

---

TEZĂ DE DOCTORAT (Rezumat)

# Bolile autoimune sistemice la copil – Factori prognostici și particularități clinice și terapeutice

---

Doctorand **Claudia-Luminița Sîrbe**

---

Conducător de doctorat Prof.dr. **Simona Rednic**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

## CUPRINS

<b>ABREVIERI</b>	13
<b>INTRODUCERE</b>	15
<b>MULȚUMIRI</b>	17
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	
<b>1. Lupusul eritematos sistemic cu debut juvenil</b>	21
1.1. Introducere	21
1.2. Patogeneza	22
1.3. Aspecte clinice	25
1.4. Investigații de laborator	28
1.5. Criterii de clasificare	29
1.6. Tratament	30
1.7. Prognostic	31
<b>2. Hepatita Autoimună la copil</b>	32
2.1. Introducere	33
2.2. Patogeneza	34
2.3. Aspecte clinice și diagnostice	38
2.4. Investigații de laborator	39
2.5. Aspecte histologice	39
2.6. Tratament	39
2.6.1. Tratament de primă linie	39
2.6.2. Tratament alternativ	40
2.6.3. Tratament în cazul formelor refractare	41
2.6.4. Întreruperea tratamentului	41
2.6.5. Transplant hepatic	42
2.7. Prognostic	42
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	43
<b>Obiective și Ipoteza de lucru</b>	45
<b>3. Studiu I. Lupusul eritematos sistemic – diferențe între pacienți juvenili și adulți</b>	47
3.1. Introducere	47
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	47
3.3. Material și metodă	48
3.3.1. Tipul studiului și caracteristicile lotului	48
3.3.2. Protocol de investigații	48
3.3.3. Procesarea markerilor serici	49
3.3.4. Analiza statistică	50
3.4. Rezultat	57
3.5. Discuții	60
3.6. Concluzii	61
<b>4. Studiu II. Evoluția hepatitei autoimune la copil</b>	61
4.1. Introducere	61
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	61
4.3. Material și metodă	61
4.3.1. Tipul studiului și caracteristicile lotului	62
4.3.2. Protocol de investigații	62
4.3.3. Procesarea markerilor serici	63
4.3.4. Analiza statistică	63
4.4. Rezultate	70
4.5. Discuții	76
4.6. Concluzii	79
<b>5. Studiu III. Detectarea de noi biomarkeri în hepatita autoimună și în lupusul eritematos sistemic</b>	79

5.1. Introducere	79
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	81
5.3. Material și metodă	81
5.3.1. Tipul studiului și caracteristicile lotului	81
5.3.2. Protocol de investigații	82
5.3.3. Prelucrarea probelor și detectarea proteinelor	83
5.3.4. Descrierea proteinelor identificate	83
5.3.5. Analiza statistică	84
5.4. Rezultate	84
5.4.1. Cohorta clinică	84
5.4.2. Profilarea proteomului țintă	86
5.4.3. Abundența proteinelor la pacienții cu HAI, aLES și jLES	87
5.4.4. Compararea profilurilor proteice între subfenotipurile HAI	91
5.4.5. Corelații între profilurile proteice și vitamina D	91
5.4.6. Analiza rețelei de interacțiune a proteinelor	93
5.5. Discuții	95
5.6. Concluzii	100
<b>6. Studiu IV. Rolul vitaminei D în evoluția lupusului eritematos sistemic și a hepatitei autoimune</b>	101
6.1. Introducere	101
6.2. Ipoteza de lucru/obiective	103
6.3. Material și metodă	103
6.3.1. Tipul studiului și caracteristicile lotului	104
6.3.2. Protocol de investigații	105
6.3.3. Prelucrarea probelor și genotiparea	105
6.3.4. Analiza statistică	106
6.4. Rezultate	109
6.5. Discuții	111
6.6. Concluzii	111
<b>7. Studiu V. Prognosticul pacienților pediatrici cu lupus eritematos sistemic și hepatită autoimună - implicații psihice, emoționale și sociale</b>	113
7.1. Introducere	113
7.2. Ipoteza de lucru/obiective	113
7.3. Material și metodă	114
7.3.1. Tipul studiului și caracteristicile lotului	114
7.3.2. Protocol de investigații	115
7.3.3. Chestionare HRQoL	115
7.3.4. Analiza statistică	116
7.4. Rezultate	116
7.4.1. Aspecte epidemiologice și clinice	116
7.4.2. Calitatea vieții	118
7.5. Discuții	120
7.6. Concluzii	123
<b>8. Discuții generale</b>	125
<b>9. Concluzii generale</b>	133
<b>10. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	135
<b>REFERINȚE</b>	137

**Cuvinte cheie:** lupus eritematos sistemic, hepatită autoimună, copii, boli autoimune, diagnostic, biomarkeri, calitatea vieții, prognostic

## INTRODUCERE

Lupusul eritematos sistemic (LES) este o boală cronică care face parte din grupul heterogen al colagenozelor caracterizate de prezența anticorpilor formați împotriva antigenelor proprii din țesuturi. Inflamația persistentă mediată imun poate cuprinde simptome ce variază de la manifestări clinice ușoare până la condiții amenințătoare de viață. LES este o boală sistemică de cauză necunoscută care prezintă afectare cutanată, articulară, cardiovasculară, hematologică, renală și neurologică. Incidența jLES (lupus eritematos sistemic juvenil) la nivel mondial este redusă, afectează mai frecvent sexul feminin, la toate categoriile de vârstă. Se estimează că între 10% și 20% dintre pacienți prezintă debutul LES înainte de vârsta adultă. Între copil și adult se menționează multiple asemănări, dar și deosebiri în legătură cu mecanismele patogenetice, aspectele clinice și criteriile diagnostice. Înțelegerea acestor diferențe este importantă în tratamentul specific și în prognosticul bolii. Mecanismul patogenetic este complex, implicând factori genetici, imunologici, hormonal și de mediu. Asistența medicală oferită copiilor și adolescenților cu jLES este diferită de cea a adulților din cauza impactului bolii și al terapiei asupra creșterii și dezvoltării fizice, psihosociale și emoționale.

