



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“ - ВАРНА
ФАКУЛТЕТ ПО МЕДИЦИНА
КАТЕДРА ПО ОБЩА МЕДИЦИНА**

д-р Ирина Иванова Момчева

**ИЗСЛЕДВАНЕ УЧАСТИЕТО НА ХУМОРАЛНИТЕ ФАКТОРИ
НА ВРОДЕНИЯ ИМУНИТЕТ В ПАТОГЕНЕЗАТА
НА АКТИВИРАНАТА ОСТЕОАРТРОЗА**

АВТОРЕФЕРАТ

*на дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“
по специалност „Обща медицина“*

Научен ръководител: Доц. Жения Русева, д.м.

Варна, 2024 г.

Дисертационният труд съдържа 120 машинописни страници и е онагледен с 24 таблици, 18 фигури и 6 хистограми. Списъкът на цитираната литература включва 237 заглавия, от които 4 на кирилица и 233 на латиница.

Забележка: Номерата на таблиците, фигурите и хистограмите в автореферата не съответстват на тези в дисертационния труд.

Дисертационния труд е обсъден инасочен за защита от Катедрения съвет на Катедрата по „Обща медицина“ при Медицински университет „Професор д-р Параскев Стоянов“ – Варна.

Научно жури:

Външни членове:

Проф. д-р Владимир Христов Гончев, д.м.

Проф. д-р Николай Георгиев Николов, д.м.

Доц. д-р Кирил Стефанов Славейков, д.м.

Вътрешни членове:

Проф. д-р Валентина Маждова, д.м.

Проф. д-р Боряна Борисова Върбанова, д.м.

Резервен външен член:

Доц. д-р Радост Спиридонова Асенова, д.м.

Резервен вътрешен член:

Доц. д-р Марияна Михайлова Кръстева – Русева, д.м.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на от часа в МУ „Професор д-р Параскев Стоянов“ – Варна на заседание на Научното жури в система

Материалите по защитата са публикувани на интернет страницата на МУ „Професор д-р Параскев Стоянов“ – Варна и са на разположение в Катедрата по обща медицина при МУ „Професор д-р Параскев Стоянов“ – Варна.

СЪДЪРЖАНИЕ

1	ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:	4
2	ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	5
3	ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	9
4	МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ:	9
4.1.	КЛИНИЧЕН МАТЕРИАЛ:	9
4.2.	КРИТЕРИИ:	10
4.2.1.	ВКЛЮЧВАЩИ КРИТЕРИИ:	10
4.2.2.	ИЗКЛЮЧВАЩИ КРИТЕРИИ:	10
4.3.	МЕТОДИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО:	11
4.3.1.	КЛИНИЧНИ МЕТОДИ	11
4.3.2.	ЛАБОРАТОРНИ МЕТОДИ	11
4.3.3.	ИНСТРУМЕНТАЛНИ МЕТОДИ:	13
4.3.4.	СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ:	14
5	РЕЗУЛТАТИ	15
6	ОБСЪЖДАНЕ	25
7	ИЗВОДИ:	30
8	ПРИНОСИ	30
9	ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	31
10	ПРИЛОЖЕНИЯ	32

1 ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:

Съкращения на латиница:

ACR - Американски колеж по ревматология

CRP - С-реактивен протеин

C - комплемент

CR - рецептори за комплемента

C5aR - комплементарен рецептор C5a

C3aR - комплементарен рецептор C3a

DAMPs - damage-associated molecular patterns

ECM - екстрацелуларен матрикс

IL - Интерлевкин

MAC - мембрано-атакуващ комплекс

MMP - матриксни металопротеинази

NF-κB - ядрен фактор капа бета

PG - простагландин

PAMPs - pathogen-associated molecular patterns

SM - синовиална мембрана

TNF - Тумор некрозис фактор

TLR - toll like receptor

Съкращения на кирилица:

АН - артериално налягане

ГК - глюкокортикоиди

Ео - еозинофили

ИК - имунни комплекси

МА - макрофаги

Мо - моноцити

мл - милилитър

мкл – микролитър

ОА - остеоартроза

ОК - остеокласти

РА - Ревматоиден артрит

СЗСТ - системни заболявания на съединителната тъкан

ЧД - черен дроб

2 ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Остеоартрозата /ОА/ е заболяване на синовиалната става с три основни патогенетични елемента:

- хрущялна загуба
- ремоделиране на прилежащата кост
- съпътстващо нискостепенно локално възпаление.

Доскоро класифицирана като невъзпалително заболяване, поради отсъствие на системно възпаление и неутрофили в синовиалната течност, днес се счита, че нискостепенното локално възпаление е основен двигател на дегенеративния процес.

Деструкцията на хрущяла, като отличителен белег на ОА се дължи на активността на матриксните металопротеинази и агреканизи като MMP1, MMP3, MMP13 и ADAMTS5. След началната пролиферативна фаза, в дегенериращият хиалинен хрущял настъпва хипоцелуларитет с намален синтез на екстрацелуларен матрикс. Хондроцитния брой е силно намален с напредване на ставната дегенерация поради преждевременна клетъчна смърт чрез некроза и апоптоза на хондроцитите. Нарушава се колагеновата мрежа поради разкъсване на връзките между колагеновите фибрили. Започва разграждане на протеогликаните, намалява размера на техните агрегати, те абсорбират вода и така стават по-достъпни за ензимната атака на металопротеиназите. Нараства продукцията на металопротеинази, редуцира се и продукцията на тъканни инхибитори на металопротеиназите. Промените в хиалинния хрущял резултират в промени в клетъчния и молекулярния състав на синовиалната течност.

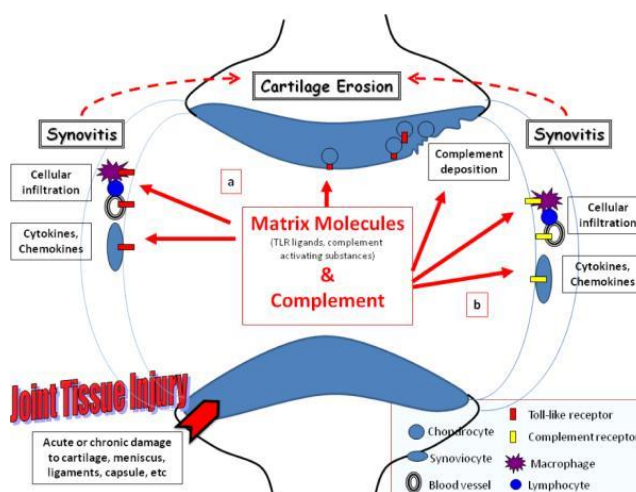
Възпалението на синовиалната мембрана, клинично най-често проявяващо се с хидропс е характерна особеност на активираната ОА. В условията на нискостепенно възпаление (активиране на ОА) синовиумът хиперплазира, инфилтрира се основно с макрофаги и по-малък брой В и Т-лимфоцити и естествени клетки убийци. При ОА синовиумът по-скоро е фокален, за разлика от РА. Синовиумът може да покаже значителни промени, дори преди да е настъпила видима дегенерация на хрущяла. Синовиумът е свързан с болка, функционален дефицит и дори може да бъде независим фактор за появата на ОА и да ускори структурната прогресия на болестта.

Продуктите от деградацията на хрущяла, освободени в синовиалната течност, се фагоцитират от синовиалните клетки, поддържайки синовиалното възпаление. На свой ред, активираните синовиални клетки във възпалената синовия произвеждат катаболни и провъзпалителни медиатори, които водят до ексцесивно производство на протеолитичните ензими, отговорни за разграждането на хрущяла, създавайки положителна обратна връзка. Възпалителният отговор се усилва от активирани синовиални Т клетки, В клетки и

инфилтриращи макрофаги. Хрущялните фрагменти могат да играят роля на неоантигени, индуциращи асептично възпаление.

Нискостепенното възпаление прогресира чрез производство на цитокини от хондроцити, синовиоцити тип А, мононуклеари, субхондрални остеобласти: IL-1 β , IL6, IL8, IL15, IL17, IL18 и TNF-alfa, които допринасят за катаболната каскада, характерна за ОА.

ОА не е свързана с изразен адаптивен имунен отговор. Понастоящем са налични данни от множество проучвания относно водещата роля на вродения имунитет при ОА (фиг.1). Вродената имунна система е първа линия на имунна защита.



Фигура №1. Вродена имунна система – първа линия на имунна защита. Модел на активиране на комплемента при ОА.

