

БЪЛГАРСКА АСОЦИАЦИЯ ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ
BULGARIAN ASSOCIATION FOR CLINICAL IMMUNOLOGY



Годишник на БАКИ 2016



**Издателство „Лице“
София, 2017**

© Издателство „Лице“, 2017
e-mail: litse@abv.bg
0888 56 54 39

ISSN 1313-47-52

СЪДЪРЖАНИЕ

СТРАНИЦА НА ПРЕДСЕДАТЕЛЯ НА УПРАВИТЕЛНИЯ СЪВЕТ НА СДРУЖЕНИЕ „БЪЛГАРСКА АСОЦИАЦИЯ ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ“	5
ПРИНОСЪТ НА СВЕТОВНИЯ РЕГИСТЪР ЗА ОСИГУРЯВАНЕ НА ТЪКАННО СЪВМЕСТИМИ ДОНОРИ ЗА ТРАНСПЛАНТАЦИЯ НА ХЕМОПОЕТИЧНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ <i>Цв. Луканов, Л. Куин, В. Атанасова, А. Недялкова, Д. Маринова, М. Иванова-Шиварова, А. Михайлова, Е. Наумова</i>	7
ПАТОФИЗИОЛОГИЧНА, ДИАГНОСТИЧНА И ПРОГНОСТИЧНА РОЛЯ НА АВТОАНТИТЕЛАТА ПРИ МИАСТЕНИЯ ГРАВИС <i>Р. Владимирова, Е. Викентиева, Д. Попова</i>	15
ЕВОЛЮЦИЯ НА ДИАГНОЗАТА „АНТИФОСФОЛИПИДЕН СИНДРОМ“ <i>Марта Балева</i>	27
СЪВРЕМЕННИ ВЪЗМОЖНОСТИ НА КЛИНИЧНАТА ИМУНОЛОГИЯ ЗА ДИАГНОСТИКА И МОНИТОРИНГ ПРИ НЯКОИ ИНФЕКЦИОЗНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ <i>К. Плочев, М. Баймакова, Г. Попов, Р. Михайлова-Гарнизова, Е. Наумова</i>	34
СЕКРЕТОРНИ ФАКТОРИ В СРЕДА ОТ КЛЕТЪЧНИ КУЛТУРИ, ИЗОЛИРАНИ ОТ GLIOBLASTOMA MULTIFORME, ОКАЗВАТ ВЛИЯНИЕ ВЪРХУ БРОЯ НА TREGS <i>Калина Туманглова-Юзеир, Екатерина Иванова-Тодорова, Цветелина Великова, Емануил Найденов, Екатерина Красиминова, Севдалин Начев, Доброслав Кюркчиев</i>	45
ФЕНОТИПНИТЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ЧОВЕШКАТА КРЪВ ОТ ПЪПНА ВРЪВ ДЕМОНСТРИРАТ НЕЗРЯЛОСТ НА НЕОНАТАЛНАТА ИМУННА СИСТЕМА <i>Валентина Атанасова, Анжела Антонова, Анастасия Михайлова, Елисавета Наумова</i>	55
МУЛТИЦЕНТРОВО ОТВОРЕНО НАБЛЮДЕНИЕ НА ЧЕСТОТАТА НА ВЪЗНИКВАНЕ И ТЕЖЕСТТА НА ИНФЕКЦИИ НА ГОРНИТЕ ДИХАТЕЛНИ ПЪТИЩА ПРИ ПАЦИЕНТИ, ПРИЕМАЩИ РЕЗИСТА ФОРТЕ <i>Христо Златанов, Надя Георгиева и колектив</i>	66

**РОЛЯ НА ВИРУСОЛОГИЧНИЯ МОНИТОРИНГ НА ВКV РЕПЛИКАЦИЯ
ПРИ БЪБРЕЧНО ТРАНСПЛАНТИРАНИ ПАЦИЕНТИ**

*А. Георгиева, Сн. Михайлова, Я. Кръстева, А. Михайлова,
М. Иванова-Шиварова, Цв. Луканов, В. Атанасова,
Л. Христова, Е. Паскалев, Е. Наумова* 79

ЗАХАРЕН ДИАБЕТ ТИП 1 И ИМУНОЛОГИЧНИ МАРКЕРИ

Е. Викентиева, Д. Попова, Р. Владимирова 86

**EX VIVO РАЗМНОЖЕНИ ЛИМБАЛНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ –
ТЕРАПЕВТИЧНО ПРИЛОЖЕНИЕ**

Р. Христова, Я. Здравков, М. Христова, И. Танев 97

**БИОЛОГИЧНИТЕ СРЕДСТВА В ЛЕЧЕНИЕТО НА РЕВМАТОЛОГИЧНИТЕ
ЗАБОЛЯВАНИЯ**

Р. Рашков, Д. Калинова 106

**ИМУНОБИОЛОГИЯ НА КЛЕТКИТЕ НА SÉZARY – РОЛЯ ЗА
ДИАГНОЗАТА И В-СТАДИРАНЕТО**

*Д. Попова, Р. Владимирова, Е. Викентиева, И. Николов,
Р. Станчев, И. Дамянов, К. Милчева, Н. Петкова, А. Недева,
И. Киндеков, И. Гигов, Ю. Райнов* 128

**ВТОРИЧНА МЕМБРАНОЗНА НЕФРОПАТИЯ
С ОТЛОЖЕНИЯ НА IgA ПРИ ХОЧКИНОВ ЛИМФОМ**

*И. Здравкова, Е. Тилкиян, В. Минкова, Е. Кумчев,
М. Колева-Иванова* 143

**ПЕРСИСТИРАЩА T-LGL ПРОЛИФЕРАЦИЯ ПРИ EBV ИНФЕКЦИЯ:
ЛЕВКЕМИЯ ИЛИ РЕАКТИВНА ЛИМФОЦИТОЗА?**

*Е. Викентиева, Р. Владимирова, Д. Попова, И. Николов,
Р. Станчев, Р. Михайлова, К. Плочев, Ю. Райнов* 149

**ПЪРВИЧНА БИЛИАРНА ЦИРОЗА – ОЦЕНКА НА РАЗЛИЧНИ
ИМУНОЛОГИЧНИ ПОДХОДИ ЗА ДИАГНОСТИКА: КЛИНИЧЕН СЛУЧАЙ**

*Е. Иванова-Тодорова, Цв. Великова, К. Тумангелова-Юзеир, Е. Куртева,
К. Павлов, Р. Митова, Р. Наков, Й. Генов, Б. Владимирова,
Д. Кюркчиев* 159

СТРАНИЦА НА ПРЕДСЕДАТЕЛЯ НА УПРАВИТЕЛНИЯ СЪВЕТ НА СДРУЖЕНИЕ „БЪЛГАРСКА АСОЦИАЦИЯ ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ“

Уважаеми колеги,

Един от учредителите на Българската асоциация по клинична имунология академик д-р Богдан Петрунов навърши 80 години! Управителният съвет на БАКИ на свое заседание взе решение да награди с почетен плакет академик Петрунов за приноса му в развитието на българската имунология и БАКИ. Наградата беше връчена по време на Юбилейната научна конференция, посветена на десетата годишнина от създаването на БАКИ.

През 2016 година в Сдружение „Българска асоциация по клинична имунология“ бяха приети като редовни членове доц. д-р Мария Спасова, д-р Неофит Спасов, д-р Хасан Бурнусузов, д-р Ралица Николова, д-р Екатерина Куртева и Атанаска Георгиева. Д-р Цветелина Младенова придоби специалност по клинична имунология.

Какво свършихме и какво не успяхме да направим през изминалата година?

Международният ден на имунологията 29 април и седмицата на ПИД 22–29 април традиционно се отбелязаха по места с различни прояви, като участия в съствата за масова информация с публикации и интервюта. Проведоха се безплатни медицински прегледи в УМБАЛ „Александровска“ – София, Плевен, Стара Загора и Пловдив, в контекста на подобряване на достъпа до оптимални грижи за всички пациенти с имуномедиирани болести. Във връзка с това на 15 и 16 април в почивната база на МУ – Пловдив, Цигов Чарк съвместно с МУ – Пловдив и Функционален експертен център „Джефри Модел“ – България се проведе първото лятно училище за пациенти с първични имунодефицити. Двудневната програма включваше доклади, практическо обучение, заседание на национална работна група по първични имунни дефицити, среща на Българската асоциация на хора с първични имунни дефицити и интерактивен диалог между лекари и пациенти. Това събитие събра водещи имунолози от цялата страна и пациенти с първичен имунодефицит, за да се запознаят с подробности относно тяхното заболяване, да се осъществи тесен контакт между пациенти и лекари за подобряване качеството на живот. Обсъдени бяха бъдещи стратегии за кампании и дейности, насочени към лекарите и обществото, за подобряване на ранната диагноза, подходящото лечение и проследяване на ПИД с оглед намаляване на заболяемостта и смъртността, свързана с ПИД.

Усилията ни през изминалата година бяха насочени в подготовката и провеждането на Юбилейната научна конференция, посветена на десетата годишнина от създаването на БАКИ. Благодарение на активната работа на организационния комитет беше направена отлична научна програма, обхващаща основните направления в клиничната имунология. Особено интересно и полезно беше разглеждането на даден медицински проблем от страна на имунолога и съответния специалист в морето от имуномедиирани болести. За успеха на

конференцията допринесоха и участието на международно признатите учени в областта на първичните и вторичните имунодефицити проф. д-р Андрю Кант от Великобритания и проф. д-р Владимир Лебедев от Русия, които изнесоха доклади посветени на съвременните терапевтични подходи за поддържане на добра имунна система. Те бяха удостоени с почетния знак на БАКИ. В конференцията имаше около 150 регистрирани участници, работещи в областта на фундаменталната имунология, клинична имунология, ревматология, педиатрия, онкология, микробиология, инфектология, трансплантология и други. Тяхното активно участие като пленарни лектори, докладчици в научните сесии, както и в дискусиите, несъмнено бе предпоставка за успеха на конференцията. Изключително важен резултат от този научен форум е възникването на идеи за съвместни проекти, например в областта на репродуктивната имунология, първичните и вторичните имунни дефицити, имуноонкологията и други. Проведе се конкурс за най-добър постер, като наградените на първите три места са научни колективи от БАН и МУ – София. Накрая бих искала да благодаря на всички участници в конференцията, на организационния комитет, на спонсорите и на фирмата организатор за осигуряването на отлични условия за научна работа и неформални дискусии и контакти по време на конференцията.

Външната оценка на качеството е една от важните дейности на БАКИ. През 2016 г. са проведени всички предвидени схеми за ВОК по имунология. Резултатите се отчетоха и анализираха по време на общото събрание на БАКИ. Дискутира се въпросът за консенсусите при интерпретацията на резултатите, получени от изследване на антинуклеарни антитела и унифициране на референтните стойности за имуноглобулини и С3, С4 фракции на комплемента.

Съществена дейност на БАКИ е учредяване и раздаване на стипендии и награди за подпомагане главно на млади учени и членове на БАКИ, като им предоставя възможности за участия в различни национални и международни научни прояви. С решения на УС на БАКИ през 2016 г. бяха раздадени четири стипендии на млади учени за участие в научни форуми в Германия, Турция и Чехия.

В процес на изграждане е новият сайт на БАКИ, след като вече уточнихме дизайна му.

Бъдещите насоки за работата на БАКИ през 2017 година са отразени в програмата за дейността ѝ. Главеният акцент е свързан с предизвикателствата пред имунологичната наука, наложени от съвременния начин на живот и свързаните с него рискове за имунитета и здравето на хората. Обсъждат се възможностите за организация на профилактични мерки и ранна диагноза на нарушенията на имунната система при деца и възрастни на национално ниво.

Уважаеми колеги, скъпи приятели, позволете ми да Ви поздравя с предстоящите коледни и новогодишни празници и да Ви пожелаая здраве, щастие и успехи в личен и професионален план.

*ПРОФ. Д-Р ЕЛИСАВЕТА НАУМОВА, Д.М.Н.
ПРЕДСЕДАТЕЛ НА УС НА БАКИ*

ПРИНОСЪТ НА СВЕТОВНИЯ РЕГИСТЪР ЗА ОСИГУРЯВАНЕ НА ТЪКАННО СЪВМЕСТИМИ ДОНОРИ ЗА ТРАНСПЛАНТАЦИЯ НА ХЕМОПОЕТИЧНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ

*Цв. Луканов, Л. Куин, В. Атанасова, А. Недялкова,
Д. Маринова, М. Иванова-Шиварова, А. Михайлова, Е. Наумова*

С напредъка в разбирането на биологията на трансплантацията на хемопоетични стволови клетки (ТХСК) и разработването на нови по-щадящи протоколи за кондициониране нараства броят на заболяванията, които могат да се лекуват, обхващайки по този начин все повече хора. Годишно в световен мащаб се извършват над 60 000 трансплантации на хемопоетични стволови клетки [1].

Освен постоянното разширяване на списъка на индикациите за трансплантация се наблюдава и изместване на периода за трансплантация към по-ранните стадии на заболяванията. Ретроспективният анализ на американската национална програма за донори на костен мозък (National Marrow Donor Program, NMDP), включващ близо 4000 трансплантации от неродствени донори, показва, че трансплантациите в ранните стадии на болестта се свързват с 38% по-нисък риск от смъртност, в сравнение с тези в средните етапи. Когато трансплантацията се извърши в късен стадий на болестта, рискът от смъртност е двойно по-висок [2]. Други изследвания също установяват подобни резултати, като по-късите интервали между диагнозата и трансплантацията се свързват със свободна от болест преживяемост [3, 4]. Освен по-добър изход, ранната трансплантация се свързва и с по-ниска вероятност от усложнения, като рефракторна болест, инфекции и токсичност на органите.

Нормалните генетични вариации в човешкия геном могат да генерират потенциално имуногенни трансплантационни антигени, които да доведат до реакция на присадката срещу гостоприемника (graft-versus-host disease, GvHD), ефект на присадката срещу левкемията (graft-versus-leukemia, GVL) или отхвърляне на присадката. Най-значима роля имат гените на HLA (човешки левкоцитен антиген – Human Leukocyte Antigen) системата, кодирани от главния комплекс на тъканна съвместимост (Major Histocompatibility Complex, MHC). Молекулярно-генетичните методи осигуриха безпрецедентен поглед върху разнообразието на HLA региона. Приложението им при подбора на донори на хемопоетични стволови клетки значително подобри преживяемостта на пациентите и хвърли светлина върху процесите, свързани с изхода от трансплантацията.

Развитието на технологиите за типизиране, както и непрекъснато увеличаващият се брой на донори в Световния регистър (Bone Marrow Donors Worldwide, BMDW) без съмнение подпомогнаха откриването на „достатъчно“ съвместими донори. Въпреки това за много пациенти не може да се открие напълно съвмес-

тим донор поради огромното разнообразие на HLA алели и хаплотипи. Към м. октомври 2016 г. само в „класическите“ HLA локуси, имащи най-голяма роля в ТХСК, са открити над 15 000 алела и над 10 000 протеина (таблица 1) [5]. Поради това за много пациенти предизвикателство към лабораториите по тъканна съвместимост е откриването на донор или единица кръв от пъпна връв (КПВ) с най-голям потенциал за успешно лечение.

Таблица 1. Брой открити HLA алели (IMGT/HLA Database v. 3.26, октомври 2016)

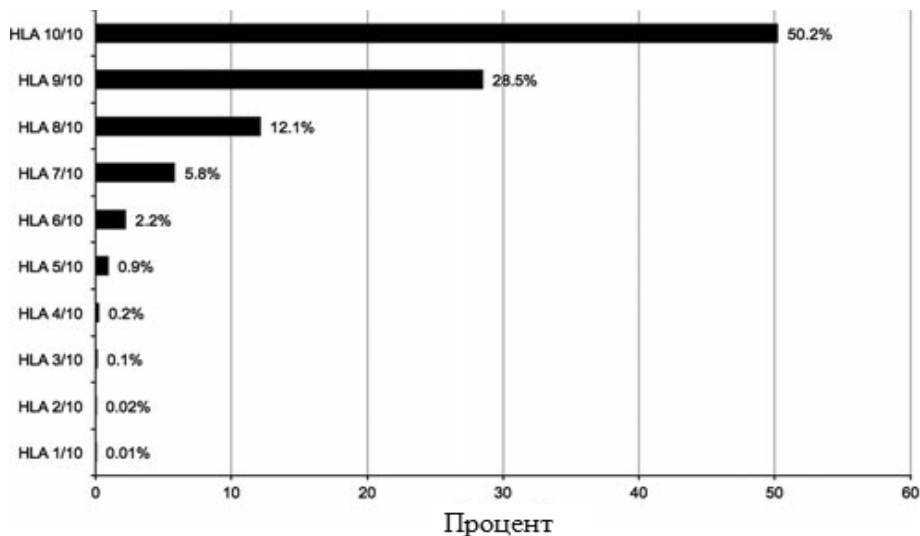
Ген		HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DR	HLA-DQ	HLA-DP
Алели	(>15 000)	3657	4459	3290	2215	1054	766
Протеини	(>10 000)	2480	3221	2196	1629	712	611
Нулеви алели		166	138	119	61	28	19

Смята се, че най-добрият донор е сиблинг на пациента, който е идентичен по HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 и -DPB1 локусите (12/12 съвместимост). За тези пациенти, при които не се намира съвместим донор в семейството, възможност за животоспасяваща трансплантация дава намирането на съвместим неродствен донор. За останалите реципиенти единствената опция е намирането на алтернативен донор – хаплоидентичен фамилен (5–9/10 алелни съвместимости), частично несъвместима/и единица/и кръв от пъпна връв (3–6/6 по HLA-A, -B, -DRB1) или несъвместим неродствен донор (7–9/10) [6–9]. В такива случаи се препоръчва трансплантация с т.нар. „позволени“ несъвместимости, въпреки че дефиницията на този термин е въпрос на постоянен дебат. По данни на Международната работна група за тъканна съвместимост (International Histocompatibility Working Group, IHWG) на база на 25 855 ТХСК процентът на 10/10 трансплантациите е 50,2 от общия дял, следвани от 9/10 (28,5%) и 8/10 (12,1%; фигура 1) [10].

В Световния регистър за донори членуват 54 държави с 76 регистъра за доброволни донори и 53 банки за КПВ. Общият брой на доброволните донори е почти 29 млн., а на единиците КПВ – малко над 710 000 [11]. През 2009 г. със заповед на Министъра на здравеопазването в Александровска болница се създава Националната публична донорна банка за стволови клетки и костен мозък (НПДБ), към която са включени Българският регистър за донори на стволови клетки от периферна кръв и костен мозък (ВВМДР) и Националната публична донорна банка за стволови клетки от КПВ. Българският регистър е създаден през 2002 г., а от 2005 г. е пълноправен член на Световния регистър. В резултат на създадената Национална стратегия за организация и координация на дейностите

по промоция, вземане, експертиза, обработка и предоставяне, разработена в рамките на Национална програма за развитие на трансплантацията на стволови клетки в Република България 2007–2013 г., активната работа с пациентски организации, провеждането на кампании за набиране на донори и създаването на донорски мрежи на територията на цялата страна, броят на доброволните донори и съхранените единици КПВ непрекъснато се увеличава [12–15].

Фигура 2. Процентно съотношение на трансплантациите според нивото на HLA съвместимост



Към м. ноември 2016 г. регистрираните доброволни донори в Българския регистър са 2445, като 1006 са подадени в BMDW.

Над 600 бременни жени са изявиали желание да станат донори на кръв от пъпна връв. Броят на взетите единици КПВ представлява 78% от броя на бременните, подписали информирано съгласие. Обработените и криоконсервирани единици са 304, което е 81% от всички колекции. Съобразно критериите за допустимост, утвърдени в НПДБ, окончателно определени като годни за дългосрочно съхранение в течен азот и подходящи за аlogenна трансплантация са 58% от общия брой взети единици КПВ, като до м. ноември 2016 г. 165 от тях са регистрирани в BMDW.

Вероятността за откриване на HLA идентичен родствен донор зависи основно от броя на сиблингите – от 25% при пациенти с един до 90% при тези с 8 братя и сестри. От друга страна, вероятността за намиране на съвместим неродствен донор до голяма степен зависи от честотата на HLA хаплотипите на пациента и неговия етнос. Межу 1 и 5% нямат потенциално съвместим донор при първоначалното търсене в базата данни на BMDW, тъй като мнозинството от доброволните донори са от западноевропейски произход [16, 17]. Неравно-

мерното представяне на различните популации в BMDW прави етническата принадлежност на реципиента един от основните фактори, които влияят върху ефикасността на търсенето. Най-ниска е вероятността за намиране на съвместим донор за пациентите с африкански произход, докато за тези от кавказката раса вероятността за намиране на 10/10 съвместим донор е 45–65%. Тази вероятност нараства с още 20–30%, ако се приеме 9/10 донор [16–18]. Други фактори, ограничаващи шанса за намиране на съвместим неродствен донор, са HLA локусите с ниска експресия, не-класическите HLA локуси, както и различни гени извън HLA системата.

Основно ролята на HLA несъответствията зависи от броя на различията, вида им (алелни или антигенни) и локуса. Изходът от трансплантацията се повлиява и от броя и местоположението на аминокиселинните замени – дали засягат, или не антиген-разпознаващото място. При наличие само на несъвместими донори, познаването на локус-специфичния риск на отделните несъответствия би подпомогнало селекцията. Въпреки че са описани като рискови фактори за изхода от ТХСК, ефектът на тези несъответствия в HLA системата може да се контролира. Освен това наличието им благоприятства GVL ефекта, въпреки че поддържането на баланс между него и GvHD е много трудно [19].

Единичните несъвместимости по локусите с висока експресия (high expression loci, HEL) – HLA-A, -B, -C, -DRB1, имат най-голямо клинично значение. Ролята на локусите с ниска експресия (low expression loci, LEL) – HLA-DQB1, -DPB1, -DRB3, -DRB4 -DRB5, е по-скоро второстепенна и то само в комбинация с несъвместимост по някои от локусите с висока експресия [20–25]. Проучването на риска, свързан с антигенни (между две серологично различни HLA детерминанти) или алелни (между две секвенции на един HLA антиген) несъответствия в отделните локуси, показва малко по-голяма имуногенност при първите [2, 8]. Изключение е HLA-C локуса, където несъответствията на антигенно ниво се свързват със значително по-лош изход, отколкото тези на алелно [2, 15]. Тези резултати могат да се обяснят с ниската имуногенност на някои HLA-C алелни несъвместимости (напр. C*03:03/03:04), както и с наличието на KIR-свързващи HLA-C епитопи, които са по-често срещани при антигенните, отколкото при алелните несъответствия [24]. Подобни алелни несъответствия с ниска имуногенност са описани и в други локуси – DRB1*11:01/11:04, DRB1*14:01/14:54, DQB1*03:01/03:02 [23].

Нашият опит също показва, че наличието на поне една HLA несъвместимост силно понижава общата и свободната от болест преживяемост. Медианата за настъпване на събитие – летален изход, е по-малко от 3 месеца при 9/10, сравнено с 6 и 5 месеца при 10/10. Двугодишната обща и свободна от болест преживяемост при 10/10 е 47–54%, сравнено с около 27% при наличие на HLA несъвместимост [26].

Едно изследване на NMDP, обхващащо близо 4000 трансплантирани със злокачествени хематологични заболявания, показва разликите в преживяемостта на пациентите в зависимост от наличието на HLA несъвместимост и експе-

сията на локусите. Наличието на HLA несъвместимост в някой от локусите с ниска експресия – DQ, DRB3/4/5, DP, оказва влияние върху преживяемостта само при наличие на несъвместимост и в някой от локусите с висока експресия. Наблюдаваният ефект е кумулативен [25].

Нарастват сведенията за „хаплотипен ефект“, който включва и не-HLA полиморфизми в MHC региона и влияе върху успеха на ТХСК [27–29]. Смята се, че преживяемостта на пациенти, трансплантирани от 10/10 съвместим неродствен донор от националния регистър, е по-висока от тази на пациенти, трансплантирани от съвместим неродствен донор от международния регистър [20, 30].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вероятността за намиране на подходящ донор се базира главно на честотата на HLA хаплотипа на реципиента, която е функция на етническата принадлежност. При липсата на HLA идентичен сиблинг, познаването на ролята на HLA системата и свързаните с нея гени, по-доброто характеризирание на разпределението на хаплотипите в националния и международния регистри, разширяване и повишаване на качеството на информацията в BMDW, би подпомогнало трансплантационните центрове в процеса на търсене на подходящ донор – неродствен, единица КПВ, хаплоидентичен родствен донор. Ясно е, че спешността на трансплантацията и опитът на трансплантационния център ще повлияят алгоритма на търсене, но можем да направим някои практически препоръки на база на тъканната съвместимост:

- HLA хомозиготност на пациента по различаващия се локус, HLA несъвместимост в HvG посока, наличие на донор специфични анти-HLA антитела в реципиента преди трансплантация и кръвнотиповата несъвместимост са сред най-важните фактори, които повишават риска от отхвърляне на присадката;
- Кумулативният ефект на несъвместимост по LEL локусите (≥ 3) към несъвместимост по някои от HEL локусите, както и по-високата имуногенност при донорите от международния регистър, водят до по-висока смъртност, свързана с трансплантацията и по-висок риск от развитие на GVHD.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Gratwohl A., Baldomero H., Gratwohl M., Aljurf M.D., Bouzas L.F., Horowitz M., et al. *Quantitative and qualitative differences in use and trends of hematopoietic stem cell transplantation: a Global Observational Study*. Haematologica, 2013. 98(8): p.1282–1290.
2. Lee SJ, Klein J, Haagenson M, et al. *High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation*. Blood, 2007. 13: p. 4576–4583.
3. Cornelissen JJ, Carston M, Kollman C, et al. *Unrelated marrow transplantation for adult*

- patients with poor-risk acute lymphoblastic leukemia: strong graft-versus-leukemia effect and risk factors determining outcome.* Blood, 2001. 97(6): p.1572–1577.
4. McGlave PB, Shu XO, Wen W, et al. *Unrelated donor marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia: 9 years' experience of the National Marrow Donor Program.* Blood, 2000. 95(7): p. 2219–2225.
 5. EMBL-EBI. *IPD – IMGT/HLA.* 2016 [cited 14 ноември 2016]; Available from: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>.
 6. Petersdorf EW Anasetti C, Martin PJ, et al. *Limits of HLA mismatching in unrelated hematopoietic cell transplantation.* Blood, 2004. 104: p.2976–2980.
 7. Morishima Y, Sasazuki T, Inoko H, et al. *The clinical significance of human leukocyte antigen (HLA) allele compatibility in patients receiving a marrow transplant from serologically HLA-A, HLA-B, and HLA-DR matched unrelated donors.* Blood, 2002. 99: p.4200–4206.
 8. Flomenberg N, Baxter-Lowe LA, Confer D, et al. *Impact of HLA class I and class II high resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplant outcome.* Blood, 2004. 104: p.1923–1930.
 9. Sasazuki T, Juji T, Morishima Y, *Effect of matching of class I HLA alleles on clinical outcome after transplantation of hematopoietic stem cells from an unrelated donor.* N. Engl. J. Med, 1998. 339: p.1177–1185.
 10. Petersdorf EW Malkki M, Hsu K, et al. *16th IHIW: International Histocompatibility Working Group in Hematopoietic Cell Transplantation.* Int J Immunogenetics, 2013. 40: p. 2–10.
 11. BMDW. *Bone Marrow Donors Worldwide.* 2016 [cited 14 ноември 2016]; Available from: <http://www.bmdw.org/>.
 12. Zlatev A, Ivanova M, Michailova S, et al. *Bulgarian Bone Marrow Donors Registry – past and future directions.* Cell Tissue Banking, 2008. 9: p. 347–351.
 13. Zlatev A, Mihaylova A, Baltadjieva D, et al. *Cord Blood Stem Cell Transplantation. Why it is Necessary to Establish a Bulgarian Cord Blood Bank?* Cell Tissue Banking, 2008. 9: p. 343–346.
 14. Наумова Е, Атанасова В, Михайлова А. *Национална публична донорна банка за стволови клетки от пълна връв.* Годишник на Българската асоциация по клинична имунология, 2011: p. 63–66.
 15. Наумова Е, Куин Л, Иванова М, et al. *Национална програма за развитие на трансплантацията на стволови клетки в Р България – резултати и перспективи.* Годишник на Българската асоциация по клинична имунология, 2013: p. 15–22.
 16. Tiercy JM. *Unrelated Hematopoietic Stem Cell Donor Matching Probability and Search Algorithm.* Bone Marrow Research, 2012. 2012: p.8.
 17. Hirv K, Bloch K, Fischer M. *Prediction of duration and success rate of unrelated hematopoietic stem cell donor searches based on the patient's HLA-DRB1 allele and DRB1-DQB1 haplotype frequencies.* Bone Marrow Transplant, 2009. 7: p. 433–440.
 18. Gragert L, Eapen M, Williams E, et al. *HLA matched likelihoods for hematopoietic stem cell grafts in the U.S. registry.* N Engl J Med, 2014. 371(4): p. 339–348.
 19. Godder KT, Henslee-Downey PJ, Mehta J, Park B, Chiang K-Y, Abhyankar S, et al. *Long term disease-free survival in acute leukemia patients recovering with increased gd T cells after partially mismatched related donor bone marrow transplantation.* Bone Marrow Transplant, 2007. 39: p. 751–757.

20. Furst D, Muller C, Vucinic V, et al. *High-resolution HLA matching in hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective collaborative analysis*. Blood, 2013. 122(18): p. 3220–3229.
21. Verneris MR, Lee SJ, Ahn KW, et al. *HLA Mismatch Is Associated with Worse Outcomes after Unrelated Donor Reduced-Intensity Conditioning Hematopoietic Cell Transplantation: An Analysis from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research*. Biol Blood Marrow Transplant, 2015. 21(10): p. 1783–1789.
22. Morishima Y, Kawase T, Matsuo K, et al. *Biological significance of HLA locus matching in unrelated donor bone marrow transplantation*. Blood, 2015. 125(7): p. 1189–1197.
23. Passweg JR, Schanz U, Chalandon Y, et al., *High-resolution HLA matching in unrelated donor transplantation in Switzerland: differential impact of class I and class II mismatches may reflect selection of nonimmunogenic or weakly immunogenic DRB1/DQB1 disparities*. Bone Marrow Transplant, 2015. 50(9): p. 1201–1205.
24. Fernandez-Vina MA Wang T, Lee SJ, et al. *Identification of a permissible HLA mismatch in hematopoietic stem cell transplantation*. Blood, 2014. 123(8): p. 1270–1278.
25. Fernandez-Vina MA, Klein JP, Haagenson M, et al. *Multiple mismatches at the low expression HLA loci DP, DQ, and DRB3/4/5 associate with adverse outcomes in hematopoietic stem cell transplantation*. Blood, 2013. 121(22): p. 4603–4610.
26. Луканов Цв. *Проучване на имуногенетични маркери – роля при трансплантации*. 2015, МУ – София: София. p. 148.
27. Florence Bettens Jakob Passweg, Urs Schanz, Yves Chalandon, Dominik Heim, Tayfun Gungör, Georg Stussi, Grazia Nicoloso, Helen Baldomero, Alois Gratwohl, Jean-Marie Tiercy: *Impact of HLA-DPB1 Haplotypes on Outcome of 10/10 Matched Unrelated Hematopoietic Stem Cell Donor Transplants Depends on MHC-Linked Microsatellite Polymorphisms*. Biol Blood Marrow Transplant, 2012. 18(4): p. 608–616.
28. Petersdorf EW Malkki M, Horowitz MM, et al. *Mapping MHC haplotype effects in unrelated donor hematopoietic cell transplantation*. Blood, 2013. 121(10): p. 1896–1905.
29. Joris MM, Lancaster AC, von dem Borne PA, et al., *The impact of frequent HLA haplotypes in high linkage disequilibrium on donor search and clinical outcome after unrelated haematopoietic SCT*. Bone Marrow Transplant, 2013. 48(4): p. 483–490.
30. Tiercy JM. *How to select the best available related or unrelated donor of hematopoietic stem cells?* Haematologica, 2016. 101(6): p. 680–687.

**ПРИНОСЪТ НА СВЕТОВНИЯ РЕГИСТЪР ЗА ОСИГУРЯВАНЕ
НА ТЪКАННО СЪВМЕСТИМИ ДОНОРИ ЗА ТРАНСПЛАНТАЦИЯ
НА ХЕМОПОЕТИЧНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ**

Цв. Луканов, Л. Куин, В. Атанасова, А. Недялкова,
Д. Маринова, М. Иванова-Шиварова, А. Михайлова, Е. Наумова

Един от главните фактори, които допринасят за подобряване на преживяемостта след алогенна трансплантация на хематопоетични стволови клетки е прогресът, който се направи в областта на тъканната съвместимост. Напредъкът в молекулярно-биологичните техники за тъканно типизиране позволи да се прецизира съвместимостта

между донора и реципиента. От друга страна, непрекъснато нарастващият брой доброволни донори в Световния регистър и все по-широко застъпеното използване на алтернативни източници – хаплоидентични донори и единици кръв от пъпна връв, подобри търсенето на подходящ донор.

Ключови думи: трансплантация на хематопоетични стволови клетки, HLA съвместимост, Световен регистър за донори на костен мозък, Български регистър за донори на стволови клетки от периферна кръв и костен мозък.

Адрес за кореспонденция:

Цветелин Луканов

Клиника по клинична имунология с банка за стволови клетки,

УМБАЛ „Александровска“

Ул. „Г. Софийски“ 1,

1431 София,

Тел: 02/9230690

CONTRIBUTION OF THE BONE MARROW DONORS WORLDWIDE FOR PROVISION OF COMPATIBLE DONORS FOR HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION

Ts. Lukanov, L. Quin, V. Atanasova, A. Nedyalkova

D. Marinova, M. Ivanova-Shivarova, A. Mihaylova, E. Naumova

One of the main factors contributing to a better survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is the progress made in the field of histocompatibility. The development of HLA molecular typing technologies allowed to precise the compatibility between donor and recipient. Additionally, the growing number of donors in the international database as well as the increasingly used alternative sources of stem cells – haploidentical donors and cord blood units, has greatly facilitated donor searches.

Keywords: Hematopoietic stem cell transplantation, HLA compatibility, Bone Marrow Donors Worldwide, Bulgarian Bone Marrow Donors Registry.

Contact address:

Ts. Lukanov

Department of Clinical Immunology with cord blood banking

University Hospital Alexandrovska

1 G. Sofiiski str.

1431 Sofia

Tel 02/9230690

ПАТОФИЗИОЛОГИЧНА, ДИАГНОСТИЧНА И ПРОГНОСТИЧНА РОЛЯ НА АВТОАНТИТЕЛАТА ПРИ МИАСТЕНИЯ ГРАВИС

Р. Владимирова, Е. Викентиева, Д. Попова

Военномедицинска академия, София

ВЪВЕДЕНИЕ

Миастения гравис (МГ) е относително рядко органоспецифично автоимунно заболяване следствие от циркулиращи автоантитела, насочени срещу протеини и рецептори на нервномускулната връзка (НМВ) и на скелетната мускулатура. Автоантителата, свързвайки се с компонентите на НМВ, нарушават нормалната ѝ функция и увреждат нервномускулната проводимост, като резултатът е мускулна слабост [1].