Hepatita autoimună (HAI) este o boală hepatică complexă care face parte din bolile hepatice autoimune descrise în populația pediatrică alături de colangita sclerozantă autoimună (CSA) și HAI de novo după transplantul de ficat. HAI este caracterizată prin injurie hepatocitară mediată imun care determină inflamație, insuficiență hepatică și fibroză. HAI este o boală rară care poate apărea la orice vârstă și etnie. Incidența HAI pediatrică a crescut în ultimele două decenii, în special la copii. HAI este o boală cronică rară, care este mai frecvent întâlnită la sexul feminin. Adesea, HAI nu este recunoscută în stadiile incipiente ale bolii din cauza unui spectru larg de simptome care poate varia de la simptome nespecifice până la hepatită acută severă urmată de insuficiență hepatică acută. Etiologia HAI nu este complet cunoscută, dar este incriminată interacțiunea dintre variantele genetice, modificările epigenetice și factorii de mediu. Mecanismele implicate în bolile hepatice autoimune au la bază interacțiunea între genele predispozante ale antigenului leucocitar uman (HLA) și sistemele non-HLA. În prezența unui proces inflamator progresiv, injuria hepatocitară continuă poate cauza disfuncție hepatică și fibroză hepatică pe termen lung.

## CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

În studiile acestei teze am căutat să identificăm diferențele între lupusul eritematos sistemic la copil (jLES) și adult (aLES), respectiv între tipurile de hepatită autoimună (HAI), care ar putea ajuta la dezvoltarea unor tratamente adaptate în funcție de vârsta la care apare debutul bolii. Am urmărit descrierea și compararea diferențelor în ceea ce privește manifestările clinice, inclusiv severitatea bolii, activitatea și tratamentul pacienților. Am realizat printre singurele studii publicate în literatura de specialitate până în prezent, care vizează profilul proteomic al HAI și LES. Am căutat să înțelegem rolul vitaminei D în bolile autoimune și am efectuat pentru prima dată polimorfismele nucleotidice unice ale receptorului vitaminei D corelate cu studiul de proteomică la pacienții LES și HAI. Am evaluat calitatea vieții legată de sănătate la pacienții pediatrici cu jLES și HAI. Aceste studii reprezintă o problemă de actualitate, care au abordat evaluarea pacientului în totalitate pentru a oferi un tratament cât mai adecvat și individualizat.

Teza cuprinde cinci studii care au avut un design de tip analitic, observațional, dintre care primele două studii au fost de tip retrospectiv și de cohortă, iar următoarele trei studii au fost de tip prospectiv, transversal și caz-control.

### **Studiul I. Lupusul eritematos sistemic – diferențe între pacienți juvenili și adulți**

#### **Introducere și ipoteza de lucru**

Diagnosticul stabilit precoce, progresele terapeutice și asistența multidisciplinară contribuie la creșterea șansei de supraviețuire la pacienții cu jLES. Pentru îmbunătățirea strategiilor de tratament la pacienții cu jLES, am urmărit caracterizarea manifestărilor clinice și evoluția bolii, identificarea factorilor care pot influența prognosticul și potențialii factori de risc care cresc morbiditatea și mortalitatea. În plus, identificarea diferențelor

între jLES și aLES ar putea ajuta la dezvoltarea unor tratamente adaptate în funcție de vârsta la care apare debutul bolii.

### Material și metodă

Acest studiu retrospectiv, a cuprins 69 de pacienți, dintre care 29 (42.03%) au fost pacienți cu jLES, iar 40 (57.97%) cu aLES. Au fost preluate datele de la internările pacienților cu jLES și aLES de la prima internare în spital până la ultimul control, pacienți care au prezentat cel puțin o internare/control între luna ianuarie 2021 și luna septembrie 2022. Studiul a fost efectuat pe informațiile obținute din fișele de observație ale pacienților care s-au prezentat la internare în scop diagnostic, terapeutic sau control al bolii. În această analiză au fost incluse date demografice detaliate, etnie, vârsta de debut, criteriile de clasificare, rezultatele de laborator, rezultatul biopsiei renale și informații despre medicație și prognostic.

### Rezultate și concluzii

Mai multe diferențe au fost detectate în cele două grupuri. Dintre manifestările constituționale studiate, febra a fost cel mai puțin frecventă în rândul pacienților cu jLES, însă pierderea în greutate și limfadenopatia au fost cele mai frecvente. Serozita, împreună cu leucopenia au fost cele mai răspândite la această grupă de vârstă. Afectarea organelor majore sub formă de nefrită lupică și afectarea hematologică au fost statistic cele mai prevalente în rândul pacienților cu jLES. Copiii cu jLES sau adulții cu jLES au prezentat o formă de boală semnificativ mai activă pe parcursul controalelor. Leziunile de organ au constat în: afectare renală cu boală cronică renală mai frecventă la jLES versus aLES; afectare cardiacă și osoasă mai frecventă la aLES versus jLES; pubertate întârziată și hipostatură doar în cadrul jLES. Dintre pacienții cu jLES care au prezentat afectare renală, trei au ajuns în stadiu de boală terminal cu necesitatea hemodializei și doi dintre aceștia au beneficiat de transplant renal de la donator viu înrudit. Niciun pacient aLES nu a necesitat hemodializă sau transplant renal.

Complexitatea și gravitatea jLES necesită un tratament multidisciplinar pediatric care să ia în considerare aspectele legate de implicarea organică și activitatea bolii, de care depinde alegerea medicației, care contribuie la creșterea, dezvoltarea psihosocială și educațională.

## Studiul II. Evoluția hepatitei autoimune la copil

### Introducere și ipoteza de lucru

Îmbunătățirea strategiilor de tratament pentru pacienții pediatrici cu hepatită autoimună (HAI) poate fi posibilă prin înțelegerea manifestărilor clinice, a evoluției bolii și a factorilor care pot influența prognosticul. Astfel, obiectivul principal al acestui studiu a fost analizarea caracteristicilor clinice și paraclinice, diagnosticul, tratamentul și răspunsul la tratament în funcție de tipul HAI. În plus, descrierea diferențelor între tipurile de boală ar putea ajuta la dezvoltarea unor tratamente adaptate pentru prognostic mai bun.