Източник: Editor-In-Chief C. Michael Gibson, M.S., M.D. Osteoarthritis pathophysiology (Internet open access)

Активирането на вроденият имунен отговор стартира със стимулиране на намиращите се върху клетъчната мембрана рецептори за разпознаване на секретирани от патогена молекули – PAMPs (патоген-асоциирани молекулни модели). Извън случаите на инфекция същите рецептори разпознават и се активират при увреждане на клетки и извънклетъчен матрикс. В условия на дегенеративни процеси в ставата, компоненти на ЕЦМ, фибронектинови изоформи, фрагменти от хиалуронова киселина са предполагаеми лиганди за PAMPs. В тези случаи PAMPs могат да бъдат активирани чрез свързани с ендогенни увреждания молекулни модели (DAMPs), а не чрез микробни лиганди.

В групата на DAMPs са и toll-like receptors (TLRs), конститутивно експресирани върху кл. мембрана на различни клетки, както и вътреклетъчно разположени. Различни лиганди активират различни TLRs. Нарушаването на матриксната хомеостаза в хода на ОА е пример за активиране на тези рецептори при хронична увреда. Последващият клетъчен отговор е чрез активиране на специфични транскрипционни фактори, сред които основна роля играе nuclear-factor κB (NF-κB). TLR7 са свързани с X-хромозомата, което обяснява донякъде по-голямата честота на Гонартроза при женския пол. Хондроцитите също могат да служат за таргет за TLR-активация. Множество матриксни metalloпротеинази, продуцирани от хрущяла при ОА са зависими от активирането на NF-κB. Въпреки недокрай изяснената роля на TLRs при ОА, насочването към тези сигнални пътища при остеоартрозата е възможен нов подход за модулиране баланса между анаболни и катаболни процеси в хиалинния хрущял. Последните проучвания допълнително изясниха, че системното възпаление, чрез възпалителни медиатори, може да препрограмира хондроцитите към хипертрофична диференциация и катаболни отговори през NF-κB пътя и механизми на автофагия.

Хуморалните фактори на вродения имунитет са CRP и системата на комплемента. Когато екзогенен или ендогенен тригер задейства системата на комплемента, протеази разцепват протеините на комплемента, активират ги и задействат каскадата му. Трите пътя на активиране на комплемента (класически, алтернативен и лектинов) имат общ ключов етап на активиране - протеаза C3-конвертаза (Фиг. 2). Тя разцепва и активира компонент C3, създавайки C3a и C3b. Продуктите от разграждането на C3 могат да служат за оценка на активацията на комплементарната система. За разлика от посочените C3 фрагменти, които са с кратък полуживот, C3c е надежден стабилен биомаркер за оценка нивата на C3 в плазмата. Конверсията на C3 в C3c се извършва за около час при телесна температура.

На повърхността на много клетки има рецептори за комплемента – CR. Тяхната функция е да адхезират прицелните за фагоцитоза обекти. А чрез C3R се активира самата комплементарна каскада, а също така и кислородният метаболизъм на клетката, който има основно значение за фагоцитозата. За всеки един от пътищата на комплементарната каскада има тригери на активация. Крайният резултат от активиране на комплемента е лиза на таргетните клетки, опсонизация, последвани от хемотаксис на макрофаги и неутрофили, фагоцитоза и транспорт на имунни комплекси до Купферовите клетки в черния дроб и до слезка с цел почистването им.

Системата на комплемента като част от вродения имунитет е една от първите линии на защита срещу нахлуващите патогени. Отделно от тази основна, еволюционно детерминирана защитна функция, тя играе роля и в отстраняването на клетъчните отломки и имунни комплекси, опсонизация и стимулиране на В- и Т-лимфоцити. Продуктите от разграждането

на хрущяла, освободени в хода на ставна дегенерация, апоптоични хондроцити представляват отделен клас мощни модулатори на комплемента. Различни компоненти на ЕСМ и техни фрагменти в дегенеративните стави могат да активират комплемента. Активирането на комплемента в ставата може да стане и директно при механичен стрес, както и чрез локална продукция на фактори на комплемента от синовиоцити тип А при активиране на артрозната болест.

При ОА основните клетки в ставната течност са хондроцити и синовиоцити. Фракциите на комплемента се свързват към комплементните рецептори по повърхността на техните клетъчни мембрани чрез TLR. Системата на комплемента участва в множество процеси в хода на артрозната болест: дегенерация на хондроцити, деградация на ЕСМ, нискостепенно възпаление в артрозната става, клетъчен лизис, синовит, небалансирано ремоделиране на костите, образуване на остеофити и репаративни процеси като неоангиогенеза. Данни от множество проучвания сочат, че *пред науката все още стои недоизяснен въпросът дали каскадата на комплемента играе роля само на почистваща система или и на водещ патогенетичен фактор при активирана ОА.*

Синовиалната възпалителна реакция включва синтез и освобождаване на разнообразие от цитокини и хемокини. Хуморалните фактори на възпалението са мощен хепатостимулиращ фактор за синтез на CRP и други острофазови протеини. Продуцираният от Мо, Ма, дендритоцити и адипоцити IL6 е един от основните хепатостимулиращи фактори за синтез на протеини на острата фаза на възпалението с цел поддържане на хомеостазата. Нативният CRP претърпява калциево зависимо свързване с определени белтъчни молекули като фосфорилхолин, ядрен хроматин, плазмени липопротеини с много ниска плътност. Тези агрегати активират комплемента, което чрез MAC води до стимулиране на тромбоцити и фагоцитиращи клетки и така се опсонизират и отстраняват чужди клетки, продукти на клетъчната деструкция и апоптоптозата.

Концентрацията на протеини в синовиалната течност зависи от концентрацията им в плазмата, молекулното им тегло и форма, пермеабилитета на синовиалната мембрана и локалната продукция или консумация на този протеин. **Протеините в ставната течност са до 20% от съдържанието им в кръвната плазма. Общоприетата норма за нивата на комплемента в ставната течност е да са около 10% от серумните нива.** Поради консумация на комплемента при СЛЕ, РА, бактериален артрит, кристалиндуциран артрит тези нива в конкретните случаи са с около 30% по-ниски. Досегашните проучвания при ОА сочат по-високи нива в сравнение със здрави.

3 ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Хипотезата на настоящото изследване е откриване на доказателства за пряко участие на хуморалните фактори на вродения имунитет в патогенезата на остеоартрозната болест чрез отстраняване на деструктивни и апоптоични продукти на дегенеративния процес от ставното пространство и в процеса на самоподдържане на нискостепенно възпаление в артрозната става.

Целта на проучването е да се изследват нивата на някои хуморални фактори на вродения имунитет с оглед установяване на клиничното им значение при пациенти с активирана остеоартоза.

За постигане на целта бяха поставени следните задачи:

1. Анализ на научната литература относно участието на хуморалните фактори на вродения имунитет в процеса на възпаление и изработване на модел на нискостепенно локално възпаление при ОА.
2. Подбор на болни с активирана гонартроза според ACR критерии (1991) и липса на друго заболяване, което би причинило хидропс.
3. Верификация на рентгенологичния стадий по скалата на Kellgren-Lewrence.
4. Използване на ултрасонография за доказване на синовиален излив и при контролирана артроцентеза.
5. Изследване на показателите на хуморалния имунитет CRP, С3 и С4 фракции на комплемента в кръвна плазма и синовиална течност.
6. Сравнителен анализ на нивата им в двете телесни течности и търсене на корелационна зависимост според рентгенологичния стадий на гонартрозата по Kellgren-Lewrence и пола на пациентите.

4 МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ:

4.1. Клиничен материал:

В проучването бяха избрани пациенти с активирана остеоартроза на колянна става при липса на анамнестични, клинични и лабораторни данни за друго заболяване, което би могло да е причина за хидропс.

Диагнозата „гонартроза“ се постави въз основа клиничните и рентгенографски критерии на ACR (1991).

В наблюдението бяха обхванати 156 пациента на възраст между 43 и 90 години, изпълняващи ACR критериите за ОА на колянна става. От тях 121 жени и 35 мъже.

Всички участници в изследването подписаха формуляр за информирано съгласие. .

Научното изследване бе одобрено от Комисията по етика на УМБАЛ Бургас АД (Протокол от заседание на комисията от 23.01.2019 г).

Изследванията се извършваха съобразно изискванията на добрата клинична практика (Good Clinical Practice) и спазване на Декларацията от Хелзинки за правата на изследваните лица.

4.2. Критерии:

4.2.1. Включващи критерии:

Единствен включващ критерий бе наличие на хидропс на колянната става (признак на активирана ОА) при пациенти с артрозна болест, независимо от рентгенологичния стадий по Kellgren-Lewrence.