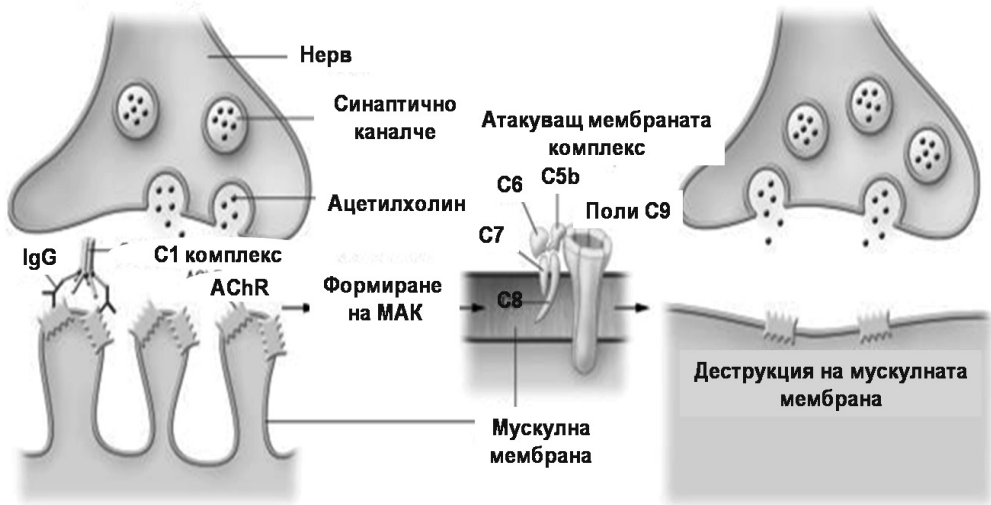
Диагнозата МГ се предполага при наличие на мускулна слабост без загуба на рефлексии, нарушение на чувствителността или други неврологични функции и се прецизира чрез клинични тестове, като антихолинестеразен тест и електродиагностично тестване. При 80% от пациентите установените циркулиращи автоантитела срещу ацетилхолиновия рецептор (acetylcholine receptor – AChR) са патогенни ефекторни молекули и представляват специфичен и чувствителен диагностичен тест [1]. Следващи по значимост за диагнозата са автоантителата срещу мускул-специфичната тирозин киназа (muscle-specific tyrosine kinase – MuSK), ензим с основна роля за формирането на AChR кълстери и нормално функциониране на НМВ [2, 3]. При пациентите с МГ са намерени и голяма група автоантитела, насочени срещу протеините на скелетния мускул, но към момента тяхната патогенетична роля остава неизяснена [4]. Установени са различни по сила връзки между концентрацията на анти-AChR, анти-MuSK и редица други позитивни при МГ автоантитела с тежестта на заболяването и терапевтичния отговор.

ПАТОФИЗИОЛОГИЯ

Анти-AChR антитела увреждат нервномускулната проводимост по няколко механизма:

Активация на комплемента:

Предполага се, че активацията на комплемента в НМВ е първичната причина за увредата на AChR и нарушение на нервномускулната проводимост. При пациентите с МГ е установено наличие на активационния фрагмент на комплемента C3, литичния C9 и мембранно атакуващ комплекс (МАК) при НМВ (Фигура 1). Доказано е, че при дефицит на регулатори на комплементната каскада анти-AChR антитела причиняват мускулна слабост в по-висока степен.



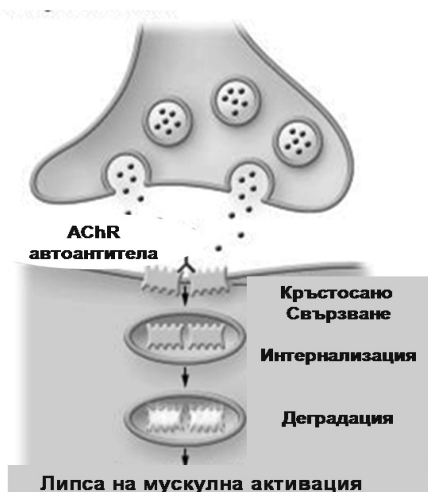
Фигура 1. Свързването на автоантителата към AChR активира каскадата на комплемента, формира МАК, като крайният резултат е локализирана деструкция на постсинаптичната мембрана на НМВ [7].

Антигенна модулация (усилване деградацията на AChR при свързване с автоантитела):

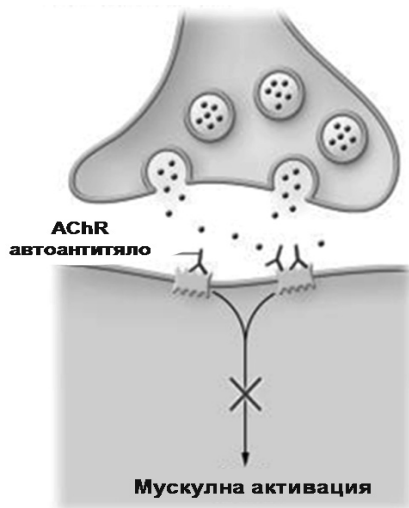
При пациентите с МГ *in vivo* и *in vitro* е доказано, че IgG може да причини антигенна модулация на AChR чрез кръстосано свързване на два AChR, следва активация на вътреклетъчни сигнали, усилващи ендоцитозата и деградацията. Ако процесът не се компенсира с повишен синтез на рецептора, количеството на AChR молекули намалява значително, което води до миастенични симптоми. Въпреки, че IgG молекулата има две залавни места, не всички автоантитела причиняват антигенна модулация поради разнообразието в епитопните локации на таргета, възпрепятстващи връзката с втора молекула (Фигура 2).

Функционална блокада на AChR:

Функционалната блокада на рецептора вследствие на връзката между антигена и антитялото е рядко срещан механизъм, причиняващ остра миастенична криза. Някои от пациентите с МГ имат ниски нива на анти-AChR антитела, разпознаващи залавните места за ацетилхолин, като следствието е рецепторна блокада, независимо от ниската концентрация, а резултатът – остра миастенична криза [5, 6] (Фигура 3).



Фигура 2. Кръстосано свързване на AChR молекули на постсинаптичната мембрана води до ендоцитоза и деградация [7]



Фигура 3. Свързването на автоантитела към ACh-свързващите места на рецептора води до функционален блок и нарушение в проводимостта [7]

T-клетки:

Анти-AChR антитела са високо афинитетни имуноглобулинови молекули и синтезът им зависи от активирани CD4⁺ T-клетки. Диференцираните CD4⁺ T-клетки се класифицират в подтипове на база цитокинова секреция. Th1 и Th2 са с различни функции: Th1-клетките секретират провъзпалителни цитокини (IL-2, IFN- γ и TNF- α) със значение за клетъчно медирания имунен отговор и

индукцията на субкласове IgG активиращи комплемента, а Th2 клетките – противовъзпалителни цитокини (IL-4, IL-6 и IL-10), индуктори на хуморалния имуноен отговор и субкласове IgG, които не свързват комплемента. Освен това IL-4 стимулира диференциацията на Th3 клетки, секретирани TGF- β и участващи в механизмите на имunosупресия. Миастения гравис е придобито автоимунно заболяване с известна генетична предиспозиция, като хиперпластичният тимус вероятно играе важна роля в автоимунния процес [7].

Тимус:

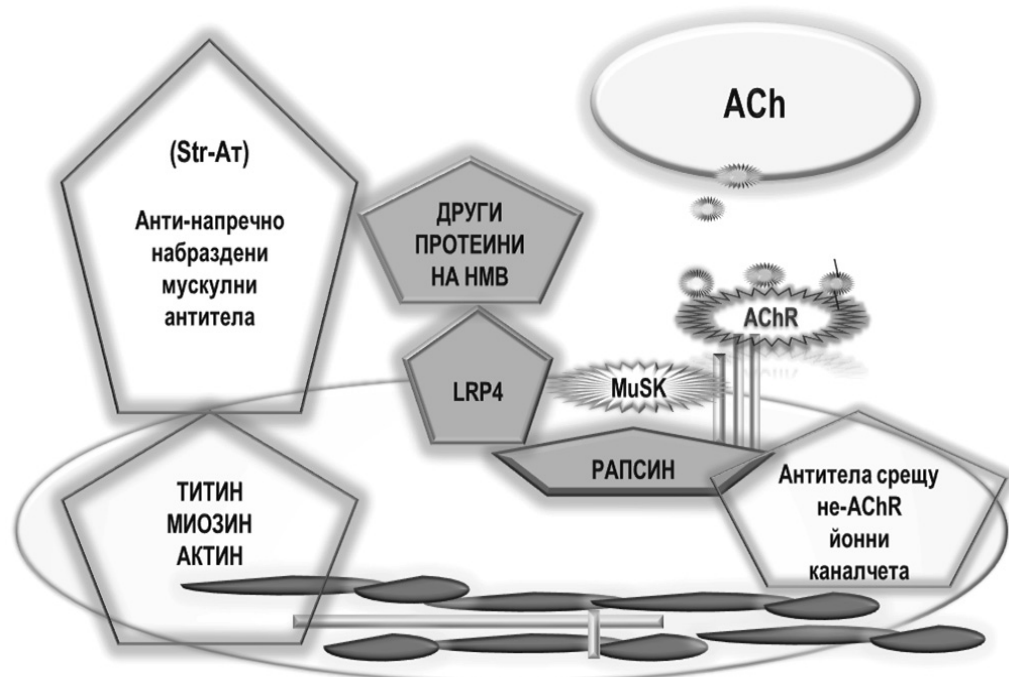
Ролята на тимусната жлеза е с голямо значение в патогенезата на МГ положителна за анти-AChR антитела (50% от всички пациенти са с тимусна хиперплазия и 10–15% с тимом) [8]. Хиперпластичният тимус при пациенти с МГ съдържа всички функционални компоненти, необходими за развитие на автоимунен отговор срещу AChR (Т- и В-лимфоцити, плазматични клетки, мускулоподобни клетки, експресиращи AChR) [9], което е в подкрепа на хипотезата за тимусната среда като фактор за отключването на автоимунна реакция срещу AChR при пациенти с тимусна хиперплазия (100% позитивност за анти-AChR антитела, като епитопите на тези антитела се различават от тези при пациенти без тимом) [10, 11]. Специфични CD4+ Т-клетки за AChR се намират в тимуса и периферната кръв на серопозитивни пациенти за тези автоантитела [12], което доказва ролята на тимуса в механизма на автосенсibiliзация при МГ [13]. Тимусната жлеза е първичен лимфоиден орган на имунната система и дисфункцията ѝ води до дефект в имунната регулация и развитие на автоимунен отговор.

АВТОАНТИТЕЛА ПРИ МИАСТЕНИЯ ГРАВИС

Понастоящем най-добре са характеризирани анти-AChR и анти-MuSK автоантителата по отношение на патогенетична роля, специфичност, принос към диагнозата и мониторинг на прогресия и терапия. Пациентите с МГ позитивират и редица други автоантитела срещу антигени на напречно набраздените мускули, протеини на нервномускулната връзка и йонни каналчета, което предполага, че изговянето на профил на позитивните автоантитела за всеки пациент ще позволи оформянето на подгрупи пациенти с различен клиничен ход и отговор към терапия (Фигура 4).

Анти-AChR антитела

Експериментално е доказано, че анти-AChR антитела са патогенни, те са основната причина за мускулна слабост при миастения гравис, крайната загуба на AChR върху постсинаптичните мембрани и нарушението на нервномускулната проводимост [5]. Извеждането на циркулиращите автоантитела чрез дренаж или плазмен обмен повлиява благоприятно симптомите [14, 15]. Анти-AChR антитела принадлежат към субкласове IgG1 и IgG3, като основният им таргет е важен имуногенен регион върху повърхностно клетъчния участък на AChR- α веригата [16].



Фигура 4. Видове автоантитела при миастения гравис

Анти-АChR антитела според ефекта, оказван върху рецептора, се разделят на три типа [17]:

Свързващи анти-АChR антитела: Установяват се при 80–85% от пациентите с генерализирана МГ и при 50–75% от пациентите с очна форма на заболяването [18, 19]. Повишените концентрации на свързващите анти-АChR антитела при пациенти със симптоматика за това заболяване категорично потвърждават диагнозата. Пациентите с тимом и тези, при които заболяването стартира преди 40-годишна възраст и е съпроводено с генерализирана мускулна слабост, са с най-високите концентрации на автоантитела в сравнение с останалите субгрупи пациенти с МГ. Тези антитела се отчитат в по-ниски нива при пациенти със спокоен ход на заболяването или ограничена мускулна слабост [20, 21]. Свързващите анти-АChR антитела са специфичен маркер за МГ, но са установявани и при пациенти със системен лупус, ревматоиден артрит, аутоимунни чернодробни заболявания, тимом без МГ и терапия с пеницилин [22].

Блокиращи анти-АChR антитела: Те са малка част от анти-АChR антитела, като обикновено са придружаващи на свързващите автоантитела, което лимитира диагностичната им употреба. Патологичното им значение е в обострянето на болестта [17].

Модулиращи анти-АChR антитела: Определянето *in vitro* на усиленa интернализация на рецептора е с диагностично значение в случаите, когато

пациентите не позитивират свързващи анти-AChR антитела [21]. При пациенти с тимом са установени значимо повишени нива на тези автоантитела [23].

Към момента не е намерена връзка между серумната концентрация на анти-AChR антитела и тежестта на заболяването, но пациентите само с очна форма на МГ са с по-ниски нива на автоантитела от тези с генерализирана МГ. Установено е, че при отделни пациенти проследяването на нивата корелира с динамиката на заболяването, но като цяло значението им за прогнозата и мониторинга на терапията е неясно [19–21].

Анти-MuSK антитела

Мускул-специфичната тирозин киназа (MuSK) е протеин от НМВ, който се експресира на постсинаптичната мембрана заедно с AChR, основната му функция е формиране на клъстери от ацетилхолинови рецептори [49], като инхибирането на ензима води до дисперсия и деградация на AChR [24]. Установено е, че 50% от пациентите с генерализирана МГ, отрицателни за анти-AChR антитела позитивират анти-MuSK антитела (МГ-MuSK) [2, 3], които са предимно от субклас IgG4 и не активират комплемента. Наличието на анти-MuSK антитела потвърждава диагнозата МГ-MuSK (фалшиво положителни резултати не са установени), освен това тези автоантитела изключително рядко се намират при анти-AChR+ МГ. Пациентите с МГ-MuSK са предимно жени, често с атипични клинични симптоми, като селективна лицева, вратна и респираторна мускулна слабост и значителна мускулна атрофия [25]. Мускулната слабост може да бъде с нетипична локализация [26], освен това при пациентите се наблюдава повишена чувствителност, липса на терапевтичен отговор и дори влошаване на състоянието при лечение с антихолинестеразни агенти [27]. Тимусната хистология показва атрофия, свързана с възрастта, без наличие на хиперплазия или неоплазия и концентрацията на автоантителата не се променя след тимектомия, което предполага липса на тимусна патология [25, 28]. Концентрацията на анти-MuSK антителата корелира с клиничните симптоми и терапевтичния отговор [29, 30].

Патофизиологията на МГ-MuSK не е добре изяснена, проучванията върху загубата на ацетилхолинови рецептори и активацията на комплемента при пациенти с МГ-MuSK показват незначителна промяна в плътността на рецепторите и по-рядко отлагане на комплементарни фракции в сравнение с анти-AChR+ МГ [31]. Експериментално върху миши модел е установено, че IgG от анти-MuSK+ пациенти причиняват прогресивна редукция в плътността на ацетилхолиновите рецептори, промени в постсинаптичната мембрана и мускулна слабост [32].

Според извършените до момента проучвания около 8% от пациентите с МГ не позитивират анти-AChR или анти-MuSK антитела, поради което се предполага, че други протеини на НМВ играят патогенетична роля в заболяването при тези двойно негативни пациенти.

Автоантитела срещу други протеини на нервномускулната връзка и йонни каналчета:

Липопротеин рецептор-свързан протеин 4 (lipoprotein receptor-related protein 4 – LRP4) заедно с MuSK е рецептор за агрин – молекула, необходима за формиране на клъстери от AChR и нормално функциониране на НМВ [33]. Анти-LRP4 антитела се установяват при 9% от пациентите негативни за анти-AChR и анти-MuSK антитела. Тези автоантитела са от субклас IgG1, активират комплемента и са специфични за МГ (не се отчитат при пациенти с други неврологични заболявания) [34–36].

Рапсин (Rapsyn): Рапсинът е интрацелуларен протеин, който също е необходим за формиране на клъстери от ацетилхолинови рецептори на постсинаптичната мембрана на НМВ [37]. Автоантителата се позитивират при 15% от пациентите предимно с тимом [38], но са установени и при други неврологични заболявания [39].

Автоантитела срещу протеини на напречно набраздените мускули:

При пациентите с МГ се позитивират и автоантитела срещу протеини на напречно набраздената мускулатура с важно значение за функцията на ацетилхолиновия рецептор. Тези автоантитела не се считат за патогенни поради вътреклетъчната локализация на антигена (титин, миозин, актин, рианодинови рецептори), но наличието им показва връзка с различни клинични прояви на заболяването, като тимом, миозит и миокардит. Автоантителата срещу напречно набраздените мускули не са специфични за МГ, те се позитивират и при пациенти с тимом без МГ, както и при други автоимунни заболявания [40]. Автоантителата рядко биват откривани при пациенти, отрицателни за анти-AChR антитела, което ги прави не особено полезни в диагностичен план. Те се позитивират по-често при възрастни пациенти и при агресивен ход на заболяването, което дава основание за предположението, че неблагоприятният клиничен ход е следствие от имунна атака срещу множество мускулни антигени [41].

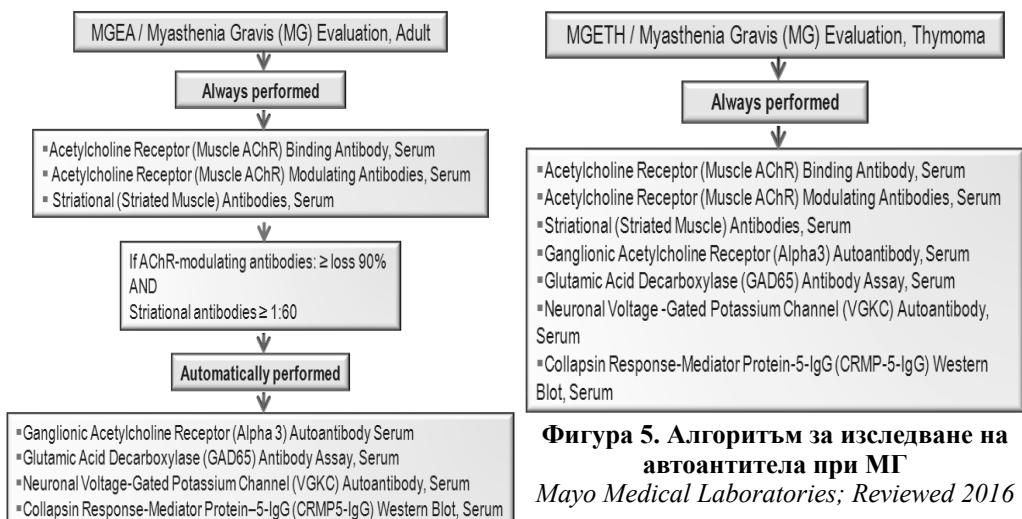
Антититинови антитела: Позитивират се при 70–90% от пациентите с тимом и при 50% от пациентите без тимом. Тези автоантитела корелират с агресивния клиничен ход на МГ и определят група пациенти, по-често рефрактерни към терапия, включително към тимектомия [42, 43]. Антититиновите антитела са от субклас IgG1 и активират комплемента [44], те рядко се позитивират в началото на заболяването на анти-AChR позитивни пациенти и не са установени при положителни анти-MuSK антитела. Стимулацията на мононуклеарни клетки от периферна кръв, положителна за антититинови антитела при култивиране с основния имуногенен район на титина индуцира Т-клетъчен антиген-специфичен имуноен отговор [45]. Титинът се експресира в хиперпластичния тимус и в тимомна тъкан, което предполага, че това е първичното място на автосензибилизация [46, 47], но не обяснява позитивността при възрастни пациенти без тимом или отрицателния резултат при пациенти с ранно начало на МГ и хиперплазия на тимуса.

Анти-RyR антитела (ryanodine receptor – RyR): RyR е калциев канал, пропускател на Ca^{2+} в саркоплазмата, което води до контракция на мускула [48]. Анти-RyR антителата се установяват предимно при пациенти с тимом, придружен със слабост на респираторната мускулатура [49], свързват се както към скелетните, така и към сърдечните мускулни форми на RyR. Те са от субкласове IgG1 и IgG3 с възможност за активация на комплемента [50].

Антититиновите антитела са високо специфични при МГ с тимом (позитивни при 95% от пациентите), но ниско специфични при пациентите с късна проява на МГ със или без тимом (позитивни при 50%) [38, 42, 43]. Анти-RyR антителата са по-специфични при тимом, но се позитивират само при 75% от пациентите. Успоредното определяне на двата вида автоантитела дава много добра чувствителност и специфичност при МГ с тимом (95% чувствителност и 70% специфичност) [4, 38]. Анти-RyR антителата показват положителна връзка с инвазивния малигнен тимом, поради което при позитивните пациенти, подлежащи на тимектомия, трябва да се отстрани напълно тимусът. Тъй като наличието на антититин и анти-RyR антитела корелира с тежестта на МГ, определянето на позитивността им е особено полезно при определянето на риска, терапията и проследяването [42].

Антитела, насочени към протеини на напречно набраздените мускули, свързват и други антигени, като миозин, актин, тропомиозин и тропонин с роля в мускулната контракция, с неизяснена към момента клинична значимост [51].

В заключение бихме искали да представим диагностичния алгоритъм на Mayo Medical Laboratories; Ревизия 2016 год. за имунологична диагностика и оценка на прогнозата при пациенти с клинични симптоми за миастения гравис със или без тимом.



ЛІТЕРАТУРА:

1. Meriggioli MN, Sanders DB. Autoimmune myasthenia gravis: emerging clinical and biological heterogeneity. *Lancet Neurol.* 2009; 8(5):475–90.
2. Hoch W, McConville J, Helms S, et al. Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nat Med.* 2001; 7(3):365–68.
3. McConville J, Farrugia ME, Beeson D, et al. Detection and characterization of MuSK antibodies in seronegative myasthenia gravis. *Ann Neurol.* 2004; 55(4):580–84.
4. Romi F, Skeie GO, Aarli JA, et al. Muscle autoantibodies in subgroups of myasthenia gravis patients. *J Neurol.* 2000; 247(5):369–75.
5. Drachman DB, Adams RN, Stanley EF, et al. Mechanisms of acetylcholine receptor loss in myasthenia gravis. *J Neurol Neurosurg Psychiatr.* 1980; 43(7):601–10.
6. Gomez AM, Van Den Broeck J, Vrolix K, et al. Antibody effector mechanisms in myasthenia gravis-pathogenesis at the neuromuscular junction. *Autoimmunity.* 2010; 43(5–6):353–70.
7. Conti-Fine BM, Milani M, Kaminski HG. Myasthenia gravis: past, present, and future. *J. Clin. Invest.* 2006. 116:2843–54
8. Willcox N, Leite MI, Kadota Y, et al. Autoimmunizing mechanisms in thymoma and thymus. *Ann NY Acad Sci.* 2008; 1132:163–73.
9. Schluep M, Willcox N, Vincent A, et al. Acetylcholine receptors in human thymic myoid cells in situ: an immunohistological study. *Ann Neurol.* 1987; 22(2):212–22.
10. Heidenreich F, Vincent A, Willcox N, et al. Anti-acetylcholine receptor antibody specificities in serum and in thymic cell culture supernatants from myasthenia gravis patients. *Neurology.* 1988; 38(11):1784–88.
11. Gilhus NE, Aarli JA, Matre R. Myasthenia gravis: the specificities of skeletal muscle and thymus antibodies. *Acta Neurol Scand.* 1983; 68(5):328–36.
12. Hohlfeld R, Kalies I, Kohleisen B, et al. Myasthenia gravis: stimulation of antireceptor autoantibodies by autoreactive T cell lines. *Neurology.* 1986; 36(5): 618–21.
13. Sommer N, Willcox N, Harcourt GC, et al. Myasthenic thymus and thymoma are selectively enriched in acetylcholine receptor-reactive T-cells. *Ann Neurol.* 1990; 28(3):312–19.
14. Lefvert AK. Immunoglobulins in myasthenia gravis. Kinetic properties of the acetylcholinereceptor antibody studied during lymph drainage. *Clin Exp Immunol.* 1978; 34(1):111–17.
15. Newsom-Davis J, Pinching AJ, Vincent A, et al. Function of circulating antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis: investigation by plasma exchange. *Neurology.* 1978; 28(3):266–72.
16. Tzartos SJ, Lindstrom JM. Monoclonal antibodies used to probe acetylcholine receptor structure: localization of the main immunogenic region and detection of similarities between subunits. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1980; 77(2):755–59.
17. Howard FM Jr, Lennon VA, Finley J, et al. Clinical correlations of antibodies that bind, block, or modulate human acetylcholine receptors in myasthenia gravis. *Ann NY Acad Sci.* 1987; 505:526–38.
18. Lefvert AK, Bergström K, Matell G, et al. Determination of acetylcholine receptor antibody in myasthenia gravis: clinical usefulness and pathogenetic implications. *J Neurol Neurosurg Psychiatr.* 1978; 41(5):394–03.

19. Vincent A, Newsom-Davis J. Acetylcholine receptor antibody as a diagnostic test for myasthenia gravis: results in 153 validated cases and 2967 diagnostic assays. *J Neurol Neurosurg Psychiatr.* 1985; 48(12):1246–52.
20. Agius MA, Richman DP, Vincent, A. Autoantibody testing in the diagnosis and management of autoimmune disorders of neuromuscular transmission and related disorders. In: Kaminski, HJ., editor. *Myasthenia Gravis and Related Disorders.* 2. Humana Press; NJ, USA: 2009. p. 143–56.
21. Vincent A, Newsom-Davis J. Acetylcholine receptor antibody characteristics in myasthenia gravis. Patients with generalized myasthenia or disease restricted to ocular muscles. *Clin Exp Immunol.* 1982; 49(2):257–65.
22. Lefvert AK, Björkholm M. Antibodies against the acetylcholine receptor in hematologic disorders: implications for the development of myasthenia gravis after bone marrow grafting. *N Engl J Med.* 1987; 317(3):170–75.
23. Vernino S, Lennon VA. Autoantibody profiles and neurological correlations of thymoma. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(21):7270–75.
24. Punga AR, Lin S, Oliveri F, et al. Muscle-selective synaptic disassembly and reorganization in MuSK antibody positive MG mice. *Exp Neurol.* 2011; 230(2):207–17.
25. Sanders DB, El-Salem K, Massey JM, et al. Clinical aspects of MuSK antibody positive seronegative MG. *Neurology.* 2003; 60(12):1978–80.
26. Sanders DB, Juel VC. MuSK-antibody positive myasthenia gravis: questions from the clinic. *J Neuroimmunol.* 2008; 201:85–89.
27. Hatanaka Y, Hemmi S, Morgan MB, et al. Nonresponsiveness to anticholinesterase agents in patients with MuSK-antibody-positive MG. *Neurology.* 2005; 65(9):1508–09.
28. Leite MI, Strübel P, Jones M, et al. Fewer thymic changes in MuSK antibody-positive than in MuSK antibody-negative MG. *Ann Neurol.* 2005; 57(3):444–48.
29. Bartoccioni E, Scuderi F, Minicuci GM, et al. Anti-MuSK antibodies: correlation with myasthenia gravis severity. *Neurology.* 2006; 67(3):505–07.
30. Niks EH, van Leeuwen Y, Leite MI, et al. Clinical fluctuations in MuSK myasthenia gravis are related to antigen-specific IgG4 instead of IgG1. *J Neuroimmunol.* 2008; 195(1–2):151–56.
31. Shiraiishi H, Motomura M, Yoshimura T, et al. Acetylcholine receptors loss and postsynaptic damage in MuSK antibody-positive myasthenia gravis. *Ann Neurol.* 2005; 57(2):289–93.
32. Cole RN, Reddel SW, Gervósio OL, et al. Anti-MuSK patient antibodies disrupt the mouse neuromuscular junction. *Ann Neurol.* 2008; 63(6):782–89.
33. Zong Y, Zhang B, Gu S, et al. Structural basis of agrin-LRP4-MuSK signaling. *Genes Dev.* 2012; 26(3):247–58.
34. Higuchi O, Hamuro J, Motomura M, et al. Autoantibodies to low-density lipoprotein receptor-related protein 4 in myasthenia gravis. *Ann Neurol.* 2011; 69(2):418–22.
35. Pevzner A, Schoser B, Peters K, et al. Anti-LRP4 autoantibodies in AChR- and MuSK-antibodynegative myasthenia gravis. *J Neurol.* 2012; 259(3):427–35.
36. Zhang B, Tzartos JS, Belimezi M, et al. Autoantibodies to lipoprotein-related protein 4 in patients with double-seronegative myasthenia gravis. *Arch Neurol.* 2012; 69(4):445–51.
37. Agius MA, Zhu S, Kirvan CA, et al. Rapsyn antibodies in myasthenia gravis. *Ann NY Acad Sci.* 1998; 841:516–21.

38. Skeie GO, Romi F. Paraneoplastic myasthenia gravis: immunological and clinical aspects. *Eur J Neurol.* 2008; 15(10):1029–33.
39. Agius MA, Zhu S, Aarli JA. Antirapsyn antibodies occur commonly in patients with lupus. *Ann NY Acad Sci.* 1998; 841:525–26.
40. Strauss AJ, Kemp PG Jr. Serum autoantibodies in myasthenia gravis and thymoma: selective affinity for I-bands of striated muscle as a guide to identification of antigen(s). *J Immunol.* 1967; 99(5):945–53.
41. Romi F, Gilhus NE, Varhaug JE, et al. Thymectomy and anti-muscle autoantibodies in late-onset myasthenia gravis. *Eur J Neurol.* 2002; 9(1):55–61.
42. Romi F, Skeie GO, Aarli JA, et al. The severity of myasthenia gravis correlates with the serum concentration of titin and ryanodine receptor antibodies. *Arch Neurol.* 2000; 57(11):1596–00.
43. Skeie GO, Mygland A, Aarli JA, Gilhus NE. Titin antibodies in patients with late onset myasthenia gravis: clinical correlations. *Autoimmunity.* 1995; 20(2):99–04.
44. Romi F, Skeie GO, Vedeler C, et al. Complement activation by titin and ryanodine receptor autoantibodies in myasthenia gravis. A study of IgG subclasses and clinical correlations. *J Neuroimmunol.* 2000; 111(1–2):169–76.
45. Skeie GO, Aarli JA, Matre R, et al. Titin antibody positive myasthenia gravis patients have a cellular immune response against the main immunogenic region of titin. *Eur J Neurol.* 1997; 4:131–37.
46. Romi F, Bo L, Skeie GO, et al. Titin and ryanodine receptor epitopes are expressed in cortical thymoma along with costimulatory molecules. *J Neuroimmunol.* 2002; 128(1–2):82–89
47. Skeie GO, Freiburg A, Kolmerer B, et al. Titin transcripts in thymomas. *J Autoimmun.* 1997; 10(6):551–57.
48. Coronado R, Morrissette J, Sukhareva M, et al. Structure and function of ryanodine receptors. *Am J Physiol.* 1994; 266:1485–04.
49. Mygland A, Aarli JA, Matre R, et al. Ryanodine receptor antibodies related to severity of thymoma associated myasthenia gravis. *J Neurol Neurosurg Psychiatr.* 1994; 57(7):843–46.
50. Skeie GO, Mygland A, Treves S, et al. Ryanodine receptor antibodies in myasthenia gravis: epitope mapping and effect on calcium release in vitro. *Muscle Nerve.* 2003; 27(1):81–89.
51. Ohta M, Ohta K, Itoh N, et al. Anti-skeletal muscle antibodies in the sera from myasthenic patients with thymoma: identification of anti-myosin, actomyosin, actin, and alpha-actinin antibodies by a solid-phase radioimmunoassay and a western blotting analysis. *Clin Chim Acta.* 1990; 187(3):255–64.

ПАТОФИЗИОЛОГИЧНА, ДИАГНОСТИЧНА И ПРОГНОСТИЧНА РОЛЯ НА АВТОАНТИТЕЛАТА ПРИ МИАСТЕНИЯ ГРАВИС

Р. Владимирова, Е. Викентиева, Д. Попова

Миастения гравис е автоимунно заболяване, следствие от нарушение на нервномускулната проводимост в резултат на свързването на автоантитела към протеини, провеждащи сигнали в нервномускулната връзка. Основните имуногенни протеини са ацетилхолиновият рецептор (AChR) и в по-малка степен мускул-специфичната тирозин киназа (MuSK) с участие във формирането на AChR кълстери. Двете най-добре характеризирани автоантитела с роля в патогенезата на заболяването – анти-AChR и анти-MuSK автоантителата се установяват в серума на почти всички пациенти с миастения гравис. Автоантитела срещу протеините на напречно набраздените мускули се отчитат предимно при пациенти с анти-AChR положителна миастения гравис и подпомагат определянето на пациенти с миозит, тимом и кардиомиопатия. Вероятно автоантителата срещу други протеини играят съществена роля при двойно негативни за анти-AChR- и анти-MuSK пациенти.

Ключови думи: миастения гравис, автоантитела, диагноза.

Адрес:

Р. Владимирова

ВМА, Катедра по клинична лаборатория и клинична имунология

София, „Г. Софийски“ 3

PATHOPHYSIOLOGICAL, DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC ROLE OF THE AUTOANTIBODIES IN MYASTHENIA GRAVIS

R. Vladimirova, E. Vikentieva, D. Popova

Myasthenia gravis is an autoimmune disease caused by the failure of neuromuscular transmission, which results from the binding of autoantibodies to proteins involved in signaling at the neuromuscular junction. These proteins include the acetylcholine receptor (AChR) or, less frequently, a muscle-specific tyrosine kinase (MuSK) involved in AChR clustering. Two well-characterized autoantibodies playing a role in disease pathogenesis are found in the serum of most patients with myasthenia gravis – anti-AChR and anti-MuSK antibodies. Antibodies to striated muscle proteins generally occur in anti-AChR positive Myasthenia gravis and aid in identifying patients with myositis, thymoma and cardiomyopathy. Autoantibodies to other proteins may play a role in patients with anti-AChR- and anti-MuSK-negative myasthenia gravis.

Keywords: myasthenia gravis, autoantibodies, diagnosis.

Address:

R. Vladimirova

Military Medical Academy

Chair of clinical laboratory and clinical immunology

3 G. Sofiyski str., Sofia

ЕВОЛЮЦИЯ НА ДИАГНОЗАТА „АНТИФОСФОЛИПИДЕН СИНДРОМ“

Марта Балева

*Клиника по клинична имунология с банка за стволови клетки
УМБАЛ „Александровска“*

*Уотсън, ти гледаш, но не виждаш!
(Шерлок Холмс към д-р Уотсън)*

Какво знаем за антифосфолипидните антитела?

Първото описано антифосфолипидно антитяло (aPL) е фалшиво положителната реакция за сифилис (VDRL) [1, 2]. Установено е, че такава реакция често се доказва в серума на болни от системен лупус (SLE). C.L. Conley и R.C. Hartmann през 1952 г. [3] откриват циркулиращ антикоагулант при трима болни и доказват, че тази субстанция блокира превръщането на протромбина в тромбин. Наименованието *лупусен антикоагулант* (LA) е предложено от D.I. Feinstein и S.I. Rapaport [4] и днес е широко възприето, въпреки че това антитяло има прокоагулантна, а не антикоагулантна активност. Двамата автори всъщност са открили, че при болни с LA и хеморагична диатеза има втори-чен дефект в коагулацията. Друга ирония на съдбата е, че голям брой от LA положителните болни – може би дори половината – нямат SLE. Лупусният антикоагулант всъщност е второто aPL. Връзката между LA и тромбозите е открита и описана за първи път от E. J. Bowie и сътр. [5] през 1963 г. при 4 от 8 изследвани пациенти, а през 1980 г. и от J. R. Mueh и сътр. при 8 от 35 пациенти [6].

Третото aPL – антикардиолипин (aCL), също има интересна история. E.N. Harris и сътр. [7], търсейки по-чувствителен и лесен метод от тестовете за определяне на LA, разработват RIA и ELISA за доказване на aCL в лабораторията на G.R.V Hughes. Тези методи се използват и до днес.