### Material și metodă

Acesta este un studiu retrospectiv în care am inclus 30 de copii spitalizați cu HAI în clinica noastră, între februarie 2016 și februarie 2022, cu o perioadă medie de urmărire de 7.5 luni. Studiul a fost efectuat pe informațiile obținute din fișele de observație ale pacienților care s-au prezentat la internare în scop diagnostic, terapeutic sau control al bolii. În această analiză au fost incluse date demografice detaliate, etnie, vârsta de debut, criteriile de diagnostic, rezultatele de laborator, ecografie și informații despre medicație și prognostic.

### Rezultate și concluzii

În cadrul acestui studiu, am identificat diferențele dintre HAI-1 și HAI-2 la pacienții pediatrici. Copiii cu HAI-2 au avut evoluție mai severă a bolii, dar și răspuns bun la terapie, cu scăderea mai rapidă a probelor hepatice și cu mai puține complicații față de HAI-1. De asemenea, doar pacienții cu HAI-1 au prezentat insuficiență hepatică acută. HAI are o evoluție cronică, implicând tratament imunosupresor pe termen lung, cu posibilitatea întreruperii terapiei în mai puțin de un sfert din cazurile cu HAI-1 și doar în cazuri limitate cu HAI-2. Pacienții cu HAI-1 au necesitat doze mai crescute de glucocorticoizi și de azatioprină. Am reușit să arătăm că evoluția HAI la copiii tratați cu terapie imunosupresivă imediată este favorabilă, cu rate bune de supraviețuire pe termen lung. Enzimele hepatice, fosfataza alcalină, gama-glutamiltransferaza și nivelul de bilirubină au prezentat o rată de

scădere mai mare în HAI-2 decât în HAI-1 în primele patru luni de la inițierea tratamentului. Probabilitatea ca IgG să nu scadă după inițierea tratamentului a fost de 2 ori mai mare pentru HAI-1 versus HAI-2. Ciroza hepatică poate să apară în evoluția HAI, chiar și cu tratament corect instituit, fiind importantă evaluarea factorilor de risc pentru evoluție nefavorabilă. Ciroza hepatică a fost descrisă la 4 pacienți cu HAI-1 și doar unul cu HAI-2.

Studiul nostru subliniază importanța unei analize ample a pacienților pediatrici cu HAI-1 și HAI-2 pentru a înțelege mai bine diferențele dintre entități, care contribuie la alegerea imunosupresiei adaptate pentru a maximiza rezultatele.

### **Studiul III. Detectarea de noi biomarkeri în hepatita autoimună și în lupusul eritematos sistemic**

#### **Introducere și ipoteza de lucru**

Tehnologia proteomicii suprinde imaginea întregului nostru sistemului biologic și oferă abordarea personalizată a bolilor prin utilizarea unor noi biomarkeri. Analiza proteomică nu a fost efectuată anterior la pacienți pediatrici cu HAI și sunt date limitate în cadrul LES. Pentru a aborda această importantă parte de cercetare, au fost evaluați biomarkerii serici cu ajutorul a două paneluri de 92 de proteine (panel Inflamator și Cardio-metabolic, OLINK, Uppsala, Suedia) la pacienții cu HAI și la probele de control de la persoane sănătoase. În literatura de specialitate sunt descrise diferențe între tipurile de HAI, între HAI și sindromul overlap cu colangita sclerozantă. Vitamina D este menționată ca posibil biomarker de prognostic al HAI.

De asemenea, panelul Inflamator a fost efectuat la pacienții cu LES și probele de control de la persoane sănătoase. În studii se menționează diferențe între aLES și jLES. Vitamina D este considerată posibil biomarker al evoluției LES.

#### **Material și metodă**

Am inclus 39 de participanți, copii diagnosticați cu HAI (n=20) și copii fără boli autoimune sau hepatice (grup control; n=19). De asemenea, am și inclus 41 de participanți adulți, aLES (n=19) și grup control (n=26); 24 de participanți copii, jLES (n=19) și grup control (n=5). Acești pacienți au fost înrolați între februarie 2021 și martie 2022. Un total de 184 de proteine au fost măsurate în ser cu ajutorul panelurilor OLINK Cardio-metabolic și Inflamator (92 de proteine fiecare) la HAI și Inflamator (92 de proteine) la aLES și jLES. Proteinele au fost cuantificate prin analiza de extensie a proximității (PEA).

#### **Rezultate și concluzii**

În acest studiu descriem pentru prima dată profilul proteomic al HAI pediatrice și din cadrul aLES cu diferențe nominal semnificative între pacienți și grup control. Am demonstrat diferențe între nivelurile circulante ale proteinelor care, pe baza literaturii existente, sunt relevante pentru patogeneza HAI și LES.

Am descris 16 proteine care au prezentat o expresie diferențiată semnificativă din punct de vedere numeric în circulația pacienților cu HAI, și anume CA1, CA3, GAS6, FCGR2A, TIMD4, EFEMP1, CSF-1, CX3CL1, CCL23, IL-18R1, IL-10RB, OPG, 4E-BP1, CXCL10 și CCL19. Aceste proteine au fost exprimate în mod diferit în rândul pacienților cu HAI și al martorilor, cu proteine supra-reglate (GAS 6, FCGR2A, CXCL10 și CCL19) și cu proteine sub-reglate (CA1, CA3 și 4E-BP1). Aceste profiluri proteomice nu au diferențiat pacienții pe baza tipului 1 sau tipului 2 HAI, nici pe baza HAI vs. HAI-CSA.

Au fost identificate la aLES diferențe nominal semnificative în ceea ce privește abundența proteinelor, cum ar fi IL-15RA, TRAIL, EN-RAGE, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL19, TNF, PD-L1, și CX3CL1 în panelul Inflamator. Alte diferențe care nu au atins semnificația statistică au fost: ADA, TRANCE, TNFRSF9, CDCP1, IL-18, IL-12B, IL-18R1. Proteinele candidate care au fost supra-reglate au fost CCL19, CXCL10, EN-RAGE sau sub-reglate au fost ADA, IL-15RA.