4.2.2. Изключващи критерии:

- Коморбидност с други ревматични заболявания, в т.ч. РА, псориатичен артрит, спондилоартрит, СЗСТ, васкулити, подагра, фибромиалгия и др.;
- Прием на антикоагуланти, нарушения в кръвосъсирването;
- Предшестваща вътреставна фрактура или документирана високоенергийна травма на долен крайник;
- Тежки декомпенсирани придружаващи заболявания; много ниски стойности на АН;
- Имунокомпрометирани болни;
- Анамнеза за вазовагален шок, бременност, кърмене;
- Локална кожна инфекция, псориатична плака в зоната на евентуална артроцентеза;
- Анамнеза за лечение със системни ГК през последните 3 месеца или вътреставни депо-ГК през последните 6 месеца;
- Прием на НСПВС през последните 7 дни;
- Отказ от страна на пациента за артроцентеза.

4.3. Методи на изследването:

4.3.1. Клинични методи

След подписване на информирано съгласие и съгласие за предоставяне на лични данни, на всички участници в изследването се снемаше детайлна анамнеза и се оценяше обективното състояние, включително пълен ставен статус. Оценяваха се включващи и изключващи критерии и се пристъпваше към изпълнение на утвърдения протокол: венепункция и артроцентеза.

Чрез венепункция се вземаха 3 мл венозна кръв в моновета с EDTA. След отделяне на кръвна плазма, тя се изследваше за нива на CRP, C3 и C4 фракции на комплемента.

Артроцентезата се извършваше при екстензирана колянна става с латерален достъп към супрапателарна bursa. Получената чрез артроцентеза синовиална течност се поставяше също в моновета с EDTA. След центрофугиране се отделяше супернатант (А) от „утайка“ (Б), след което двете проби се изследваха съответно за разтворимите и клетъчно свързаните фракции на CRP, C3 и C4.

4.3.2. Лабораторни методи

Получените по гореописания начин кръвна плазма и проби А и Б от синовиална течност се изпращаха в сертифицирана клинична лаборатория. Всяка проба се изследваше за нива на CRP, C3 и C4 фракции на комплемента. След това сравнихме плазмената и синовиална концентрация, както и стойностите им във фракции А и Б на ставната течност. Резултатите бяха подложени на статистически анализ, на базата на което се направи съответно обсъждане и се изведоха изводи.

Пробите бяха изработени в сертифицирана лаборатория „Лина“ Бургас на апарат Cobas c501, с реактиви на фирма Roche и калибрация за C3, C4, CRP - c.f.a.c. Proteins. Методът е стандартизиран спрямо вътрешен метод, проследим към CRM 470 (RPPHS – референтна подготовка за протеини в човешки серум). Има направен качествен контрол - PCCC Level 1 и Level 2.

CRP бе изследван с имунотурбидиметричен тест, усилен с частици. Методът се базира на човешки CRP, който аглутинира с латексови частици, обвити с моноклонални анти-CRP антитела. Агрегатите се определят турбидиметрично.

Референтните стойности са под 6,0 mg/l.

C3 и C4 се изследваха с имунотурбидиметричен анализ, лабораторно стандартизиран метод (122, 123). Методът се базира на следната реакция: човешки C3 и C4 образуват преципитат със специфичен антисерум, които се определя турбидиметрично при 340 nm.

Таблица №1. Изследвани показатели и референтния им обхват

Показатели	Обхват на отчитане	PU
1. CRP	0,3 – 350 mg/l	< 6,0 mg/l
2. C3	0,3 – 5,0 g/l	0,9 – 1,8 g/l
3. C4	0,06 – 1,0 g/l	0,1 – 0,4 g/l

Референтите стойности на C3 са: 0,90 – 1,8 g/l, а на C4: 0,1 – 0,4 g/l.

В изследването си се придържахме към следния **Работен протокол**:

1. Вземане на кръвна проба за изследване

Кръвта се вземаше в EDTA моновета, до 20 минути от венепункцията се центрофугираше на 4000 оборота за 10 минути. Кръвната плазма се отделяше от формените елементи и така получената плазма се съхраняваше в транспортна моновета. Същата се замразяваше при -20 градуса по Целзий за максимум до 8 дни. Следваше размразяване и темперирание на 37 гр. С за 60 мин. След това пробите се изпращаха в лабораторията за анализ.

2. Вземане на синовиална течност за изследване

Извършихме артроцентеза на колянна става при екстензирано коляно на пациента. Получената по този начин синовиална течност се поставяше в моновета с EDTA. След центрофугиране се отделяше супернатант (А) от „утайка“ (Б), след което двете проби се изследваха съответно за разтворимите и клетъчно свързаните фракции на CRP, C3 и C4. Един милилитър от синовиалната течност, аспирирана едновременно от всеки един пациент се поставяше в EDTA моновета, към нея се добявяха 400 Е хиалуронидаза, след което се центрофугираше на 4000 оборота за 10 минути.

В следващия етап отделихме в равни количества: проба със супернатант А и проба с центрофугат (или т.нар. „утайка“) Б. Двете фракции синовиална течност се поставяха в отделни транспортни моновети, към проба Б се добавяше 10 мкл протеиназен инхибиторен коктейл, съгласно протокола на производителя. Пробите се замразяваха на -20 гр. С за

максимум до 8 дни. Следваше размразяване и temperиране на 37 гр. С за 60 мин. След това се изпращаха в лабораторията за анализ.

Разделихме изследването на два етапа.

1) *първи етап* - проведен при 50 пациента, при които изследвахме нивата на CRP, С3, С4 в кръвна плазма и ставна течност, без фракциониране на ставната течност, с цел сравняване на получените съотношения с общоприетите стойности за тях. Тези резултатите от представителната извадка на българската популация и бяха сравнени с данните от световни проучвания.

2) *втори етап* - при останалите 106 пациента центрофугирахме ставната течност, отделяйки фракции А и Б и изследвах всяка една от тях поотделно за нива на горепосочените протеини. Целта бе да се изследват фракционирано както разтворимите, така и клетъчно свързаните С3 и С4.

След това извършихме сравнителен анализ на синовиалната и плазмената концентрация на CRP и С3 и С4, както и разликите в стойностите на тези показатели в различните фракции на ставната течност – А и Б. Потърсихме корелационна зависимост между нивата на хуморалните фактори и различните рентгенологични стадии по Kellgren-Lewrence, както и наличие на зависимост от пола на пациентите. Полученият резултат бе обсъден според изложената по-горе хипотеза.

4.3.3. Инструментални методи:

За верификация на рентгенологичния стадий по скалата на Kellgren-Lewrence при всички участници в проучването бе проведена конвенционална рентгенография в право положение на тялото в позиция „Schuss“ на рентгенов апарат Agfa DX – D500.

За диагностициране на активността на гонартрозата направихме ехография на колянна става, като за целта използвахме ултрасонограф Chison Model Q9 с линейен трансдюсер D12L40L с честотен диапазон 7-18 MHz с оглед инструментално потвърждение на синовиалния излив и за асистирана артроцентеза, която бе необходима при някои от болните.

4.3.4. Статистически методи:

Използвания програмен продукт за статистическа обработка на данните бе **IBM SPSS Statistics 20**.

Другите използвани статистически методи бяха следните:

- Описателна (дескриптивна) статистика: изчислявахме средни стойности, статистическо отклонение, коефициент на вариация, асиметрия и ексцес.

- Корелационен анализ – установихме силата и посоката на зависимостта между изследваните показатели: CRP, C3, C4 в кръвен серум и ставна течност А и Б, както и коефициентите на корелация.

Изпълнихме всички етапи на корелационния анализ: априорен анализ с графично представяне на данните в корелационното поле като точкова диаграма; измерване на връзката, прилагайки определена формула; проверка на статистическата значимост на корелационния коефициент и интерпретирахме получените резултати.

При получената линейна корелация изчислихме корелационния коефициент на Пирсън (r), а неговата абсолютната стойност бе от 0 до 1.

- Графичен анализ: използвахме графичен анализ за онагледяване на получените данните.

- Дисперсионен анализ – установихме статистически значима разлика в изследваните показатели в различните възрасти, пол, рентгенологичен стадий и т.н.

- Основният използван статистически метод в работата ни бе проверката на статистическата хипотеза за зависимите извадки или т.нар T- критерий на Стюдънт. Заложено от нас алфа-равнище на значимост бе 1% или 0,01, което гарантира 99% вероятност на получените резултати в заложената от нас хипотеза. С H_0 обозначихме нулевата хипотеза, а с H_1 – алтернативната хипотеза.

5 РЕЗУЛТАТИ

След статистическа обработка на получените данни от научното изследване получих следните резултати:

5.1. Обхванатата таргетна група пациенти е във възрастов диапазон между 43 и 90 годишна възраст, средна възраст 64,18 г., като при жените е 65,68 г., а при мъжете – 61 години, което съответства на статистическите данни за предилекционна възраст за остеоартроза на колянна става.