Впоследствие се изяснява че антителата срещу beta-2-glycoprotein I (aB2GPI) са по-важен маркер за диагнозата на антифосфолипидния синдром (APS), а aCL се разделят на зависими и независими от beta-2-glycoprotein I [8, 9]. Последва лавина от антигени, с които са свързани aPL: фосфатидилсерин (PS), фосфатидилинозитол (PI), фосфатидилетаноламин (PE), сфингомиелин, анексин V (AnV), протромбин (PT) и др [10].

Еволюция на класификациите на APS

Първоначално APS се дефинира като състояние, при което съществува пред-разположение към тромбози (тромбофилия), характеризиращо се с клинични

симптоми и съответни параклинични нарушения. През 1987 г. групата на E.N. Harris и сътр. [11] публикува т.нар. сигурни критерии за APS:

- Клинични – венозни или артериални тромбози, поне два спонтанни аборта
- Лабораторни – положителните aCL и/или лупусният антикоагулант (LA).

През 1992 г. D. Alarcon-Segovia и сътр. [12] публикуват сигурните според тях критерии за APS, като са задължителни най-малко два от следните клинични симптома: рецидивиращи аборти или венозна тромбоза, или артериална оклузия или язви на подбедрицата, или livedo reticularis, или хемолитична анемия, или тромбоцитопения. Лабораторните критерии са: повишени IgG или IgM aCL (норма + 5SD) и/или наличие на LA. Според тези автори диагнозата APS е вероятна, ако има един клиничен критерий и повишение на антителата или два клинични критерия и ниски антитела (норма + 2SD).

До 1999 г. консенсусни критерии за поставяне на диагнозата са: клинични данни за тромбози, спонтанни аборти, тромбоцитопения, и лабораторни данни за IgG aCL и/или LA. В края на столетието се публикуват критериите от Сапоро [13, 14], които включват: съдова тромбоза – един или повече епизода на артериална, венозна или тромбоза на малките съдове на която и да е тъкан или орган, усложнена бременност (една или повече необяснима смърт на морфологично нормален фетус до или след 10-а гестационна седмица или едно или повече преждевременни раждания на морфологично нормални новородени до или след 34-та гестационна седмица или три или повече необясними спонтанни аборта преди 10-а гестационна седмица. Лабораторните критерии са: aCL от клас IgG или IgM в средновисок или висок титър при две или повече определяния в течение на 6 седмици; LA – при две или повече определяния в течение на 6 седмици. За граница между ниските, средните и високите стойности за aCL се използват следните критерии: а) 15 или 20 международни единици б) 2 или 2,5 пъти по-големи стойности от средните за aCL в) 99 персантил на aCL за здравите. Наличието на поне един клиничен и един лабораторен критерий поставя диагнозата.

През 2006 г. се изработват нови критерии на международната група по класификация на АФС – критерии от Сидни [15], в които са включени следните симптоми: съдова тромбоза – един или повече епизода на артериална, венозна или тромбоза на малките съдове на която и да е тъкан или орган; усложнена бременност – една или повече необяснима смърт на морфологично нормален фетус до или след 10-а гестационна седмица или едно или повече преждевременни раждания на морфологично нормални новородени до 34-та гестационна седмица поради еклампсия, прееклампсия или недостатъчност на плацентата или три или повече необясними спонтанни аборта преди 10-а гестационна седмица при изключване на анатомични и хормонални нарушения на майката и хромозомни нарушения при майката и бащата. Лабораторните критерии са: LA повишен и определян с общовалидни методи – при две или повече определяния в течение на 12 седмици, aCL в серум или плазма от клас IgG и/ или IgM

в среден или висок титър (>40GPL или MPL) или >99 перцентил при две или повече определяния в течение на 12 седмици определи със стандартизирани ЕЛИЗА методи; анти-бета-2 гликопротеин I в серум или плазма от клас IgG и/или IgM в титър >99 перцентил при две или повече определяния в течение на 12 седмици определи със стандартизирани ЕЛИЗА методи.

Серонегативен APS

Още през 2003 г. G.R. Hughes и M.A. Khamashta [16] по аналогия със „серонегативния ревматоиден артрит“ (ревматоиден артрит без ревматоиден фактор) и „серонегативния системен лупус еритематозус“ (системен лупус без антинуклеарни антитела) въвеждат и термина „серонегативен APS“ – SN-APS. Основание за това са наблюденията, че много често има несъответствие между титъра на aPL и клиничната изява на синдрома [16, 17]: от една страна – наличие на негативни aPL (aCL, aB2GPI, LA), при класически клинични симптоми за APS, а от друга страна – при наличие и/или липса на aPL – прояви и на други симптоми като: главоболие, ливедо ретикуларис, спонтанни аборти, клапни увреди, инсулти, тромбоцитопения. Според тях зад диагнозата SN-APS могат да се крият следните състояния: наличие на друга коагулопатия, възможност предишни положителни антитела да се променят и да се негативират. Според G. R. Hughes [18] диагнозата SN-APS представлява една нова група от пациенти, които трябва да бъдат диагностицирани и лекувани.

Диагнозата SN-APS се подкрепя от редица автори [16, 19], но други са скептични спрямо това твърдение [20, 21].

„Non-criteria“ aPL и „non-criteria“ клинични симптоми на APS

През последните години се обсъжда и въпросът за т.нар. „non-criteria“ aPL [22] и „non-criteria“ клинични симптоми на APS [23]. Пример за това са болните със засягане на сърдечните клапи, вкл. и тези със SLE. Метаанализът на публикациите по този въпрос показва, че позитивните aPL са свързани с 5-кратно по-голям риск от засягане на сърдечните клапи, вкл. и пациентите с Libman-Sacks ендокардит, което налага ехокардиографското изследване при болните с aPL и SLE поради високия риск от артериални тромбози [24].

Тромбоцитопенията, нефропатията, ливедо ретикуларис, кожните язви са чести симптоми на APS, но до този момент не са включени в класификационните критерии поради по-малката им специфичност [23, 25–28]. Към тази група могат да се включат и нелекуваното главоболие, мигрената, епилепсията, хорейта, амаврозис фугакс и тромбозата на ретината [29, 30], а болните с мултиплена склероза и положителни aPL трябва да се отдиференцират с помощта на ядрено-магнитен резонанс [29].

Аргументи „за“ и аргументи „против“ SN-APS [31]:

- аргументи за: 1. Наличие на антитела, различни от „класическите“ 3 антитела, с които се поставя диагнозата APS – aCL, aB2GP I и LA: aPS, aPE, анти-фосфатидилинозитол (aPI), anV, aPT, срещу виментин и много други при пациенти с тромбози или неблагоприятна бременност. 2. Използване на нови техники като: immunostaining on thin layer chromatography plates. 3. Миокарден инфаркт, мозъчен инсулт, неблагоприятна бременност без данни за APS трябва да бъдат изследвани по-обширно.
- аргументи против: 1. Неподходящ избор на метод за определяне на антителата. 2. Възможност за положителни IgA антитела. 3. Загуба на антителата с урината (нефротичен синдром); повишен катаболизъм или намалено производство на антителата; консумация на антителата по време на тромботичния инцидент. 4. Понижена серумна концентрация след лечение с кортикостероиди. 5. Сероконверсия.

В заключение: SN-APS е мозайка от антитела и клинични симптоми. Еволюцията на APS е в ход и са необходими още проучвания, за да се постави със сигурност тази диагноза. Сполучливото предположение на R.A. Asherson и R. Cervera [32] „The antiphospholipid syndrome: a syndrome in evolution“, направено през 1992 г., е все още валидно и очаква своите изследователи.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Wassermann A, Neisser A, Bruck C. Eine diagnostische Reaktion bei Syphilis. Deutch Med Woch 1906; 32:745–6.
2. Pangborn MC. A new serologically active phospholipid from beef heart. Proc Soc Exp Biol Med 1941; 41: 484–6.
3. Conley CL, Hartmann RC. A hemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematosus. J Lab Clin Invest 1952; 31:621–2.
4. Feinstein DI, Rapaport SI. Acquired inhibitors of blood coagulation. Prog Hemostas Thromb 1972; 1:75–95.
5. Bowie EJ, Thompson JH Jr, Pascuzzi CA, Owen CA Jr. Thrombosis in systemic lupus erythematosus despite circulating anticoagulants. J Lab Clin Med 1963; 62:416–30.
6. Mueh JR, Herbst KD, Rapaport S. Thrombosis in patients with lupus anticoagulant. Ann Intern Med 1980; 92: 156–9.
7. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, et al. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. Lancet 1983; 2: 1211–4.
8. Galli M, Comfurius P, Maassen C, et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to plasma protein cofactor. Lancet 1990; 335: 1544–7.
9. McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: β 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87 (11):4120–4124.

10. Bertolaccini ML, Amengual O, Andreoli L, et al. 14th congress on antiphospholipid antibodies task force. Report on antiphospholipid syndrome laboratory diagnostics and trends. *Autoimmunity Rev* 2014; <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2014.05.001>.
11. Harris EN, Baguley E, Asherson RA, Hughes GRV. Clinical and serological features of the „antiphospholipid syndrome“ (APS). *Br J Rheumatol* 1987; 26: 17.
12. Alarcón-Segovia D, Pérez-Vázquez ME, Villa AR, Drenkard C, Cabiedes J. Preliminary classification criteria for the antiphospholipid syndrome within systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 1992; 21:275–85.
13. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthr Rheum* 1999; 42:1309–11.
14. Lockshin MP, Samantiano LR, Schwartzman S. Validation of the Sapporo criteria for antiphospholipid syndrome. *Arthr Rheum* 2000; 43: 440–443.
15. Miyakis S, Lockshin M, Atsumi T et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *J Thrombosis Haemost* 2006; 4:295–306.
16. Hughes GR, Khamashta MA. Seronegative antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 2003; 62:1127.
17. Ruiz-Irastorza G, Khamashta MA, Hughes GRV. Hughes syndrome crosses boundaries. *Autoimmun Rev* 2002; 1:43–48.
18. Hughes GR. Antiphospholipid syndrome (Hughes syndrome): 10 clinical topics. *Lupus* 2010; 19:343–346.
19. Alessandri C, Conti F, Conigliaro P, Mancini R, Massaro L, Valesini G. Seronegative Autoimmune Diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences. Contemporary Challenges in Autoimmunity* 2009; 1173:52–59.
20. Miret C, Cervera R, Reverter JC, Garcia-Carrasco M, et al. Antiphospholipid syndrome without antiphospholipid antibodies at the time of the thrombotic event: transient ‘seronegative’ antiphospholipid syndrome? *Clin Exp Rheumatol* 1997; 15:541–544.
21. Jawad AS. Seronegative antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 2004; 63:608 author reply 608.
22. Bertolaccini ML, Amengual O, Atsumi T, Binder WL, et al. „Non criteria“ aPL tests: report of a task force and preconference workshop at the 13th International congress on antiphospholipid antibodies, Galveston, TX, USA, April 2010. *Lupus* 2010; 20: 191–205.
23. Erkan D and Lockshin MD: Non-criteria manifestations of antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2010; 19:424–427.
24. Zuily S, V. Regnault V, Selton-Suty C, Eschwe`ge V, et al. Increased Risk for Heart Valve Disease Associated With Antiphospholipid Antibodies in Patients With Systemic Lupus Erythematosus. Meta-Analysis of Echocardiographic Studies. *Circulation* 2011; 124:215–224.
25. Atsumi T, Furukawa S, Amengual O, Koike T. Antiphospholipid antibody associated thrombocytopenia and the paradoxical risk of thrombosis. *Lupus* 2005; 14:499–504.
26. Frances C. Dermatological manifestations of Hughes‘ antiphospholipid antibody syndrome. *Lupus* 2010; 19:1071–1077.
27. Zuily S, Huttin O, Mohamed S, Marie PY, Selton-Suty C, Wahl D. Valvular heart disease in antiphospholipid syndrome. *Curr Rheumatol Rep* 2013; 15:320.

28. Tektonidou MG. Renal involvement in the antiphospholipid syndrome (APS)-APS nephropathy. Clin Rev Allergy Immunol 2009; 36:131–140.
29. Brey RL, Muscal E, Chapman J. Antiphospholipid antibodies and the brain: a consensus report. Lupus 2011; 20:153–157.
30. Hanly JG, Urowitz MB, Su L, Gordon C, et al. Seizure disorders in systemic lupus erythematosus results from an international, prospective, inception cohort study. Ann Rheum Dis 2012; 71:1502–1509.
31. Cervera R, Conti F, Doria A, Iaccarino L, Valesini G. Does seronegative antiphospholipid syndrome really exist? Autoimmunity Reviews 2012; 11:581–584.
32. Asherson RA and Cervera R. The antiphospholipid syndrome: a syndrome in evolution. Ann Rheum Dis 1992; 51:147–150.

ЕВОЛЮЦИЯ НА ДИАГНОЗАТА „АНТИФОСФОЛИПИДЕН СИНДРОМ“

Марта Балева

Още през 2003 г. G.R. Hughes и M.A. Khamashta по аналогия със „серонегативния ревматоиден артрит“ (ревматоиден артрит без ревматоиден фактор) и „серонегативния системен лупус еритематозус“ (системен лупус без антинуклеарни антитела) въвеждат и термина „серонегативен“ антифосфолипиден синдром (SN-APS) – APS без класическите антитела – aCL, aB2GP I, LA. Аргументи за SN-APS: 1. Наличие на антитела, различни от „класическите“ 3 антитела, с които се поставя диагнозата APS. Такива са антителата срещу: фосфатидилсерин, фосфатидилетаноламин, фосфатидилинозитол, анексин V, протромбин, виментин и много други при пациенти с тромбози или неблагоприятна бременност. 2. Използване на нови техники, като immunostaining on thin layer chromatography plates, с които става по-ясното разграничение на антителата. 3. Сериозни заболявания, като миокарден инфаркт, мозъчен инсулт, неблагоприятна бременност без „класически антитела“ за APS, трябва да бъдат изследвани за други антитела. Аргументи против SN-APS: 1. Неподходящ избор на метод за определяне на антителата. 2. Възможност за положителни IgA-антитела. 3. Загуба на антителата с урината (нефротичен синдром); повишен катаболизъм или намалено производство на антителата; консумация на антителата по време на тромботичния инцидент. 4. Понижена серумна концентрация на антителата след лечение с кортикостероиди. 5. Сероконверсия.

Ключови думи: серонегативен APS.

Адрес за кореспонденция:

М. Балева

Клиника по клинична имунология с банка за стволови клетки

УМБАЛ „Александровска“

„Г. Софийски“ 1

София 1431

e mail: marta_baleva@yahoo.com

EVOLUTION OF THE DIAGNOSIS „ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROM“

Marta Baleva

In 2003 G.R. Hughes and M.A Khamashta analogous to „seronegative rheumatoid arthritis“ (rheumatoid arthritis without rheumatoid factor) and „seronegative systemic lupus erythematosus“ (systemic lupus without antinuclear antibodies) introduce „seronegative“ Antiphospholipid syndrome (SN-APS)“ – APS without classical antibodies – aCL, aB2GPI and LA. Arguments for SN-APS: 1. Detection of antibodies different from „classical antibodies“ such as antibodies to phosphatidylserine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol, annexin V, prothrombin, vimentin and many others in patients with thromboses and unsuccessful pregnancy. 2. Use of new technics as immunostaining on thin layer chromatography plates which differentiate antibodies. 3. Serious diseases as myocardial infarction, stroke and unsuccessful pregnancy without „classical“ antibodies for APS must be examined for other antibodies. Arguments against SN-APS: 1. Unsuitable method for the determination of antibodies. 2. Possibility for positive IgA antibodies. 3. Loss of antibodies with urine (nephrotic syndrome), increase of catabolism and decrease of the synthesis of antibodies, consumption of antibodies during thrombotic event. 4. Decreased serum concentration of antibodies after corticosteroid treatment. 5. Seronversion.

Keywords: seronegative APS.

Contact address:

M. Baleva

Department of clinical immunology with stem cell bank,

University Hospital Alexandrovska

1 G. Sofiiyski str.

Sofia 1431

e mail: marta_baleva@yahoo.com

СЪВРЕМЕННИ ВЪЗМОЖНОСТИ НА КЛИНИЧНАТА ИМУНОЛОГИЯ ЗА ДИАГНОСТИКА И МОНИТОРИНГ ПРИ НЯКОИ ИНФЕКЦИОЗНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

*К. Плочев¹, М. Баймакова¹, Г. Попов¹,
Р. Михайлова-Гарнизова¹, Е. Наумова²*

¹Клиника по инфекциозни болести, ВМА – София

²Клиника по клинична имунология с банка за стволови клетки,
УМБАЛ „Александровска“, МУ – София

ВЪВЕДЕНИЕ

Напоследък забелязваме чувствителна промяна във вида на масово разпространените заразни заболявания – не само в световен, но и в регионален и национален мащаб. Появата на новооткрити (това е по-точният термин от нововъзникнали) и разрастването на познати, но ограничени в миналото до минимум инфекциозни заболявания, поставя пред нас редица въпроси.

Ясно е, че в природата съществуват много други заразни причинители (антигени), които постепенно обхващат човешката популация, най-често под формата на единични случаи, локални епидемични взривове до епидемии, а през 2014 г. се разви и нова пандемия. От биологична гледна точка по-голямата част от тези заболявания са зоонози и/или антропозоонози. Причините за разпространението им са няколко:

1. От една страна, домашните животни не винаги подлежат на стриктен и прецизен епидемичен контрол (по организационни и финансови причини), което ги прави ефективен резервоар на много, опасни и за хората инфекции.
2. От друга страна, дивите животни са подложени на частичен, епизодичен контрол (случайни регистрации от горски работници, ловджии, местно население).
3. Много често животните са резервоар и междинно звено за разпространение на болести, предавани от ухапвания чрез насекоми. На преден план излиза и нов биологичен феномен – регистрирани са **причинители, внезапно сменящи гостоприемника си**.
4. Все по-интензивното и безконтролно инвестиционно нахлуване в дивата природа (дори в места, където не е „стъпвал човешки крак“), отваря биологични ниши. Там живеят непознати за човешката имунна система микроорганизми (бактерии, вируси, рикетсии, гъбички, неизвестни биологични видове – например приони). Такива случаи вече са регистрирани – Хандра вируси, Нипах, Ебола, Ханта вируси и други **непознати нам до скоро причинители**.

Друга, не по-малка опасност преставляват т.нар. завръщащи се от миналото (приети за изчезнали/-ващи) инфекциозни заболявания – вариола, полиомиелит, туберкулоза, дифтерия и други.

Трети рисков фактор са генетичните селекции – спонтанни, след природни феномени или предизвикани от социално-икономически въздействия, възникващи в хода на еволюцията или други неизвестни причини (черна биология), които водят до трудно диагностициране и саниране на пациенти, заразени от „мутанти“.

Следователно, предизвикателствата към имунната система стават все по-големи.

От друга страна, знаем, че генетично детерминираната задача на имунната система е не само да разпознава собствените от чуждите антигени, но и да маркира, фиксира и елиминира вътрешна и външна генетично непозната (вкл. дефектно синтезирана) антигенна и функционална информация. С други думи, тя се „самосезира“ за дефекти във функциите и компетентността на системата. За да знаем това, използваме тестове, които ни ориентират:

- кой компонент от системата е дефектирал;
- останали ли са възможности на системата да работи;
- дали е в състояние на дефицит или свръхпродукция на компоненти;
- дали не е настъпил хаос (тотален дисбаланс) на системата;
- дали е престанала да разпознава „свое“ от „чуждо“;
- дали не е свръхактивирана, респективно свръхагресивна;
- дали тя не реагира пароксизмално на антигенно дразнене.

В резултат на въведените през последните 50–60 г. нови по-точни и възпроизводими методи на анализ на отделните компоненти на системата и тяхното функционално състояние можем с относителна точност да оценим количествено и качествено състоянието на имунитета. Съвременните подходи на пробовземане и анализ ни дават информация за следното :

Дали проблемът е чисто инфекциозен?

1. Дали болният е имунокомпроментиран (вродено или придобито)?
2. Дали имунното нарушение е в рамките на подлежащите на терапия?

За да отговорим на тези въпроси, е необходимо **да не забравяме следното:**

1. Медицинският екип, обслужващ инфекциозно болните, е препоръчително винаги да има насочено клинично мислене за имунни промени (клинични и лабораторни) при пациента. Много важно е наличието на клинични имунолози, с които можем да се консултираме и да си сътрудничим.
2. Да се снима подробна анамнеза (минала и настояща), включваща въпроси, които насочват към имунологични проблеми, социално поведение, професия, хобита, обществени, професионални и трудови контакти, вредни навици.
3. Специфична група са пациентите със спленектомия, преминали (или получаващи в момента) химио- и лъчетерапия, трансплантираните и

такива на хронидиализа – при наличие на инфекциозно заболяване имунологични изследвания при тях са задължителни.

4. При физикалния преглед се препоръчва да се изключи наличието на анатомични аномалии, които много често може да са причина за инфекции.
5. Клинико-лабораторните изследвания включват: **ПКК** с диференциално броене, **биохимия** (кръвна захар, азотни тела, екскреторно-билиарна функция, протеиносинтезираща функция на черния дроб, холостазни ензими, цитолиза, детоксична функция), **йонограма**, **хемостаза**.
6. Липсата на каквито и да е имунологични промени (клинични и лабораторни) при категорични епидемиологични, клинични и клинико-лабораторни данни, насочващи към остър инфекциозен процес, също носи информативна стойност – вероятна липса на реактивност.
7. През последните години обемът и качеството на имунологичните изследвания значително се повишиха.

Това е и целта на настоящия доклад: да обсъдим подходящ за нуждите на инфектологията скрининг и мониториращ лабораторен панел, които биха ни помагали да подобрим и ускорим диагнозата на болния, а от там и правилния терапевтичен подход. До колко той (имунологичният панел) да е задължителен, какъв да е обемът му и дали се вмести в зададени **не от нас** финансови параметри (т.е. да се заплаща от Касата), зависи от това до какъв научен консенсус ще стигнем.

ИЗЛОЖЕНИЕ:

ИНФЕКЦИОЗНИ БОЛЕСТИ

Въведена е административно регулирана система, регламентираща обема и качеството на всяка медицинска дейност, наречена медицински стандарт [1]. Системата включва:

БАЗИ – Специализирани кабинети в доболничната помощ, специализирани болници, клиники и отделения по инфекциозни болести.

НИВА НА КОМПЕТЕНТНОСТ – те са 3 и се различават по броя на работещите специалисти и броя болнични легла и частично по обема медицински дейности.

ИНФЕКЦИОЗНА ЗАБОЛЕВАЕМОСТ В РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

На Таблица 1 са дадени най-често диагностицираните инфекциозни болести през последните 5 г., които подлежат на наблюдение.

Таблица 1. Инфекциозни заболявания през последните 6 години

НОЗОЛ. ЕДИНИЦА/ ЗАБОЛЯВАНЕ	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	ОБЩО
Грип/ОРЗ	11 2412	145 151	125 502	121 993	136 717	145 389	88 710	875 874
Варицела	19 344	26 969	27 277	37 869	22 423	25 020	24 706	183 608
Гастроентерит, ентероколит	18 736	20 091	20 626	19 099	19 193	19 312	12 576	129 633
Скарлатина	2553	2589	3165	4107	3842	4985	3336	24 577
Остър вирусен хепатит АВСD	3192	6427	5773	2559	1323	1762	850	21 886
Ротавирусен гастроентерит	0	346	1560	1709	1861	1542	1300	8318
Салмонелоза	1121	868	691	654	638	895	333	5200
Дизентерия (шигелоза)	506	675	604	325	376	296	166	2948
Колиентерити – ешерихиози	536	460	347	258	305	332	226	2464
Лаймска болест	506	587	365	337	354	417	194	2760
Марсилска треска	463	405	364	387	335	203	173	2330

РЕГИСТРИРАНИ СА МИНИМАЛЕН БРОЙ ЗАБОЛЕЛИ ОТ: йерсиниоза, комплибактероза, коклюш, ку-треска, туларемия, вирусни менингити и менинго енцефалити, бактериални менингити и менингоенцефалити.

*HIV/СПИН и туберкулоза не са включен в този анализ, понеже се регистрират и отчитат по отделна наредба и указания.
Източник: Национален център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ), Епидемиологичен бюлетин (2016, 34-та седмица), 26 август 2016; http://www.ncspd.org/index.php?option=com_biuletin&view=view&month=34&year=2016&lang=bg [2]

Ние направихме сравнителен анализ на регистрацията на заразните заболявания преди 100 г., който показва коренна промяна в „репертоара“ на тези заболявания (Таблица № 2). Водила се е статистика (задължително деклариране на 36 заболявания. На таблицата сме представили някои от тях. Забележете, че тогава е върлувала т.нар. „испанска болест“ (грип), но регистрация на тези болни не е имало. Причината – войната на Балканите и в Европа.

Таблица 2. Инфекциозни заболявания в началото на миналия век

ЗАБОЛЯВАНЕ	БРОЙ, ГОДИНА
Чума	1900–1920 – единични случаи; последен – 1924 г.
Холера	1913–60372 заболели. Ликвидирана 1921 г.
Вариола	От 1908 до 1916–309 регистрирани. 1927 г. – 2 случая. Ликвидирана през 1928 г.
Възвратен тиф	Въшков – 500 през 1918; Кърлежов – няма данни
Петнист тиф	1927 г. 4.6/100 000. Ликвидиран 1966 г.
Кореман тиф	1912–1921 г. 99/100000. Последните 10 г. единични вносни случаи
Скарлатина	1920 г. 72,7/100 000. Понастоящем: 2015 г. – 68.3/100 000
Дифтерия	1920 г. 45–1/100 000. Последен регистриран случай – 1995 г.
Епидемичен менингит и енцефалит	1919–0.4/100 000; 1934–4.3/100 000 (най-висока); 1995 г. – 0.91/100 000
Детски паралич	От 1916 до 1927 0,25/100 000. Ликвидирана 2011 г.

*Литературен източник: Илиев, Б. – 2001 г. [3]

Ние не знаем доколко коректна като брой заболели е информацията от Таблица № 1. Както се вижда, преобладават детските инфекции, поради което не се наемаме да правим заключения (ние не работим с деца). Прави ни впечатление обаче, че през последните няколко години има промяна в документацията, с която се насочват болните към Клиниката. Конкретно в Клиниката по инфекциозни болести към ВМА преобладава симптомната пред нозологичната регистрация. Болните се насочват по преобладаващ симптом (синдром), а не с диагноза. Предполагаме, че това важи и за всички инфекциозни клиники и отделения в страната, тъй като те работят в същата система, по същите правила. Този факт ни дава основание да се отнесем резервирано към информацията, подадена ни от националните здравни институции.

Следните симптоми/синдроми насочват към възможност заболяването да е и инфекциозно:

1. Фебрилен,
2. Обривен,
3. Иктеричен,
4. Диаричен,
5. Горен диспептичен,
6. Долен диспептичен,

7. Горен респираторен,
8. Долен респираторен,
9. Цефалгичен,
10. Периферно неврологичен,
11. Астеничен,
12. Консумативен,
13. Синдром на хроничната умора,
14. Лимфаденопатичен,
15. Хепато/спленомегален,
16. Хеморагичен,
17. Плегичен,
18. Паралитичен,
19. Менинго-радикулерен,
20. Цитолитичен
21. Лабораторно-възпалителен (левкоцитоза, ускорена СУЕ, увеличен CRP, увеличен фибриноген, увеличени острофазови белтъци)
22. Уринарен (увеличени пигменти)
23. Ликворен синдром.

МОГАТ ДА СЕ ПОСОЧАТ СЛЕДНИТЕ ОСНОВНИ ПРОБЛЕМИ ОТ КЛИНИЧНА ГЛЕДНА ТОЧКА:

1. Неточна информация предоставяна на НЗОК, а от там и невярна статистика.
2. Наличие на нововъзникнали инфекциозни заболявания, които трудно се разпознават.
3. Самолечение, което маскира истинската причина за поява на инфекциозни симптоми и синдроми.
4. „Обучаване“ на пациентите, когато попаднат в болнично заведение, (амбулатория, спешно отделение), да съобщават за инфекциозни симптоми. Това се прави с цел да им се „помогне“, т.е. да им се осигури болничен прием и достъп до диагностични процедури, които по една или друга причина не са извършени в доболничната помощ. Това е особено характерно за тежко и хронично болни. Както знаете обаче, пациенти с инфекциозни симптоми и синдроми не се връщат до изясняване на заболяването. Така че остава един вариант. Пациентите да бъдат хоспитализирани със „симптомите“, които ни съобщават.

ИМУНОЛОГИЯ

Тази специалност също е стандартизирана [4]. Стандартите служат за точна и възпроизведима оценка на имунния статус (Имунен статус – състояние на имунната система в даден период от време).

БАЗИ – доболнични и болнични лаборатории, кабинети, отделения/клиники по имунология

НИВА НА КОМПЕТЕНТНОСТ – три и се различават по броя на работещите специалисти, наличие или не на болнични легла и частично по обема медицински дейности.

ДИСКУСИЯ

Замисълът на този доклад бе да анализираме, да обосновем научно и да предложим на НЗОК включването на препоръчителен (по преценка на изпълнителя на клиничната пътека) пакет имунологични изследвания и консултации при инфекциозно болни.

Дотук стана ясно, че има добре организирана мрежа от лаборатории и достатъчен брой специалисти (инфекционисти и имунолози), които биха осигурили необходимата клинична и имунологична информация, която да бъде компетентно интерпретирана и използвана за нуждите на диагностично-лечебния процес на две големи групи заболявания – имунни и инфекциозни.

Информацията, която получаваме по клиничен и лабораторен път, ни е необходима както за правилно интерпретиране на симптоматиката, така и за окончателната нозологична диагноза. Това, което трябва да изясним, е кои инфекциозни заболявания и кои инфекциозни симптоми и синдроми се нуждаят от имунологична диагноза и до колко това е в синхрон с вижданията на имунолозите за съвместна колаборация.

По-горе ви предоставихме информация за контролираните в момента заразни заболявания. Изяснихме също, че тази информация е неточна, което означава, че има риск да направим, грешни анализи и предложения. Това, което можем и трябва да направим, е следното: **ПЪРВО** – да изясним кои инфекциозни болести задължително се нуждаят от имунодиагностика (не дискутираме HIV и туберкулоза). По наше мнение това са:

1. Вирусните хепатити В и С;
2. Лаймската борелиоза;
3. Вирусните и бактериалните менинго-енцефалити;
4. Херпесни инфекции алфа, бета и гама;
5. Доброкачествена лимфогрануломатоза;
6. Микоплазмени инфекции;
7. Морбили;
8. Инфекциозна лимфоцитоза.

ВТОРО – освен нозологични единици ние трябва да обсъдим и категория пациенти, при които се предполага имунен дефицит, респективно повишена склонност към инфекции. Това са:

1. Онкологично болни
2. Хематологично болни

3. Лица над 65-г. възраст
4. Диабетно болни
5. Лица с доказани автоимунни заболявания
6. Недоносени деца
7. Деца с малформации и генетични дефекти
8. Хора с хронична алергия
9. Пациенти на хронична диализа
10. Трансплантирани.

ТРЕТО – ние описахме инфекциозните симптоми и синдроми, за които за съжаление, нямаме регистрация и информация за честотата на проявлението им. Според нас на имунологично уточняване подлежат:

1. Фебрилният синдром (неизяснено в рамките на един месец фебрилно състояние)
2. Лимфаденопатичният синдром
3. Консумативният синдром
4. Обривен синдром (неизяснен в рамките на един месец)
5. Иктерен синдром (неизяснен в рамките на един месец)
6. Персистиращ възпалителен лабораторен синдром
7. Диарийен синдром (с продължителност над един месец)
8. Ликворен синдром (имуноелектрофореза, ELISA)

Очертават се три групи критерии. Според нас, най-полезно за клиничната практика е да предложим имунологични изследвания на пациенти с предполагаем **имунен дефицит** съобразено с конкретните им **симптомни/синдромни оплаквания**, насочващи към инфекциозна генеза. За пациентите с предполагаем имунен дефицит знаем, че по принцип са необходими имунологични изследвания (те подлежат и на евентуална имуноterapia с последващо мониториране), а за да уточним дали даден клиничен и/или лабораторен синдром е част от инфекциозна болест, се нуждаем от допълнителни лабораторни имунологични изследвания и консултации. Но при епидемия, не е необходимо да се правят лабораторни имунологични изследвания и консултации. В такава ситуация усилията са насочени основно по овладяване на масовата заболяемост.

От друга страна трябва да се отчита и фактора време. Лабораторните изследвания имат задължително технологично време, с което трябва да се съобразяваме. Клиничните пътеки също са лимитирани във фактора време, с което пък лабораторните лекари и консултантите имунолози също трябва да се съобразяват. Това означава, че трябва като имунологични показатели да включим изискващите най-малко технологично време. Тук инфекционистите не могат да бъдат конкретни и да предлагат показатели, поради което водещо е мнението на имунолозите. Съобразяването с фактора време предлагаме да бъде препоръчано от Националните консултанти при преговорите с НЗОК и договори да се сключват само с лаборатории, които отговарят на необходимите ни за клиничната практика времеви изисквания.

ПРЕДЛОЖЕНИЯ

С оглед по-добрата и навременна диагноза и лечение на пациентите с инфекциозни заболявания, предлагаме набор от лабораторни имунологични показатели, съобразено с имунологичните стандарти и нуждите на инфектологията. Оптималният вариант е обемът да се детайлизира след консултация с клиничен имунолог, а когато е необходимо и с други специалисти (хематолози, патолози) което може да бъде написано в изискванията на инфекциозните клинични пътеки:

1. Флоуцитометричен анализ на лимфоцити и техните субпопулации
2. Стойности на имуноглобулини от клас А, Г, М, Е
3. Стойности на острофазови белтъци
4. Стойности на специфични и неспецифични автоантитела
5. Определяне на ревматоиден фактор (РФ)
6. Определяне на антистрептолизинов титър (АСТ)
7. Определяне на криоглобулини
8. Определяне на антинуклеарни антитела (АНА)
9. Определяне на антимитохондриални антитела (АМА)
10. Определяне на антигладкомускулни антитела (АГМА)
11. Определяне на антифосфолипидни антитела (АФА)
12. Определяне на антинеутрофилни цитоплазмени антитела (АНЦА)
13. Определяне на антитела към щитовидна жлеза (антитиреоглобулинови – ТАТ), антимицрозомални - МАТ), срещу тиреоидна пероксидаза – ТПО, срещу рецептор за тирео-стимулиращ хормон и др.)
14. Определяне на С-реактивен протеин (СРП)
15. Определяне на туморни маркери – СА 19-9, СЕА, СА 15-3, PSA, AFP, bHCG и др.
16. Определяне на антитела и антигени от вируси, бактерии (вкл. хламидии и микоплазми), паразити.

Разбираме, че това ще натовари финансово, с допълнителни разходи, стойността на клиничните пътеки. Подобни специализирани изследвания би трябвало да се правят в амбулаторен порядък, но по закон дори предполагаемо инфекциозно болни не могат да бъдат върнати за допълнително лабораторно доизясняване, така че специализираните (имунологични) лабораторни изследвания трябва да се изпълнят по време на болничния престой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Специалистите по инфекциозни болести и клинична имунология обсъдиха как чрез механизмите на здравето осигуряване да се приложат в клиничната практиката информативни, възпроизводими и съвременни имунологични лабораторни тестове, които да подпомогнат не само диагнозата, но и компетентното включване на имунотерапевтични средства в хода на лечението. Предложеният

оптимален имунологичен панел за оценка на настъпилите промени в имунната хомеостаза на макроорганизма в хода на инфекциозното заболяване е разработен въз основа на богатия професионален опит и съвременните научни постижения и би задоволил изискването за синхрон между полза и цена. Вярваме, че нашите предложения ще бъдат подкрепени от здравните институции в полза на пациентите.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Наредба № 21 от 24 юни 2010 г. за утвърждаване на медицински стандарт „Инфекциозни болести“.
2. Национален център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ). Епидемиологичен бюлетин (2016, 34-та седмица), 26 август 2016; http://www.ncipd.org/index.php?option=com_biuletin&view=view&month=34&year=2016&lang=bg
3. Илиев, Б. Инфектология, София: „Проф. М. Дринов“, 2001.
4. Наредба № 44 от 26 август 2010 г. за утвърждаване на медицински стандарт „Клинична имунология“.