Pentru o mai bună înțelegere a mecanismelor implicate în LES, am efectuat același panel Inflamator și la pacienții jLES și grupul control. Au fost identificate la jLES diferențe nominal semnificative în ceea ce privește abundența proteinelor, cum ar fi CXCL6 și CST5. Alte diferențe care nu au atins semnificația statistică au fost: TNF, HGF, FGF-5, CD244, MMP-10, TNFRSF9. Proteinele au fost diferite între cele două categorii de vârstă. Proteinele candidate care au fost supra-reglate au fost CST5, TNF sau sub-reglate au fost CXCL6, CD244.

În studiul de față, pacienții cu HAI, aLES și jLES au prezentat deficit de vitamina D față de grupul control. Asocierea realizată între proteinele exprimate diferențiat din panelurile Olink și nivelul seric al vitaminei D la acești pacienți nu a relevat corelații semnificative în ambele paneluri analizate. Doar în cadrul aLES, au fost observate corelații clare pentru proteinele uPA, IL-12B, CD5, TNFRSF9 și vitamina D. Aceste proteine au fost invers corelate față de nivelul vitaminei D, proteinele fiind în titru crescut în cazul deficitului de vitamina D.

Datele noastre descriu heterogenitatea serologică în HAI pediatrică și LES și propun o varietate de mecanisme care stau la baza acestor boli. Identificarea de noi autoantigeni specifici în aceste boli poate influența caracterizarea răspunsurilor autoimune și explorările rolului lor patogen. Cercetări suplimentare ale autoanticorpilor în HAI pediatrică și LES pot decide valoarea lor pentru diagnostic și pot obține o mai bună înțelegere a patogenezei în acestor boli.

## **Studiul IV. Rolul vitaminei D în evoluția lupusului eritematos sistemic și a hepatitei autoimune**

### **Introducere și ipoteza de lucru**

Vitamina D are efecte pleiotropice sugerate de expresia VDR în limfocite și celule dendritice. Numeroase studii menționează rolul vitaminei D în bolile autoimune și inflamatorii, intervenind în sistemul imun înăscut și adaptativ. Vitamina D poate influența incidența și severitatea HAI și LES. Prin urmare, scopul acestui studiu a fost dozarea vitaminei D la pacienții cu HAI și LES. În plus, am urmărit să demonstrăm dacă SNPs FokI și A-1012G pot fi un factor de risc în apariția HAI sau LES.

### **Material și metodă**

Acest studiu a fost efectuat între luna ianuarie 2021 și luna septembrie 2022 și a inclus 17 pacienți pediatrici cu HAI și 19 subiecți în grupul de control. De asemenea, grupurile de studiu în cadrul LES au cuprins 52 de pacienți cu aLES și 54 pacienți în grupul de control. SNPs VDR rs4516035 (A-1012G) și rs2228570 (FokI) au fost detectate prin qPCR cu discriminare alelică TaqMan.

### **Rezultate și concluzii**

Deficitul de vitamina D a fost prezent la pacienții cu LES și HAI, nivelurile scăzute fiind corelate cu activitatea și prognosticul bolilor. Polimorfismele FokI și A-1012G nu au fost asociate cu susceptibilitatea la LES și HAI. Nu am decelat o frecvență mai crescută a genotipurilor F/F și F/f la pacienți aLES și HAI. Am constatat o frecvență crescută a alelei f la pacienții cu aLES și a alelei dominante F/F+F/f. Am observat o creștere a frecvenței genotipurilor dominante a/a la pacienți cu LES. De asemenea, am observat o frecvență crescută a alelei F la pacienții cu HAI. A fost raportată mai frecvent alela a la pacienții cu HAI față de martori.

Rolul SNPs VDR este încă neclar, deoarece există dovezi limitate cu privire la influența sa asupra acțiunii vitaminei D. Sunt necesare studii suplimentare care să evalueze interacțiunea SNPs cu nivelurile serice de vitamina D. Acestea ar putea clarifica rolul vitaminei D în susceptibilitatea și modularea evoluției LES și HAI.

## **Studiul V. Prognosticul pacienților pediatrici cu lupus eritematos sistemic și hepatită autoimună - implicații psihice, emoționale și sociale**

### **Introducere și ipoteza de lucru**

Bolile autoimune prezintă un impact negativ asupra calității vieții, inclusiv în stadiile inițiale. Aceasta este o problemă de actualitate, precum și necesitatea evaluării pacientului în totalitate pentru a oferi un tratament cât mai cuprinzător. Scopul acestui studiu a fost evaluarea calității vieții legate de sănătate la pacienți pediatrici cu jLES și HAI. În plus, am urmărit compararea acestor rezultate cu cele ale unor copii sănătoși și cu alte cohorte de pacienți din literatura de specialitate.

## Material și metodă

Acest studiu a fost efectuat între luna ianuarie 2021 și luna septembrie 2022 și a inclus 40 de pacienți pediatrici, dintre care 20 au fost pacienți cu jLES care au completat chestionarul CHQ-28, iar 20 cu HAI care au completat chestionarul PedsQL 4.0.

## Rezultate și concluzii

Rezultatele noastre indică faptul că, în medie, pacienții cu jLES au o calitate a vieții mai slabă și a sănătății generale (CHQ) în comparație cu controalele sănătoase în domeniul fizic și psihosocial. Cele mai afectate categorii pentru jLES au fost sănătatea globală, limitările sociale, stimă de sine scăzută, percepția generală asupra sănătății, cu izolare socială față de prieteni și colegi, absenteism școlar, activități cu familia reduse și coeziune familială scăzută. Părinții au fost afectați pe parte emoțională și pe timpul acordat îngrijirii copilului.