5.2. Анализът на нивата на CRP в синовиална течност спрямо тези в кръвната плазма при първата група от 50 пациента е представен в Фигура №2.

Използваният статистически метод е „Проверка на статистически хипотези“. Заложих следните хипотези:

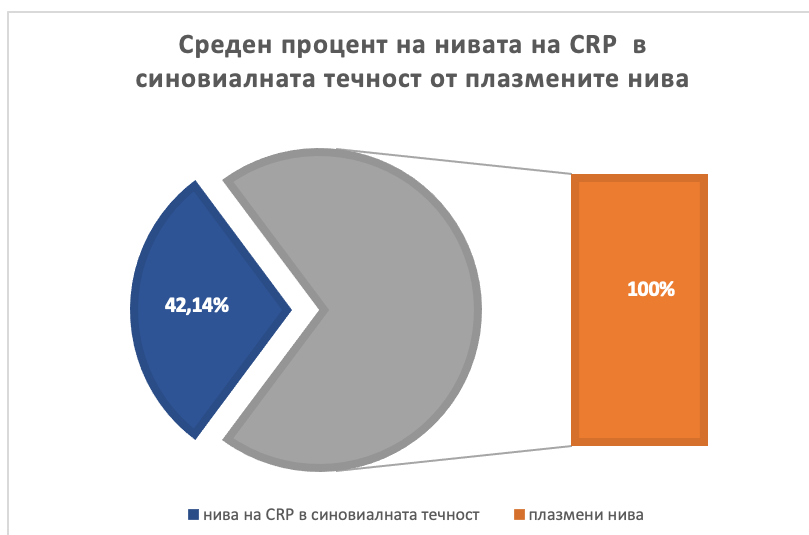
Но: $\mu \leq 20\%$ - нулева хипотеза, т.е. μ в ставната течност за генералната съвкупност да е $\leq 10\%$ от стойността в кръвната плазма.

H1: $\mu > 20\%$ - алтернативна хипотеза, т.е. μ в ставната течност за генералната съвкупност да е $> 10\%$ от стойността в кръвната плазма.

μ е параметър на генералната съвкупност, средна стойност. Тъй като от уводната част стана ясно, че средните стойности на CRP, C3 и C4 в синовиалната течност в норма са около 20% за CRP и 10% за C3 и C4 от плазмените, залагам μ да е съответно под и над тези проценти в двете хипотези. С помощта на метода: Проверка на статистически хипотези, сравнявам получените резултати при първите 50 пациента от нашата извадка с общоприетите норми.

Средният процент на нивата на CRP в синовиалната течност за извадката е 42.14% от плазмените нива.

$p\text{-value} = 0.0000 \Rightarrow$ Отхвърляме Но в полза на H1 при равнище на значимост $\alpha = 1\% \Rightarrow$ С 99% сигурност можем да кажем, че средната за генералната съвкупност е по-голяма от 20% (норма според използваната литература) при пациенти с активирана остеоартроза на колянна става.



Фигура № 2: Среден % на нива на CRP в синовиална течност спрямо плазмени нива

5.3. Анализът на синовиалните нива на С3 спрямо плазмените е представен на фиг. №3.

Средният процент на стойностите на С3 в синовиалната течност за извадката е 34.90% от плазмените нива.

$p\text{-value} = 0.0000 \Rightarrow$ Отхвърляме H_0 в полза на H_1 при равнище на значимост $\alpha = 1\% \Rightarrow$ С 99% сигурност можем да кажем, че средната за генералната съвкупност е по-голяма от 10% (норма според използваната литература) при пациенти с активирана артроза на колянна става.

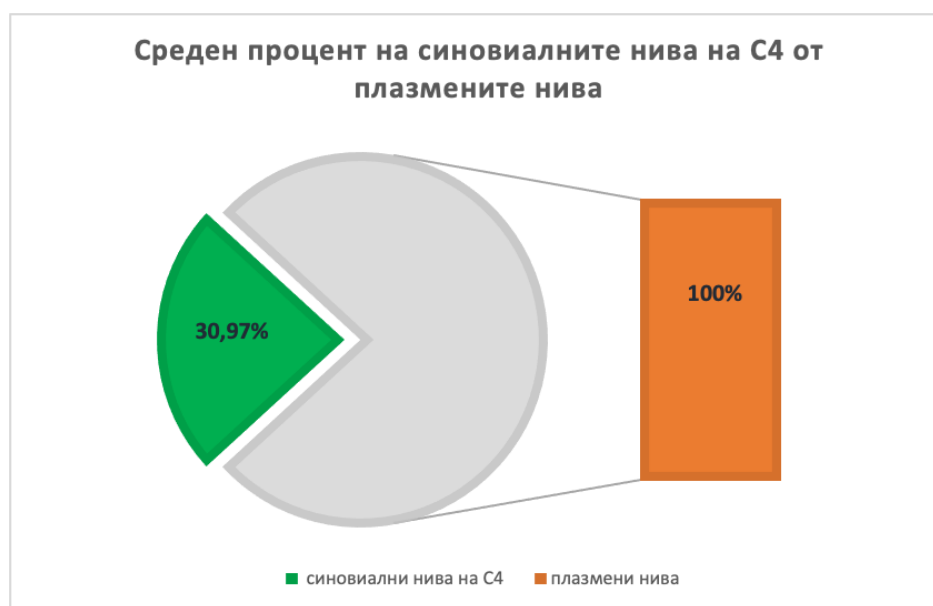


Фигура № 3. Среден процент на стойности на С3 в синов.течност спрямо плазмени нива

5.4. Анализът на синовиалните нива на С4 спрямо плазмените е представен в фиг. № 4

Средният процент на синовиалните нива на С4 за извадката е 30.97% от плазмените.

$p\text{-value} = 0.0000 \Rightarrow$ Отхвърляме H_0 в полза на H_1 при равнище на значимост $\alpha = 1\% \Rightarrow$ С 99% сигурност можем да кажем, че средната за генералната съвкупност е по-голяма от 10% (норма според използваната литература) при пациенти с активирана артроза на колянна става.



Фигура № 4: Среден процент на синовиални нива на С4 в сравнение с плазмени нива

5.5. Анализ на разликата между стойностите на трите изследвани протеина в синовиална течност А и Б.

Отново като методика използваме „Проверка на статистически хипотези“. Използваме като параметър μD , който означава взаимно зависими извадки, т.е. като наредени двойки – за един и същи пациент изследваме показателя в различни телесни течности. В конкретният случай – това е разликата между стойностите на трите протеина в двете фракции на ставната течност – супернатанта и утайката. $D = B - A$.

Статистически заключения (проверка на статистически хипотези)

1. Хипотези:

Но: $\mu_D \leq 0$ – нулева хипотеза: няма разлика в стойностите на изследвания показател в проба А и проба В.

Н1: $\mu_D > 0$ – алтернативна хипотеза: стойностите на изследвания показател в проба В са по-високи от тези в проба А.

$$(d = B - A)$$

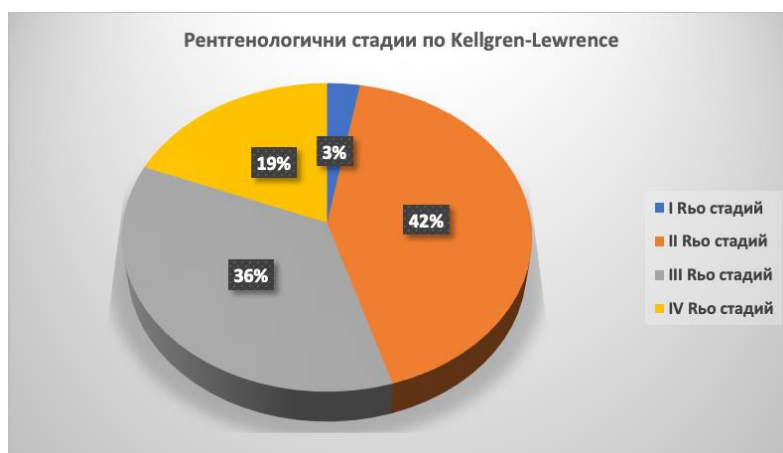
CRP: p-value = 0.1635 => няма основание да се отхвърли Но при всяко равнище на значимост: $\alpha = 1\%$, $\alpha = 5\%$ или $\alpha = 10\%$, т.е. нямаме основание да твърдим, че стойностите на CRP в ст.течност В са статистически по-големи от тези в ст.течност А за генералната съвкупност.

С3: p-value = 0.0000 => Отхвърляме Но в полза на Н1 при равнище на значимост $\alpha = 1\%$ => С 99% сигурност можем да кажем, че разликата В – А в генералната съвкупност е положителна или стойностите на С3 в ст.течност В са по-големи от тези в ст.течност А.