СЪВРЕМЕННИ ВЪЗМОЖНОСТИ НА КЛИНИЧНАТА ИМУНОЛОГИЯ ЗА ДИАГНОСТИКА И МОНИТОРИНГ ПРИ НЯКОИ ИНФЕКЦИОЗНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

К. Плочев, М. Баймакова, Г. Попов, Р. Михайлова-Гарнизова, Е. Наумова

Разработеният материал има за цел да обобщи познанията, а от там и необходимостта от въвеждането в клиничната практиката на съвременни имунологични методи, с цел откриване на промени в макроорганизма на пациенти, боледуващи от циркулиращите в нашия географски регион заразни инфекциозни заболявания. Необходимо е да подчертаем, че не се касае за прилагане на тестове с цел етиологично уточняване на диагнозата. Втората ни цел е да обсъдим как чрез механизмите на здравното осигуряване да приложим в клиничната практиката на информативни, възпроизводими и съвременни имунологични лабораторни тестове, които да подпомогнат не само диагнозата, но и компетентното включване на имунотерапевтични средства в хода на лечението.

Най-разпространените инфекциозни заболявания за периода 2010–2016 г. на територията на РБ са:

Таблица 1. Инфекциозни заболявания през последните 6 години

НОЗОЛ. ЕДИНИЦА/ ЗАБОЛЯВАНЕ	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	ОБЩО
Грип/ОРЗ	112412	145151	125502	121993	136717	145389	88710	875 874
Варицела	19 344	26 969	27 277	37 869	22 423	25 020	24 706	183 608
Гастроентерит, ентероколит	18 736	20 091	20 626	19 099	19 193	19 312	12 576	129 633
Скарлатина	2 553	2 589	3 165	4 107	3 842	4 985	3 336	24 577

Остър вирусен хепатит АВСD	3 192	6 427	5 773	2 559	1 323	1 762	850	21 886
Ротавирусен гастроентерит	0	346	1560	1709	1861	1542	1300	8318
Салмонелоза	1121	868	691	654	638	895	333	5200
Дизентерия (шигелоза)	506	675	604	325	376	296	166	2948
Колиентерити – ешерихиози	536	460	347	258	305	332	226	2464
Лаймска болест	506	587	365	337	354	417	194	2760
Марсилска треска	463	405	364	387	335	203	173	2330

РЕГИСТРИРАНИ СА МИНИМАЛЕН БРОЙ ЗАБОЛЕЛИ ОТ: йерсиниоза, компилибактероза, коклюш, ку-треска, туларемия, вирусни менингити и менинго енцефалити, бактериални менингити и менингоенцефалити,

***HIV/СПИН и туберкулоза не са включен в този анализ, понеже се регистрират и отчитат по отделна наредба и указания.**

Източник: Национален център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ). Епидемиологичен бюлетин (2016, 34- та седмица), 26 август 2016; http://www.ncipd.org/index.php?option=com_biuletin&view=view&month=34&year=2016&lang=bg [2].

В материала са описани на основата на литературни данни, кои изследвания под формата на панел (алгоритъм) биха били полезни за оценка на настъпилите промени в имунната хомеостаза на макроорганизма в хода на острата фаза на заболяването. По наше мнение е уместно подобна оценка да се прави и в хода на реконвалесценцията (при контролните прегледи) с цел изписване на подходящо поддържащо имунолечение и в този етап на болестта.

В дискусиата авторите обсъждат оптималния обем имунологични изследвания, които биха задоволили изискването за синхрон между полза и цена.

Ключови думи: инфекциозни болести, клинична имунология, медицински стандарт, имунологични изследвания.

Адрес за кореспонденция:

проф. К. Плочев

Клиника по инфекциозни болести, ВМА – София

СЕКРЕТОРНИ ФАКТОРИ В СРЕДА ОТ КЛЕТЪЧНИ КУЛТУРИ, ИЗОЛИРАНИ ОТ GLIOBLASTOMA MULTIFORME, ОКАЗВАТ ВЛИЯНИЕ ВЪРХУ БРОЯ НА TREGS

*Калина Тумангелова-Юзеир¹, Екатерина Иванова-Тодорова¹,
Цветелина Великова¹, Емануил Найденов², Екатерина
Красимирова¹, Севдалин Начев³, Доброслав Кюркчиев¹*

¹Лаборатория по клинична имунология, УМБАЛ „Св. И. Рилски“,

Катедра по клинична лаборатория и клинична имунология, МУ – София,

²Клиника по неврохирургия, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ – София,

³Военномедицинска академия, Катедра по обща и клинична патологи – София

ВЪВЕДЕНИЕ

Glioblastoma multiforme (GBM) е най-често срещаният и най-агресивният от високостепенните глиални тумори на централната нервна система. Най-новите данни в научната литература сочат, че възникването му е свързано с мутации и „матурационен арест“, настъпващи в неврални стволови клетки и/или техни прогенитори, което води до формиране на туморни стволови клетки (ТСК) и впоследствие на GBM. Смята се, че именно ТСК са отговорни за неконтролируемия растеж и рецидивирането на този тумор [1, 2]. GBM е изключително устойчив на всички конвенционални терапии, като е установено, че той потиска имунната система както на локално, така и на системно ниво. Основна причина за това е привличането на различни имunosупресивни популации от тумора, като толерогенни дендритни клетки, myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), тумор-асоциирани макрофаги (TAM) и Т-регулаторни клетки (Tregs) [3, 4, 5, 6]. Установено е, че привлечените в туморното обкръжение Tregs винаги се откриват в близост до ефекторните Т-лимфоцити. Някои автори откриват и силна корелация между акумулацията на тези клетки и степента на малигненост на тумора [7, 8]. По този начин Т-клетките ефектори се оказват една от основните мишени на тумор-асоциираната имunosупресивна микросреда, като е установен механизъм за предизвикване на анергия в тях [9].

Предходни изследвания на нашия екип, проведени върху адхерентни клетъчни култури, изолирани от хистологично доказани GBMs, показват прилика на ТСК, с мезенхимни стволови клетки (МСК). Установено беше, че GBM клетъчните култури притежават характерната за МСК морфология и растат като прилепнали, фибробластоподобни клетки, притежават свойството *клоногенност*, достигат до остеогенна диференциация и секретират големи количества IL-6 и IL-8 (от изследвани 13 цитокина) [10]. Наред с това те експресират фенотипни маркери, характерни както за МСК (липса на експресия за CD34 и CD45 и голям процент

клетки, положителни за CD73, CD90, CD105, CD29, CD146), така и за TСК (голям процент от клетките показва експресия на Nestin, Sox2, GFAP и CD44) [11].

По отношение на способността на описаните клетки да регулират имунния отговор се счита, че този процес е свързан със секрецията им на цитокини. Напоследък има все повече данни в научната литература за влиянието на IL-6 върху различните субпопулации от Т-лимфоцити. Предишни данни, получени от нашия екип, показват, че супернатанти от GBM клетъчните култури потискат активацията на Т-клетки, изолирани от здрави донори, като смятаме, че IL-6 участва в процеса [10].

ЦЕЛ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО

Да се установи влиянието на супернатанти от GBM клетъчни култури върху две популации Tregs: CD4+CD25+FoxP3+ и CD4+CD25-FoxP3+ в състава на периферни кръвни мононуклеарни клетки (PBMCs), изолирани от здрави донори.

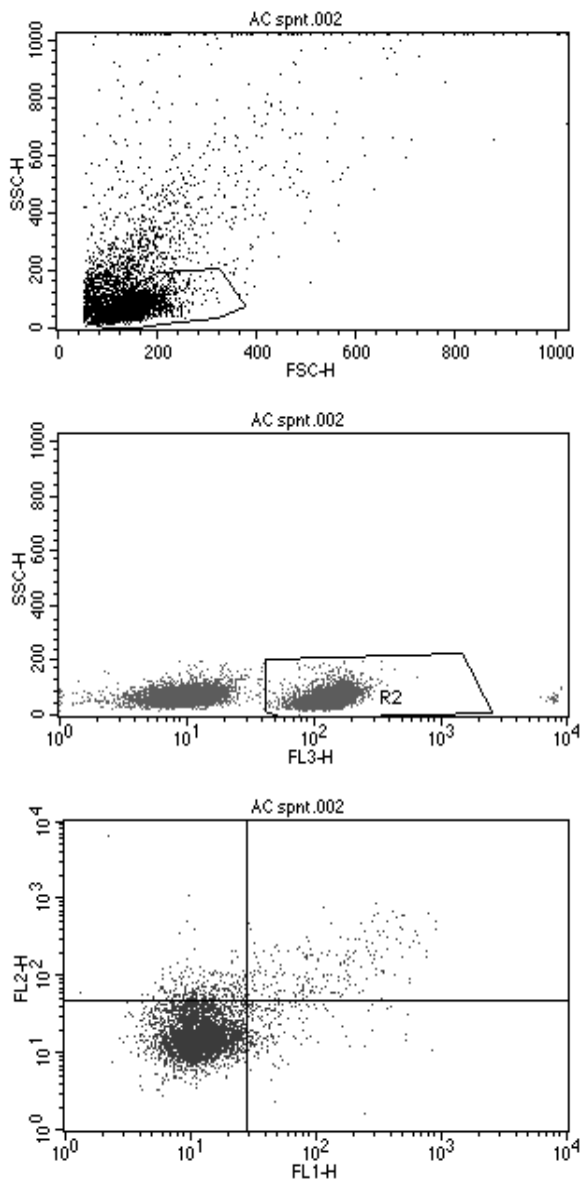
Да се изследва средата от култивираните със среда от GBM клетъчни култури PBMCs за секрецията им на IL-10.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Свежи материали от оперативно отстранени тумори при пациенти с хистологично доказана диагноза GBM ни бяха предоставени от Клиниката по неврохирургия към УМБАЛ „Св. Иван Рилски“. От тях по протокол разработен в Лабораторията по клинична имунология към УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, бяха изолирани и култивирани клетки, като супернатанти от получените клетъчни култури бяха събрани и замразени на -70°C [10]. За целта на настоящото изследване чрез фиколова сепарация бяха изолирани PBMCs от 8 здрави донори, които бяха култивирани със супернатанта от 8 клетъчни култури от GBM. Бяха заложени контролни клетки от същите донори с контролна среда. След 60 часа култивиране клетките бяха отделени, а супернатантите бяха събрани и замразени на -70°C за последващи изследвания. Флоуцитометрично беше изследвано влиянието на GBM средите върху две субпопулации Tregs: CD4+CD25+FoxP3+ и CD4+CD25-FoxP3+ (Фигура 1). Получените данни бяха обработени чрез програми CellQuest и WinMDI 2.

Средата на култивираните със супернатанта от GBM клетъчни култури PBMCs, както и на съответстващите им контроли, беше изследвана за секреция на IL-10 чрез ELISA метод. За целта беше използван търговски кит и при изработката му бяха спазени препоръките на производителя (Gen-probe Diaclone SAS, France).

Статистическият анализ на суровите данни беше извършен с програма Software package for statistical analysis (SPSS), IBM 2009, версия 19 (2010) и Excel (v. 2010). Използван беше непараметричен метод за свързани извадки на Wilcoxon.



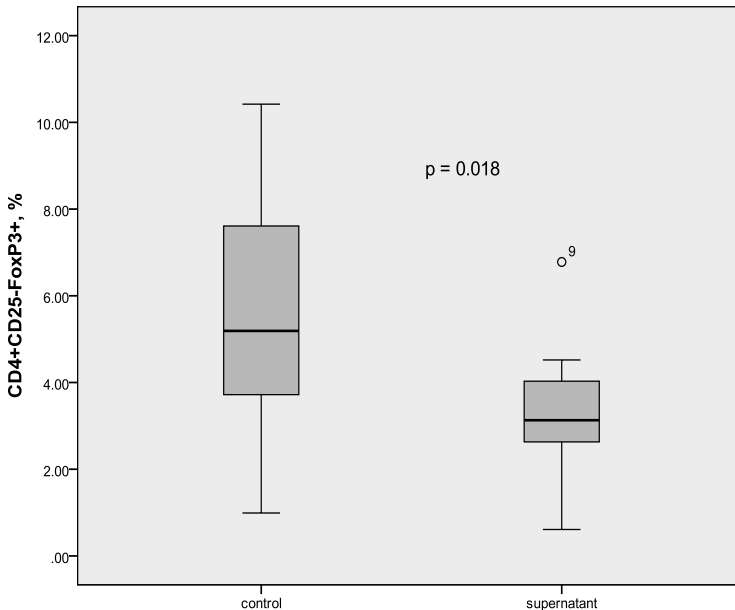
Фигура 1. Флуцитометрична платформа за анализ на Tregs

В най-горния флуцитометричен прозорец по R1 е селектиран лимфоцитният облак. Във втория прозорец в R2 са селектирани положителните по CD4 клетки. В горния десен квадрант на трети прозорец са представени CD25+FoxP3+ T-клетки, а в горния ляв – */CD25-FoxP3+.

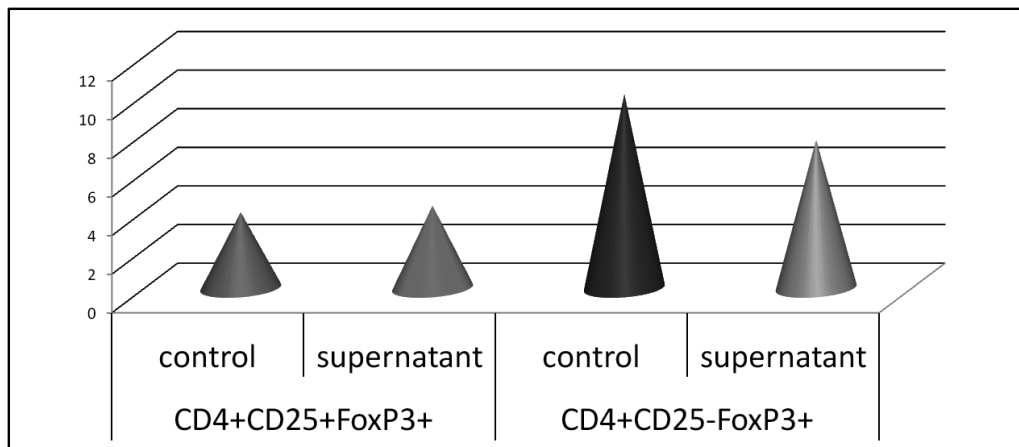
РЕЗУЛТАТИ

При изследване на влиянието на супернатанта от GBM клетъчни култури върху CD4+CD25+FoxP3+ Tregs беше установена тенденция към тяхното повишение. Средната стойност, получена за контролните клетки, беше 3,92% от CD4+ лимфоцити, докато за култивираниите със супернатанта от клетъчни култури от GBM беше 4,26%. При изследването на CD4+CD25-FoxP3+ субпопулацията на Tregs беше установено тяхното понижение след култивирането им със среда от GBM клетъчни култури. Процентът CD4+CD25-FoxP3+, отчетен при контролни клетки, беше средно 10,04% от CD4+ лимфоцити, докато при култивираниите със среда от GBM клетъчни култури беше 7,66%, като беше установена значима разлика $p=0,018$ (Фигура 2, Фигура 3 и Фигура 4).

Изследването на секрецията на IL-10 в среда от PBMCs, култивирани със супернатанта от клетъчни култури от GBM и контролни PBMCs, не показва разлики.

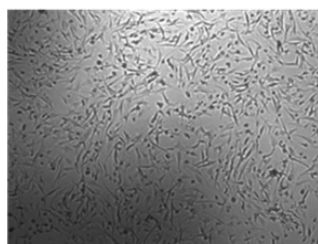


Фигура 2. Средни нива на процента CD4+CD25-FoxP3+ Tregs при контролни PBMCs и такива, третираны със среда от GBM клетъчни култури

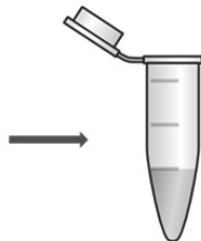


Фигура 3. Диаграма, отразяваща разпределението на двете изследвани популации Tregs при контролни PBMCs и PBMCs, третирани със супернатанта от GBM клетъчни култури

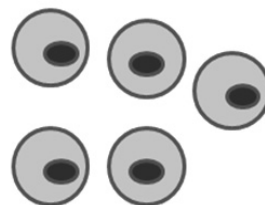
Влияние на супернатанта от GBM клетъчни култури върху Т-лимфоцити



Клетъчна култура от GBM



Супернатанта от GBM клетъчна култура (IL-6)



- > Намалена активация на Т-лимфоцити
- > Намален брой CD4+CD25-FoxP3+ Tregs
- > Тенденция към повишение на CD4+CD25+FoxP3+

Фигура 4. Влияние на супернатанта от GBM клетъчни култури върху Т-лимфоцитни субпопулации

ДИСКУСИЯ

Т-лимфоцитите са едни от основните участници в борбата на организма с туморни заболявания. Оказва се обаче, че туморната микросреда, и в частност тази на GBM, успява да модифицира имунния отговор на организма и да си

осигури благоприятни условия за развитие и растеж чрез привличане на имуносупресивни популации от клетки. Смята се, че една от тези популации са Tregs, като някои автори твърдят, че акумулацията на Tregs силно корелира със степента на малигненост на туморите [7, 8]. В настоящата постановка беше проведено изследване на влиянието на супернатанти от GBM клетъчни култури върху две субпопулации на Tregs, като беше установена тенденция към повишение на CD4+CD25+FoxP3+ Tregs и значимо намаляване на CD4+CD25-FoxP3+ Tregs.

Предишно изследване на нашия екип относно способността за активация на Т-лимфоцити, изолирани от здрави донори, след култивирането им със супернатанта от GBM клетъчни култури показва нейното намаление. Това води до извода, че фактор (фактори), секретирани от GBM клетъчни култури, води до супресия на ефекторната Т-лимфоцитната популация. Наред с това резултатите, които описваме тук, разкриват, че секреторен фактор повлиява CD4+CD25+FoxP3+, както и води до явно понижение на CD4+CD25-FoxP3+ субпопулацията на Tregs. За промените в броя на двете субпопулации Tregs обяснение може да даде съществуващата хипотеза, според която CD4+CD25-FoxP3+ представляват резервоар за формирането на класическата популация CD4+CD25+FoxP3+ на Т-регулаторните клетки [12]. Следователно може да се изкаже предположение за наличие на фактор/и в изследваните среди от GBM клетъчни култури, който предизвиква преминаването на отрицателната по CD25 популация в класически Tregs.

По отношение на секреторния фактор, отделян от GBM клетъчните култури, предходни опити на нашия екип показват наличие на IL-6, за който се знае, че активира Stat3 както в туморните клетки, така и в клетките на имунната система, включително и в Т-лимфоцити [13]. Както вече беше споменато, изолираните и култивирани от нашия екип GBM клетки показват характеристики на МСК. За МСК е известно, че също секретират IL-6, като дори има спекулации за участието му в генерирането на Tregs [14]. Съществуват и алтернативни мнения, които сочат, че IL-6 има и друго действие, свързано с Tregs – Dominitzki, et al. твърдят, че този цитокин води до частично инхибиране на Tregs при миши модел [15]. Проучвания върху автоимунни заболявания също така описват IL-6 като цитокин, блокиращ Tregs формирането [16]. Необходими са допълнителни изследвания, за да се изясни влиянието на този цитокин при малигнени заболявания.

Известно е, че Tregs имат способността да секретират IL-10 и по този начин да потискат ефекторните Т-клетки. По тази причина супернатантите на PBMCs, култивирани със среда от GBM клетъчни култури, бяха изследвани за секрецията на този цитокин. Резултатите ни обаче показаха липса на разлика в секрецията на IL-10 при контролните PBMCs и тези, култивирани в среда от GBM клетъчни култури.

TGF β е друг основен цитокин, който, наред с това, че насочва CD4+CD25-наивни Т-клетки към диференциация в Tregs, е и фактор, свързан с Treg инхибиращото действие. Ето защо супернатантите от GBM клетъчни култури бяха изследвани за наличие на TGF β , но наличието на цитокина беше установено в

много ниски концентрации. Твърде ниското ниво на последния цитокин в супернатанти от GBM клетъчни култури и слабо повишение на CD4+CD25+FoxP3+ най-вероятно говори за липса на фактор, индуциращ Tregs в супернатанти от GBM култури, или поне, че той не е TGF β . В тази посока са и нашите резултати, показващи липсата на разлика в нивата IL-10 в супернатанти от PBMCs, култивирани със среда от GBM култури и контролните клетки. Както сочат част от литературните източници, наличието на Tregs в туморната микросреда най-вероятно се дължи на привличането им и на индуцирането им при взаимодействие с дендритни клетки [8, 17], които не фигурират в нашата опитна постановка. От друга страна, статистически значимото намаление на CD4+CD25-FoxP3+ и макар и несигнификантното увеличение на CD4+CD25+FoxP3+ би могло да се тълкува в посока, че под влияние на фактор, секретирани от GBM клетъчните култури, CD25 негативната популация на Tregs се трансформира в CD25 положителна и следователно секреторни фактори от туморните клетки участват в Treg формирането.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Glioblastoma multiforme е едно от заболяванията, представляващо огромно предизвикателство пред съвременната медицина. Получените от нашия екип резултати водят до извода, че фактор/и секретирани от GBM клетъчни култури, намаляват броя на CD4+CD25-FoxP3+ и увеличават несигнификантно CD4+CD25+FoxP3+ Tregs, като успоредно не се установява увеличена IL-10 секреция от PBMCs. Получените резултати сякаш не съответстват на общите представи за имunosупресивни механизми, осъществявани от GBM. Данните обаче дават възможност и за алтернативно тълкуване, свързано с повишено образуване на „класически“ Tregs за сметка на техния резерв – CD4+CD25-FoxP3+ клетки. Предполагамият фактор, който упражнява този ефект, според нашия екип най-вероятно е IL-6, чиято секреция беше установена в голямо количество в изследваните супернатанти от GBM клетъчни култури.

Двете възможни хипотези водят до извода, че все още много от механизмите, случващи се в туморната микросреда, са неясни и че е необходимо провеждането на още изследвания, за да бъдат опознати.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Agnihotri S, et al. (2011) Brain Tumor-initiating Cells and Cells of origin in glioblastoma. *Translational Neuroscience*, 2(4), 331–338.
2. Bachoo RM, et al. (2002) Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: Convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis. *Cancer Cell*, 1, 269–277.
3. Fecci PE, et al. (2006) Increased regulatory T-cell fraction amidst a diminished CD4 compartment explains cellular immune defects in patients with malignant glioma. *Cancer Res.* 66(6): 3294–3302.
4. Ogden AT, et al. (2006) Defective receptor expression and dendritic cell differentiation of monocytes in glioblastomas. *Neurosurgery*, 59:902–910.

5. Sampson JH, et al. (2010) Immunologic escape after prolonged progression-free survival with epidermal growth factor receptor variant III peptide vaccination in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J. Clin. Oncol.*, 28:4722–4729.
6. Abe BT, Macian F (2013) Uncovering the mechanisms that regulate tumor-induced T-cell anergy. *OncImmunology*; 2:e22679.
7. Grauer OM, et al. (2007) CD4+FoxP3+ regulatory T-cells gradually accumulate in gliomas during tumor growth and efficiently suppress antiglioma immune responses in vivo. *Int. J. Cancer*, 121(1), 95–105.
8. Jacobs JFM, et al. (2009) Regulatory T-cells and the PD-L1/PD-1 pathway mediate immune suppression in malignant human brain tumors. *Neuro Oncol.* 11(4), 394–402.
9. Staveley-O'Carroll K, et al. (1998) Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95:1178–83.
10. Тумангелова-Юзеир К и др. (2015) Периферни кръвни мононуклеарни клетки, изолирани от здрави хора, показват намалена способност за активация след култивиране със среда от клетъчни култури, получени от глиобластома мултиформе. *Годишник на Българска асоциация по клинична имунология 2014*, с. 48–57.
11. Kyurkchiev D, et al. (2016) Stem- Like Adherent Cells Isolated and Cultured from Glioblastoma Multiforme, *Avidscience*, 1–22.
12. Yan B and Liu Y (2009) The nature of increased CD4+CD25-FoxP3+ T-cells in patients with Systemic lupus erythematosus: a novel hypothesis. *The Open Rheumatology Journal*, 3:22–24.
13. Yu H, et al. (2007) Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol*, 7:41 –51.
14. Ivanova-Todorova E, et al. (2012) Conditioned medium from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells induces CD4+FOXP3+ cells and increases IL-10 secretion. *J Biomed Biotechnol*: 295167.
15. Dominitzki C, et al. (2007) Cutting Edge: +CD25Trans- T-Cells Signaling via the Soluble IL-6R Abrogates the Induction of FoxP3 in Naïve CD4+CD25- T-cells, *J Immunol* 2007; 179:2041–2045.
16. Kimura A and Kishimoto T (2010) IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *Eur. J. Immunol*, 40:1830–1835.
17. Francisco L, et al. (2009) PD1-L regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T-cells. *J. Exp. Med.*, 206:3015–3029.

**СЕКРЕТОРНИ ФАКТОРИ В СРЕДА ОТ КЛЕТЪЧНИ КУЛТУРИ,
ИЗОЛИРАНИ ОТ GLIOBLASTOMA MULTIFORME,
ОКАЗВАТ ВЛИЯНИЕ ВЪРХУ БРОЯ НА TREGS**

*Калина Тумангелова-Юзеир, Екатерина Иванова-Тодорова, Цветелина Великова,
Емануил Найденов, Екатерина Красиминова, Севдалин Начев,
Доброслав Кюркчиев*

Glioblastoma multiforme (GBM) е един от най-често срещаните и агресивни тумори на ЦНС, който предизвиква както локална, така и системна имunosупресия. Съвременни данни сочат, че той най-вероятно произхожда от неврални стволови клетки след настъпил в тях матурационен арест. **Цел на изследването:** Да се установи влиянието

на супернатанти от клетъчни култури, изолирани от GBM върху T-клетки в състава на периферни кръвни мононуклеарни клетки (PBMCs), изолирани от здрави донори. Да се изследва супернатанта от PBMCs, култивиран със среда от GBM клетъчни култури за секреция на IL-10. **Материали и методи:** PBMCs, изолирани от 8 здрави донори, бяха култивирани със супернатанти от 8 клетъчни култури от GBM. Впоследствие беше изследвано влиянието на супернатанта от клетъчните култури върху броя на две субпопулации на T-регулаторните лимфоцити (Tregs): CD4+CD25+FoxP3+ и CD4+CD25-FoxP3+. Като контрола бяха използвани PBMCs от същите донори, поставени в контролна среда. Супернатантите от PBMCs, култивирани със среда от GBM клетъчни култури, бяха изследвани и за секреция на IL-10. **Резултати:** Изследването на влиянието на супернатанта от GBM клетъчни култури върху броя на CD4+CD25+FoxP3+ Tregs показва тенденция към тяхното повишение, докато при CD4+CD25-FoxP3+ беше установено значимо намаление. Не беше установена разлика в количеството на IL-10 между PBMCs, култивирани със среда от GBM клетъчни култури, и клетките, култивирани в контролна среда. **Заключение:** Предишни наши резултати сочат, че супернатантът от GBM клетъчни култури потиска активацията на T-лимфоцити, изолирани от здрави донори, а с настоящото изследване установяваме, че тя води и до значимо намаление в броя на CD4+CD25-FoxP3+ Tregs. Предполагамият фактор, който упражнява този ефект, според нашия екип най-вероятно е IL-6, чиято секреция беше установена в голямо количество в изследваните супернатанти от GBM клетъчни култури при предходни наши изследвания.

Ключови думи: Glioblastoma multiforme, Tregs, IL-6, IL-10.

Адрес за кореспонденция:

Калина Тумангелова-Юзеир

Лаборатория по клинична имунология, УМБАЛ „Св. И. Рилски“,

бул. „Акад. Иван Евст. Гешов“ 15

София

SECRETORY FACTORS IN THE MEDIUM OF GBM CELL CULTURES AFFECT THE NUMBER OF TREGS

*Kalina Tumangelova-Yuzeir, Ekaterina Ivanova-Todorova, Tsvetelina Velikova,
Emanuil Naydenov, Ekaterina Kurteva,
Sevdalin Nachev, Dobroslav Kyurkchiev*

Glioblastoma multiforme (GBM) is one of the most common and aggressive tumor of CNS which causes local and systemic immune suppression. Recent data show that GBM arises from neural stem cells after maturation arrest of differentiation. Aim of the study: To determine the effect of supernatants from cell cultures isolated from GBM on T-cells in the pool of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), isolated from healthy donors. Additional aim was the medium of PBMCs cultured with supernatant of GBM cell cultures to be tested for secretion of IL-10. Materials and Methods: PBMCs isolated from 8 healthy donors were cultured with 8 supernatants from GBM cell cultures. Subsequently we investigated the effect of these supernatants on the percentage of two T-regulatory cells subpopulations

(Tregs): CD4+CD25+FoxP3+ and CD4+CD25-FoxP3+. PBMCs delivered from the same donors and cultured with control medium were used for control of the study. The supernatants from PBMCs cultured with medium from GBM cell cultures were investigated for presence of IL-10. Results: The study about the influence of GBM cell cultures medium on the number of CD4+CD25+FoxP3+ Tregs demonstrated a tendency for their upregulation. For CD4+CD25-FoxP3+ subpopulation we found a significant decrease of their percentage under the influence of GBM culture medium. There was no difference between the amounts of IL-10 detected in PBMCs, cultured with medium from GBM cell cultures and the control cells. Conclusion: Previous results of our team showed that medium from GBM cell cultures suppress the activation of T-lymphocytes isolated from healthy donors. The present study concludes that this medium leads to statistically significant decrease of the number of CD4+CD25-FoxP3+ Tregs. The supposed factor that exerts this effect in the view of our team is IL-6, which secretion was found in large quantities in the GBM cell cultures supernatants.

Keywords: Glioblastoma multiforme, Tregs, IL-6, IL-10.

Contact address:

Kalina Tumangelova-Yuzeir

Laboratory of Clinical Immunology, University Hospital „St. I. Rilski“

15 Acad. Ivan Evst. Geshov bul.

Sofia

ФЕНОТИПНИТЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ЧОВЕШКАТА КРЪВ ОТ ПЪПНА ВРЪВ ДЕМОНСТРИРАТ НЕЗРЯЛОСТ НА НЕОНАТАЛНАТА ИМУННА СИСТЕМА

Валентина Атанасова¹, Анжела Антонова¹, Анастасия Михайлова^{1,2}, Елисавета Наумова^{1,2}

¹ УМБАЛ „Александровска“ ЕАД – София,

Клиника по клинична имунология с банка за стволови клетки

*² Катедра по клинична лаборатория и клинична имунология,
Медицински университет – София*

ВЪВЕДЕНИЕ

Проучванията с използване на кръв от пъпна връв (КПВ) демонстрират количествени и качествени различия в имунните клетки в сравнение с възрастните, както и недостатъчно ефективен имунен отговор на новородените към бактериални и вирусни антигени [1]. Въпреки че трансплацентарно преминалите майчини антитела допринасят за ранна защита срещу патогенни организми, новородените са силно податливи на инфекции. Неонаталната имунна система съзрява бързо през първите три месеца, но непълни [2, 3] имунни отговори могат да се наблюдават до 18-месечна възраст. Проучването на разпределението и фенотипното характеризиране на имунните клетки в умбиликална кръв може да допринесе за разширяване на познанията ни за нормалното развитие на имунната система от раждането, което е от особена важност при лечение на деца с имунни разстройства.

Ето защо оценихме клетъчния имунен профил на новородени от българската популация чрез изследване на Т-лимфоцити и техните субпопулации, В- и НК клетки и експресията на специфични антигени на диференциация, съзряване и активация върху клетките в кръв от пъпна връв.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Материал

В проучването бяха включени 72 единици кръв от пъпна връв, дарени на Националната публична донорна банка за стволови клетки, УМБАЛ „Александровска“, София, след подписване на информирано съгласие от здрави бременни жени. Патологични и рискови бременности бяха изключени от проучването. Етническата принадлежност на всички новородени донори бе от българската популация (майка и биологичен баща). Дарената кръв от пъпна връв беше събрана при безпроблемно раждане (вагинално или цезарово сечение) на доносни бебета (между 37-а и 41-ва гестационна седмица), етикетирана, опакована и транспортирана съгласно утвърдените стандартни оперативни процедури на Националната публична донорна банка за стволови клетки.

Флоуцитометричен анализ

Т- и В-лимфоцити, Т-клетъчни субпопулации и НК клетки са изследвани чрез директна 6-цветна имунофлуоресценция (BD Multitest 6-color TBNK, BD Biosciences). Допълнително чрез комбинация на различни маркери и многоцветна имунофлуоресценция е направена комплексна имунофенотипна характеристика на клетките в КПВ. За целта е използван набор от моноклонални антитела, включващ: CD45-APC-Cy7, CD34-PerCP-Cy5,5, HLA-A,B,C-FITC, CD38-PE-Cy7, CD4-FITC/CD25-PE/CD3-PerCP, HLA-DR-FITC, CD117-PE, $\alpha\beta$ TCR-FITC/ $\gamma\delta$ TCR-PE/CD3-PerCP (BD Bioscience); CD45RA-FITC, CD45RO-PE (BD Pharmingen); HLA-DR-PerCP, CD117-APC (Invitrogen); CD133/2-APC (Miltenyi Biotec); CD90-PE (Beckman Coulter). Събирането и анализът на данните е извършен с флоуцитометър FACSCanto II. Абсолютните стойности на изследваните имунни клетки са определяни чрез индиректен (двойна платформа) и директен метод (единична платформа, BD Trucount Tubes и автоматичен софтуер FACSCanto).

Статистически методи

Данните са обработени със статистическия пакет IBM SPSS Statistics 16.0. Приложени са следните методи: дескриптивен анализ, вариационен анализ, критерий на Шовене, тест на Колмогоров – Смирнов и непараметричен тест на Шапиро – Уилк, Т-критерий на Стюдънт, непараметричен тест на Ман – Уитни, графичен анализ. За оценка на корелационните зависимости е използван корелационен коефициент на Пирсън. За ниво на значимост е прието $p < 0,05$.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Определяне на референтни граници за Т-, В- и НК клетки на българските новородени при раждането

При определянето на референтните граници бяха следвани насоките на актуализирания документ С28-А3 и препоръчвания протокол на IFCC (Международна федерация по клинична химия) и CLSI (Институт за клинично-лабораторни стандарти) [4]. Определянето на референтната група беше извършено чрез предварителен подбор на донорите (a priori). Тестът на Колмогоров – Смирнов показва Гаусово разпределение на всички изследвани променливи, с изключение на двойно положителните (CD3+CD4+CD8+) Т-лимфоцити. Референтните стойности на общите Т-клетки (CD3+), В-клетки (CD19+), НК клетки (CD3-CD16/CD56+), хелперно-индусерни (CD3+CD4+) и супресорно-цитотоксични (CD3+CD8+) Т-лимфоцити, CD4/CD8 индекс и двойно положителни Т клетки в изследваните проби КПВ са представени в Таблица 1. Референтните интервали на абсолютните стойности за тези популации са представени в Таблица 2.