Cele mai afectate categorii pentru HAI au fost categoriile emoționale și psihosociale. Pacienții cu HAI au avut scoruri mai mici decât copiii sănătoși pentru toate domeniile evaluate. Astfel, aceștia au prezentat o calitate a vieții ușor mai slabă față de copiii sănătoși. Copiii cu HAI au prezentat stimă de sine scăzută în special la adolescenți cu sindrom Cushing secundar tratamentului cu corticoizi, percepție proastă privind sănătatea. Părinții au fost ușor afectați pe parte emoțională și legat de timpul acordat îngrijirii copilului. Prezența colangitei sclerozante și a cirozei a avut cel mai mare impact negativ asupra calității vieții și a sănătății pacienților, fiind cel mai mult asociate cu afectarea stării generale de sănătate, a sănătății fizice și a vieții de familie.

Bolile autoimune apărute în copilărie continuă la vârsta adultă. Aceste boli sunt asociate cu un risc ridicat de invaliditate și de afectare a calității vieții pacienților. Evaluarea îngrijirii medicale axate pe calitatea vieții și a sănătății pacienților este extrem de importantă la pacienții de vârstă pediatrică cu jLES și HAI.

## ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI

Originalitatea și contribuția inovativă a tezei constă în următoarele aspecte:

1. În acest studiu am identificat diferențele între jLES și aLES, respectiv între tipurile HAI, care ar putea ajuta la dezvoltarea unor tratamente adaptate în funcție de vârsta la care apare debutul bolii.
2. Am descris și comparat diferențele în ceea ce privește manifestările clinice, inclusiv severitatea bolii, activitatea și tratamentul pacienților cu jLES și aLES, respectiv între tipurile HAI.
3. Din cunoștințele noastre, am realizat singurul studiu publicat în literatura de specialitate până în prezent, care vizează profilul proteomic la HAI și printre singurele care vizează LES.
4. Am efectuat pentru prima dată dozarea vitaminei D și a polimorfismelor nucleotidice unice ale receptorului vitaminei D corelate cu studiul de proteomică la pacienții LES și HAI, ceea ce ar putea reprezenta baza pentru dezvoltarea unor studii în viitor, studii care să permită o mai bună cunoaștere a acestor boli, pentru a facilita rolul proteomicii și a vitaminei D în procesul de luare a deciziilor clinice personalizate și de evaluare a riscului.
5. Am efectuat unul dintre puținele studii legate de calitatea vieții la acești pacienți pediatrici cu jLES și HAI, ceea ce ar putea reprezenta un element de importanță majoră în realizarea unor programe structurate de îngrijire a acestor pacienți și în facilitarea implementării acestora.

Aceste studii au abordat teme de actualitate, în ceea ce privește evaluarea copiilor/aduților tineri cu patologie autoimună în integritatea lor, pentru a oferi tratament și îngrijire adecvată, individualizată, apropiată nevoilor fiecărui pacient.

Studiile cuprinse în această teză pot deschide căile unor cercetări viitoare, în ceea ce privește proteomica pentru diagnostic și monitorizarea evoluției, rolul vitaminei D în evaluarea evoluției și în tratament. Prin lărgirea lotului analizat se va avea în vedere caracterizarea elementelor care influențează calitatea vieții la pacienții cu boli autoimune și stabilirea unor protocoale/programe de monitorizare și îngrijire care să se adreseze diferiților factori de risc pentru evoluții nefavorabile.



---

PhD THESIS (Abstract)

# Systemic autoimmune diseases in children - Prognostic factors and clinical and therapeutic features

---

PhD Student **Claudia-Luminița Sîrbe**

---

PhD Supervisor Prof.dr. **Simona Rednic**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# THESIS CONTENTS

<b>ABBREVIATIONS</b>	13
<b>INTRODUCTION</b>	15
<b>ACKNOWLEDGEMENTS</b>	17
<b>CURRENT STATE OF KNOWLEDGE</b>	
<b>1. Systemic lupus erythematosus with juvenile onset</b>	21
1.1. Introduction	21
1.2. Pathogenesis	22
1.3. Clinical aspects	25
1.4. Laboratory investigations	28
1.5. Classification criteria	29
1.6. Treatment	30
1.7. Prognosis	31
<b>2. Autoimmune hepatitis in children</b>	32
2.1. Introduction	33
2.2. Pathogenesis	34
2.3. Clinical and diagnostic aspects	38
2.4. Laboratory investigations	39
2.5. Histological aspects	39
2.6. Treatment	39
2.6.1. First-line treatment	39
2.6.2. Alternative treatment	40
2.6.3. Treatment of refractory forms	41
2.6.4. Treatment discontinuation	41
2.6.5. Liver transplantation	42
2.7. Prognosis	42
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	43
<b>Working hypothesis/objectives</b>	45
<b>3. Studiu I. Systemic lupus erythematosus - differences between juvenile and adult patients</b>	47
3.1. Introduction	47
3.2. Hypothesis/Objectives	47
3.3. Material and methods	48
3.3.1. Type of study and group characteristics	48
3.3.2. Study work-up	48
3.3.3. Serum biomarker processing	49
3.3.4. Statistical analysis	50
3.4. Results	
3.5. Discussions	57
3.6. Conclusions	60
<b>4. Studiu II. Prognosis of autoimmune hepatitis in children</b>	61
4.1. Introduction	61
4.2. Hypothesis/Objectives	61
4.3. Material and methods	61
4.3.1. Type of study and group characteristics	62
4.3.2. Study work-up	62
4.3.3. Serum biomarker processing	63
4.3.4. Statistical analysis	63
4.4. Results	
4.5. Discussions	70
4.6. Conclusions	76
<b>5. Studiu III. Detection of novel biomarkers in autoimmune hepatitis and systemic lupus erythematosus</b>	79
5.1. Introduction	79
5.2. Hypothesis/Objectives	81