С4: p-value = 0.0045 => Отхвърляме Но в полза на Н1 при равнище на значимост $\alpha = 1\%$ => С 99% сигурност можем да кажем, че разликата В – А в генералната съвкупност е положителна или стойностите на С4 в ст.течност В са по-големи от тези в ст.течност А.

5.6. Изследване на горепосочените зависимости (Б/А) според Ro- стадий.

Включени са пациенти от 4-те рентгенологични стадия по Kellgren-Lewrence: в I Рьо стадий - 3, във II Рьо стадий - 45, в III Рьо стадий – 38 и в IV-ти- 20 пациента (Фигура № 5).



Фигура № 5. Разпределение на пациентите според рентгенологичния стадий

При това изследване извадките са независими. μ_1 е средната за I-ва група, в която са обединени пациенти в Ro- стадий I и II (поради ниския брой пациенти в I Ro- стадий). μ_2 е средната за II-ра група, в която са обединени пациенти в Ro- стадий III и IV (поради ниския брой пациенти в IV Ro- стадий).

Хипотези:

Но: $\mu_1 - \mu_2 \leq 0$ - нулева хипотеза

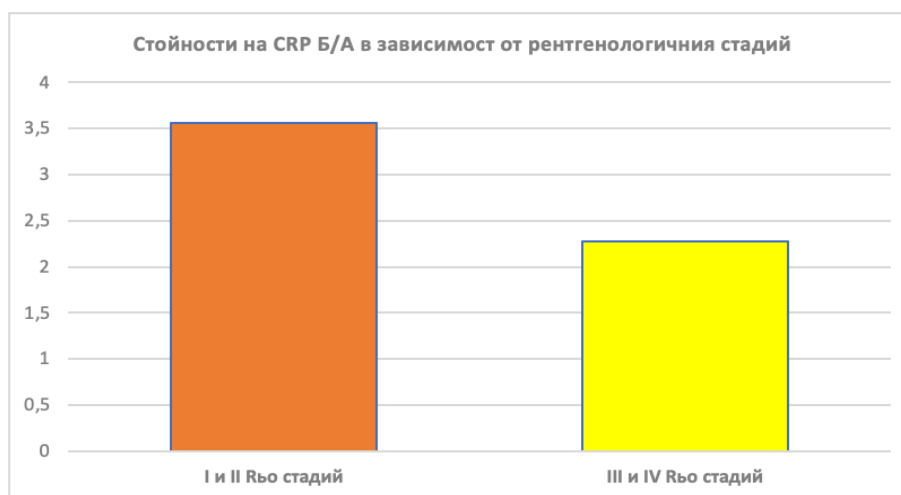
Н1: $\mu_1 - \mu_2 > 0$ – алтернативна хипотеза

или

Но: $\mu_1 \leq \mu_2$

Н1: $\mu_1 > \mu_2$

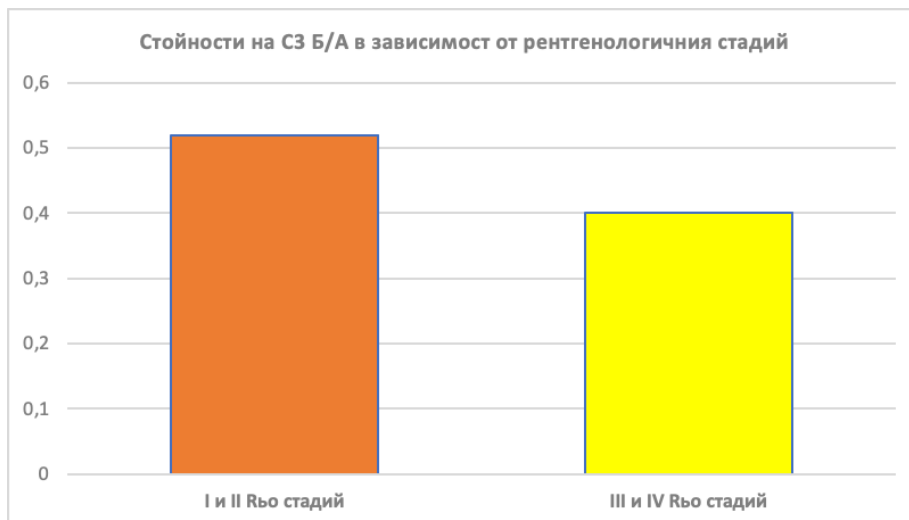
5.6.1. Стойности на CRP Б/А в зависимост от рентгенологичния стадий (фогура № 6):



Фигура № 6: Стойности на CRP Б/А в зависимост от рентгенологичния стадий

Заклучение: с 99% сигурност: $p\text{-value} = 0.0805 \Rightarrow$ нямаме основание да отхвърлим Но в полза на Н1 при равнище на значимост $\alpha = 1\% \Rightarrow$ Не разполагаме с достатъчна информация, за да твърдим, че разликата $\mu_1 - \mu_2$ е положителна (>0) или $\mu_1 > \mu_2$ при равнище на значимост $\alpha = 1\%$. Така при равнище на значимост 1% нямаме достатъчно основание да приемем, че стойностите на CRP в ставната течност са зависими от рентгенологичния стадий.

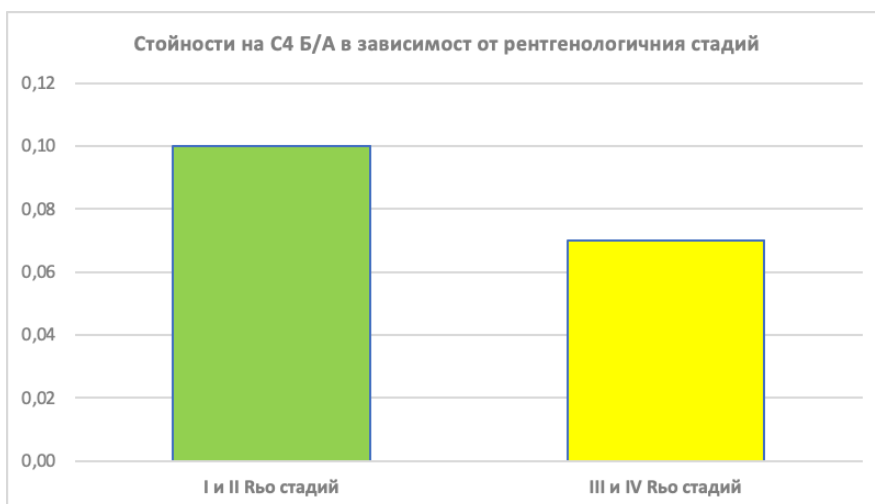
5.6.2. Стойности на С3 в зависимост от рентгенологичния стадий (Фигура №7):



Фигура № 7. Стойности на С3 Б/А в зависимост от рентгенологичния стадий

Заключение: p-value = 0.0030 => отхвърляме H_0 в полза на H_1 при равнище на значимост $\alpha = 1\%$ => С 99% сигурност можем да твърдим, че разликата $\mu_1 - \mu_2$ е положителна или $\mu_1 > \mu_2$. Това на практика означава, че стойностите на С3 в ставната течност са по-високи на по-ранните рентгенологични стадии, т.е. I-ви и II-ри, в сравнение с напреднала болест – III-ти и IV-ти рентгенологичен стадий.