Таблица 1. Референтни стойности на лимфоцитните популации и субпопулации в кръв от пъпна връв, получена от здрави доносени бебета

Популация, %	Min	Max	Mean \pm 2SD
CD3+	38,70	81,50	62,27 \pm 19,28
CD3+CD8+	8,97	28,04	16,65 \pm 9,08
CD3+CD4+	22,48	60,33	44,88 \pm 16,42
CD3-CD16&56+	4,72	39,60	17,27 \pm 16,80
CD19+	4,81	34,80	17,47 \pm 10,92
CD4/CD8	1,18	5,21	2,86 \pm 1,64

Таблица 2. Абсолютен брой ($\times 10^9/L$) на левкоцити, лимфоцити, Т-, В-, НК клетки и Т-клетъчни субпопулации при новородени в момента на раждането

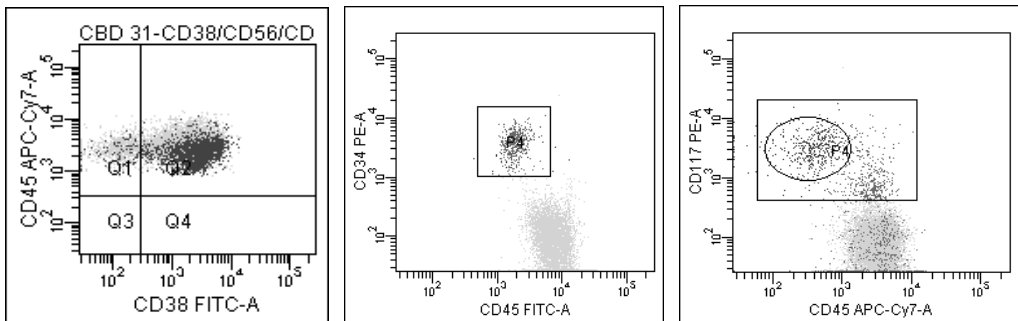
Абс. брой	левкоцити	лимфоцити	CD3+	CD3+CD8+	CD3+CD4+	CD3+CD4+CD8+	CD3-CD16&56+	CD19+
mean	9,404	3,085	1,939	0,520	1,397	0,028	0,569	0,570
median	8,850	2,848	1,770	0,470	1,284	0,018	0,411	0,542
P5	3,625	1,219	0,778	0,203	0,563	0,005	0,146	0,142
P95	18,450	7,101	4,101	1,206	3,155	0,147	1,764	1,715

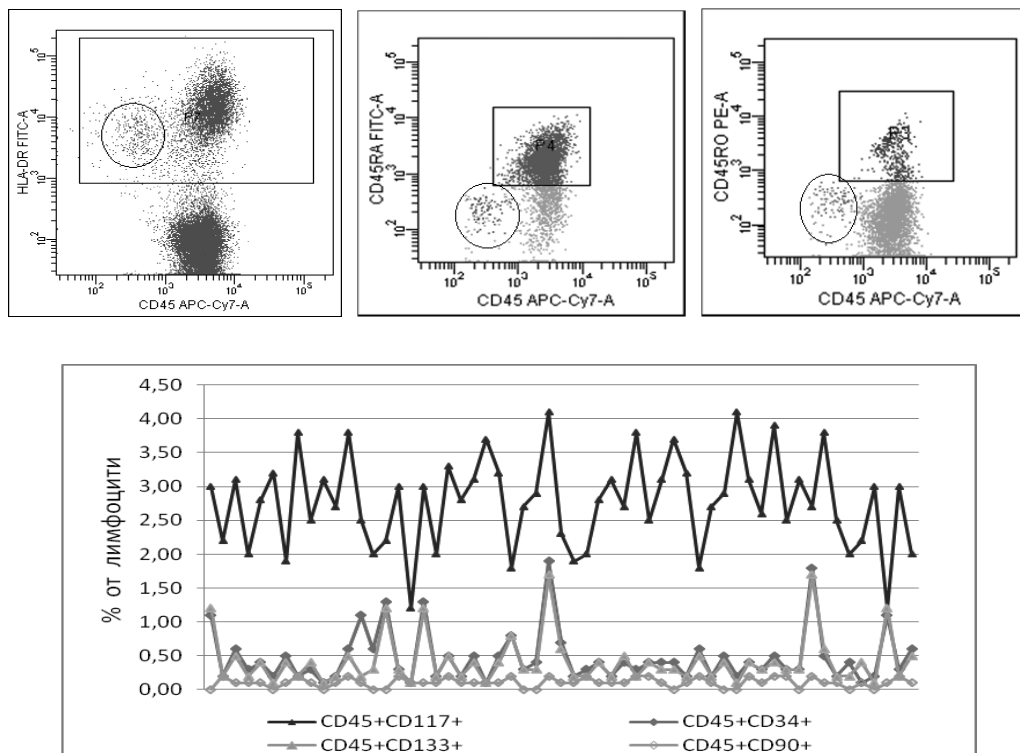
Данните в литературата за количествено определяне на лимфоцитните популации в КПВ са оскъдни, което, едновременно с различията от генетичен произход, правят сравненията трудни. По този начин референтните интервали, определени от едни проучвания, не биха били приложими за хора с различни популационни особености, независимо от това дали се използват съпоставими методи за анализ. От друга страна, повечето проучвания са лимитирани от малкия размер на извадката. Тази тенденция често се наблюдава в публикуваните резултати от обширни проучвания, които обхващат голям брой възрастови групи [5,6]. Нашите данни не показаха сигнификантни разлики в стойностите на В-клетките спрямо получените при други проучвания [7,8], но разпределението на Т- и НК клетките в изследваните от нас проби показва значими различия в сравнение със същите, получени в Холандия [7], Италия [9] и Турция [8]. Наблюдаваните несъответствия между резултатите от отделните проучвания биха могли да се дължат на особеностите на генофонда или на фактори на околната среда, както и на разлики в методологията и/или вариации между различните апарати.

Експресия на повърхностни антигени от лимфоцитите и от CD34+ клетки в КПВ

T-клетките като част от придобития имунитет вероятно играят по-малка роля в имунния отговор на новороденото. Трябва да се има предвид обаче, че положителните за $\gamma\delta$ T-клетъчен рецептор (TCR) T-лимфоцити често се описват като незряла или примитивна субпопулация, която се развива рано по време на онтогенезата [10,11] и представлява „мост“ между вродения и придобития имунитет [12]. Счита се също, че $\gamma\delta$ T-клетките са една от първите линии на защита срещу бактериални инфекции [10,11]. Ние установихме, че делът на T-клетките с $\alpha\beta$ (97,29±1,32%) и $\gamma\delta$ (2,31±1,29%) TCR в КПВ беше сходен с този в кръвта на възрастни. CD25 (алфа субединицата на IL-2 рецептора) участва в ранните етапи на клетъчно активиране, но е важна и в поддържане на автотолеранс и имунната хомеостаза. Известно е, че CD4+CD25^{high} включват регулаторните T-клетки (Treg). Активирането им чрез TCR генерира неспецифични супресорни клетки, потискащи активацията на CD4+ или CD8+ T-клетки [13]. В настоящото проучване бяха намерени около 4% (4,17±0,71%) CD4+CD25^{high} T-лимфоцити. Ролята на Treg от кръв от пъпна връв се обсъжда активно през последните години. Обнадеждаващи са резултатите от клинично прилагане на адоптивна терапия с Treg от КПВ при трансплантация на хемопоетични стволови клетки за намаляване риска от GVHD [14]. Въпреки наличните данни, че тези клетки са активни в ключови патофизиологични процеси при трансплантация, са необходими допълнителни проучвания, за да се изясни точното им значение.

Ранните антигени на диференциация, чиято експресия беше проучена върху лимфоцитите, се използват за фенотипно дефиниране на незрели имунни клетки. Както се вижда от Фигура 1, маркерите CD34 и CD133 показват почти еднакви профили на експресия, а CD90 се установява в ниски нива и при не повече от 0,2% от лимфоцитите.





Фигура 1. Експресия на маркерите CD38, CD34, CD117, HLA-DR, CD45RA и CD45RO от лимфоцитите (CD34+ клетки са в овален електронен прозорец); Диаграма на резултатите в изследвани проби кръв от пъпна връв

Наблюдаван е характерен профил на експресия на CD117. Лимфоцити с висока експресия на CD45 (CD45^{high}) имат по-ниски нива на CD117, докато клетките с ниски нива на CD45 (CD45^{low}), включващи CD34⁺ клетки, имат по-висока експресия на този маркер. Нашите резултати показват, че много висок процент ($94,53 \pm 1,56\%$) от лимфоцитите експресират маркера CD38. Също така $18,04 \pm 5,78\%$ са положителни за HLA-DR, средната стойност за лимфоцитите, експресиращи CD45RA е $63,58 \pm 9,8\%$, а за CD45RO процентът е нисък ($5,1 \pm 1,42\%$).

При изследването на хетерогенната популация на CD34⁺ стволови/прогениторни клетки нашите анализи позволиха определянето на имунния им фенотип с възможност за дефиниране на най-примитивните представители на хематопоеичните клетки в кръв от пъпна връв. Резултатите от проучването на експресията на CD133, CD38, HLA-DR, CD117, CD90, CD45RA и CD45RO върху популацията на CD34⁺ клетки са представени в Таблица 3.

Таблица 3. Експресия на CD38, CD133, CD117, CD90 и HLA-DR от CD34+ клетки в КПВ

Популация, %	Min	Max	Mean± SD
CD34+CD133+	75,0	100	91,86 ± 6,73
CD34+CD38+	95,4	100	99,51 ± 1,07
CD34+HLADR+	67,3	100	93,83 ± 5,79
CD34+CD117+	67,3	100	90,57 ± 6,43
CD34+CD90+	0,0	30,2	16,94 ± 6,89

Нашите данни показват фенотипни специфичности на лимфоцитите в КПВ, които се различават от характерните за имунните клетки в кръвта на възрастни. Липсата на адаптивен имунитет при новородените се изразява в преобладаване на CD45RA+ наивни лимфоцити и ниски стойности на клетките, експресиращи CD45RO изоформата, която се приема за маркер за паметови клетки. Съвременни проучвания описват хематопоеичните стволови клетки (ХСК) в КПВ с отсъствие на експресия на CD45RA [15]. В съответствие с гореизложеното: в изследваните от нас проби не беше открита експресия както на CD45RA, така и на CD45RO върху CD34+ клетки. Резултатите показаха характерен профил на експресия на CD117 от лимфоцитите, както и наличието му върху над 90% от CD34+ клетки. CD117 (c-kit) е протоонкоген, кодиращ трансмембранен рецептор, който играе ключова роля в хемопоезата [16]. В човешкия костен мозък и кръв от пъпна връв CD117 се експресира върху хематопоеичните стволови и ранните миелоидни прогениторни клетки и е низходящо регулиран по време на узряването, с изключение на мастните клетки [17]. CD117 участва в сигнализацията, активирането и пролиферацията на клетките [18].

Антигенът CD133 (AC133 или Prominin-1) е молекула, експресирана върху примитивните човешки стволови клетки на хематопоеичната, ендотелната и невронната линия [19,20,21]. Нашите анализи сочат, че над 91% от CD34+ клетки са положителни за маркера CD133. Молекулата CD133 не е хомоложна с описаните повърхностни антигени на ХСК и има бърза низходяща регулация при диференциране на човешките ХСК във фенотипно рестриктирани клетки [22].

Счита се, че в кръвта от пъпна връв CD34+CD90+ клетките притежават висок клоногенен капацитет и потенциал за експанзия [23]. Нещо повече, антигенът CD90 (или Thy-1) е сред маркерите, които са включени във фенотипа на хематопоеичните стволови и прогениторни клетки в КПВ [15]. В анализите от нас проби беше установено, че средно 17% от CD34+ клетки са положителни за този маркер.

Съществуват важни различия между популациите CD34+CD38+ и CD34+CD38- в кръвта от пъпна връв и в костния мозък, като липсата на CD38

експресия се приема като маркер за по-незрели хемопоеични прогенитори. Ние установихме, че над 99,5% от CD34+ са положителни за CD38, което е в съответствие с констатациите на други автори [24], за преобладаване на фенотип на по-зрели прогенитори в КПВ на доносени бебета. От друга страна, има данни, че и двете популации (CD34+CD38+ и CD34+CD38-) от КПВ пролиферират по-бързо в отговор на цитокинова стимулация *in vitro*, в сравнение със същите от костния мозък [25, 26, 27]. По-бързото начало на пролиферация *in vitro* отчасти се дължи на по-големия им процент в КПВ *in vivo* и на големия капацитет на клетките в покой, реагиращи на стимулация. Не само CD34+38- клетките от КПВ се размножават *in vitro*, но и всяка клетка (независимо дали е CD34+CD38+, или CD34+CD38-) може да генерира повече потомство от съответната клетка в костния мозък [28].

Имунният фенотип, който обикновено се използва за идентифициране на хематопоетичните стволови клетки в костен мозък, не се прилага за КПВ. Клетките CD34+ в костния мозък с ниска или липсваща експресия на антигена HLA-DR са източник на примитивни клетъчни колонии с висок пролиферативен потенциал [29,30]. Обратно, в кръвта от пъпна връв субпопулацията на CD34+HLA-DR+ клетки е по-примитивна от популацията CD34+HLA-DR- [28]. Според нашите данни 18,04±5,78% от лимфоцитите в КПВ експресират HLA-DR, а процентът на CD34+ клетки, експресиращи HLA-DR, е много висок (над 93%). Този резултат ни дава основание да предположим, че в рамките на хетерогенната популация на CD34+ клетки доминира по-примитивната субпопулация.

Имунният фенотип и функционалните особености на клетките в КПВ са предпоставка за различното им поведение в отговор на антигенни стимули, в сравнение с клетките в периферна кръв на възрастни. Нашият опит за комплексно характеризирание на лимфоцитите разкри възможност за цялостен поглед върху състава на имунните клетки в кръвта от пъпната връв. Характеризирането на малобройната хетерогенна популация на CD34+ клетки показва, че тази популация съдържа голям процент примитивни клетки, притежаващи висок клоногенен капацитет и потенциал за експанзия.

В заключение, проучването на разпределението на клетъчните популации в КПВ на здрави доносени бебета допълва познанията ни за нормалното развитие на имунната система от раждането. За първи път у нас са предоставени референтни интервали за Т- и В-лимфоцити, НК клетки, хелперно-индусерни и супресорно-цитотоксични Т-клетки в кръвта на доносени бебета от българската популация, които имат потенциал за широко приложение в рутинната медицинска практика при оценка на свързаните с възрастта разлики в клетъчния имунитет, както и при диагностиката на първични и вторични имунни дефицити. Получените данни за абсолютния брой на белите кръвни клетки също могат да послужат за основа при определяне на референтни стойности на левкоцитите в КПВ.

Извършеното комплексно фенотипизиране на имунните клетки в кръв от пъпна връв показва експресия на някои ранни фенотипни маркери, което вероятно дава отражение върху функционалните им особености. Установените от нас:

преобладаване на клетки с наивен фенотип, експресия на CD38 (маркер за нестимулирани Т- и В-клетки) при повече от 90% от лимфоцитите и преобладаване на CD34+ фенотип с висок клоногенен капацитет, потвърждават констатациите за незрялост на неонаталната имунна система и допринасят за разширяване на познанията ни за имунобиологията на клетките в КПВ.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Basha S, Surendran N, Pichichero M. Immune responses in neonates. 2014 September; 10(9):1171–1184.
2. Vosters O, Lombard C, Andre F, Sana G, Sokal EM, Smets F. The interferon-alpha and interleukin-10 responses in neonates differ from adults, and their production remains partial throughout the first 18 months of life. *Clinical and experimental immunology*. 2010; 162(3):494–499.
3. Chen L, Cohen AC, Lewis DB. Impaired allogeneic activation and T-helper 1 differentiation of human cord blood naive CD4 T cells. *Biology of blood and marrow transplantation: journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2006; 12(2):160–171.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. Defining, establishing and verifying reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline, 3rd ed. CLSI document C28-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008; 28(30):pp 61.
5. van Gent R, et al. Refined characterization and reference values of the pediatric T- and B-cell compartments. *Clin Immunol*, 2009; 133:95–107.
6. Comans-Bitter WM, de Groot R, van den Beemd R, et al. Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations. *J Pediatr*, 1997; 130:388–393.
7. de Vries E, et al. Longitudinal survey of lymphocyte subpopulations in the first year of life. *Pediatr Res*, 2000; 47:528–537.
8. Ikinciogullari A, Kendirli T, Dogu F, et al. Peripheral blood lymphocyte subsets in healthy Turkish children. *The Turkish Journal of Pediatrics*, 2004; 46:125–130.
9. D'Arena G, et al. Flow cytometric characterization of human umbilical cord blood lymphocytes: immunophenotypic features. *Haematologica*, 1998; 83(3):197–203.
10. Konigshofer Y, Chien YH. $\gamma\delta$ cells-innate immune lymphocytes? *Curr Opin Immunol*. 2006;18:527–533.
11. Xiong N, Raulet DH. Development and selection of $\gamma\delta$ T cells. *Immunol Rev*. 2007;215:15–31.
12. Beetz S, Wesch D, Marischen L, et al. Innate immune functions of human $\gamma\delta$ T-cells. *Immunobiology*.2008; 213:173–182.
13. Shevach EM. CD4 + CD25 + Suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2:389–402.
14. Brunstein CG, Miller JS, McKenna DH, et al Umbilical cord blood-derived T regulatory cells to prevent GVHD: kinetics, toxicity profile, and clinical effect. *Blood* 2016. 127(8):1044–1051.
15. Majeti R, Park CY, Weissman IL. Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. *Cell Stem Cell*, 2007; 1:635–645.
16. Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, et al. Human proto-oncogene c-kit: a new cell

- surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J*, 1987; 6:3341–3351.
17. Preffer F, Dombkowski D. Advances in Complex Multiparameter Flow Cytometry Technology: Applications in Stem Cell Research. *Cytometry B Clin Cytom*, 2009 September; 76(5):295–314.
 18. Vliagoftis H, Worobec AS, Metcalfe DD. The protooncogene c-kit and c-kit ligand in human disease. *J Allergy Clin Immunol*, 1997; 100:435–440.
 19. Shmelkov SV, St Clair R, Lyden D, et al. AC133/CD133/Prominin-1. *Int J Biochem Cell Bio*, 2004; 37:715–719.
 20. Hess DA, Wirthlin L, Craft TP, et al. Selection based on CD133 and high aldehyde dehydrogenase activity isolates long-term reconstituting human hematopoietic stem cells. *Blood*, 2006; 107:2162–2169.
 21. Kusumbe AP, Mali AM, Bapat SA. CD133 expressing stem cells associated with ovarian metastases establish an endothelial hierarchy and contribute to tumor vasculature. *Stem Cells Express* 2009doi:10.1634.
 22. Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, et al. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation characterization and molecular cloning. *Blood*, 1997; 90: 5013–5021.
 23. Notta F, Doulatov S, Laurenti E, Poepl A, Jurisica I, Dick J. Isolation of Single Human Hematopoietic Stem Cells Capable of Long-Term Multilineage Engraftment. *Science*, 2011;333(6039):218–221.
 24. Podestà M, Bruschetini M, Cossu C, Sabatini F, Dagnino M, Romantsik O, et al. (2015) Preterm Cord Blood Contains a Higher Proportion of Immature Hematopoietic Progenitors Compared to Term Samples. *PLoS ONE* 10(9): e0138680. doi:10.1371/journal.pone.0138680.
 25. Lu L, Xiao M, Shen R, et al. Enrichment, Characterization, and responsiveness of single primitive CD34 human umbilical cord blood hematopoietic progenitors with high proliferative and replating potential. *Blood* 81:41–48, 1993.
 26. Hows JM, Bradley BA, Marsh JCW, et al. Growth of human umbilical-cord blood in longterm haemopoietic cultures. *Lancet* 340:73, 1992.
 27. Traycoff CM, Abboud MR, Laver J, et al. Evaluation of the *in vitro* behavior of phenotypically defined populations of umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 1994; 22:215.
 28. Hao QL, Shah AJ, Thiemann FT, et al. A functional comparison of CD34+CD38- cells in cord blood and bone marrow. *Blood*, 1995; 86(10):3745–3753.
 29. Sutherland HJ, Eaves CJ, Eaves AC, et al. Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis *in vitro*. *Blood* 74: 1563, 1989.
 30. Srour EF, Brandt JE, Briddell RA, et al. Human CD34+HLA-DR- bone marrow cells contain progenitor cells capable of self-renewal, multilineage differentiation, and long-term *in vitro* hematopoiesis. *Blood Cells* 17:287, 1991.

БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящото съобщение е получило втора награда на Юбилейната научна конференция „10 години Българска асоциация по клинична имунология“ в рамките на Постерната сесия на Конференцията. Авторите изразяват своята благодарност за високата оценка и присъдената награда.

ФЕНОТИПНИТЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ЧОВЕШКАТА КРЪВ ОТ ПЪПНА ВРЪВ ДЕМОНСТРИРАТ НЕЗРЯЛОСТ НА НЕОНАТАЛНАТА ИМУННА СИСТЕМА

Валентина Атанасова¹, Анжела Антонова¹, Анастасия Михайлова^{1,2},
Елисавета Наумова^{1,2}

¹ УМБАЛ „Александровска“ ЕАД – София, Клиника по клинична имунология с
банка за стволови клетки

² Катедра по клинична лаборатория и клинична имунология, Медицински
университет – София

Проучванията с използване на кръв от пъпна връв (КПВ) демонстрират количествени и качествени различия в имунните клетки в сравнение с възрастните, както и незрялост на имунния отговор на новородените към бактериални и вирусни антигени.

Цел: Настоящото проучване има за цел да оцени клетъчния имунитет на българските новородени.

Методи: 72 единици КПВ, дарени на Националната публична банка за стволови клетки, УМБАЛ „Александровска“, София, бяха анализирани с многоцветна флуориметрия.

Резултати: Популациите имунни клетки в КПВ бяха представени както следва: CD3+ Т клетки: 62.27±9.64%; CD19+ В-клетки: 17.47±5.46%; CD3-CD16/CD56+ NK клетки: 17.27±8.4%; високо съотношение CD4/CD8 (2.86±0.82), поради нисък процент на супресорно-цитотоксичните CD3+CD8+ клетки (16.65±8.21). Броят на CD3+gdTCR+ (1.0÷5.3%) и CD3+CD4+CD8+ (0.16÷3.58%) Т-клетки варираше. Беше установена експресия на CD38 при 94.53±1.56 от лимфоцитите, докато HLA-DR се откри при 18.04±5.78% от тях. Наблюдаван бе превес на наивните CD45RA+ (63.58±9.8%), в сравнение с CD45RO+ (5.1±1.42%) паметови клетки. Ранните хемопоеични маркери CD34 и CD133 демонстрираха почти идентични профили на експресия. Малко CD45^{high} клетки (1.0÷4%) бяха положителни за CD117, в сравнение със CD34+ клетки (90.57±6.43%). Маркерът CD90, участващ в развитието на хемопоеичните стволови клетки, се откри в променливи проценти (0÷30.2%) от стволовите клетки. Популацията CD34+ клетки експресира антигени на диференциацията, специфични за клетки с висок клоногенен и репопулационен капацитет, с преобладаване на субпопулацията CD90-CD45RA-CD133+CD38+CD117+HLA-DR+.

Заклучение: Нашите данни потвърждават констатациите за незрялост на неонаталната имунната система и могат да допринесат за оценка на свързаните с възрастта разлики в клетъчния имунитет. Друго възможно приложение на нашите резултати е при диагностиката на първични и вторични имунни дефицити.

Ключови думи: кръв от пъпна връв, имунофенотипизиране, референтни стойности.

Адрес за кореспонденция: Валентина Костова Атанасова, Клиника по клинична имунология с банка за стволови клетки, УМБАЛ „Александровска“ ЕАД, тел. 02 9230 915, e-mail: kki.alexandrovska@abv.bg, София 1431, ул. „Г. Софийски“ № 1

PHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF HUMAN CORD BLOOD CELLS DEMONSTRATE THE IMMATURETY OF THE IMMUNE SYSTEM AT BIRTH

Valentina Atanasova¹, Anzhela Antonova¹, Anastasya Mihaylova^{1,2},
Elisaveta Naumova^{1,2}

¹Department of clinical immunology and stem cell bank,
UMBAL „Alexandrovska“ – Sofia; ²Medical University – Sofia

Studies using cord blood (CB) demonstrate qualitative and quantitative differences in immune cells when compared with adults, as well as immaturity of the neonatal immune system at birth to respond bacterial and viral antigens.

Aim. This study aimed to assess the cellular immunity in Bulgarian neonates.

Methods: 72 CB units donated to the National public bank for stem cells, University Hospital „Alexandrovska“, Sofia, were analyzed by multicolor flowcytometry.

Results: The immune cell populations in CB were represented as follows: CD3+ T cells: 62.27±9.64%; CD19+ B cells: 17.47±5.46%; CD3-CD16/CD56+ NK cells: 17.27±8.4%. CD4/CD8 ratio was high (2.86±0.82) due to the lower percentage of suppressor/cytotoxic CD3+CD8+ T cells (16.65±8.21). The number of CD3+gdTCR+ (1.0÷5.3%) and double positive (0.16÷3.58%) T cells vary. More than 90% of the lymphocytes expressed CD38 (94.53±1.56) while HLA-DR was detected on 18.04±5.78% of them. The naive CD45RA+ lymphocytes shown a clear preponderance (63.58±9.8%) compared to memory CD45RO+ (5.1±1.42%) cells. The early hematopoietic markers CD34 and CD133 demonstrated almost identical expression profiles. Very few CD45^{high} cells (1.0÷4.0%) were positive for CD117 compared to CD34+ cells (90.57±6.43%). CD90 antigen involved in hematopoietic stem cell development was detected in variable percentages (0÷30.2%) of stem cells. CD34+ cord blood cells expressed differentiation antigens specific for cells with high clonogenic and repopulation capacity, with predominance of CD90-CD45RA-CD133+CD38+CD117+HLA-DR+ subpopulation.

Conclusion: Our data support the findings for immaturity of neonatal immune system and could contribute to the evaluation of age-related differences in the cellular immunity. Moreover, it could be applied in the diagnostic of primary and secondary immunodeficiency disorders.

Keywords: cord blood, immunophenotyping, reference values.

Contact address:

V. Alexandrova

Department of clinical immunology and stem cell bank, UMBAL „Alexandrovska“, Sofia
e-mail: kki.alexandrovska@abv.bg

МУЛТИЦЕНТРОВО ОТВОРЕНО НАБЛЮДЕНИЕ НА ЧЕСТОТАТА НА ВЪЗНИКВАНЕ И ТЕЖЕСТТА НА ИНФЕКЦИИ НА ГОРНИТЕ ДИХАТЕЛНИ ПЪТИЩА ПРИ ПАЦИЕНТИ, ПРИЕМАЩИ РЕЗИСТА ФОРТЕ

Доц. д-р Христо Златанов, д-р Надя Георгиева и колектив

УНК клиника, ВМА – София

УВОД

Острите инфекции на горните дихателни пътища (ГДП) са самоограничаващи се, най-често вирусни заболявания, които се характеризират с болки в гърлото, кашлица, ринорея/назална конгестия, фебрилитет, обща отпадналост и болки в гърдите. В зависимост от органа, който е засегнат, те биват ринити, синусити, фарингити, тонзилити, ларингити и трахеити.

Острите инфекции на (ГДП) са най-честото заболяване при хората¹. В САЩ те са причина за 25 милиона визити при лекар годишно². Ако няма грипна епидемия (причинена най-често от грипни вируси група А и В), най-честият причинител на инфекциите на ГДП са риновируси (30–50% от случаите¹). Над 200 вида други вируси участват в етиологията на ОРЗ, но най-честите са аденовируси, ентеровируси, парагрипни вируси, респираторно-синцитиалният вирус и др.

Най-значимият бактериален причинител на инфекции на ГДП (предимно бактериален тонзилит и фарингит) е бета-хемолитичният стрептокок от група А – *Streptococcus pyogenes*, причиняващ 15% до 30% от случаите с остър тонзилофарингит при деца и около 10% от случаите при възрастни³. Опасенията от насложена бактериална инфекция обаче е причината за свръхупотребата (при 53% от децата и 73% от възрастните с болки в гърлото в САЩ) на антибиотици³. Това презастраховане води до повишена резистентност на бактериалните щамове към антибиотици и до загубата на тяхната ефективност в дългосрочен план.

Основната цел на настоящото проучване е да се проследи ефектът от 90-дневен прием на Резиста Форте през периода октомври 2015 – март 2016 г., при пациенти, които за същия период в предходната година са имали 3 и повече епизода на ОРЗ, като се наблюдават и отчитат броят болестни епизоди на инфекции на ГДП и броят болнични дни, дължащи се на същата причина. Да се установи честотата на употреба на антибиотик и броят хоспитализации като резултат на заболяване на ГДП за наблюдавания период и да се сравнят резултатите на тези показатели със същия период на предходната година (октомври 2014 г. – март 2015 г).

Вторична цел на проучването е да се оцени тежестта и продължителността на симптомите на инфекции на ГДП (кашлица, фебрилитет, обща отпадналост, тежест и болка в гърдите, болки в гърлото (фарингит, ларингит или тонзилит) и ринит с ринорея или назална конгестия). Тази оценка става чрез петстепенна скала за тежест на симптомите (0 – липсва, 1 – лек, 2 – среден, 3 – изразен, 4 – тежък).

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

За периода от октомври 2015 г. до март 2016 г. в 58 независими изследователски центъра на територията на България бяха включени пациенти за профилактика с Резиста Форте (EpiCor, екстракт от Шийтаке, коластра, цинк, витамин D, фруктоолигозахариди, пробиотична комбинация, състояща се от *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* и *Streptococcus salivarius*).

Подбор на пациентите

Критерии за включване: Пациенти от двата пола на възраст над 5 години и за периода октомври 2014 г. – март 2015 г., имали три и повече болестни епизода на инфекции на ГДП. Пациентите не са ваксинирани с противогрипна ваксина към момента на включване.

Критерии за изключване:

Пациенти, ваксинирани с противогрипна ваксина през последните 12 месеца.

Пациенти със злокачествени заболявания.

Пациенти с диагностицирано или лекувано имунологично заболяване.

ХИВ позитивни пациенти.

Пациенти със свръхчувствителност към някоя от съставките на Resista Forte.

Проследяване

Пациентите са включвани по реда на тяхното идване и дали отговарят на критериите за включване. Поради начина на дозиране на продукта и в зависимост от възрастта пациентите са разделени в три групи:

- Група А: Пациенти от 5 до 11 г. Прием на Resista Forte – 1 таблетка дневно за 90 дни.
- Група Б: Пациенти от 12 до 18 г. Прием на Resista Forte – 2 таблетки дневно за 90 дни.
- Група В: Пациенти от 18 до 85 г. Прием на Resista Forte – 2 таблетки дневно за 90 дни.

Наблюдавани показатели

- Брой болестни епизоди на инфекции на ГДП.
- Брой болнични дни поради инфекции на ГДП.
- Брой хоспитализации поради инфекции на ГДП.
- Употреба на антибиотик поради инфекции на ГДП.

Тежест и средна продължителност на следните симптоми в дни:

- кашлица
- болки в гърлото – фарингит, ларингит или тонзилит
- фебрилитет
- ринит с ринорея и/или назална конгестия

- обща отпадналост
- тежест и болка в гърдите.

Статистически анализ

За анализ на получените данни е използвана статистическата програма SPSS, като за установяване на наличието на статистически значими разлики между средните стойности по изследваните показатели в двата разглеждани периода е използван Paired-Samples T-test. Този анализ е проведен както за всички включени в проучването пациенти (5–85 г.в.), така и по отделните възрастови групи.

Поради изискванията към подбора на пациентите, които да бъдат включени за наблюдение, това проучване е представително за често боледуващи (3 и повече пъти) пациенти с инфекции на ГДП.

РЕЗУЛТАТИ

Всичките 341 пациенти (154 мъже и 187 жени) на възраст от 5 до 85 години отговарят на критериите за включване. В отделните групи разпределението е: 5–11 г. – 111 пациенти, 12–17 г.в. – 41 пациенти и 18–85 г.в. – 189 пациенти.

Резултати за общата група пациенти:

А. Превенция

Профилактиката на инфекциите на ГДП при често боледуващите пациенти е една възможност да се намали както здравният риск от усложнения, така и финансовата тежест от честите отсъствия от работа.

На база на проведенния статистически анализ за всички попаднали в изследването лица е установено наличие на статистически значими разлики ($p < 0.05$) по всеки един от наблюдаваните показатели.

Резултатите от наблюдението на пациентите в общата група (5-85 г.в.) са представени в Таблица 1.

	Възраст 5–85 г.	
	01.10.14–31.03.15 г.	01.10.15–31.03.16 г.
Среден брой болестни епизоди с инфекции на ГДП	5,84	1,78
Среден брой болнични дни поради инфекции на ГДП	20,90	5,79
Среден брой хоспитализации поради инфекции на ГДП	0,23	0,03
Среден брой епизоди на инфекции на ГДП с антибиотици	4,11	0,84

Таблица 1. Средни стойности на проследяваните показатели за двата периода. Наблюдава се статистически значима разлика ($p < 0.05$) на показателя за втория период (на фона на приложение на Резиста Форте) спрямо първия (без активна профилактика).

Общ брой епизоди на инфекция на ГДП

Приложението на Резиста Форте за 90 дни успява да намали статистически значимо броя на болестните епизоди с инфекции на ГДП за наблюдаваните пациенти. Средната стойност на този показател за периода октомври 2014 г. – март 2015 г. е 5,84, а след приема на Резиста Форте е 1,78.

На фона на лечение с Резиста Форте 86 пациенти (25,22%) не са имали епизоди на инфекция на ГДП за периода на наблюдение. Средният брой на епизоди в тази група (86 човека) за предходния период е бил 4,48, а дните, в които не са били на работа/училище поради болест – средно 9,22. Профилактичният прием на Резиста Форте при тези пациенти е довел до свободен от епизоди на инфекции на ГДП и отсъствие от работа/училище есенно-зимен период.

Брой болнични дни и хоспитализации поради инфекция на ГДП

Преди включването в проучването, пациентите са били неработоспособни/отсъстващи от училище средно 20,90 дни (почти един работен месец), докато лечението с Резиста Форте намалява този показател до 5,79 дни (една работна седмица), което представя статистически значим резултат ($p < 0.05$). След лечението 164 пациенти (48,1%) не са отсъствали от работа/училище, за сравнение само 100 пациенти (29,3%) са били без отсъствия за предходния период.

За общата популация на пациентите в проучването хоспитализациите са средно 0,23 за периода преди лечението с Резиста Форте и 0,03 след това ($p < 0.05$).

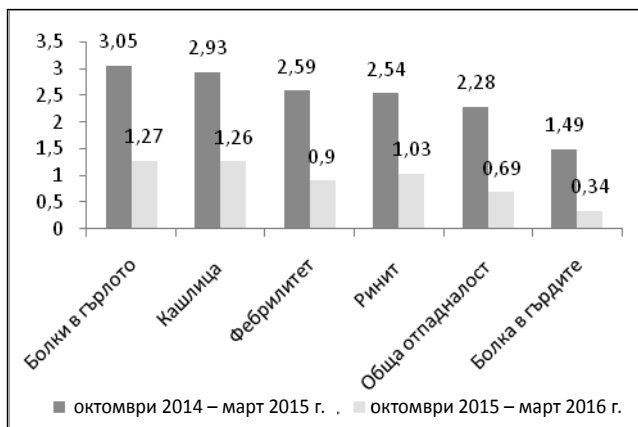
Брой болестни епизоди на инфекции на ГДП, покрити с антибиотици

За периода октомври 2014 г. – март 2015 г. изследваната група пациенти са били лекувани с антибиотик средно 4,1 пъти, а за периода след приема на Резиста Форте този показател показва статистически значима ($p < 0.05$) редукция до 0,84 пъти.

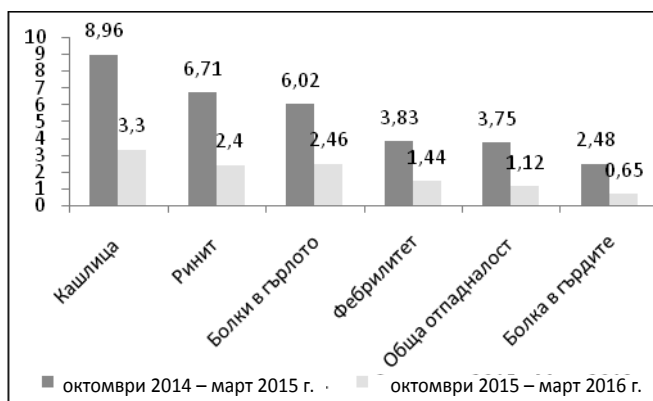
Б. Намаляване тежестта на симптомите при инфекции на ГДП.