5.3. Material and methods	81
5.3.1. Type of study and group characteristics	81
5.3.2. Study work-up	82
5.3.3. Sample processing and protein detection	83
5.3.4. Identified proteins description	83
5.3.5. Statistical analysis	84
5.4. Results	84
5.4.1. Clinical cohort	84
5.4.2. Targeted proteome profiling	86
5.4.3. Comparison of protein abundance in patients with AIH, aLES and jLES	87
5.4.4. Comparison of proteome profiles between AIH subphenotypes	91
5.4.5. Correlations between AIH and vitamin D	91
5.4.6. Protein interaction network and GO enrichment analysis	93
5.5. Discussions	95
5.6. Conclusions	95
<b>6. Studiu IV. The role of Vitamin D in the development of systemic lupus erythematosus and autoimmune hepatitis</b>	<b>100</b>
6.1. Introduction	101
6.2. Hypothesis/Objectives	103
6.3. Material and methods	103
6.3.1. Type of study and group characteristics	104
6.3.2. Study work-up	105
6.3.3. Sample processing and genotyping	105
6.3.4. Statistical analysis	105
6.4. Results	106
6.5. Discussions	109
6.6. Conclusions	111
<b>7. Studiu V. Prognosis of pediatric patients with systemic lupus erythematosus and autoimmune hepatitis - psychological, emotional and social implications</b>	<b>113</b>
7.1. Introduction	113
7.2. Hypothesis/Objectives	113
7.3. Material and methods	114
7.3.1. Type of study and group characteristics	114
7.3.2. Study work-up	115
7.3.3. HRQoL questionnaires	115
7.3.4. Statistical analysis	116
7.4. Results	116
7.4.1. Epidemiological and clinical aspects	116
7.4.2. Quality of life	118
7.5. Discussions	120
7.6. Conclusions	123
<b>8. General discussions</b>	<b>125</b>
<b>9. General conclusions</b>	<b>133</b>
<b>10. Originality and innovative contributions of the thesis</b>	<b>135</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>137</b>

**Keywords:** systemic lupus erythematosus, autoimmune hepatitis, children, autoimmune diseases, diagnosis, biomarkers, quality of life, prognosis

## INTRODUCTION

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic disease that belongs to the connective tissue diseases, characterized by the presence of antibodies formed against the body's own tissue antigens. Persistent immune-mediated inflammation can include symptoms ranging from mild clinical manifestations to life-threatening conditions. SLE is a systemic disease of unknown cause with cutaneous, joint, cardiovascular, haematological, renal and neurological involvement. The worldwide incidence of jLES (juvenile systemic lupus erythematosus) is reduced, affecting especially women, in all age groups. It is estimated that between 10% and 20% of patients have disease onset before adulthood. There are various similarities and differences between children and adults regarding pathogenetic mechanisms, clinical aspects and diagnostic criteria. These differences can influence the specific treatment and prognosis of the disease. The pathogenetic mechanism is complex, involving genetic, immunological, hormonal and environmental factors. The care provided to children and adolescents with jLES is different from adults due to disease complications regarding physical, psychosocial and emotional growth.

Autoimmune hepatitis (AIH) is a complex liver disease that belongs to the autoimmune liver diseases described in the pediatric population along with autoimmune sclerosing cholangitis (ASC) and de novo AIH after liver transplantation. AIH is characterized by immune-mediated hepatocyte injury resulting in inflammation, liver failure and fibrosis. AIH is a rare disease that can occur at any age and ethnicity. The incidence of pediatric AIH has increased over the last two decades, particularly in children. AIH is a rare chronic disease that has a female preponderance. AIH can range from a broad spectrum of clinical symptoms from non-specific symptoms to severe acute hepatitis followed by acute liver failure. The etiology of AIH is not completely known, but the interaction between genetic variants, epigenetic changes and environmental factors is incriminated. At the basis of AIH pathogenesis is the interaction between specific genetic traits and molecular mimicry for disease development, impaired immunoregulatory mechanisms, an intricate pathway that includes gene to gene and gene to environment interactions with various drugs, and viral infections. The progressive inflammatory process with hepatocyte injury can cause long-term liver dysfunction and liver fibrosis.

## PERSONAL CONTRIBUTION

The studies comprised in this thesis assessed the differences between juvenile (jSLE) and adult (aSLE) systemic lupus erythematosus and the differences between the types of autoimmune hepatitis (AIH), that could contribute to the development of novel age-specific treatments. The main objective was to describe and compare the differences regarding clinical manifestations, including disease severity, activity and treatment. To our knowledge, we conducted one of the few studies published in the literature which targeted the proteomic profile in AIH and SLE. We assessed the role of vitamin D in autoimmune diseases and performed for the first time correlations between single nucleotide polymorphisms of vitamin D receptor with the proteomic profile in SLE and AIH. We assessed the health-related quality of life in pediatric patients with SLE and AIH. These studies comprised an important medical topic that addressed the pediatric patient with autoimmune disorders in order to provide a step further to a more appropriate and individualized treatment.

This thesis comprises five studies that had an analytical, observational design, of which the first two studies were retrospective and cohort studies, and the next three were prospective, cross-sectional and case-control studies.

### **Study I. Systemic lupus erythematosus - differences between juvenile and adult patients**

#### **Introduction and working hypothesis**

Early diagnosis, novel therapeutic strategies and multidisciplinary care can positively influence the survival rate in patients with SLE. In order to improve the assessment of patients with jSLE, we aimed to describe the clinical manifestations and disease evolution, to identify factors that may influence the prognosis and potential risk factors that can increase disease morbidity and mortality. In addition, we assessed the differences between jSLE and aSLE which could provide important information in the development of novel age-specific therapies.

### **Material and methods**

This is a retrospective study that included 69 patients, of which 29 (42.03%) were patients with jSLE and 40 (57.97%) with aSLE. Included patients with jSLE and aSLE presented at least one admission/follow-up between January 2021 and September 2022; patients' data comprised informations from all hospital admissions. The study was conducted based on informations obtained from patients' hospital records from diagnosis to disease follow-up. Demographics, ethnicity, age at disease onset, classification criteria, laboratory results, renal biopsy results, medication and prognosis were included in this analysis.