5.6.3. Стойности на С4 в зависимост от рентгенологичния стадий (Фигура № 8):



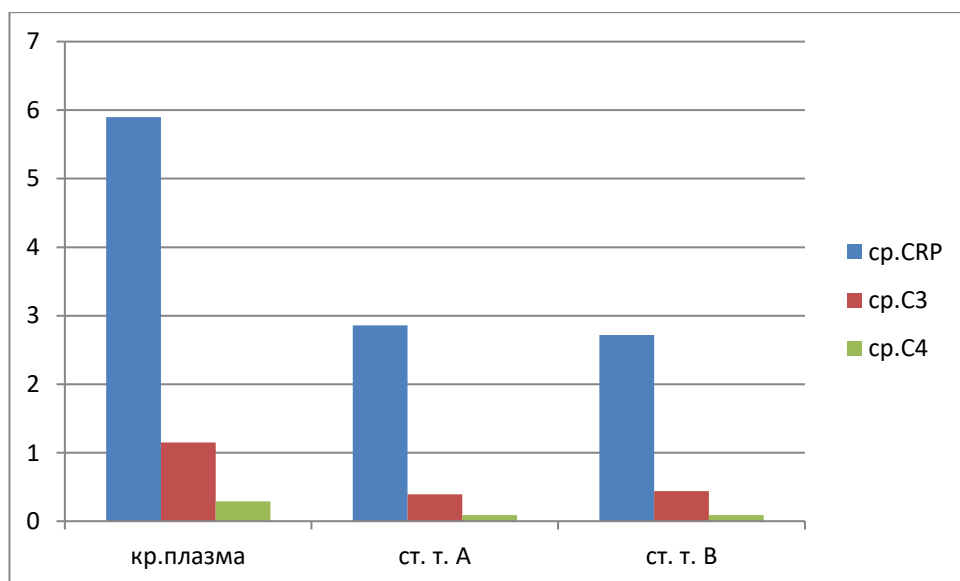
Фигура № 8: Стойности на С4 Б/А в зависимост от рентгенологичния стадий

Заключение: $p\text{-value} = 0.0005 \Rightarrow$ отхвърляме H_0 в полза на H_1 при равнище на значимост $\alpha = 1\% \Rightarrow$ С 99% сигурност можем да твърдим, че разликата $\mu_1 - \mu_2$ е положителна или $\mu_1 > \mu_2$. Това на практика означава, че стойностите на С4 в ставната течност, подобно на резултатите за С3 са по-високи на по-ранните рентгенологични стадии, т.е. I-ви и II-ри, в сравнение с напреднала болест – III-ти и IV-ти рентгенологичен стадий.

5.7. Чрез графичен анализ осреднените стойности на трите изследвани показателя в трите изследвани проби са представени в фигура № 9.

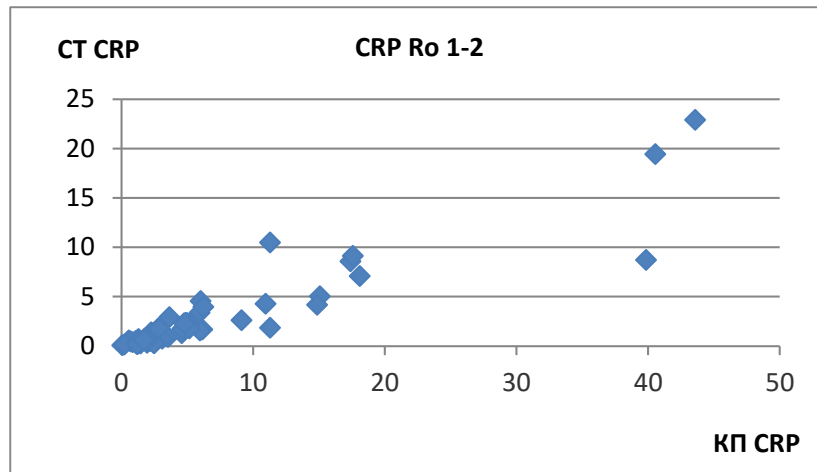
Прави впечатление, че средните стойности на трите показателя в кръвната плазма са в границите на референтните норми, т.е. това е потвърждение, че при тези пациенти няма данни както за системно възпаление (повишени стойности), така и аутоимунно заболяване (понижени стойности).

	кр.плазма	ст. т. А	ст. т. В
ср.CRP	5,9	2,86	2,72
ср.C3	1,15	0,39	0,44
ср.C4	0,29	0,09	0,09



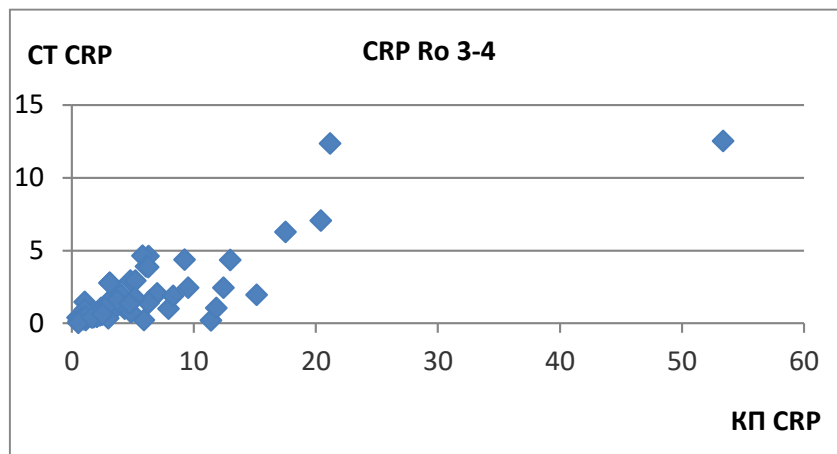
Фигура № 9. Графичен вид на средни стойности на CRP, C3 и C4 в кръвна плазма, ставна течност А и ставна течност Б.

5.8. Чрез прилагане на дисперсионен анализ се стигна отново до извод, че установените зависимости са по-отчетливо изразени на по-ранните стадии на болестта, но персистират, макар и в по-ниска степен при III-ти и IV-ти рентгенологичен стадий, видно от хистограми №1, 2, 3, 4, 5, 6.



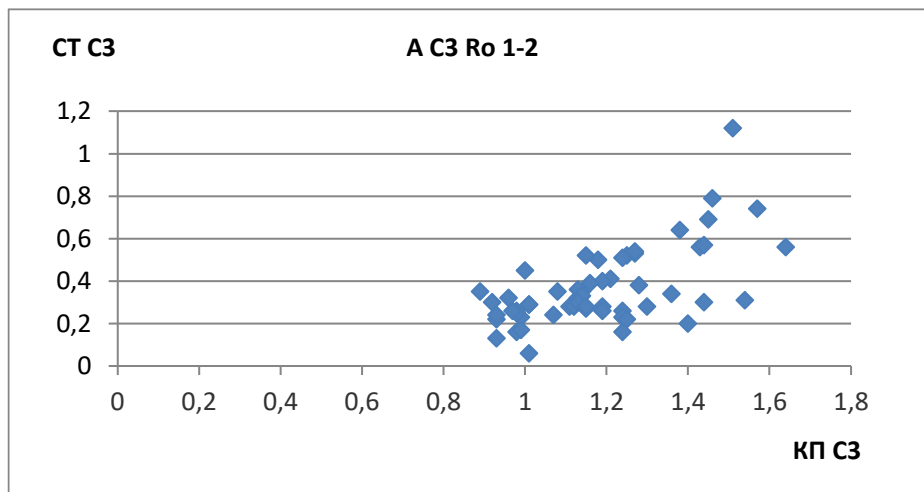
Хистограма № 1. CRP при рентгенови стадии I и II

Наблюдава се много силна и силна корелация. $r = 0,92$



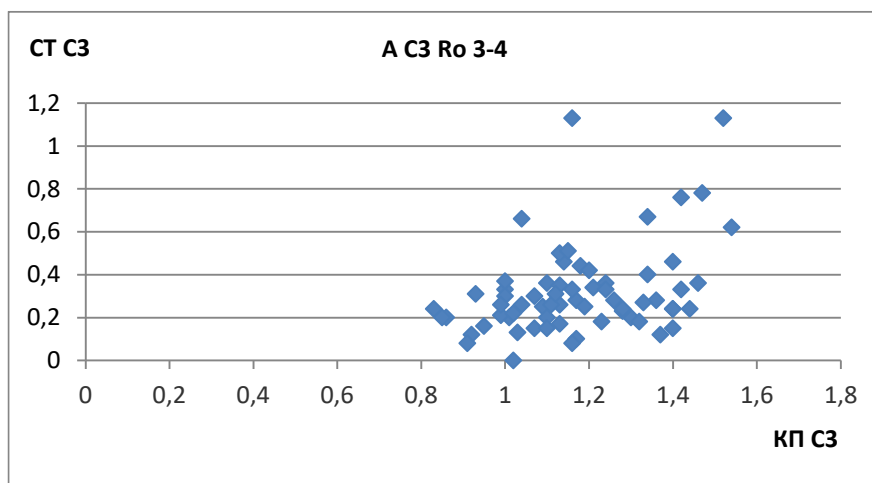
Хистограма № 2. CRP при рентгенови стадии III и IV

Наблюдава се силна корелация $r = 0,83$, макар и по-слаба в сравнение с ранните рентгенови стадии.