Тежестта на симптомите при ОРЗ са оценявани субективно по петстепенна скала (0 – липсват, 4 – тежки). Отчетени са както тежестта, така и продължителността на изява на симптомите. Наблюдаваните симптоми са фебрилитет, обща отпадналост, тежест и болка в гърдите, болки в гърлото (фарингит, ларингит, тонзилит), кашлица и ринит с ринорея.

Средни резултати от оценката на тежестта и продължителността на симптомите на инфекция на ГДП са представени във Фигура 1 и Фигура 2.



Фигура 1. Средни стойности на оценката за тежест на симптомите на инфекции на ГДП. След прием на Резиста Форте симптомите са по-леко изразени, като статистическата достоверност е $p < 0.05$



Фигура 2. Средна продължителност в дни на симптомите на инфекции на ГДП. Симптомите протичат за по-кратко време, като статистическата достоверност е $p < 0.05$

Симптомите, понасящи се най-тежко от пациента – болки в гърлото, фебрилитет и кашлица, са дали най-голяма редукия за периода на наблюдение. В началото на проучването стойностите на показателя „болки в гърлото“ е със средна тежест 3,05, кашлица – с 2,93, и фебрилитет – с оценка 2,59, а в края му тежестта на тези симптоми е съответно 1,27, 1,26 и 0,90, което достига статистическа достоверност ($p < 0.05$) в редукията на оценката в края на проучването към предходния период. Средната продължителност в дни на тези три симптома също е намаляла значимо ($p < 0.05$). За периода октомври 2014 г. – март 2015 г. средната продължителност на болките в гърлото при пациентите е била 6,02 дни, на кашлицата – 8,96 дни, а на фебрилитета – 3,83 дни. Приемът на Резиста Форте намалява тази продължителност до съответно 2,46, 3,30 и 1,44 дни.

Таблица 2 А	Възраст 5–11 г.	
	01.10.14–31.03.15 г.	1.10.15–31.03.16 г.
Среден брой болестни епизоди с инфекции на ГДП	7,89	2,51
Среден брой болнични дни поради инфекции на ГДП	33,98	9,68
Среден брой хоспитализации поради инфекции на ГДП	0,32	0,01
Среден брой болестни епизоди на инфекции на ГДП с антибиотици	5,54	0,98

Таблица 2 В	Възраст 12–17 г.	
	01.10.14–31.03.15 г.	01.10.15–31.03.16 г.
Среден брой болестни епизоди с инфекции на ГДП	5,88	1,61
Среден брой болнични дни поради инфекции на ГДП	21,05	5,41
Среден брой хоспитализации поради инфекции на ГДП	0,20	0,05*
Среден брой болестни епизоди на инфекции на ГДП с антибиотици	3,73	0,78

Таблица 2 С	Възраст 18–85 г.	
	01.10.14–31.03.15 г.	01.10.15–31.03.16 г.
Среден брой болестни епизоди с инфекции на ГДП	4,63	1,38
Среден брой болнични дни поради инфекции на ГДП	13,18	3,59
Среден брой хоспитализации поради инфекции на ГДП	0,19	0,03
Среден брой болестни епизоди на инфекции на ГДП с антибиотици	3,35	0,76

Таблица 2 А, В и С: Средни стойности на проследяваните показатели за двата наблюдавани периода по възрастови групи. Наблюдава се статистически значима разлика ($p < 0.05$) на показателите за втория период (на фона на приложение на Резиста Форте), спрямо първия (без активна профилактика).

***Статистическа достоверност в редукцията не бе достигната за показател „брой хоспитализации поради инфекции на ГДП“ за възраст 12–17 години.**

Профилактиката с Резиста Форте е намалила тежестта на ринита и назалната конгестия от 2,54 на 1,03 ($p < 0.05$). Средната продължителност в дни също е намалела значимо от 6,71 дни на 2,40 дни. Тежестта в гърдите и общата отпадналост за предходния период са оценени от пациентите като леки и средно

тежки $-1,49$ и $2,28$, със средна продължителност от $2,48$ и $3,75$ дни. Резиста Форте намалява значимо тежестта и продължителността и на тези два симптома.

Приемът на Резиста Форте за наблюдавания период редуцира тежестта и продължителността на симптомите при пациенти, които боледуват често и са във висок риск от инфекции на ГДП.

Резултати по възрастови групи

А. Превенция

Резултатите, получени от наблюдението на пациентите за общите показатели по възрастови групи, са представени в Таблица 2 А, В и С.

Всички наблюдавани показатели достигат статистическа значимост за периода октомври 2015 – март 2016 г. спрямо същия период от време в предходната година с изключение на броя хоспитализации поради инфекции на ГДП във възрастовата група 12–17 години.

Пациентите на възраст 5–11 г. са боледували най-често, като средният брой на епизодите е $7,89$ за октомври 2014 – март 2015 г. Те имат най-много отсъствия от училище по болест – средно $33,98$ дни.

След проведената профилактика броят епизоди в тази възраст намалява значимо – $3,14$ пъти ($p < 0.05$) и достига $2,51$. Аналогична е и редуцията в броя на дните с отсъствие от училище – $3,51$ пъти. Този показател също дава статистически значима разлика спрямо предходния период, като достига стойност от средно $9,68$ дни.

Употребата на антибиотици също е най-честа в тази възрастова група. От средно $7,89$ епизода с инфекция, при средно $5,54$ от тях се предписват антибиотици, въпреки че най-честата причина за инфекциите на ГДП са вирусни заболявания, срещу които антибиотиците нямат ефект. Профилактиката с Резиста Форте при пациентите от 5–11 г. намалява в най-голяма степен употребата на антибиотици, сравнено с другите две възрастови групи, като в края на проучването антибиотици са предписвани средно при $0,98$ случая.

За периода октомври 2014 – март 2015 г. поради усложнения на инфекциите на ГДП в тази възрастова група пациентите са били хоспитализирани – средно $0,32$ (всеки трети епизод е завършвал с хоспитализация), след лечението редуцията в този показател достига значимост $p < 0.05$ и за периода на прием на терапията показателят е достигнал стойност от средно $0,01$ хоспитализации (намалява 32 пъти).

Най-голяма редуция в броя на епизодите с инфекции на ГДП и броя на дните с отсъствие от училище е постигната във възрастта 12–17 г. (съответно $3,65$ и $3,89$ пъти). Тези пациенти са имали средно по $5,88$ епизода и 21 дни отсъствие за периода октомври 2014 – март 2015 г. В края на проследявания период двата показателя са средно $1,61$ епизода и $5,41$ дни отсъствие от училище. Тази редуция води до значимо ($p < 0.05$) подобрене в живота на децата.

В групата на възрастните (18–85 години) всички показатели за наблюдавания период са достигнали статистически значима редуция. Приложението на Резиста Форте в тази група е добра възможност за профилактика при пациенти, които често боледуват от инфекции на ГДП и отсъстват от работа по тази причина.

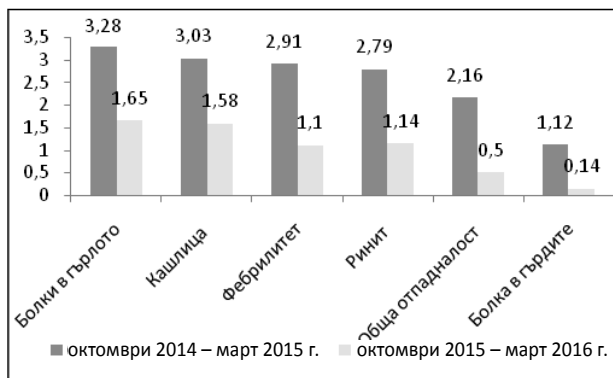
Б. Намаляване тежестта на симптомите при инфекции на ГДП в различните възрастови групи

Тежестта на симптомите и тяхната продължителност за двата периода на наблюдение са отразени във Фигура 3–8. Всички показатели са отчели статистически значима редукция на фона на лечение с Резиста Форте спрямо периода на включване.

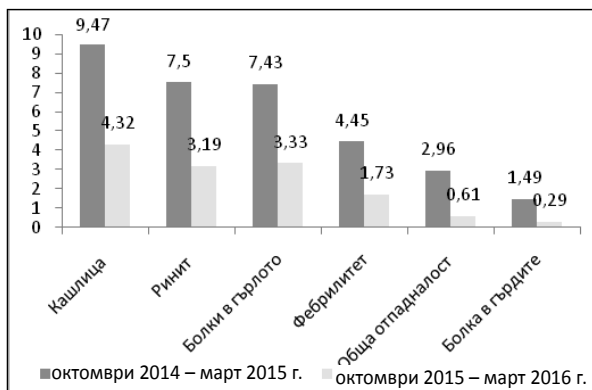
Симптомите на болки в гърлото, кашлица, фебрилитет и ринит с ринорея и/или назална конгестия са оценени от пациентите като най-тежки в началото на проучването. Тези показатели са най-изразени при децата във възрастовата група от 5 до 11 г. Болките в гърлото са били с по-значима стартова тежест – 3,28, но след лечението с Резиста Форте пациентите са оценявали степента им на тежест като лека към средна – 1,65. Сходна е и оценката на кашлицата, фебрилитета и ринита. Техните начални оценки са със степен „тежка“ или „изразена“ към „тежка“ (3,03, 2,91 и 2,79), но в резултат на лечението са намалели до „лека“ (кашлица – 1,58, фебрилитет – 1,10 и ринит – 1,14).

Най-голяма редукция в средните оценки на степента на тежест на отделните симптоми е постигната във възрастовата група 12–17 години. За фебрилитета тя е 3,5 пъти (от 2,73 на 0,78), за ринит с ринорея/конгестия – 3,05 пъти (от 2,76 на 0,9), кашлицата намалява 2,8 пъти (от 2,8 на 1), а болките в гърлото – 2,69 пъти (от 3,15 на 1,17).

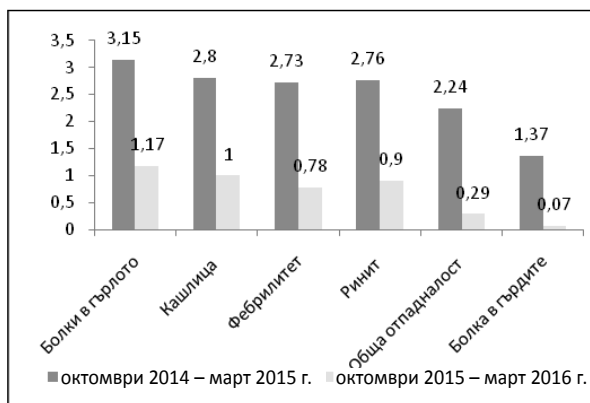
Средната продължителност на симптомите също намалява статистически значимо ($p < 0.05$), като в края на проучването симптомите преминават средно за около 2 дни.



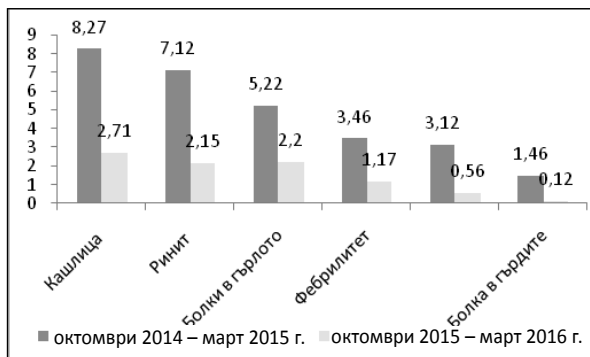
Фигура 3. Средни стойности за тежест на симптомите на инфекции на ГДП в група А (5–11 г.)



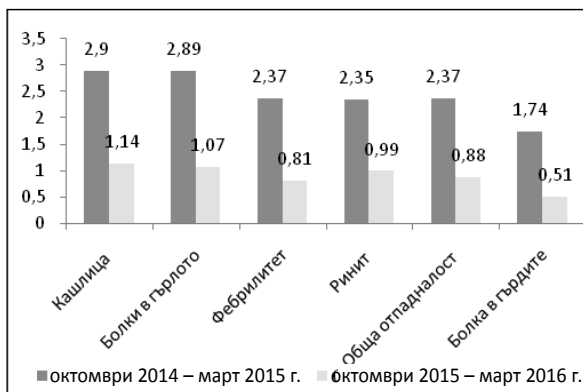
Фигура 4. Средна продължителност в дни на симптомите на инфекции на ГДП в група А (5–11 г.)



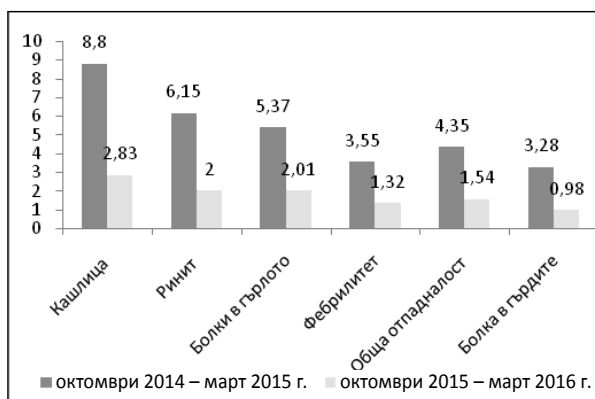
Фигура 5. Средни стойности за тежест на симптомите на инфекции на ГДП в група Б (12–17 г.)



Фигура 6. Средна продължителност в дни на симптомите на инфекции на ГДП в група Б (12–17 г.)



Фигура 7. Средни стойности за тежест на симптомите на инфекции на ГДП в група В (18–85 г.)



Фигура 8. Средна продължителност в дни на симптомите на инфекции на ГДП в група В (18–85 г.)

При възрастните с най-голяма редукция са „болки в гърлото“ (еднаква по степен редукция със същия показател при група 12–17 години – 2,69 пъти). Обяснението на този ефект е в дозата на Резиста Форте – при деца над 12 години и възрастни е две таблетки дневно. Резиста Форте е таблетка за смучене и съдържа специален щам пробиотик, насочен към подобряване на имунитета в устната кухина (*Streptococcus salivarius*). Дозата от две таблетки дава по-висока концентрация от живи пробиотични единици, които да действат локално и да намаляват болката в гърлото при инфекции на ГДП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резултатите от това мултицентрово отворено наблюдение удовлетворяват поставените цели – проследява се ефектът от 90-дневно лечение с Резиста Форте за периода октомври 2015 – март 2016 г. при пациенти, които са имали 3 и повече епизода на инфекции на ГДП за същия период от предходната година.

Установява се, че има статистически значима разлика в честотата на възникване, тежестта и продължителността на болестните епизоди при тези пациенти.

От изследваната популация 86 човека (25,22%) са без инфекция на ГДП. Приемът на активната терапия не само намалява честотата на епизодите 3,28 пъти (от средно 5,84 на 1,78), но и намалява значително ($p < 0.05$) броя на дните с отсъствия от работа/училище (3,61 пъти – от средно 20,90 дни на 5,79 дни), честотата на употреба на антибиотици (4,89 пъти – от средно 4,11 епизода на 0,84 епизода с АБ) и хоспитализациите (7,67 пъти – от 0,23 на 0,003) при тези пациенти.

Степента на тежест на основните симптоми след прием на Резиста Форте са оценени като по-леко изразени спрямо предходни болестни епизоди. Продължителността на тези симптоми също е намаляла значително ($p < 0.05$).

Всички наблюдавани показатели достигат статистическа значимост ($p < 0.05$) и при отделните възрастови групи – от 5 до 11 г., от 12 до 17 г. и от 18 до 85 г., като единствено за показателя „брой хоспитализации“ на възрастовата група 11–17 г. тя не е постигната.

ИЗВОДИ

Лечението на пациентите с Резиста Форте е една добра възможност за профилактика на епизодите на инфекции на ГДП в есенно-зимния сезон, защото намалява статистически значимо броя им, тяхната тежест и продължителност в дни. Освен това се намалява броят на дните с отсъствие от училище/работа, както и честотата на усложнения, като хоспитализации и нужда от употреба на антибиотично лечение както при децата (5–18 г.в.), така и при възрастните, които боледуват по-често – имат 3 или повече епизода на инфекции на ГДП за периода от октомври до март. Епизодите на инфекция на ГДП на фона на профилактичното лечение с Резиста Форте протичат по-леко и са по-краткотрайни.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Heikkinen T, Järvinen A. The common cold. In: *Lancet*. Vol 361; 2003:51–59. doi:10.1016/S0140-6736(03)12162-9.
2. Lee GM, Friedman JF, Ross-Degnan D, Hibberd PL, Goldmann DA. Misconceptions about colds and predictors of health service utilization. *Pediatrics*. 2003;111(2):231–236.
3. Alcaide ML, Bisno AL. Pharyngitis and epiglottitis. *Infect Dis Clin North Am*. 2007;21(2):449–469, vii. doi:10.1016/j.idc.2007.03.001.
4. Bramley TJ, Lerner D, Sames M. Productivity losses related to the common cold. *J Occup Environ Med*. 2002;44(9):822–829.
5. Linder JA, Stafford RS. Antibiotic treatment of adults with sore throat by community primary care physicians: a national survey, 1989–1999. *JAMA*. 2001;286(10):1181–1186.

МУЛТИЦЕНТРОВО ОТВОРЕНО НАБЛЮДЕНИЕ НА ЧЕСТОТАТА НА ВЪЗНИКВАНЕ И ТЕЖЕСТТА НА ИНФЕКЦИИ НА ГОРНИТЕ ДИХАТЕЛНИ ПЪТИЩА ПРИ ПАЦИЕНТИ, ПРИЕМАЩИ РЕЗИСТА ФОРТЕ

Доц. д-р Христо Златанов, д-р Надя Георгиева и колектив

Цел: Да се проследи ефекта от 90-дневен прием на Резиста Форте през периода октомври 2015 – март 2016 г. върху честотата на възникване, тежестта и продължителността на болестните епизоди на инфекции на горните дихателни пътища (ГДП) при пациенти, които са били с три и повече епизода на инфекции на ГДП за същия период на предходната година (октомври 2014 г. – март 2015 г.).

Методи: В това мултицентрово отворено наблюдение са включени и проследени 341 пациенти, които през предходната година са имали три и повече епизода на инфекции на ГДП и за периода на наблюдение не са били имунизирани с противогрипна ваксина. Пациентите са приемали Резиста Форте за период от 90 дни и са били наблюдавани за брой епизоди с инфекции на ГДП, брой болнични дни, честота на хоспитализациите, употребата на антибиотици. Поради особености на дозирането и възрастта пациентите са групирани в три възрастови групи. Статистическият анализ на данните е направен както за цялата популация на изследваните пациенти, така и по отделните възрастови групи.

Резултати: Всички наблюдавани по време на проучването показатели в общата група от пациенти (на възраст от 5 до 85 години) достигат статистически значима разлика на фона на лечението през периода октомври 2015 г. – март 2016 г., сравнени със същия период от време в предходната година. От изследваната популация, приемаща Резиста Форте за 90 дни, 86 човека (25,22%) са без епизод на инфекция на ГДП за наблюдавания период. Приемът на активната терапия през това време не само намалява честотата на епизодите на инфекции на ГДП 3,28 пъти (от средно 5,84 на 1,78 епизода), но и намалява значително ($p < 0.05$) броя на дните с отсъствия от работа/училище (3,61 пъти – от средно 20,90 дни на 5,79 дни), честотата на употреба на антибиотици (4,89 пъти – от средно 4,11 епизода на 0,84 епизода с АБ) и хоспитализациите (7,67 пъти – от 0,23 на 0,003) при тези пациенти. Тези от изследваните лица, които са имали епизод на респираторна инфекция на фона на лечение с Резиста Форте, са оценили степента на тежест на основните симптоми (кашлица, ринит, фебрилитет, обща отпадналост, болки в гърлото, болки в гърдите) като по-леко изразена спрямо предходни болестни епизоди. Продължителността на тези симптоми в дни също е намаляла значително ($p < 0.05$).

Почти всички наблюдавани показатели достигат статистическа значимост ($p < 0.05$) и при анализа на резултатите по отделните възрастови групи – от 5 до 11 г., от 12 до 17 г. и от 18 до 85 г., като единствено за показателя „брой хоспитализации“ на възрастовата група 12–17 г. тя не е постигната.

Изводи: Профилактиката с Резиста Форте е една добра възможност за ефективно намаляване броя епизоди на инфекции на ГДП в есенно-зимния сезон, тяхната тежест и продължителност в дни. Освен това се намаляват броят на дните с отсъствие от училище/работа, честотата на усложнения, като хоспитализации и нужда от употреба на антибиотично лечение както при деца (5–18 г.в.), така и при възрастни. Епизодите на инфекция на ГДП на фона на профилактичното лечение с Резиста Форте протичат по-леко и са по-краткотрайни.

Ключови думи: инфекции на ГДП, превенция, Резиста Форте.

Адрес за кореспонденция:
доц. д-р Христо Златанов
УНК клиника – ВМА, гр. София,
e-mail: drzlatanov@abv.bg

MULTICENTER OPEN OBSERVATION OF THE FREQUENCY OF INCIDENCE AND SEVERITY OF INFECTIONS OF THE UPPER RESPIRATORY TRACT IN PATIENTS TREATED WITH RESISTA FORTE

Christo Zlatanov, Nadja Georgieva, et al.

Aim: To assess the effect of 90-day intake of Resista Forte during the period October 2015–March 2016 on the incidence, severity and duration of the episodes of Upper Respiratory Tract Infections (URTI) in patients, who had three or more Upper Respiratory Tract Infections for the same period of the previous year (October 2014–March 2015).

Methods: In this multicenter open observational study, for followup were included 341 patients, who had three or more episodes of URTI during the winter season of the previous year and had not been immunized with influenza vaccine for the period of observation. Patients had taken Resista Forte for a period of 90 days and had been assessed for number of episodes with URTI, number of sick-days taken from work/school, number of hospitalizations and use of antibiotics. Due to dose regimen recommendations, patients have been divided into three age groups. Statistical analysis of the data was performed both for the whole group of patients and within the different age groups.

Results: All parameters in the observed population of patients (aged 5 to 85 years) reached statistical significance after treatment with Resista Forte for the period October 2015–March 2016, compared to the same period during the previous year. There were 86 patients (25.22%) from the assessed population, taking Resista Forte for 90 days, who did not develop an episode of URTI during the observed period. The active treatment not only reduced the incidence of URTI 3.28 times (from mean 5.84 to 1.78 episodes), but also reduced significantly ($p < 0.05$) the number of sick days taken from work/school (3.61 times – from mean 20.90 to 5.79 days), the use of antibiotics (4.89 times – from mean 4.11 episodes to 0.84 episodes with antibiotic use) and the number of hospitalizations (7.67 times – from mean 0.23 to 0.003 cases) in these patients. Those patients, who experienced episodes of URTI during treatment with Resista Forte, have rated the severity of the main symptoms (cough, rhinitis, temperature, weakness, sore throat, chest pain) as milder, compared to previous episodes. The duration of these episodes was also significantly reduced ($p < 0.05$).

In the analysis of the three age groups – from 5 to 11 years, from 12 to 17 years and from 18 to 85 years, almost all observed parameters reached statistical significance. The only parameter that could not reach the significance value of $p < 0.05$ was „number of hospitalizations“ in the 12–17 years' age group.

Conclusions: Prophylactic use of Resista Forte is a good opportunity for effectively reducing the episodes of URTI during the fall-winter season and the symptoms' severity and duration in days. It can also reduce the number of sick days taken from work/school, incidence of complications like hospitalization and need of antibiotic use both in children (aged 5–18y.) and in adults. The episodes of URTI during treatment with Resista Forte are milder and shorter in duration.

Keywords: URTI, prevention, Resista Forte.

РОЛЯ НА ВИРУСОЛОГИЧНИЯ МОНИТОРИНГ НА ВКВ РЕПЛИКАЦИЯ ПРИ БЪБРЕЧНО ТРАНСПЛАНТИРАНИ ПАЦИЕНТИ

¹А. Георгиева, ¹Сн. Михайлова, ¹Я. Кръстева, ¹А. Михайлова,
¹М. Иванова-Шиварова, ¹Цв. Луканов, ¹В. Атанасова,
²Л. Христова, ²Е. Паскалев, ¹Е. Наумова

¹Клиника по клинична имунология с банка за стволови клетки,
УМБАЛ „Александровска“, МУ – София

²Клиника по нефрология и трансплантация, УМБАЛ „Александровска“,
МУ – София

ВК вирусът (ВКВ) принадлежи към семейство Polyomaviridae, двойноверижни ДНК-ови вируси [1]. Неговият геном е разделен на 3 региона: ранен, късен и транскрипционен (ТСR). Раните гени кодират малки и големи Т-протеини, а късните гени кодират вирусно капсидни протеини (VP1, VP2, VP3) и ангиопротейин [1, 2]. Транскрипционният регион включва елементи за транскриптазен контрол за ранна и късна генна експресия [1, 3].

Първичната инфекция с ВКВ обикновено се появява в ранна детска възраст. Серопозитивността при възрастни варира от 46–94% в зависимост от географските региони [1, 4, 5]. Инфекцията поначало е асимптоматична, но след първоначалното инфектиране ВКВ може да се запази през целия живот в бъбреците и епитела на урогениталния тракт, мононуклеарните периферни клетки, тонзилите и хематопоетичните тъкани [6, 7]. ВКВ може да се реактивира при лица с променена имунна реактивност, като например пациенти, заразени с човешкия имунодефицитен вирус (HIV), захарен диабет, старост, бременни жени, при пациенти, подложени на химиотерапия, и такива с трансплантация на костен мозък и солидни органи [7–10].

ВКВ инфекцията при бъбречно трансплантираните пациенти се проявява като тубулоинтерстициален нефрит, стеноза на уретера, хеморагичен цистит, преходна бъбречна дисфункция и прогресивно бъбречно увреждане поради ВК асоциирана нефропатия (ВКVAN) [1]. ВКVAN е една от най-важните причини за отхвърляне на присадката [7]. Наблюдава се в около 1–10% от пациенти с бъбречна трансплантация и е причина за загуба на бъбречен алографт при 10 до 80% от пациентите в зависимост от времето на откриване, различните имуносупресивни протоколи и диагностични подходи [1, 7, 11].

ВК вирусът може да бъде установен както в кръвта, така и в урината. Обикновено непосредствено след неговата реактивация той преминава в урината, а вiremията настъпва едва няколко седмици по-късно. Счита се, че ВКV нивата в плазма имат по-висока положителна предиктивна стойност за ВКVAN в сравнение с вирурията (96% и 43% съответно) [12].

Детекцията на ВКV ДНК в плазма чрез RT-PCR (Real Time PCR) е силно чувствителен методологичен подход, важен за оценката на риска от развитие на ВКVN. Чувствителността му достига 100% според някои проучвания, а специфичността ~90%. Все още не е определена минималната стойност на вирусния товар, при която е налице нефропатия, но някои ретроспективни изследвания са установили, че ВКV товар $>10\,000$ копия/мл предполага наличие на нефропатични лезии при анализ на биопсичен материал.

Отпадането на клетки от уроепитела, съдържащи ВКV частици, е често явление и се случва в 30% от случаите на бъбречно трансплантирани. Някои автори предполагат, че клинично значимите за развитието на ВКVAN стойности на ВКV в урина са $>10\,000\,000$ копия/мл. Според други трайната ВК вирурия е надежден маркер, позволяващ ранно идентифициране на пациенти с висок риск от развитие на ВКVAN и следователно осигурява профилактични терапевтични интервенции.

ВКV репликацията обикновено започва в ранния следтрансплантационен период с прилагането на високодозова имуносупресивна терапия [8]. Ранното откриване на ВКV вирурия (средно на 5-и ден след трансплантация) се счита за рисков фактор за последващо развитие на виремия. В този смисъл ранната вирурия е сигурен признак за последваща поява на вируса в кръвта ($P=0.006$) [13]. Някои автори предполагат, че клинично значимите за развитието на ВКVAN стойности на ВКV в урина са $>1 \times 10^7$ копия/мл. Предишно проучване на български колектив е установило присъствие на т.нар. T-ген в урината на 86% от пациентите с бъбречна трансплантация. В периферни мононуклеарни клетки ВКV генетичен материал е бил установен само при 8% от болните. В това проучване обаче не е извършвано измерване количеството на вирусната ДНК [15].

Поради изключително важната ролята на ВКV в патогенезата на ВКVAN, мониторирането на бъбречно трансплантирани пациенти е от съществено значение, за предотвратяване загубата на алографта.

Целта на сегашното проучване е оценка значението на мониториране на ВКV реактивация при бъбречно трансплантирани с оглед предотвратяване на усложненията, свързани с вирусната репликация и развитието на вирусно-асоциирана нефропатия.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

За периода 01.2015–10.2016 г. изследвахме 106 бъбречно трансплантирани пациенти на възраст от 14 до 60 г. Тридесет и двама от тях в ранен следтрансплантационен период и 74 в късен. Периодът на мониториране варира от 1 до 57 месеца след трансплантацията. По-голяма част от пациентите са на конвенционална терапия с калциневринови инхибитори (такролимус), преднизон и микофенолатмофетил. Петдесет и трима пациенти са трансплантирани от трупен и 53 от жив донор (родствен 87%, неродствен 13%).

Като изходен материал използвахме урина и плазма. За детекция на ви-

руса в плазма използвахме стандартен протокол към търговския кит (Gene Proof, Czech Republic). Разработихме протокол за изолоране и детекция на BKV-DNA от урина. Десет ml урина се центрофугират в конична епруветка на 2800 оборота/мин за 10 минути. Супернатантата се отстранява, а седиментът се ресуспендира в 400 μ l. Двеста μ l от тях се използват за изолоране на вируса посредством автоматизирана система INVITROGEN с обем на елуиране 100 μ l. За установяване на вiremия използвахме съответно 200 μ l плазма. Получените ДНК-та изследвахме чрез RT-PCR Applied Biosystems кит Gene Proof (Czech Republic). За установяване на коинфекция с CMV и EBV използвахме китове R-Gene Biomerux (France).

РЕЗУЛТАТИ

При 14,2% от реципиентите се намери вiremия, а при 21,0% вирурия. Активация на вируса се установи при пациентите, трансплантирани от трупен и от жив донор с приблизително еднаква честота (56% и 44%). Средното измерено ниво на BKV-DNA в урина е 7 966 315 копия/мл (най-високата стойност 110×10^9 копия/мл) и 395 400 копия/мл в плазма (най-висока стойност 4×10^6 копия/мл). Най-ниската стойност и при двете биологични течности е 10,0 копия/мл. Пациентите, положителни за BKV-DNA ($n=15$), бяха мониторирани между 5 и 9 пъти през интервал от 1–3 месеца.

Вирусна репликация се установи в ранния следтрансплантационен период при 51,2% ($n=8$) и в късния при 48,8% ($n=7$). При почти всички пациенти (87,5%) с инфекция в ранния следтрансплантационен период активацията на вируса е между 2–4 месец. Наблюдавана беше тясна корелация между количеството на вируса в урина и плазма (Таблица 1). Прави впечатление, че стойността на вирурията е с $\sim 1 \cdot 10^4$ по-висока от стойността на вiremията при един и същ пациент. Не се установи коинфекция с CMV и EBV вируси.

При пациенти с BKV-DNA в плазма $>$ от 10 000 копия/мл бяха предприети следните терапевтични промени, които доведоха до значително понижение или негативиране на вiremията: при 61% от пациентите Tacrolimus (CNI) се замени с Ciclosporin (CNI); при 25% от пациентите Tacrolimus (CNI) се замени със Sirolimus или Certicam (mTOR инхибитор); при 14% от пациентите се понижи дозата на Tacrolimus (CNI) и се включиха други медикаменти – Valcyte, Ciprofloxacin; при трима пациенти е приложен IVIG и Leflunomide.

При двама пациенти се установи настъпила BKVAN в 10-и и 7-и месец след трансплантация, при средна стойност на вiremия $2,5 \times 10^3$ копия/мл и вирурия $8,3 \times 10^7$ копия/мл.

ДИСКУСИЯ

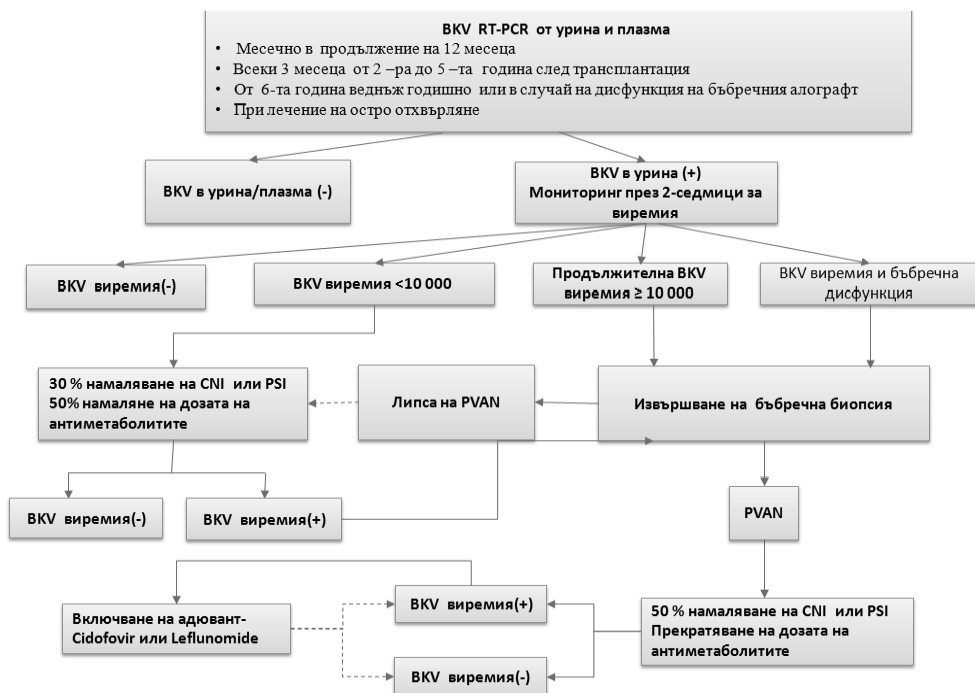
Нашите изследвания за BKV вiremия и вирурия при бъбречно трансплантирани пациенти показаха, че вiremия се открива при 14,2% от всички случаи, а вирурия при 21%. Подобни резултати са установени и при проучвания на

Awadalla Y., Bressollette-Bodin, Viscount H.B. [16–18]. Не намерихме вирусна реактивация в плазма при пациенти без ВК вирурия, както е случаят с трима пациенти в проучването на Viscount H.B. [18]. Активацията в ранния пост-трансплантационен период е между 2 и 4 месец (87,5%). Установените данни корелират с проучване на Babel N. и колектив, които съобщават за реактивация с честота 70% между 2 и 4 месец след трансплантация [14]. Въз основа на установената силна корелация между ВК виремия и ВКVAN препоръчваме мониторинг за ВКV реактивация в кръв и урина всеки месец след трансплантация през първата година и на всеки 3 месеца от края на 5-ата година. При установяване на вирурия е необходим по-чест плазмен мониторинг на всеки 2 седмици. При промяна на имunosупресията с цел понижаване вирусната репликация е необходимо също мониториране на всеки 2 седмици в плазма и урина до негативни резултати (Фигура 1).

В заключение: получените резултати показват добра корелация между постоянната ВК вирурия и ВК виремия. Скрининг на ВКV нивото в урината чрез real-time PCR може да бъде клинично полезен тест за идентифициране на трансплантирани пациенти с висок риск за ВК виремия. Мониторирането на бъбречно трансплантираните пациенти за репликация на вируса чрез изследване на урина и плазма осигурява бърза и навременна превенция и предотвратява развитието на ВКVAN.