### **Results and conclusions**

Several differences were detected in the two groups. In regard to the constitutional manifestations, fever was the least common among patients with jSLE, but weight loss and lymphadenopathy were the most common. Serositis with leukopenia were the most frequently encountered in this age group. Major organ damage comprised lupus nephritis and haematological changes, which were more common among jSLE patients. Children with jSLE or young adults with jSLE showed a significantly more active disease during follow-up. Organ damage consisted of: kidney damage with chronic kidney disease that was more common in jSLE versus aSLE; heart and bone complications were more common in aSLE versus jSLE; delayed puberty and short stature were described only in jSLE. From the jSLE patients with renal impairment, three reached end-stage renal disease with haemodialysis, and two of these patients received a living-related kidney transplantation. No aSLE patient required haemodialysis or renal transplantation.

The complexity and severity of jSLE requires a multidisciplinary pediatric care that takes into account the age-specific complications and disease activity, which influences the therapy, growth, psychosocial and educational development.

## **Study II. Prognosis of autoimmune hepatitis in children**

### **Introduction and working hypothesis**

Clinical manifestations, disease progression and risk factors that may influence the prognosis, could contribute to the development of novel treatment strategies for pediatric patients with autoimmune hepatitis (AIH). The main objective of this study was to analyze the clinical symptoms and laboratory investigations, diagnosis, treatment and response to therapy according to the type of AIH. In addition, we described the differences between the types of disease that could provide a step further to a more appropriate and individualized treatment for a better prognosis.

### **Material and methods**

This is a retrospective study that included 30 hospitalized children with AIH from our clinic, between February 2016 and February 2022, with a mean follow-up period of 7.5 months. This study was conducted on data obtained from the patients' hospital records from diagnosis and follow-ups. Demographics, ethnicity, age at disease onset, diagnostic criteria, laboratory results, ultrasound, and informations regarding medication and prognosis were included in this analysis.

### **Results and conclusions**

In this study, we identified various differences between AIH-1 and AIH-2 in our pediatric patients. Children with AIH-2 had more severe disease progression, but also a better response to therapy, with a more rapid decline in liver laboratory investigations and fewer complications than AIH-1. Also, only patients with AIH-1 experienced acute liver failure. AIH is a chronic disease, which involves long-term immunosuppressive treatment, with the possibility of therapy discontinuation in less than a quarter of cases with AIH-1 and only in limited cases with AIH-2. Patients with AIH-1 required higher doses of glucocorticoids and azathioprine. We were able to show that the course of AIH in children who were immediately treated with immunosuppressive therapy is favourable, with good long-term survival rates. Liver enzymes, alkaline phosphatase, gamma-glutamyltransferase and bilirubin levels showed a higher decline rate in AIH-2 than in AIH-1 in the first four months after treatment initiation. The probability of IgG not to decrease after treatment initiation was 2-fold higher in AIH-1 versus AIH-2. Liver cirrhosis can occur in the course of AIH, even with correct treatment, and it is important to assess the risk factors

that can negatively impact the disease outcome. Liver cirrhosis has been described in 4 patients with AIH-1 and only in one case with AIH-2.

Our study highlights the importance of a comprehensive analysis of pediatric AIH-1 and AIH-2 to better understand the differences between these two entities, which can contribute to the choice of treatment for better outcomes.

### **Study III. Detection of novel biomarkers in autoimmune hepatitis and systemic lupus erythematosus**

#### **Introduction and working hypothesis**

The proteomic technology captures the picture of our entire biological system and offers personalized disease approaches using novel biomarkers. Proteomic analysis has not previously been performed in pediatric patients with AIH and there are limited data in SLE. To address this important missing part of research, serum biomarkers were evaluated using two panels of 92 proteins (Inflammatory and Cardio-metabolic panels, OLINK, Uppsala, Sweden) in AIH pediatric patients and control samples from healthy individuals. We also described the differences between the types of AIH, and between AIH and overlap syndrome with sclerosing cholangitis. Vitamin D is mentioned as a possible prognostic biomarker of AIH.

Inflammatory panel was also performed in SLE patients and control samples from healthy individuals. In addition, we described the differences between aSLE and jSLE. Vitamin D is considered a possible biomarker of disease progression.

#### **Material and methods**

We included 39 participants, children diagnosed with AIH (n=20) and children without autoimmune or liver diseases (control group; n=19). We also included 41 adult participants, aSLE (n=19) and control group (n=26); 24 children, jLES (n=19) and control group (n=5). These patients were enrolled between February 2021 and March 2022. A total of 184 proteins were measured in serum using OLINK Cardio-metabolic and Inflammatory panels (92 proteins each panel) in AIH and Inflammatory panel (92 proteins) in aSLE and jSLE. Proteins were measured by proximity extension analysis (PEA).

#### **Results and conclusions**

In this study we described for the first time, the proteomic profile of pediatric AIH and aSLE with nominally significant differences between patients and control group. We demonstrated differences in circulating protein levels that, based on the existing literature, are relevant to the pathogenesis of AIH and SLE.

We described 16 proteins that showed significant differential expression in patients with AIH, namely CA1, CA3, GAS6, FCGR2A, TIMD4, EFEMP1, CSF-1, CX3CL1, CCL23, IL-18R1, IL-10RB, OPG, 4E-BP1, CXCL10 and CCL19. These proteins were differentially expressed among AIH patients and controls, with up-regulated proteins (GAS 6, FCGR2A, CXCL10 and CCL19) and down-regulated proteins (CA1, CA3 and 4E-BP1). These proteomic profiles did not differentiate patients with AIH type 1 from type 2, nor regarding AIH versus AIH-SCA.

Nominally significant differences in protein abundance such as IL-15RA, TRAIL, EN-RAGE, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL19, TNF, PD-L1, and CX3CL1 were identified in aSLE in the Inflammatory panel. Other differences that did not reach statistical significance were: ADA, TRANCE, TNFRSF9, CDCP1, IL-18, IL-12B, IL-18R1. Candidate proteins that were up-regulated were CCL19, CXCL10, EN-RAGE or down-regulated were ADA, IL-15RA.

To better understand the mechanisms involved in SLE, we performed the same Inflammatory panel in jLES patients and control group. differences in protein abundance, such as CXCL6 and CST5, were identified in jLES. Other differences that did not reach statistical significance were: TNF, HGF,FGF-5, CD244, MMP-10, TNFRSF9. Overabundant proteins were differently expressed between the two age groups with SLE. Candidate proteins that were up-regulated were CST5, TNF or down-regulated were CXCL6, CD244.

