parametrami. Podobnie, istotną zależność wykazano dla Ang-1 oraz poziomu WBC i PLT.

U wszystkich badanych dzieci z MIZS w badaniu ultrasonograficznym obserwowano zmiany pod postacią przerostu błony maziowej. W grupie tej u ponad 1/3 obserwowano wysoki stopień unaczynienia PDUS. Dokonano analizy stężenia markerów angiogenezy w surowicy dzieci chorych w zależności od stopnia unaczynienia błony maziowej stwierdzając pozytywną korelację pomiędzy stężeniem VEGF a stopniami unaczynienia 1-3 oraz stężeniem Ang-2 i wysokim stopniem waskularyzacji. Stężenie rozpuszczalnych receptorów dla VEGF oraz Ang-1 nie miało istotnego związku ze stopniem unaczynienia *synovium*.

W płynie stawowym najwyższe stężenia dla VEGF występowały u pacjentów ze stopniem unaczynienia 3, jednak nie uzyskano istotności statystycznej. Stężenie Ang-1 – podobnie – było istotnie wyższe u dzieci, u których stopień unaczynienia oceniono jako wysoki. Pozostałe markery angiogenezy nie wykazały znamiennej korelacji ze stopniem unaczynienia błony maziowej.

U dzieci z MIZS, u których stopień unaczynienia PDUS był wysoki, obserwowano wysoki poziom białka CRP.

Rola angiogenezy wydaje się być kluczowa w patogenezie MIZS, o czym świadczą wysokie stężenia czynników angiogennych oraz ich korelacja z aktywnością procesu chorobowego. VEGF, jako najbardziej swoisty marker angiogenezy, odzwierciedla tę korelację, zaś jego stężenie w połączeniu z obrazem ultrasonograficznym błony maziowej i stopniem jej unaczynienia dostarcza informacji o aktywności zapalnej we wczesnym etapie choroby.

Wnioski:

1. W MIZS stężenie czynników proangiogennych (VEGF, sVEGR-1, sVEGFR-2, Ang-1 i Ang-2) w surowicy jest istotnie wyższe niż u dzieci zdrowych, co przemawia za znaczącą rolą angiogenezy w patogenezie choroby
2. W płynie stawowym w MIZS stężenia VEGF, sVEGFR-1, sVEGFR-2 są znamienne wyższe niż w surowicy, podczas gdy poziomy Ang-1 i Ang-2 w tym kompartmentcie są istotnie niższe. Potwierdza to nadrzędną rolę VEGF w procesie angiogenezy
3. Stężenie VEGF w surowicy dzieci chorych na MIZS koreluje z wykładnikami zapalenia takimi jak CRP, OB, liczba krwinek białych czy płytek krwi
4. Stężenie VEGF w surowicy dzieci z MIZS wzrasta wraz z aktywnością procesu chorobowego, natomiast w płynie stawowym wraz z jego aktywnością rośnie stężenie Ang-2
5. Stężenie VEGF w surowicy i Ang-2 w płynie stawowym koreluje ze stopniem unaczynienia błony maziowej stwierdzanej w badaniu PDUS. Natomiast surowicze stężenia sVEGFR-1, sVEGFR-2 i Ang-1 nie korelują ze stopniem unaczynienia błony maziowej
6. Stężenia VEGF, sVEGFR-1, sVEGFR-2 i Ang-1 w płynie stawowym nie korelują ze stopniem waskularyzacji *synovium* u dzieci chorych na MIZS

7. Stopień unaczynienia błony maziowej w badaniu PDUS koreluje ze stężeniem białka CRP, co świadczy o przydatności łącznej oceny USG i CRP w monitorowaniu nasilenia stanu zapalnego
8. Ocena serologiczna i ultrasonograficzna angiogenezy stanowi cenne uzupełnienie badania klinicznego i wskaźników laboratoryjnych stosowanych w rutynowej diagnostyce u dzieci chorych na MIZS

Słowa kluczowe: młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów, VEGF, angiopoetyna, angiogeneza, badanie ultrasonograficzne