Таблица 1. Корелация на стойностите на ВКV-ДНК в плазма и урина

Урина (копия/мл)	Плазма (копия/мл)
202 420	257
204 590	452
2 106 500	3263
5 545 600	4338
750 000 000	85 500
1 685 675000	171 212
11 000 000 000	396 500



Фигура 1. Препоръчителна схема за вирусологичен мониторинг в плазма и урина (адаптирано по Dirk R. J. Kuypers, Management of polyomavirus-associated nephropathy in renal transplant recipients Nat. Rev. Nephrol. 8, 390–402, 2012)

ЛИТЕРАТУРА:

1. Hirsch HH, J. Steiger, Polyomavirus BK. Lancet Infect Dis. 2003; 3(10):611–23.
2. Barraclough K.A., N.M. Isbel, C.E. Staats, D.W. Johnson, BK Virus in Kidney Transplant Recipients: The Influence of Immunosuppression. J Transplant. 2011; 2011:750836.
3. Garces J.C. BK Virus-Associated Nephropathy in Kidney Transplant Recipients. Ochsner J. 2010; 10(4):245–9.
4. Dalanis T., Hirsch H.H. Human polyomaviruses in disease and cancer. Virology. 2013; 437:63e72.
5. Knowles W.A. Propagation and assay of BK virus. Methods Mol Biol. 2001; 165:19–31.
6. Costa C, M. Bergallo, F. Sidoti, S. Astegiano, M. Terlizzi Mazzucco, et. al. Polyomaviruses BK and JC DNA quantitation in kidney allograft biopsies. J Clin Virol. 2009; 44:20–23.
7. Randhawa P., E. Ramos. BK viral nephropathy: an overview. Transplant Rev. 2007; 21:77–85.
8. Bohl D.L., D.C. Brennan, BK virus nephropathy and kidney transplantation. Clin J Am Soc Nephrol. 2007; 2 (suppl):S36–S46.
9. Arthur R. R., S., Dagostin, K.V Shah, Detection of BK virus and JC virus in urine and brain tissue by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1989; 27(6):1174–1179.

10. Akhgari S., M. Mohraz, K. Azadmanesh, R. Vahabpour, M. Kazemimanes, et. al., Frequency and subtype of BK virus infection in Iranian patients infected with HIV Med Microbiol Immunol. 2015 Jul.
11. Hirsch H.H., D.C. Brennan, C.B. Drachenberg, F.Ginevri, J. Gordon, et al. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations, *Transplantation* 2005; 79(10):1277–86.
12. Jozpanahi M., A. Ramezani, S.Ossareh, M. Banifazl, A.Bavand, S. Mamishi, BKV-viremia among Iranian Renal Transplant Candidates. *Iran J Pathol.* 2016 Summer; 11(3):210–215. PMID:27799969.
13. Saundh B.K., R. Baker, M. Harris, M.P. Welberry Smith, Early BK polyomavirus (BKV) reactivation in donor kidney is a risk factor for development of BKV-associated nephropathy. *Infect Dis.* 2013 Jan 1; 207(1):137–41.
14. Babel N., J. Fendt, S. Karaivanov, G. Bold, S. Arnold, A. Sefrin. E. Lieske, et. al. Sustained BK viruria as an early marker for the development of BKV-associated nephropathy: analysis of 4128 urine and serum samples. *Transplantation.* 2009 Jul 15; 88(1):89–95.
15. Kalvatchev Z., S. Slavov, A. Petrova, P. Simeonov, L. Hristova. Detection of Human Polyomavirus Bk (BKV) In Bulgarian Adult Kidney Transplant Recipients by Polymerase Chain Reaction, *Biotechnology&Biotechnological Equipment*, 2007, 21, 3: 335–337.
16. Viscount H.B., A.J.Eid, M.J. Espy, et al. Polyomavirus polymerase chain reaction as a surrogate marker of polyomavirus-associated nephropathy. *Transplantation*, 2007; 84: 340.
17. Bressollette-Bodin C., M. Coste–Burel, M.Hourmant, et al. A prospective longitudinal study of BK virus infection in 104 renal transplant recipients. *Am J Transplant*, 2005; 5: 1926.
18. Awadalla Y., P. Randhawa, K.Ruppert, et. al. HLA mismatching increases the risk of BK virus nephropathy in renal transplant recipients. *Am J Transplant*, 2004; 4: 1691.

РОЛЯ НА ВИРУСОЛОГИЧНИЯ МОНИТОРИНГ НА ВКВ РЕПЛИКАЦИЯ ПРИ БЪБРЕЧНО ТРАНСПЛАНТИРАНИ ПАЦИЕНТИ

*А. Георгиева, Сн. Михайлова, Я. Кръстева, А. Михайлова,
М. Иванова-Шиварова, Ц. Луканов, В. Атанасова, Л. Христова,
Е. Паскалев, Е. Наумова*

ВК вирусът (ВКВ) принадлежи към семейство Polyomaviridae, двойноверижни ДНК-ови вируси. Първичната инфекция с ВКВ обикновено се появява в ранна детска възраст. Серопозитивността при възрастни варира от 46–94% в зависимост от географските региони. Инфекцията по начало е асимптоматична, но след първоначалното инфектиране ВКВ може да се запази през целия живот в бъбреците и епитела на урогениталния тракт, мононуклеарните периферни клетки, тонзилите и хематопоетичните тъкани [6, 7]. ВКВ може да се реактивира при лица с променена имунна реактивност, като например пациенти, заразени с човешкия имунодефицитен вирус (HIV), захарен диабет, старост, бременни жени, при пациенти, подложени на химиотерапия и такива с трансплантация на костен мозък и солидни органи.

В статията се оценява значението на мониториране на BKV реактивация при бъбречно трансплантирани с оглед предотвратяване на усложненията, свързани с вирусната репликация – BKVAN.

Ключови думи: BKV реактивация, BK асоцирана нефропатия (BKVAN).

Адрес за кореспонденция:

Атанаска Георгиева

Клиника по клинична имунология с банка за стволови клетки

УМБАЛ „Александровска“

Ул. „Св. Г. Софийски“ 1

ROLE OF THE VIROLOGICAL MONITORING OF BKV REPLICATION IN RENAL TRANSPLANT PATIENTS

A. Georgieva, S. Mihaylova, Y. Krasteva, A. Mihaylova, M. Ivanova-Shivarova, Ts. Lukanov, V. Atanasova, L. Hristova, E. Paskalev, E. Naumova

BK virus (BKV) belongs to genus Polyomavirus within the Polyomaviridae, a family of small, non-enveloped, double-stranded DNA viruses. The primary infection with BKV usually occurs in early childhood. It is estimated that seroprevalence reaches 46–94% in adults depending on the studied regions. Primary infection is usually asymptomatic, but after initial infection, BKV may persist lifelong in the kidney and genitourinary tract epithelium and possibly peripheral blood mononuclear cells, tonsils and other hematopoietic tissues. BKV may be reactivated in subjects with altered immune responses such as patients infected with human immunodeficiency virus (HIV), old aged, diabetes mellitus, pregnant women, patients who receive chemotherapy and in bone marrow and solid organ transplant recipients.

The article evaluates the importance of monitoring of BKV reactivation in renal transplanted patients for preventing complications associated with the viral replication – BKVAN.

Keywords: BK viral reactivation, BKV associated nephropathy (BKVAN).

Address for correspondence:

Atanaska Georgieva

Department of Clinical Immunology with cord-blood bank

University Hospital „Alexandrovskia“

1. G. Sofiisky str.

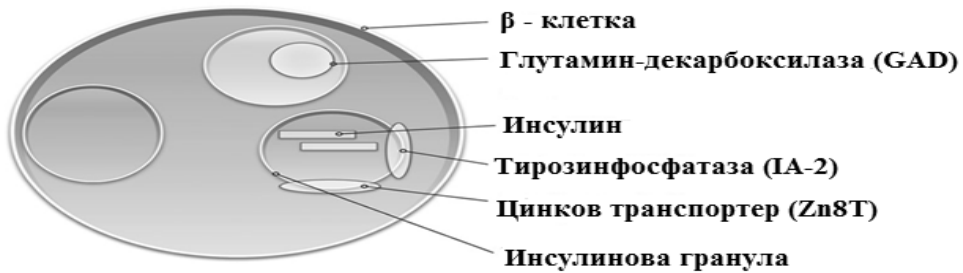
Sofia 1431

ЗАХАРЕН ДИАБЕТ ТИП 1 И ИМУНОЛОГИЧНИ МАРКЕРИ

Е. Викентиева, Д. Попова, Р. Владимирова

Военномедицинска академия – София

Захарният диабет (ЗД) тип 1 е хронично, органично-специфично, Т-клетъчно медирано, аутоимунно заболяване. Характеризира се с деструкция на произвеждащите инсулин β -клетки в Лангерхансовите острови на панкреаса в резултат на аутоимунна реакция към различни островноклетъчни антигени (Фигура 1). Процесът протича дълго в предклиничната фаза, преди настъпването на клинично изявен захарен диабет.



Фигура 1. β -клетка и прицелни антигени

ЕПИДЕМИОЛОГИЯ

Захарен диабет тип 1 може да засегне всички възрастови групи и е причина за 7–12% от случаите на ЗД в световен мащаб [23]. Най-често се диагностицира във възрастта между 4 и 5 г., но с върхова честота между 10- и 14-годишна възраст.

На Световения конгрес по диабет през 2015 г. във Ванкувър (Канада) са представени данни за заболеваемостта в световен мащаб, сочещи, че около 8,8% от възрастната популация, или 415 милиона, страда от ЗД, като се предвижда през 2040 г. този брой да достигне 642 милиона. При децата тези цифри са 542 000 за 2015 г., с ежегодно диагностициране на 86 000 нови случая. В Европа всяка година броят на новодиагностицираните деца със ЗД тип 1 нараства с 21 600 случая, като годишната тенденция за нарастване в световен мащаб е изчислена на 3%, което обуславя социалната значимост на това заболяване и необходимостта от оценка на лицата в риск (International Diabetes Federation [IDF] 2015) [23].

ЕТИОЛОГИЯ И ПАТОГЕНЕЗА

Деструктивните аутоимунни процеси при захарен диабет тип 1 са резултат от комбинирането на разнообразни генетични и негенетични фактори [13].

Около 18 региона от човешкия геном, обозначени като IDDM (Insulin-Dependent Diabetes Mellitus), съдържат гени, отговорни за предразположението към този тип захарен диабет. Първите категорични данни в тази посока са получени при проучвания върху гените, свързани с HLA (Human Leukocyte Antigens) системата [13, 31]. Установено е унаследяването на определени HLA алели, отговорни в над 40–50% от случаите за натрупването на висок риск от заболяемост в конкретни фамилии [13, 11].

В хода на развитие на захарен диабет тип 1 се отличават 4 ключови момента: 1) наличие на генетично предразположение (унаследяване на определени HLA хаплотипи); 2) развитие на аутоимунни реакции (белег за настъпването им е появата на циркулиращи аутоантитела срещу антигени на островните клетки, месеци до години преди клиничната изява); 3) пре-диабет и 4) изявен диабет (отпадане на 70–90% от инсулин-продуциращите клетки) (Фигура 2).



Фигура 2. Захарен диабет тип 1 – естествен ход (Atkinson и сътр. 2001) [3]

В над 90% от лицата със захарен диабет тип 1 се установява поне едно аутоантитяло с определена патогенетична и клинично-диагностична значимост, като само около 1% от здравите лица имат естествени антитела към структури на β-клетките без патологично значение [32].

Понастоящем определянето на антитела срещу островноклетъчни антигени е част от съвременната диагностика за доказване типа на захарния диабет и оценка на риска от заболяване.

Появата на различните аутоантитела следва определен порядък. Първи

се появяват автоантителата срещу инсулин (IAA) и глутамат-декарбоксилаза (GAD65), като това се случва не по-рано от 6-месечна възраст [30, 56]. Изключение са случаите на имунна дисрегулация, полиендокринопатия, ентеропатия и X-свързаният синдром, където новородените могат да развият автоантитела срещу инсулин или глутаматдекарбоксилаза още в първите дни от живота [41]. Автоантителата срещу тирозинфосфатаза (IA-2, IA-2 β) и цинковия йонен транспортер (ZnT8) се появяват на по-късен етап (Фигура 3). Прибавянето на нови автоантитела към вече установени на по-ранен етап говори за прогресия на болестта [4, 5, 32].



Фигура 3. Порядък на поява на автоантителата при захарен диабет

КЛИНИЧНО ЗНАЧЕНИЕ И ИНФОРМАТИВНО СЪДЪРЖАНИЕ

Автоантителата срещу различни островноклетъчни автоантигени се появяват в серума много преди клиничната изява на болестта, като броят на позитивните антитела е пропорционален на риска от заболяване. При наличие на 3 автоантитела, рискът от изява на захарен диабет до 5 години е почти 100% [48], в същото време на този етап инсулиновата секреция е съхранена (Таблица 1).

Автоантитяло	Риск за развитие на ЗД тип 1
Анти-GAD65	52%
Анти-IA-2	81%
Анти-IAA	59%
Анти-GAD65 + Анти-IAA	68%
Анти-GAD65 + Анти-IA-2	86%
Анти-IAA + Анти-IA-2	100%

Таблица 1. Риск за развитие на захарен диабет според типа установено автоантитяло – самостоятелно и/или в комбинация

➤ **Автоантитела срещу инсулин – IAA (insulinautoantibodies):**

IAA са описани за първи път и са посочени като маркер за автоимунна β -клетъчна деструкция от Palmer и кол. през 1983 г. [34]. Данни от 2 мащабни проучвания (BABYDIAB, DIPD) сочат, че антитела срещу инсулин се образуват през първите шест месеца от живота, с пик между 1- и 2-годишна възраст [36, 58]. Обикновено се доказват години преди клиничните прояви на диабет, като съществува обратнопропорционална зависимост между концентрацията им и възрастта на клинична изява на диабета [47]. Намират се при 40–70% от новодиагностицираните деца [2, 19, 42, 53, 54, 56], като при възрастни почти липсват, поради което използването на IAA е особено полезно в ранна детска възраст (под 10 г.). При първостепенни родственици със ЗД тип 1 се доказват в 90% от децата под 5-годишна възраст и само при 1/2 от младежите между 15 и 21 г. Доказана е връзка между носителството на определени HLA алели и честотата на поява и нивата на IAA. HLA-DRB1*04 и HLA-DQA1 със съответните DQA1*0101, *0102, *0103, *0201, *0301 алели се асоциират с по-високи нива на IAA в сравнение с носителството на DQA1*0401, *0501, *0601 [57].

Предиктивната стойност на автоантителата срещу инсулин зависи не само от концентрацията им в серума, но и от принадлежността им към определен субклас. При пре-диабетни и новодиагностицирани преобладават антитела от субклас IgG₁, докато субклас IgG₃ се установява предимно при пре-диабетици [8, 20, 38]. IgG₂, IgG₃ и IgG₄ се асоциират с по-висок риск от прогресия за разлика от IgG₁ [1].

Определянето на IAA е препоръчително преди започване на инсулиново лечение поради възможния имунизационен ефект на екзогенния инсулин – причина за трудното им проследяване [51]. IAA имат от 49% до 92% диагностична чувствителност за ЗД тип 1 при лица под 10-годишна възраст и само 10% при лица, диагностицирани преди навършване на 30 г. [55].

➤ **Автоантитела срещу GAD (glutamicaciddecarboxylase)**

В резултат на множество поручвания Baekkeskov S. и кол. изолират автоантитела от клас IgG, взаимодействащи с протеин с молекулно тегло 64 kDa. На следващ етап доказват таргетния антиген – ензима глутаматдекарбоксилаза (GAD), катализиращ декарбоксилирането на глутамата до гама-аминомаслена киселина (GABA) [4, 5] в присъствието на кофактор, пиридоксал-5'фосфат (активиран вит. B₆) [11]. Съществуват 2 изоформи на GAD с молекулярна маса 65 000 (GAD65) и 67000 (GAD67), с идентична ензимна активност и степен на структурна хомоложност около 65%. За разлика от GAD67, GAD65 притежава значително гъвкав карбокситерминален участък, определящ антигенните му способности [15]. Ранните хуморални имунни отговори срещу GAD65 при ЗД тип 1 са насочени срещу епитопи, локализирани в конкретни участъци от молекулата, респективно междинен (245^{та}–449^{та} аминокиселина) и С-терминален домейн [28, 39, 40].

GAD65 и GAD67 са кодирани от гени, локализирани съответно в хромозома

10 (10q11.23) и хромозома 2 (2q31). Продуктите на двата гена се експресират предимно в мозъчната тъкан, където GABA изпълнява функция на инхибиторен невротрансмитер [5, 9], но също от клетки в яйчниците, тестисите и панкреаса [5, 9, 49]. Доминираща изоформа за островноклетъчните структури е GAD65, чиято вероятна функция е свързана със секрецията на глюкагон, т.е. „локален паракринен регулатор“ [50].

Антитела срещу GAD65 се доказват при 50–80% от новозаболените от 3Д тип 1 [7, 19, 42, 54], но също и при лица с LADA (латентен автоимунен диабет при възрастни) [14]. Позитивните за GAD65 лица с LADA в 80% от случаите развиват инсулинова зависимост в кратки срокове от момента на диагностицирането, имат по-висок риск от второ автоимунно органоспецифично заболяване, а в случаите с изключително високи титри на автоантитела – нисък BMI (Body Mass Index), ниски нива на С-пептид и висока честота на носителство на асоциирани със 3Д тип 1 HLA клас II хаплотипи [14]. Според някои проучвания скоростта на изчерпване на С-пептида корелира с нивата на анти-GAD65 към момента на диагностициране и предрича загубата му за период, не по-дълъг от 6 години. В ситуацията, при която се установяват повече от едно антитела, този период съществено се скъсява. В ранните фази на имунен отговор доминиращ субклас е IgG₁ [8, 21, 40]. Антитела от субклас IgG₂ и IgG₃ често се появяват успоредно със субклас IgG₁ или много скоро след първоначалния IgG₁ отговор, докато IgG₄ се появява най-късно [40]. Анти-GAD65 се използват с успех като ранен предиктор за развитието на диабет. За разлика от IAA, които са възрастово ограничени (предимно при деца), автоантителата срещу GAD65 могат да бъдат използвани при всички възрасти.

➤ Автоантитела срещу тирозинфосфатаза-IA2 и IA-2β

IA-2 (ICA512) и IA-2β (фогрин) са трансмембранни протеини, притежаващи неактивен протеин-тирозинфосфатен (PTP) домейн в цитоплазмения си участък. Имат регулаторни функции в различни невроендокринни клетъчни типове, включително в панкреасните β-клетки. Локализираны са в мембраната на инсулиновите секреторни гранули [46].

Автоантитела срещу тези два протеина могат да бъдат установени дълги години преди развитието на болестта при първостепенни родственици на лица със 3Д. Приема се, че наличието им идентифицира лицата в риск за прогресия от пре-диабет към клинично изявена болест [25, 29].

IA-2 антитела се установяват при 55–80% от пациентите с тип 1 захарен диабет много преди появата или към момента на поява на болестта [7, 32, 42, 45, 54]. Наблюдава се зависимост между нивата на IA-2 антитела и носителството на определен HLA хаплотип. По-често и в по-високи нива се доказват при деца, носители на HLA DR4-DQA1*0301-DQB1*0302 генотип [7, 17, 18, 43]. Този тип антитела имат висока предиктивна значимост за развитие на тип 1 диабет при пациенти с отрицателен резултат от теста за анти-GAD65 антитела [1]. Антителата срещу IA-2 се приемат за по-специфичен маркер за β-клетъчна

деструкция от анти-GAD65. Наличието им във високи нива говори за бърза прогресия [6, 10, 26]. За разлика от анти-GAD65, които са стабилни във времето, при антителата срещу IA-2 е доказана тенденция за намаляване пропорционално с увеличаване на давността на ЗД [32].

При 35–50% от лицата с тип 1 ЗД се установяват антитела към IA-2 β . Над 95% от IA-2 β позитивните пациенти имат и антитела срещу IA-2. Често определянето на тези антитела се пропуска, но доказването им при позитивни за IA-2 антитела пациенти повишава предиктивността за развитието на ЗД тип 1 [1].

IA-2 антителата при пре-диабетни и новодиагностицирани лица са предимно от субклас IgG₁ [1, 8, 22].

➤ Автоантитела срещу цинков транспортер – 8 (ZnT8)

Лангерхансовите β -клетки съдържат високи нива на вътреклетъчен цинк (Zn) [52] и експресират различни цинкови транспортери, като цинков транспортер-5 (ZnT5) [24] и цинков транспортер-13 (ZnT3) [12], но в най-значителна степен конститутивно експесиран е цинков транспортер-8 (ZnT8), кодиран от SLC30A8 гена. ZnT8 е димерен трансмембранен протеин, съставен от 369 аминокиселини, и един от главните автоантигени при ЗД тип 1 [51]. Автоантителата срещу C-терминалния край на молекулата на ZnT8 са значимо асоциирани със ЗД тип 1. Намират се при 60% от новооткритите деца, като се позитивират и при 26% от лицата, негативни за друг вид автоантитяло [51]. По-често и в по-високи нива се установяват с напредване на възрастта, въпреки че са описани и при лица на 3-годишна възраст. Появата им предшества началото на болестта с години.

ПРЕПОРЪКИ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА АНТИОСТРОВНОКЛЕТЪЧНИ АНТИТЕЛА

Определянето на автоантитела е препоръчително в следните ситуации:

- Ранна диагностика на захарен диабет тип 1
- Диференциална диагноза между захарен диабет тип 2 и диабет тип LADA [14]
- При лица, развиващи скоро след поставяне на диагнозата инсулинова зависимост (< 2 години от момента на диагностициране) [14]
- Оценка на риска за развитие на захарен диабет тип 1 при пациенти с гестационен диабет [16]
- Оценка на риска за диабет при фамилно обременени лица (първостепенни родственици на лица със захарен диабет тип 1) [16]
- Мониторинг и прогноза на клиничната прогресия при ЗД тип 1
- При пациенти с панкреасна или островноклетъчна трансплантация за оценка на преживяемостта на трансплантата [44].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Комбинирано определяне на антитела срещу различни островноклетъчни антигени, адекватно съобразено с особеностите, характеризиращи всяко едно автоантитяло, е оптималният подход за получаване на необходимата информация с оглед предвиждане и оценка на риска от развитие/прогресия на ЗД тип 1. Разнообразието от разработени тестове позволява на съвременните лаборатории определяне на различните типове автоантитела в зависимост от насочеността на клиницистите. С оглед на това задълбоченото познаване на информативното съдържание на съответния лабораторен показател е от изключителна важност за коректната интерпретация и последващите от това решения.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Achenbach P, et al. Stratification of type 1 diabetes risk on the basis of islet autoantibody characteristics. *Diabetes* 53(2):384–92, 2004 Erratum in: *Diabetes*. 53(4):1175–6, 2004.
2. Atkinson MA, et al. Islet cell antibodies in insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest*.92:1608–1616, 1993.
3. Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet*.358(9277): 221–229, 2001.
4. Baekkeskov S., et al. Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. *Nature*. 8; 298(5870):167–9, 1982.
5. Baekkeskov S, et al. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature*.13; 347(6289):151–6, 1990.
6. Bingley PJ, et al. Combined analysis of autoantibodies improves prediction of IDDM in islet cell antibody-positive relatives. *Diabetes*. 43(11): 1304–1310, 1994.
7. Bonifacio E., et al. Islet autoantibody markers in IDDM: risk assessment strategies yielding high sensitivity. *Diabetologia*. 38:816–822, 1995.
8. Bonifacio E. et al. Early autoantibody responses in prediabetes are IgG1 dominated and suggest antigen-specific regulation. *J Immunol*.163(1): 525–532, 1999.
9. Bu DF, et al. Two human glutamate decarboxylases, 65-kDa GAD and 67kDa GAD, are each encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(6): 2115–9, 1992.
10. Christie MR, et al. Antibodies to islet 37k antigen, but not to glutamate decarboxylase, discriminate rapid progression to IDDM in endocrine autoimmunity. *Diabetes*. 43(10): 1254–1259, 1994.
11. Concannon P, et al. Type 1 diabetes: evidence for susceptibility loci from four genome-wide linkage scans in 1,435 multiplex families. *Diab*. 54:2995–3001, 2005.
12. Clifford KS, MacDonald MJ. Survey of mRNAs encoding zinc transporters and other metal complexing proteins in pancreatic islets of rats from birth to adulthood: similar patterns in the Sprague-Dawley and Wistar BB strains. *Diabetes Res Clin Pract*.49(2–3):77–85, 2000.
13. David MM, et al. Epidemiology of Type 1 Diabetes *Endocrinol Metab Clin North Am*39 (3): 481–497, 2010.
14. Falorni A, Brozzetti A. Diabetes-related antibodies in adult diabetic patients. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*.19(1):119–33, 2005.

15. Fenalti G, Buckle A. Structural biology of the GAD autoantigen. *Autoimmun Rev.*9:148–152, 2010.
16. Fùchtenbusch M., et al. Prediction of type 1 diabetes postpartum in patients with gestational diabetes mellitus by combined islet cell autoantibody screening: a prospective multicenter study. *Diabetes.*46(9):1459–67, 1997.
17. Genovese S., et al. Association of IA-2 autoantibodies with HLA DR4 phenotypes in IDDM. *Diabetologia* 39(10):1223–1226, 1996.
18. Gorus FK, et al. IA-2-autoantibodies complement GAD65-autoantibodies in new-onset IDDM patients and help predict impending diabetes in their siblings. The Belgian Diabetes Registry. *Diabetologia.* 40 (1):95–99, 1997.
19. Holmberg H., et al. Higher prevalence of autoantibodies to insulin and GAD65 in Swedish compared to Lithuanian children with type 1 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 72(3):308–314, 2006.
20. Hoppu S., et al. Insulin autoantibody isotypes during the prediabetic process in young children with increased genetic risk of type 1 diabetes. *Pediatr Res.* 55(2): 236–242, 2004.
21. Hoppu S., et al. GAD65 antibody isotypes and epitope recognition during the prediabetic process in siblings of children with type I diabetes. *Clin Exp Immunol.* 136(1):120–128, 2004.
22. Hoppu S., et al. IA-2 antibody epitopes and isotypes during the prediabetic process in siblings of children with T1D. *J Autoimmun.* 23(4):361–370, 2004.
23. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*, 7th edn. Brussels, Belgium.
24. Kambe T., et al. Cloning and characterization of a novel mammalian zinc transporter, zinc transporter 5, abundantly expressed in pancreatic beta cells. *Biol Chem.* 24; 277(21):19049–55, 2002.
25. Kawasaki E., et al. Autoantibodies to protein tyrosine phosphatase-like proteins in T1D. Overlapping specificities to phogrin and ICA512/IA-2. *Diabetes.* 45(10):1344–9, 1996.
26. Kulmala P., et al. Prediction of insulin-dependent diabetes mellitus in siblings of children with diabetes. A population-based study. The Childhood Diabetes in Finland Study Group. *J Clin Invest.* 101(2):327–336, 1998.
27. Lan M., et al. IA-2, a transmembrane protein of the protein tyrosine phosphatase family, is a major autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 25; 93(13):6367–70, 1996.
28. Leslie RD, et al. Autoantigens IA-2 and GAD in Type I (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia.* 42(1):3–14, 1999.
29. Morran MP, et al. Humoral autoimmunity against the extracellular domain of the neuroendocrine autoantigen IA-2 heightens the risk of type 1 diabetes. *Endocrinology.* 151(6):2528–37, 2010.
30. Naserke HE, et al. Prevalence, characteristics and diabetes risk associated with transient maternally acquired islet antibodies and persistent islet antibodies in offspring of parents with type 1 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86:4826–4833, 2001.
31. Nerup J., et al. HL-A antigens and diabetes mellitus. *Lancet.* 12; 2 (7885):864–6, 1974.
32. Notkins AL, Lernmark A. Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues. *J Clin Invest.* 108(9): 1247–1252, 2001.
33. Orban T., et al. Pancreatic islet autoantibodies as predictors of type 1 diabetes in the Diabetes Prevention Trial-Type 1. *Diabetes Care.* 32: 2269–2274, 2009.

34. Palmer JP, et al. Insulin an-tibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science*. 222:1337–1339, 1983.
35. Palmer JP. Insulin autoantibodies: their role in the pathogenesis of IDDM. *Diabetes Metab Rev*. 3(4):1005–15, 1987.
36. Parikka V., et al. Early seroconversion and rapidly increasing autoantibody concentrations predict prepubertal manifestation of type 1 diabetes in children at genetic risk. *Diabetologia*. 55(7):1926–36, 2012.
37. Peter A., et al. Islet autoantigens: structure, functions, locations and regulation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a007658, 2012.
38. Potter KN, Wilkin T.J. The molecular specificity of insulin autoantibodies. *Diabetes Metab Res Rev*. 16(5):338–353, 2000.
39. Ronkainen MS, et al. Antibodies to GAD65 epitopes at diagnosis and over the first 10 years of clinical type 1 diabetes mellitus. *Scand J Immunol*. 59:334–340, 2004.
40. Ronkainen MS, et al. Early epitope- and isotype-specific humoral immune responses to GAD65 in young children with genetic susceptibility to type 1 diabetes. *Eur J Endocrinol*. 155(4):633–642, 2006.
41. Rubio-Cabezas O., et al. Clinical heterogeneity in patients with FOXP3 mutations presenting with permanent neonatal diabetes. *Diabetes Care*. 2009; 32:111–116.
42. Sabbah E., et al. The Childhood Diabetes in Finland Study Group Disease-associated autoantibodies and HLA-DQB1 genotypes in children with newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Clin Exp Immunol*. 116: 78–83, 1999.
43. Savola K., et al. IA-2 antibodies-a sensitive marker of IDDM with clinical onset in childhood and adolescence. Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Diabetologia*. 41(4):424–429, 1998.
44. Shapiro AM, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med*. 343:230–238, 2000.
45. Strebelow M., et al. Karlsburg Type I diabetes risk study of a general population: frequencies and interactions of the four major Type I diabetes-associated autoantibodies studied in 9419 schoolchildren. *Diabetologia*. 42(6):661–670, 1999.
46. Torii S. Expression and function of IA-2 family proteins, unique neuroendocrine-specific protein-tyrosine phosphatases. *Endocr J*. 56:639–648, 2009.
47. Vardi P., et al. Concentration of insulin autoantibodies at onset of type 1 diabetes. Inverse log-linear correlation with age. *Diabetes Care*. 11:736–739, 1988.
48. Verge CF, et al. Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes*. 45(7):926–933, 1996.
49. Wang C, et al. Glucagon-like peptide-1 stimulates GABA formation by pancreatic beta-cells at the level of glutamate decarboxylase. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 292(4):E1201–6, 2007.
50. Wendt A., et al. Glucose inhibition of glucagon secretion from rat α -cells is mediated by GABA released from neighboring β -cells. *Diabetes*. 53(4):1038–45, 2004.
51. Wenzlau JM, et al. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 23;104 (43):17040–5, 2007.
52. Wijesekara N., et al. Zinc, a regulator of islet function and glucose homeostasis. *Diabetes Obes Metab*. 11 Suppl 4:202–14, 2009.
53. Williams AJ, et al. The prevalence of insulin autoantibodies at the onset of Type 1 diabetes

- is higher in males than females during adolescence. *Diabetologia*.46(10):1354–1356, 2003.
54. Winter WE, et al. Type 1 diabetes islet autoantibody markers. *Diabetes Technol Ther*. 4(6): 817–839, 2002.
 55. Yu J., et al. Transient antiislet autoantibodies: infrequent occurrence and lack of association with „genetic“ risk factors. *J Clin Endocrinol Metab*. 85(7):2421–2428, 2000.
 56. Ziegler AG, et al. Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in offspring of parents with type 1 diabetes: the 2-year analysis of the German BABYDIAB Study. *Diabetes*. 48:460–468, 1999.
 57. Ziegler R., et al. Specific Association of HLA-DR4 with Increased Prevalence and Level of Insulin Autoantibodies in 1st-Degree Relatives of Patients with Type-I Diabetes. *Diabetes*. 40: 709–14, 1991.
 58. Ziegler AG., et al. Age-related islet autoantibody incidence in offspring of patients with type 1 diabetes. *Diabetologia*. 55(7):1937–43, 2012.
-

ЗАХАРЕН ДИАБЕТ ТИП 1 И ИМУНОЛОГИЧНИ МАРКЕРИ

Е. Викентиева, Д. Попова, Р. Владимирова

Захарният диабет (ЗД) тип 1 е хронично, органично-специфично, Т-клетъчно медирано, аутоимунно заболяване с все още неясна етиология. Комбинирането на разнообразни генетични и не-генетични фактори е с ключова роля за развитието на аутоимунна реакция към различни островноклетъчни антигени – глутаматдекарбоксилаза (GAD), тирозинфосфатаза (IA-2, IA-2 β), инсулин и цинков транспортер-8 (ZnT8), като резултатът е селективна деструкция на произвеждащите инсулин β -клетки в Лангерхансовите острови на панкреаса.

Процесът протича дълго в предклиничната фаза и се асоциира с появата на циркулиращи аутоантитела месеци до години преди клинично изявен ЗД. Определянето на антиостровноклетъчни аутоантитела идентифицира лицата в риск от развитие/прогресия на болестта. ЗД тип 1 е причина за 7–12% от случаите на ЗД в световен мащаб, като тенденцията за нарастване е изчислена на 3%, което обуславя социалната значимост на това заболяване.

Ключови думи: ЗД тип 1, аутоантитела, GAD, IA-2, IA-2 β , IAA, ZnT8.

Адрес за кореспонденция:

д-р Елена Викентиева, д.м.

Лаборатория „Клинична имунология“

Катедра „Клинична лаборатория и имунология“

Военномедицинска академия

ул. „Св. Георги Софийски“ 3, 1606 София

elivikentieva@gmail.com

TYPE 1 DIABETES MELLITUS AND IMMUNE MARKERS

E. Vikentieva, D. Popova, R. Vladimirova

Type 1 diabetes mellitus (T1D) is a chronic, organ-specific, T-cell mediated autoimmune disease associated with selective destruction of insulin-producing pancreatic β -cells. T1D accounts for 7–12% of all cases of diabetes mellitus.

The etiology of T1D is still unknown. There is a strong association between genetic predisposition, environmental factors and dysregulated immune function resulting in autoimmune reaction to proteins of the islet cells of the pancreas and production of autoantibodies to glutamic acid decarboxylase (GAD), tyrosine phosphatase like protein islet antigen-2 (IA-2), insulin and zinc transporter-8 (ZnT8). During the preclinical stage these autoantibodies often circulate in the peripheral blood and their measurement can be used for identification of individuals at risk for development of T1D.

Keywords: type 1 diabetes mellitus, autoantibodies, GAD, IA-2, IA-2 β , IAA, ZnT8.

Contact address:

Elena Vikentieva, M.D., PhD
Lab of Clinical Immunology
Dpt of Clinical Laboratory and Immunology
Military Medical Academy
3 „G. Sofiiski“ Str.
1606 Sofia, Bulgaria
elivikentieva@gmail.com

EX VIVO РАЗМНОЖЕНИ ЛИМБАЛНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ – ТЕРАПЕВТИЧНО ПРИЛОЖЕНИЕ

Р. Христова¹, Я. Здравков¹, М. Христова², И. Танев¹

¹Медицински университет – София, УМБАЛ „Александровска“,

Клиника по очни болести

²УМБАЛ „Александровска“, Клиника по нефрология, Катедра по вътрешни
болести, Медицински университет – София

ВЪВЕДЕНИЕ

Очната повърхност включва два хистологично и физиологично различни видове епител – роговичен и конюнктивен, преминаващи един в друг в зоната на лимба. Този преход демонстрира палисадна подредба – палисади на Vogt. Лимбалната локализация на клетките, отговорни за регенеративните процеси в роговицата, е доказана в редица проучвания [1]. Палисадите на Vogt, заедно с интерпалисадните мрежовидни ивици (interpalisade rete ridges) и наскоро откритите лимбални епителни крипти [2] формират специфична микросреда – ствловоклетъчна ниша. В тази зона са установени струпвания на силно пигментирани клетки, които осигуряват протекция от неблагоприятните въздействия на ултравиолетовата светлина. Освен това зоната е богато кръвоснабдена и инервирана [3, 4], което позволява достъп на лимбалните ствлово клетки до повече хранителни вещества и кръвни фактори, регулиращи тяхната хомеостаза [5].