In the present study, patients with AIH, aSLE and jSLE had vitamin D deficiency compared to the control group. The associations made between differentially expressed proteins in the Olink panels and serum vitamin D levels in these patients revealed no significant correlations in both panels analyzed. Only in aSLE, clear

correlations were observed for uPA, IL-12B, CD5, TNFRSF9 and vitamin D levels. These proteins were inversely correlated with vitamin D levels, with proteins were increased in vitamin D deficiency.

Our data described serological heterogeneity in pediatric AIH and SLE and proposed a variety of underlying mechanisms in these diseases. Identification of novel specific autoantigens in these diseases may influence autoimmune responses and their pathogenic role. Further investigations of autoantibodies in pediatric AIH and SLE may prove their diagnostic value and offer a better understanding of their pathogenesis.

## **Study IV. The role of vitamin D in the development of systemic lupus erythematosus and autoimmune hepatitis**

### **Introduction and working hypothesis**

Vitamin D has pleiotropic effects suggested by VDR expression in lymphocytes and dendritic cells. Numerous studies mentioned the role of vitamin D in autoimmune and inflammatory diseases, intervening in the innate and adaptive immune system. Vitamin D may influence the incidence and severity of AIH and SLE. Therefore, the aim of this study was to assess vitamin D in patients with AIH and SLE. In addition, we aimed to demonstrate whether FokI and A-1012G SNPs may be a risk factor in the development of AIH or SLE.

### **Material and methods**

This study was conducted between January 2021 and September 2022 and included 17 pediatric patients with AIH and 19 subjects in the control group. Also, we included 52 patients with SLE and 54 patients in the control group. VDR rs4516035 (A-1012G) and rs2228570 (FokI) SNPs were detected by qPCR with TaqMan allelic discrimination.

### **Results and conclusions**

Vitamin D deficiency was present in patients with SLE and AIH, with decreased vitamin D levels correlated with disease activity and prognosis. FokI and A-1012G polymorphisms were not associated with the risk of developing SLE and AIH. We did not detect a higher frequency of F/F and F/f genotypes in patients with SLE and AIH. We found an increased frequency of the f allele and the dominant F/F+F/f allele in patients with aSLE. We observed an increased frequency of f/f dominant genotypes in patients with SLE. We also observed an increased frequency of the F allele in AIH patients. The a allele was reported more frequently in AIH patients than in controls.

The role of VDR SNPs is still unclear as there is limited evidence on the action of vitamin D in autoimmune diseases. Further studies investigating vitamin D receptor polymorphisms are needed in order to clarify the role of vitamin D in the development of SLE and AIH.

## **Study V. Prognosis of pediatric patients with systemic lupus erythematosus and autoimmune hepatitis - psychological, emotional and social implications**

### **Introduction and working hypothesis**

Autoimmune diseases have a negative impact on quality of life, including in the early stages of disease. This is an important medical topic that needs to be addressed in order to provide the most comprehensive treatment. The aim of this study was to assess health-related quality of life in pediatric patients with JSLE and AIH. In addition, we aimed to compare these results with those of healthy children and other patients from literature.

### **Material and methods**

This study was conducted between January 2021 and September 2022, and included 40 pediatric patients, of which 20 were patients with JSLE who completed the CHQ-28 questionnaire and 20 with AIH who completed the PedsQL 4.0 questionnaire.

## Results and conclusions

Our results indicated that, on average, patients with jSLE have poorer quality of life and general health (CHQ) compared to healthy controls in the physical and psychosocial domains. The most affected categories for jSLE were global health, social limitations, low self-esteem, general health perception, with social isolation from friends and colleagues, school absenteeism, reduced family activities, and low family cohesion. Parents were affected on the emotional side and on time spent with the child.

The most affected categories for AIH were the emotional and psychosocial categories. Patients with AIH had lower scores than healthy children for all domains assessed. They presented a slightly poorer quality of life than healthy children. Children with AIH showed low self-esteem especially in adolescents with Cushing's syndrome secondary to corticosteroid treatment, and poor perception of health. Parents were slightly affected on the emotional side and related to time spent on child care. The presence of sclerosing cholangitis and cirrhosis had the greatest negative impact on patients' quality of life and health, being most associated with impairment of general health, physical health and family life.

Autoimmune diseases that began in childhood continue into adulthood. These diseases are associated with a high risk of disability and impaired quality of life for patients. Health care assessment focusing on quality of life and patient health is of paramount importance in pediatric patients with JSLE and AIH.

## ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE THESIS

The originality and innovative contribution of the thesis consists of the following aspects:

1. In this study we identified the differences between jSLE and aSLE, respectively between the types of AIH, that could contribute to the development of age-specific treatments from disease onset.

2. We described and compared the differences regarding clinical manifestations, including disease severity, activity and treatment in patients with jSLE and aSLE, respectively between AIH types.

3. To the best of our knowledge, we conducted the only study published in the literature to date that addressed the proteomic profile in AIH and among the few studies that addressed SLE.

4. We performed for the first time correlations between vitamin D receptor single nucleotide polymorphisms and the proteomic profile in SLE and AIH patients. This could be the basis for further studies that could allow a better understanding of these diseases in order to include to proteomics and vitamin D in personalized clinical decisions and risk assessment.

5. We have conducted one of the few studies related to quality of life in these pediatric patients with JSLE and AIH, which could be of major importance in the developing of structured care programs for these patients.

These studies addressed important medical topics by assessing children/young adults with autoimmune pathologies in order to provide appropriate, individualized treatment and care suitable for their needs.

The studies contained in this thesis could open pathways for future research, in terms of proteomics for diagnosis and monitoring disease progression, the role of vitamin D in disease activity and treatment. A larger cohort of patients could better point to the factors that can influence the quality of life in patients with autoimmune diseases and to establish a close monitoring and care protocols/programs that address the various risk factors for poor outcomes.