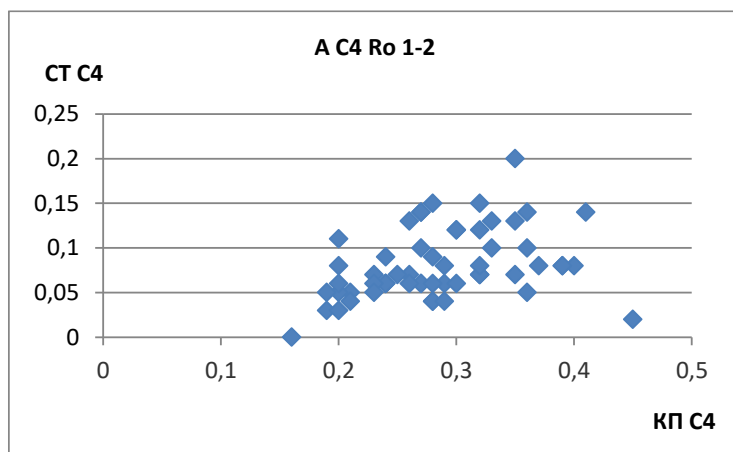
Хистограма № 3. СЗ при рентгенови стадии I и II

$r = 0,629$ (значителна корелация)

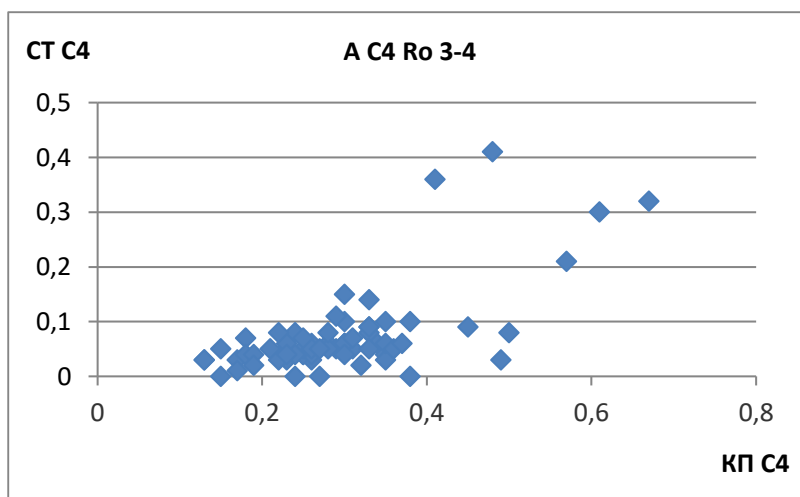


Хистограма № 4. СЗ при рентгенови стадии III и IV

$r = 0,388$ – (умерена корелация)



Хистограма № 5. С4 при рентгенови стадии I и II $r = 0,371$ (умерена корелация)



Хистограма №6 С4 при рентгенови стадии III и IV

$r = 0,665$ – (значителна корелация)

6 ОБСЪЖДАНЕ

6.1. Преданалитичните предизвикателства са една от основните причини, поради които комплемента да не бъде добре проучен в последните 100 год. Комплементните протеини се прикрепят към клетъчните мембрани и са биологично проектирани да взаимодействат с имуноглобулини. Известно е, че са температурно и времеви лабилни. Нестабилността на пробите е първият проблем за изследването им. Коагулацията също може да активира комплемента, тъй като много от коагулационните ензими могат да разцепят комплементните компоненти на активиращи фрагменти. И в двата случая: топлинно въздействие или коагулация, след активиране на комплемента, последващото измерване на фракциите ще даде фалшиво по-високи резултати. Затова се препоръчва замразяване на пробите веднага след събирането им. По време на ин витро коагулацията настъпва бързо активиране на каскадата на комплемента. По тази причина фракции на комплемента се изследват в плазма, а не в серум.

Доказва се, че EDTA е по-ефективна за инхибиране на тази ин витро активация в сравнение с цитрат и хепарин. Анализирайки и влиянието на температурата и времето на съхранение на пробите, с цел избягване на фалшиво по-високи стойности на изследваните C3 и C4 (дължащи се на ин витро активация), препоръките от това клинично изследване са: пробите да се вземат в моновети с EDTA и незабавно да се охладят на 4 гр. C; след центрофугиране EDTA-плазмата да се замразява на -70 гр.С (ако не е възможно веднага, то това да се случи до 8 часа, през което време да се държат на 4 гр. C) и тази температура на съхранение гарантира липса на сигнификантна активация на комплемента в рамките на 3 години.

Съгласно други две публикации и лабораторни препоръки кръвта в EDTA се центрофугира за 15 мин. на минимум 2000-3000 оборота за отделяне на плазмата от клетките. Според същите източници времето на биологичен полуживот на CRP е 2-4 часа; стабилността на пробите при температура 20-25 градуса по целзий е 11 дни; при 4-8 градуса е 2 месеца; при -20 градуса е 3 години. Биологичният полуживот на C3 е минути; стабилността на пробите при температура 20-25 гр. C е 4 дни; при 4-8 гр. C е 8 дни; при -20 гр. C е 8 дни. C4 е с биологичен полуживот 12-24 часа; стабилността на пробите при температура 20-25 гр. C е 2 дни; при 4-8 гр. C е 8 дни; при -20 гр. C е 3 месеца.

Ако синовиалната течност се оценява без предварителна обработка, вискозитетът може да предизвика неравномерно разпределение на клетките в хемоцитометъра, както и да затрудни анализа при пробите с висок вискозитет. Ако в тези случаи необработената ставна течност се разрези е необходимо разреждането да се извърши много прецизно с микропипета и полученият резултат да се коригира според порядъка на разреждане на всяка една проба. Една алтернатива е използване на ензима Хиалуронидаза, което предотвратява образуването на муцинови съсиреци.

Поради горепосочените данни, в хода на работа възникнаха следните преданалитични предизвикателства:

- Цитирания по-горе в други проучвания С5 като участник в патогенезата на ОА не се изследва в българските лаборатории и има полуживот 1 минута, което прави изследването му в нашите условия практически неприложимо.
- Не разполагаме с фризер с температури от порядъка на -70 гр. С. Това наложи съкращаване срока на съхранение на пробите на -20 гр. С до изпращането им за лабораторен анализ за максимум до 8 дни.
- Използвахме Хиалуронидаза с цел намаляване вискозитета на пробите от синовиална течност. Съгласно протокол за Хиалуронидаза, използвана за тази цел, накапвахме 400Е (200 мкл) Хиалуронидаза разтвор за 1 мл ставна течност, като получените в последствие резултати от лабораторния анализ коригирахме спрямо фактора на разреждане 1,4. Съгласно същия протокол, за ускоряване на деполимеризацията, както и за пълна конверсия на С3 в С3с, след размразяване темперирахме пробите на 37 градуса С за 60 мин.
- Преди замразяване на ставна течност Б към нея добавяхме протеазен инхибиторен коктейл. Целта бе протекция на изследваните екстрахируеми протеини от действието на протеазите, отделени в хода на процедурата по клетъчна деструкция (размразяване и темпериране).

Предвид изброените до тук преданалитични условия и препоръки по получаване и съхранение на пробите приехме по-горе описания работен протокол.

6.2. След анализ на получените резултати при изследваната група от 156 пациенти с активирана артроза на колянна става се установява, че стойностите на трите изследвани протеина в синовиалната течност са средно с 42,14 % за CRP, с 34,90% за C3 и с 30,97 % за C4 от стойностите им в кръвната плазма при цитираните в уводната част норми от 10% за нива на комплемента и до 20% нива за CRP в здрава става. Сравнително по-ниският процент за стойностите на C4 спрямо C3 може да бъде обяснен с факта, че при активиране на артрозата водещо участие във възпалението има вроденият имунитет, в частност активирането на комплемента по алтернативния път, където участва C3. Клиничните изследвания, цитирани в литературната справка също установяват повишени стойности на CRP, C3, C5, C6, C7 в артрозната става, но възниква въпросът защо това е така и какъв е биологичният смисъл на този феномен? В търсенето на отговор на този въпрос разделихме ставната течност на проби А и Б. Резултатите от анализа разкриват по-високи нива на C3 и C4 в проба Б в сравнение с тези в проба А ($p\text{-value} = 0,0000$ за C3 и $p\text{-value} = 0,0045$ за C4). От уводната част е видно, че фракциите на комплемента се фиксират по клетъчната мембрана на дегенерирани клетки, апоптоични хондроцити и фрагменти от екстрацелуларен матрикс.

С така приложената методика на изследване установяваме количествено, че по-високите нива на фракциите на комплемента в проба Б се дължат на отделяне при обработката (криогенна деструкция на клетките) на фиксираните върху клетъчните мембрани фракции на комплемента. Изхождайки от еволюционно детерминираната роля на системата на комплемента като част от вродения имунитет и първа линия на защита, изследването количествено оценява тази негова роля.

6.3. Наблюдението относно силата на корелация между горепосочените резултати и рентгенологичния стадий потвърждават по-силна корелация на получените резултати при по-ранните стадии на болестта, когато активността на процесите на репарация са по-изразени.

6.4. Не се наблюдават съществени различия между двата пола по всички изследвани показатели.

6.5. На база на горепосочените резултати, изработихме следният модел на нискостепенно локално възпаление при ОА:

МОДЕЛ НА НИСКОСТЕПЕННО ЛОКАЛНО ВЪЗПАЛЕНИЕ ПРИ ОА



6.6. Въпреки ясната роля на възпалението при ОА, досегашните опити за противовъзпалителни терапии, включително използването на системни и интраартикуларни биологични агенти за инхибиране на TNF α и IL-1 β , се оказват разочароващи. Проучванията продължават да подчертават хетерогенната природа на ОА, със силен интерес към разбирането и дефинирането на фенотипове на ОА.

Настоящите препоръки за лечение на ОА на коляното са съобразени основно със стадия на заболяването и степента на изява на неговата симптоматика. Необходима е повече работа върху молекулярните пътища, инициращи и поддържащи синовиално възпаление, тъй като познаването на тези пътища ще предостави нови терапевтични възможности.

6.7. ОА е хетерогенно, многофакторно, многоизмерно, многопроизходно хетерогенно заболяване. Основните предизвикателства за болестна модификация при ОА включват: идентифициране на подходящата популация пациенти за противовъзпалителна терапия; стадиране на заболяването; забавяне/спиране на структурната увреда. Синовитът като предиктор на хрущялна загуба е по-чест на по-ранните стадии (видно от статистическа обработка на представителната група). Необходимостта от идентифициране и количествено определяне на възпалението при ОА-става преди появата на необратима структурна ставна увреда дава бъдещо терапевтично обещание подобно на парадигмата, която вече е добре приета за ранното агресивно лечение на РА.



Лечението на ключови аспекти на синовиалното възпаление е обещание за аналгезия, както и за структурна модификация. Възниква въпросът дали контролираното балансирано активиране на комплемента не би могло да е бъдеща терапевтична стратегия при лечение на ОА и да предотврати прогресията и?

7 ИЗВОДИ:

7.1. Настоящото научно изследване доказва участието на CRP и комплемента като хуморални фактори на вродения имунитет в патогенезата на активираната артрозна болест;

7.2. Обективизира факта, че при ОА активирането на комплемента е по алтернативния път. (по-високи стойности на C3 в ст.течност в сравнение с C4);

7.3. C3 и C4 фракциите на комплемента пряко участват в процеса на елиминиране на деградационни продукти от ставното пространство при ОА на колянна става;

7.4. Установихме по-силна зависимост между повишените клинични показатели и рентгенографските промени в колянната става в по-ранните стадии на болестта, когато активността на процесите на репарация е по-изразена;

7.5. Обективизирайки патогенетичната роля на комплемента в артрозния процес, настоящото изследване може да даде насока за бъдеща терапевтична стратегия.

7.6. Настоящите доказателства относно участието на вродения имунитет в патогенезата на артрозната болест и възможностите на системата на комплемента за хомеостатичната регулация, справяне с инфекции и с апоптоични продукти, подкрепят тезата, че по-нататъчното изследване на комплемента при остеоартроза е уместно. Протеините на комплемента в ставната течност биха могли да се ползват като биомаркери за активиране на болестта от една страна и илюстриращи прогресията на структурната увреда от друга.

8 ПРИНОСИ

8.1. Приноси с оригинален характер:

- За пръв път в България се доказва количествено и статистически достоверно водещата роля на вродения имунитет в патогенезата на активиране на остеоартрозната болест;
- Предлага се патогенетичен модел на нискостепенно възпаление при ОА;

- Със статистическа достоверност се установява взаимовръзката между повишените нива на CRP, С3 и С4 в синовиална течност и активиране на артрозната болест;
- Получените резултати доказват и подкрепят концепцията за пътищата, инициращи и поддържащи синовиално възпаление при тази кохорта пациенти;
- Установихме по-силна зависимост между повишените клинични показатели и рентгенографските промени в колянната става в по-ранните стадии на болестта, когато активността на процесите на репарация е по-изразена;

8.2. Приноси с научно-приложен характер:

- Този тип анализ може да се приложи в клиничната практика с цел патогенетична диференциация на типа възпалителен процес при хидропс на колянна става;
- Контролираното активиране на комплемента може да бъде терапевтичен таргет при пациенти с ОА и възпалителен фенотип;
- Резултатите аргументират необходимостта от приложението на лекарствени препарати с ефект върху нискостепенното възпаление като болестопрменящ модел на лечебно поведение;
- Резултатите от изследването потвърждават необходимостта от терапевтичен контрол на възпалението в артрозната става на ранен рентгенологичен стадий от болестта.

8.3. Приноси с потвърдителен характер:

- При тази статистическа извадка от българската популация се потвърждават данните от досегашни публикации относно значението на повишените нива на CRP и комплементните фракции в артрозната става – т.е. ролята на хуморалните фактори на вродения имунитет в патогенезата на ОА,
- Резултатите от изследването потвърждават участието на нискостепенното възпаление в прогресиране на болестта.

9 ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **И.Момчева**, И.Казмин. „Алгоритъм за диагностика на остеопороза при пременопаузални и перименопаузални жени“. Списание „Medinfo“, брой 1, януари, 2019, стр. 44-46.
2. **И. Момчева**, И. Казмин, Св. Христова, В. Маджова. „Роля на възпалението в патогенезата на артрозната болест“. Сп. „Ревматология“, 2021, vol. XXXIX, No 2: 52-55
3. **И.Момчева**, Казмин И, Христова Св., Маджова В. „Остеоартроза и имунитет“. Сп.„Ревматология“, Vol. XXIX, №1, 2021, стр. 44-46, 2021

НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. И. Момчева, И. Казмин, Д. Вълчев, “Терапевтична ефективност и безопасност на вътреставни инжекции на PRP при артроза на колянна става – клинично наблюдение“. Национална конференция по ОП и ОА, Пловдив, 11-13 декември 2014, (орална презентация)
2. И. Момчева „Резултати от партньорството между Вит.К2 и Вит. Д3 при пациенти с остеопения – Национална конференция по ОП и ОА, Боровец, ноември 2018
3. И. Момчева „Повишено ниво на С3 в синовиална течност при болни с активирана гонартроза като диагностичен и терапевтичен таргет“ Годишна Конференция по остеоартроза и остеопороза – Летни ревматологични дни. Правец, 02 юни 2023 (орална презентация)

10 ПРИЛОЖЕНИЯ

Таблица 1: Изследвани показатели и референтен обхват.

Фигура 1: Вродена имунна система – първа линия на имунна защита. Модел на активиране на комплемента при ОА.

Фигура 2: Среден % CRP в синовиална течност спрямо плазмени нива.

Фигура 3: Среден % С3 в синовиална течност от плазмени нива.

Фигура 4: Среден % С4 в синовиална течност от плазмени нива.

Фигура 5: Разпределение на пациентите според рентгенологичния стадий.

Фигура 6: CRP Б/А в зависимост от рентгенологичния стадий.

Фигура 7: С3 Б/А в зависимост от рентгенологичния стадий.

Фигура 8: С4 Б/А в зависимост от рентгенологичния стадий.

Фигура 9: Средни стойности на CRP, С3, С4 в кръвна плазма, ставна течност А и ставна течност Б.

Хистограма 1: Разпределение на пациентите според стойности на CRP в Ст.Течност спрямо нива в Кр. Плазма в % (1-50).

Хистограма 2: Разпределение на пациентите според стойности на С3 в Ст.Течност спрямо нива в Кр. Плазма в % (1-50).

Хистограма 3: Разпределение на пациентите според стойности на С4 в Ст.Течност спрямо нива в Кр. Плазма в % (1-50).

Хистограма 4: Разпределение на стойностите на отношението Б/А - CRP (51-121).

Хистограма 5: Разпределение на стойностите на отношението Б/А - С3 (51-121).

Хистограма 6: Разпределение на стойностите на отношението Б/А - С4 (51-121).

Благодарности:

Издавам своята най-искрена благодарност на:

- Проф. д-р Валентина Маджова, д.м. за доверието, професионализма, търпението и урока по човечност;
- научния ми ръководител доц. Желязко Русева, д.м. за конструктивните съвети и безрезервната подкрепа;
- моя учител в ревматологията, д-р Иван Казмин, който ме мотивира да започна този труд и бе моя упора през целия път;
- д-р Пламена Хараланова и д-р Светлана Христова, д.м., които редом с мен работиха безкористно и с пословична прецизност;
- д-р Васил Костадинов и Татяна Костадинова от лаборатория „Лина“ за обработката на материала, точността на резултатите и помощта при снабдяване с консумативи;
- на семейството ми за търпението и разбирането;

Благодаря на всички, проявили интерес към научния ми труд!

Ирина Момчева