Лимбалната ствловоклетъчна инсуфициенция (Limbal Stem Cell Deficiency – LSCD) се определя като придобито частично или тотално засягане на лимба при инфекциозни, туморни или травматични състояния, които водят до намаление на броя ствлово клетки под критичния праг. Последниците са персистиращи болки и дискомфорт, помътняване на роговицата с намаление на зрението, което силно влошава качеството на живот на пациентите. При прогресия на процеса може да се формира панус, стромална скарификация, изтъняване и перфорация на роговицата [6]. Дефицитът на лимбални ствлово клетки може да е причина за неуспешна роговична трансплантация.

Лечението включва консервативни и оперативни терапевтични подходи. Локално се прилагат изкуствени сълзи, имуномодулатори, автоложен серум, матрикс регенеративна терапия, нервен растежен фактор [7, 8, 9]. При липса на ефект от консервативно лечение и засягане на зрителната ос се преминава към оперативно възстановяване на очната повърхност.

Оперативното лечение включва различни методи за трансплантация. Основни недостатъци на тези процедури са рискът от индуциране на инсуфициенция на донорното око и необходимост от продължителна имunosупресивна терапия при алогенните трансплантации [10].

Това е причина да се разработят и търсят алтернативни методи на лечение.

Пелегрини и сътр. през 1997 г. за първи път съобщават резултати от трансплантация на *ex vivo* размножени лимбални стволови клетки [11]. В повечето научни доклади като субстрат се използва инактна, или дезепителизирана, амниотична мембрана. Хранителните среди са базирани на Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) [12, 13]. Допълнителните нутриенти включват фетален телешки или автоложен човешки серум, холера токсин, антиинфекциозни агенти, различни растежни фактори и други. Редица автори използват и хранещи клетъчни слоеве от миши 3T3 фибробласти. В скорошни проучвания се съобщават резултати от използване на хранителни среди, разработени в съответствие с актуалните изисквания за Добра производствена практика [14].

До момента методиката *трансплантация на ex vivo* размножени лимбални стволови клетки претърпява редица модификации, като основната насока е създаване на биологично безопасна технология без употреба на ксенобиотични продукти.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Настоящото проучване бе одобрено от Етичната комисия на Медицински университет – София (КЕНИМУС), и проведено в съответствие с Декларацията от Хелзинки.

Методът бе приложен при 4 пациенти на средна възраст 56,5 годни (от 40 до 74 г.) от Клиника по очни болести към УМБАЛ „Александровска“ с клинични белези на лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция. Проведени бяха рутинни изследвания – определяне на зрителна острота, биомикроскопия, офталмоскопия, тонометрия.

Критериите за поставяне на клинична диагноза включват триадата хронично възпаление, неоваскуларизация и конюнктивализация на роговичната повърхност. Проведе се оптична кохерентна томография на преден очен сегмент (Topcon 3DOCT-2000FA, 3D Anterior seg., Radial Anterior seg., Line Anterior seg.) на лезиите в засегнатите очи и на зоните, предвидени за лимбална биопсия.

Поради липса на ефект от консервативно лечение се взе решение за оперативно възстановяване на очната повърхност.

ЛИМБАЛНА БИОПСИЯ

След получаване на информирано съгласие бе проведена минимално инвазивна лимбална биопсия. Процедурата включва внимателна дисекция на лимбален епител с размер 2x2 мм в зона с демонстративни палисади на Vogt на 12 ч. при стриктно спазване на асептични условия. В два от случаите за донор бе използвано контралатералното здраво око. При другите двама пациенти биопсията бе получена от зона със запазени палисади на засегнатото око. Полученият материал бе транспортиран до тъканна банка Биорегенерация в среда Stem α 2 (STEM ALPHA, Rhône-Alpes, France).

КЛЕТЪЧНИ КУЛТУРИ

За *ex vivo* размножаване на клетките бе използван иновативен протокол без употреба на ксенобиотични продукти, посочен от производителя (CnT-Frame, CELLnTEC Advanced Cell Systems AG, Bern, Switzerland). За преносител бе използвана инатктна амниотична мембрана. Растежът се проследи чрез фазовоконтрастна микроскопия. Клетъчните култури не съдържаха холера токсин, хранещи клетъчни слоеве (миши 3T3 фибробласти) и човешки/телешки серум.

С готовите трансплантати бе направено биологично покритие на роговицата при всеки пациент, което бе фиксирано с шев 10/0. Амниотичната мембрана бе поставена с епителната страна нагоре. След това се адаптира втори протективен слой (amniotic membrane patching), който инхибира протеиназната активност и осигурява антиинфламаторен и антиангиогенен ефект [15, 16]. По този начин се забавя разграждането на амнионът, преносител на стволите клетки, и се подпомага интегрирането им към тъканите на реципиента.

РЕЗУЛТАТИ

При всички пациенти се наблюдаваха клинични данни за унилатерална лимбална стволочелетъчна инсуфициенция (Фигура 1). Поради трофичния характер на основното заболяване при всички пациенти бе установена намалена до липсваща роговична сетивност. Чрез AS-OCT се наблюдаваха дефекти и изтъняване на епителния слой, стромална хиперрефлексивност, неравномерна роговична дебелина. При по-тежките случаи се наблюдава стромално изтъняване със или без перфорация (Фигура 2). В зоните предвидени за получаване на лимбален материал, не се установиха патологични изменения (Фигура 3).

Проведената минимално инвазивна биопсия в сектор с демонстративни палисади на Vogt на 12 ч. не индуцира лимбална инсуфициенция на донорното око и епителизира напълно в рамките на 7 дни (Фигура 3). Макар повечето автори да използват незасегнатото око за донор на клетки, Вазирани и сътр. [17] не откриват статистически значима разлика между култури, получени от ипси- и контралатералното око в случаи на частична унилатерална инсуфициенция, което се потвърди в настоящото проучване.

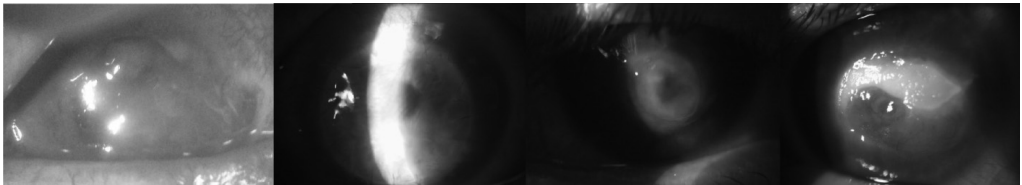
От получените материали между 10-ия и 14-ия ден се формираха епителни слоеве от клетки с морфологични белези на LESC's – малки, кубовидни, с голямо ядро и висок митотичен потенциал (Фигура 4). Оценката бе извършена чрез фазовоконтрастна микроскопия. Използваният протокол за *ex vivo* размножаване на стволови клетки не съдържа продукти от животински произход и съответства на изискванията за Добра медицинска практика.

Критериите за успех от трансплантацията на лимбални стволови клетки се дефинират като пълна епителизация на роговичната повърхност, редукция на неоваскуларизацията или пълното ѝ изчезване, възстановяване на нормални прозрачност, дебелина и рефлекс на роговицата [11, 14]. При интактен заден

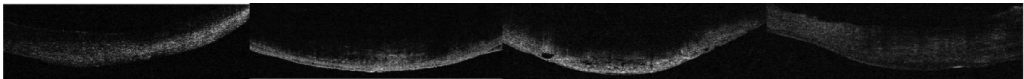
очен сегмент се включва и подобрието на зрителната острота. При трима пациенти всички критерии за успех бяха изпълнени (Фигура 5).

При един от случаите зрителната острота не се промени след трансплантацията поради засягане на зрителния нерв от туморен процес. Наблюдава се подобрието и на субективните оплаквания при всички пациенти.

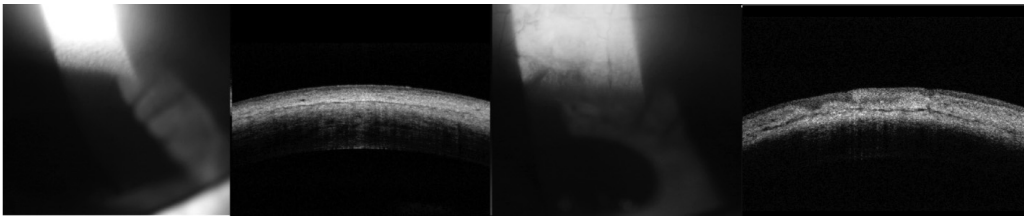
Проведената AS-OCT след трансплантацията демонстрира добре адаптирано биологично покритие на първи постоперативен ден. Четири седмици след оперативната интервенция роговичната повърхност бе напълно епителизирана с възстановена дебелина на повърхностните слоеве при всички от изследваните случаи (Фигура 6).



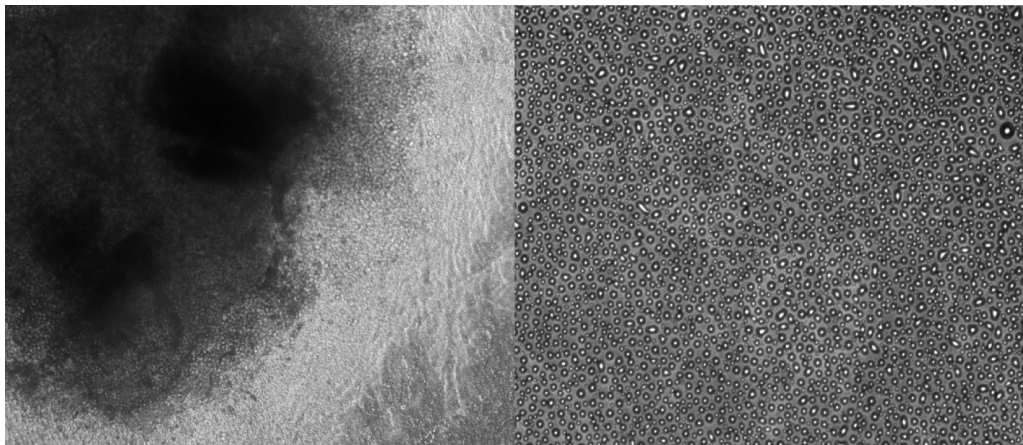
Фигура 1. Клинична картина при представянето. Наблюдават се белези на LSCD – конюнктивна хиперемия, неравномерен епител, периферна неоваскуларизация и конюнктивализация на очната повърхност



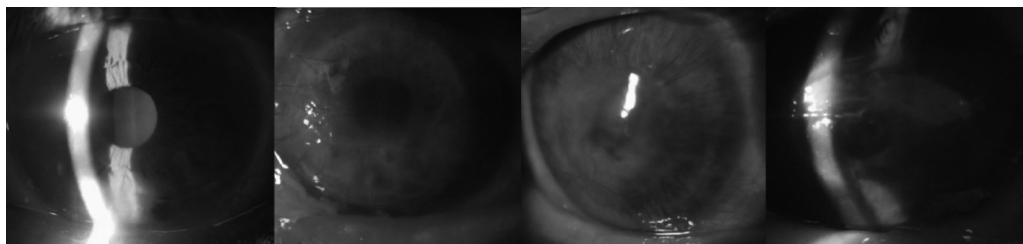
Фигура 2. Предоперативна оценка на състоянието чрез AS-OCT



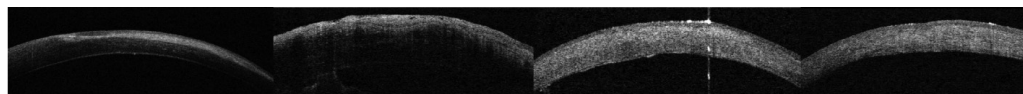
Фигура 3. Зона с демонстративни палисади на Vogt на 12 ч., предвидена за минимално инвазивна лимбална биопсия. А) Биомикроскопия на сегмента. В) AS-OCT в зоната не установи патологични промени. С) Биомикроскопски същият сегмент бе напълно епителизирал седем дни след проведената биопсия, което се потвърди и на AS-OCT (D)



Фигура 4. Фазовоконтрастна микроскопия на клетъчните култури: А) Общ изглед на материала, разположен върху амниотичната мембрана. В) По-големи увеличения показват морфологията на клетките – малки, кубовидни, с голямо ядро и чести митози



Фигура 5. Биомикроскопия четиринадесет дни след трансплантацията на автоложни *ex vivo* размножени лимбални стволови клетки



Фигура 6. Постоперативният статус бе проследен с AS-OCT – възстановена роговична дебелина, напълно епителизирана повърхност

ДИСКУСИЯ

Съвременното лечение на лимбалната стволовоклетъчна инсуфициенция е трансплантацията на *ex vivo* размножени автоложни стволови клетки. В научните съобщения до момента етиологията на лимбалната инсуфициенция при трансплантираните пациенти е свързана с химични/термични изгаряния, цикатризиращ пемфигоид или синдром на Stevens-Johnson [18]. В настоящото проучване за първи път в България са проведени трансплантации на *ex vivo* размножени лимбални стволови клетки. Включени бяха пациенти, при които инсуфициенцията е асоциирана с трофични процеси – невротрофичен кератит или очна форма на розацея, поради което се установи и силно намалена до липсваща роговична сетивност.

Предимствата на трансплантацията на *ex vivo* размножени стволови клетки са ниският риск от индуциране на инсуфициенция в донорното око поради минимално инвазивния характер на биопсията и използването на автоложни клетки, което не налага имunosупресивна терапия. При представените пациенти се наблюдава пълна епителизация на донорното око в рамките на 7 дни без възникване на усложнения.

Трансплантацията на *ex vivo* размножени стволови клетки все още е обект на проучвания и до момента има съобщени редица протоколи [12, 13]. Основна насока в развитието ѝ е създаване на биологично безопасна технология без добавяне на ксенобиотични продукти. Тя трябва да осигурява максимална клонална експанзия и едновременно да съхрани недиференциран фенотип и пролиферативен потенциал на стволовите клетки.

В настоящото проучване бе използван протокол, отговарящ на всички съвременни изисквания и стандарти. Наблюдава се ефективна клонална експанзия и формиране на епителни слоеве при всички пациенти. Сходни резултати са предствени и от други чуждестранни автори, използващи протоколи без добавяне на ксенобиотични продукти [14].

След трансплантацията на амниотичната мембрана, преносител на *ex vivo* размножените стволови клетки, не се наблюдаваха реакции на отхвърляне, съобщени в доклади на други автори [14, 17]. Успех от процедурата при представените пациенти бе отчетен както по отношение на субективното подобрене в качеството на живот на пациентите, така и по обективни критерии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящото проучване за първи път в България представяме трансплантацията на *ex vivo* размножени стволови клетки като ефективен и безопасен метод за възстановяване на очната повърхност при заболявания, асоциирани с лимбална стволовоклетъчна инсуфициенция.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Dua H. S., Azuara-Blanco A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Survey of Ophthalmology*. 2000; 44(5):415–425.
2. Dua HS, Shanmuganathan VA, Powell-Richards AO, Tighe PJ, Joseph A (2005) Limbal epithelial crypts – A novel anatomical structure and a putative limbal stem cell niche. *Br J Ophthalmol*.
3. Goldberg MF, Bron AJ. Limbal palisades of Vogt. *Transactions of the American Ophthalmological Society*. 1982; 80:155–171.
4. Lawrenson JG, Ruskell GL. The structure of corpuscular nerve endings in the limbal conjunctiva of the human eye. *Journal of Anatomy*. 1991; 177:75–84.
5. Zieske J.D. Perpetuation of stem cells in the eye. *Eye*. 1994; 8:163–169. doi: 10.1038/eye.1994.41.
6. Kenyon KR, Tseng SC. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology*. 1989, 96, 709–722.
7. Del Buey MA, Casas, P, Caramello CM, et al. Analysis of the efficacy of the tissue regenerating agent (RGTA) 0.01% poly-carboxymethylglucose sulfate in the treatment of neurotrophic corneal ulcers and persistent epithelial defects. *Acta Ophthalmologica*, 2015, 93, S255.
8. Freire V, Andollo N, Etxebarria J, et al. Corneal wound healing promoted by 3 bloodderivatives: an in vitro and in vivo comparative study. *Cornea*. 2014, 33, 614–620.
9. Lambiase S, Manni L, Bonini S, et al. Nerve growth factor promotes cornealhealing: structural, biochemical, and molecular analyses of rat and human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000, 41, 1063–1069.
10. Tsubota K, Toda I, Saito H, et al. Reconstruction of the corneal epithelium by limbal allograft transplantation for severe ocular surface disorders. *Ophthalmology*. 1996, 102, 1486–1496.
11. Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, et al. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet*. 1997, 349, 990–993.
12. Baylis O., Figueiredo F., Henein C., Lako M., Ahmad S. 13 Years of cultured limbal epithelial cell therapy: a review of the outcomes. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2011; 112(4):993–1002.
13. Tseng SCG, Chen SY, Shen YC, et al. Critical appraisal of ex vivo expansion of human limbal epithelial stem cells. *Current Molecular Medicine*. 2010, 10, 841–850.
14. Sangwan VS, Basu S, Vemuganti GK, et al. Clinical outcomes of xeno-free autologous cultivated limbal epithelial transplantation: a 10-year study. *Br J Ophthalmol*. 2011; 95(11):1525–1529.
15. Kim JS, Kim JC, Na BK, et al. Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits protease activity on wound healing following acute corneal alkali burns. *Exp Eye Res*. 2000; 70(3):329–337.
16. Tseng SCG, Espana EM, Kawakita T, et al. How does amniotic membrane work? *Ocul Surf*. 2004; 2(3):177–187.
17. Vazirani J, Basu S, Kenia H, et al. Unilateral partial limbal stem cell deficiency: contralateral versus ipsilateral autologous cultivated limbal epithelial transplantation, *American Journal of Ophthalmology*, vol. 157, no. 3, pp. 584.e2–590.e2, 2014.
18. Rama P, Matuska S, Paganoni G, Spinelli A, De Luca M, Pellegrini G. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *N Engl J Med*. 2010; 363(2):147–155.

Конфликт на интереси: Аворите не съобщават за конфликт на интереси. Статията е осъществена по Проект „Млад изследовател“ № 322 с договор №18-Д/2015 г. на Медицински университет – София. Статията е прочетена и одобрена от всички автори.

EX VIVO РАЗМНОЖЕНИ ЛИМБАЛНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ – ТЕРАПЕВТИЧНО ПРИЛОЖЕНИЕ

Р. Христова, Я. Здравков, М. Христова, И. Танев

Настоящото проучване изследва възможностите на трансплантацията на ex vivo размножени автоложни лимбални епителни стволони клетки като метод за лечение на повърхностни очни заболявания.

За първи път в България бе извършена трансплантация на автоложни ex vivo размножени лимбални стволони клетки на четирима пациенти на средна възраст 56,5 години, преминали през Клиника по очни болести към УМБАЛ „Александровска“. Всички те демонстрираха клинични белези на унилатерална лимбална стволонклетъчна инсуфициенция, асоциирана с трофични заболявания на очната повърхност. След получаване на информирано съгласие бе проведена минимално инвазивна лимбална биопсия. Получените материали бяха обработени по иновативен протокол за клетъчни култури без употреба на ксенобиотични продукти. Четиринадесет дни по-късно бе направено биологично покритие с готовия трансплантат. Проследяване на състоянието се извърши чрез оптична кохерентна томография на преден очен сегмент преди и след трансплантацията. Критериите за успех от трансплантацията на ex vivo размножени стволони клетки включват: 1. пълна епителизация на роговичната повърхност; 2. редукция на неоваскуларизацията или пълното ѝ изчезване; 3. възстановяване на нормални прозрачност, дебелина и рефлекс на роговицата; 4. подобрене на зрителната острота.

При всички пациенти се наблюдаваше подобрене на клиничната картина и субективните оплаквания. При трима от изследваните бяха изпълнени четирите критерия за успешна трансплантация. При един от случаите не бе отчетено подобрене в зрителната острота, поради засягане на зрителния нерв от туморен процес. Не се наблюдаваха реакции на отхвърляне на трансплантата. Лимбалната биопсия не индуцира инсуфициенция на донорното око.

В заключение, трансплантацията на ex vivo размножени автоложни лимбални стволони клетки е ефективен и безопасен метод за възстановяване на очната повърхност, който може да бъде приложен при различни заболявания, асоциирани с лимбална стволонклетъчна инсуфициенция.

Адрес за кореспонденция:

Розалия Христова

ул. „Св. Георги Софийски“ № 1

София 1431

e-mail: alleta@abv.bg

EX VIVO EXPANDED LIMBAL STEM CELLS – THERAPEUTIC APPLICATION

R. Hristova, Y. Zdravkov, M. Hristova, I. Tanev

The aim of the current study is to investigate the application of autologous ex vivo expanded limbal stem cell transplantation in the management of ocular surface disease.

This is the first study in Bulgaria in which autologous ex vivo expanded stem cells were transplanted to four patients with mean age 56.5 years from the Department of Ophthalmology, University Hospital Alexandrovska. All patients presented signs of unilateral limbal stem cell deficiency, associated with trophic disease of the ocular surface. After informed consent was obtained a minimally invasive limbal biopsy was performed. The limbal materials were cultured using a novel protocol without additional xenobiotic products. The grafts were transplanted after fourteen days. Anterior segment optical coherence tomography before and after the intervention was used for assessment of the condition. Success of the procedure was defined as 1. complete epithelialization of the corneal surface, 2. partial or complete reduction of neovascularization, 3. achieving normal corneal transparency, thickness and reflex, 4. visual acuity improvement.

Clinical recovery was observed in all patients, as well as improvement of subjective ocular comfort. In three of the cases all four success criteria were met. Visual acuity of one patient did not change, due to neoplastic process, pervading the optic nerve. No graft rejection reactions were observed. Limbal biopsy did not induce limbal stem cell deficiency in the donor eye.

Transplantation of autologous ex vivo expanded limbal stem cells is an effective and safe method for ocular surface reconstruction, which can be applied in different conditions, associated with limbal stem cell deficiency.

Contact address:

Rozaliya Hristova,

1 G. Sofiyski str.

Sofia 1431

e-mail: alleta@abv.bg

БИОЛОГИЧНИТЕ СРЕДСТВА В ЛЕЧЕНИЕТО НА РЕВМАТОЛОГИЧНИТЕ ЗАБОЛЯВАНИЯ

Проф. д-р Р. Рашков, дмн; д-р Д. Калинова, дм
Клиника по ревматология, МУ – София

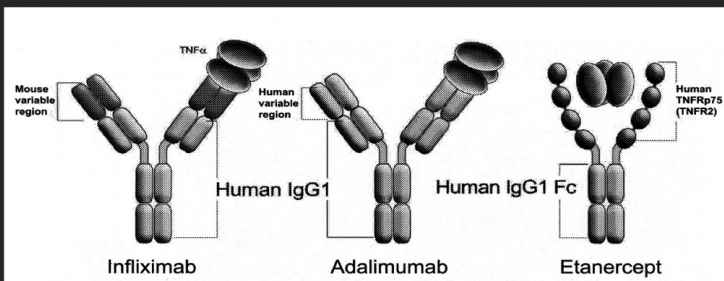
Основни моменти

1. Биологични средства – въведение в проблема.
2. Основни групи биологични средства, които се използват в ревматологичната практика.
3. Лечение на основните ревматологични заболявания с биологични средства – какви, кога?
4. Нашият личен опит и впечатления от приложението на биологични средства.

Биологични средства – въведение в проблема

Определение

Представяват белтъчни молекули или части от тях, които се получават по определени биотехнологии и имат точно определена имунологична активност



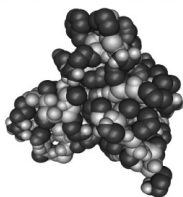
Функционално биват:



- Моноклонални антитела (Mab)
- Поликлонални антитела (IVIg)
- Рецепторни антагонисти (CEPT)
- Клъстерни блокери (anti-CD20; anti-CD22...)

Лечението с мезенхимни и хемопоеични стволови клетки също представлява биологично лечение.

Молекулите на споменатите антитела са огромни:



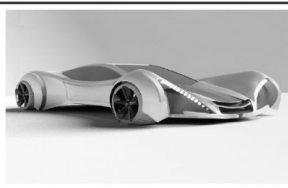
*Растежен фактор
(849 далтона)*



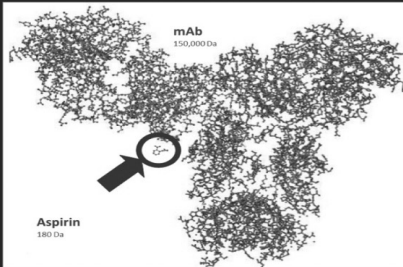
*Еритропоеин
(34 000 далтона)*



*Etanercept
(150 000 далтона)*



Молекулите на споменатите антитела са огромни:



Като те са:

- 1) Насочени към определена мишена
- 2) Имуногенни – с/у тях се синтезират антитела още в края на първата година от лечението
- 3) Имат скрити епитопи, които могат да променят характера на лекарството

Според съдържанието на чужд белтък биват:

- Химерични – до 30% чужд белтък – Ximab (Infliximab)
- Хуманизирани – до 10% чужд белтък – Mumab (Adalimumab)
- Напълно човешки – 100% човешки – Zumab (Tocilizumab, Certolizumab)
- Рецепторни антагонисти – CEPT (Etanercept)
- Биосимилари

Различните биологични препарати в ревматологичната практика:

- Infliximab (Remicade®)**
- Adalimumab (Humira®)**
- Golimumab (Simponi®)**
- Tocilizumab (RoActemra®)**
- Certolizumab pegol (Cimzia®)**
- Etanercept (Enbrel®)**
- INN Infliximab (Remsima®, Inflectra®)**
- Ustekinumab (Stelara®)**
- Secukinumab (Cosentyx®)**
- Rituximab (Mabtera®)**

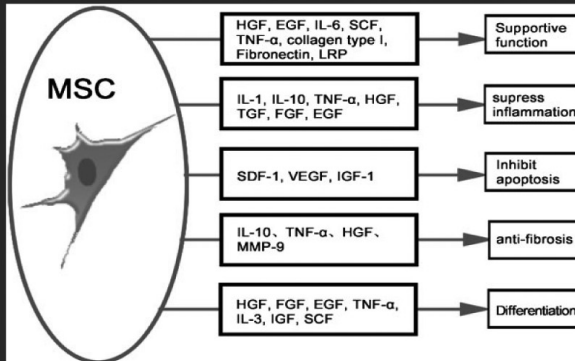
Към биологичните средства се отнасят и поликлоналните имуноглобулини:

- Immunovenine intact (250 mg/5 ml)** – БулБио НЦЗПБ ЕООД
- Gamma-Venin P (250 mg; 500 mg; 2.5 gr; 5 gr; 10 gr)** – Centeon Pharma
- Octagam® (20 ml; 50 ml; 100 ml; 200 ml)** – Octapharma Australia Pty. Ltd
- Privigen® (100 mg/ml)** – CSL Behring
- Carimune®, Flebogamma®, Gammaplex®**
- Gammagard (Immune globulin infusion, 10%)** - Baxter

Мезенхимни и хемопоеични стволови клетки:

Стволовите и мезенхимните клетки се прилагат в лицензирани лаборатории.

NB! Приложението им е включено в стандарта по ревматология.

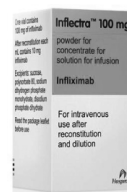
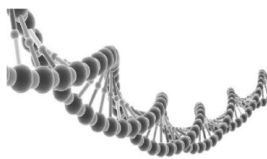


Биологичните средства с характеристика на моноклонални антитела се произвеждат от една-единствена клетъчна линия.

- Всяка мутация в тази линия променя лекарството.
- Всяка смяна на клетъчната линия с друга променя лекарството.
- Всяко производство на подобна молекула върху друга клетъчна линия е друго лекарство, макар и подобно – биоподобни лекарства.



Infiximab




Основни групи биологични средства, които се използват в ревматологичната практика:

1. **Антицитокини** – представляват моноклонални антитела, насочени срещу определени цитокини, които са възлови във възпалителната каскада – IL-1; IL-6; TNF α ; IL-17; IL-12/23.
2. **Рецепторни антагонисти** – препарати, насочени срещу разтворими и фиксирани рецептори за цитокини или клетъчни сигнализатори – TNF α ; TACI-; BAFF-; APRIL-; BlyS-;
3. **Клъстърни блокери** – моноклонални антитела срещу т.нар. cluster of differentiation.
4. **Поликлонални гамаглобулини** (интравенозни имуноглобулини) – те нямат единствен таргет.
5. **Клетъчни терапии с мезенхимни и хемопоеични стволови клетки** – в процес на проучване, с възлагане на големи надежди.

Антицитокини...

1. TNF α антагонисти



TNF α антагонисти	INN Търговско наименование	Дозов режим
Infliximab	Remicade®	3-5 mg/kg i.v. на 0, 2, 6 седмица, след което на всеки 8 седмици
Adalimumab	Humira®	40 mg s.c., на всеки две седмици
Certolizumab pegol	Cimzia®	400 mg s.c. на 0, 2, 4 седмица, след което 200 mg s.c. на всеки две седмици
Golimumab	Simponi®	50 mg s.c., 1 x месечно
Etanercept	Enbrel®	25 mg s.c., 2 x седмично

antibody

infliximab
(chimeric
antibody)

soluble receptor

etanercept
(soluble receptor)

antibody

adalimumab
(human
antibody)

antibody

golimumab
(human
antibody)certolizumab
pegol (PEGylated
Fab'-fragment)

Антицитокини...

2. Други антицитокини – моноклонални антитела, насочени срещу IL-1; IL-6; IL-17; IL-12/IL-23

Други антицитокини	Характеристика на препарата	Дозов режим
Anakinra (Kineret®)	IL-Ra антагонист	100 mg s.c. ежедневно
Rilonacept (Arcalyst®)	Напълно човешки димерен фузионен протеин, съставен от IL-1RI; IL-1RAcP	160 mg s.c. веднъж седмично
Tocilizumab (RoActemra®)	IL-6 антагонист	8 mg/kg i.v. на всеки 4 седмици
Ustekinumab (Stelara®)	IL-12/IL-23 антагонист	45 mg s.c. на 0, 4 седмица; на всеки 12 седмици
Secukinumab (Cosentix®)	IL-17 антагонист, моноклонално антитяло срещу IL-17A	300 mg s.c. на 0, 1, 2, 3 седмица; на всеки 4 седмици

Други биологични препарати, използвани в ревматологичната практика:

Биологичен препарат	Характеристика на препарата	Дозов режим
Биосимилари INN: Infliximab Remsima® Inflectra®	TNF α антагонисти; биосимилари на Infliximab	3–5 mg/kg i.v. на 0, 2, 6 седмица, след което на всеки 8 седмици
Belimumab (Benlysta®)	Маб, инхибира В-клетъчен активатор или В-лимфоцитен стимулатор (BAFF; BLyS)	10 mg/kg i.v. на 0, 14-ия, 28-ия ден, след което на всеки 4 седмици
Abatacept (Orencia®)	СЕРТ, инхибира CD80/CD86 (B7-1; B7-2), костимулаторна молекула (APC-Т-клетки)	500–1000 mg i.v., според kg на 0, 2, 4 седмица, след което на всеки 4 седмици
Поликлонални имуноглобулини	Разнообразни механизми на действие	400–800 mg/kg i.v., приложен на 3 месечни интервали
Rituximab (Mabtera®)	Клъстърен блокер, anti-CD20	1000 mg i.v., 0 и 14 ден, приложен на 6-месечни интервали 375 mg/kg ² , в 4 поредни седмици, приложен на 6 месеца

Само големите фармацевтични компании имат оригинални моноклонални антитела

Биологичен препарат	Фармацевтична компания
Infliximab (Remicade®)	MSD (Merck&Sharp&Dohme GmbH)
INN: Infliximab (Inflectra®) INN: Infliximab (Remsima®)	Alvogen Egis
Tocilizumab (RoActemra®)	Hoffman-La Roche and Chugai
Adalimumab (Humira®)	AbbVie
Certolizumab pegol (Cimzia®)	UCB
Golimumab (Simponi®)	Janssen-Cilag
Etanercept (Enbrel®)	Pfizer
Ustekinumab (Stelara®)	Janssen Inc.
Secukinumab (Cosentix®)	Novartis
Anakinra (Kineret®)	Swedish Orphan Biovitrum
Belimumab (Benlysta®)	GSK (GlaxoSmithKline)
Rituximab (Mabtera®)	Hoffman-La Roche and Chugai

Времето за произвеждане на един иновативен продукт е минимум 12 години – разходите – 12 млрд. \$.

Биоподобните – 8 години – разходите – 4-8 млрд. \$.

Лечение на основните ревматологични заболявания с биологични средства, според кратката характеристика на продукта

Биологичен препарат	Терапевтични показания по кратка характеристика на продукта
Infliximab (Remicade®)	<input type="checkbox"/> Ревматоиден артрит <input type="checkbox"/> Псориатичен артрит <input type="checkbox"/> Анкилозиращ спондилоартрит <input type="checkbox"/> Псориазис <input type="checkbox"/> IBD – ХУКК, болест на Crohn при възрастни и деца
INN: Infliximab (Inflectra®) INN: Infliximab (Remsima®)	<input type="checkbox"/> Ревматоиден артрит <input type="checkbox"/> Псориатичен артрит <input type="checkbox"/> Анкилозиращ спондилоартрит <input type="checkbox"/> Псориазис <input type="checkbox"/> IBD – ХУКК, болест на Crohn при възрастни и деца
Tocilizumab (RoActemra®)	<input type="checkbox"/> Ревматоиден артрит <input type="checkbox"/> Системен ювенилен идиопатичен артрит (сЮИА) <input type="checkbox"/> Ювенилен идиопатичен полиартрит (пЮИА)
Adalimumab (Humira®)	<input type="checkbox"/> Ревматоиден артрит <input type="checkbox"/> Ювенилен идиопатичен артрит <input type="checkbox"/> Псориатичен артрит <input type="checkbox"/> Анкилозиращ спондилоартрит <input type="checkbox"/> Псориазис при възрастни и деца <input type="checkbox"/> IBD – болест на Crohn при възрастни и деца

Лечение на основните ревматологични заболявания с биологични средства според кратката характеристика на продукта

Биологичен препарат	Терапевтични показания по кратката характеристика на продукта
Infliximab (Remicade®)	<input type="checkbox"/> Ревматоиден артрит <input type="checkbox"/> Псориатичен артрит <input type="checkbox"/> Анкилозиращ спондилоартрит <input type="checkbox"/> Псориазис <input type="checkbox"/> IBD – ХУКК, болест на Crohn при възрастни и деца
INN: Infliximab (Inflectra®) INN: Infliximab (Remsima®)	<input type="checkbox"/> Ревматоиден артрит <input type="checkbox"/> Псориатичен артрит <input type="checkbox"/> Анкилозиращ спондилоартрит <input type="checkbox"/> Псориазис <input type="checkbox"/> IBD – ХУКК, болест на Crohn при възрастни и деца
Tocilizumab (RoActemra®)	<input type="checkbox"/> Ревматоиден артрит <input type="checkbox"/> Системен ювенилен идиопатичен артрит (сЮИА) <input type="checkbox"/> Ювенилен идиопатичен полиартрит (пЮИА)
Adalimumab (Humira®)	<input type="checkbox"/> Ревматоиден артрит <input type="checkbox"/> Ювенилен идиопатичен артрит <input type="checkbox"/> Псориатичен артрит <input type="checkbox"/> Анкилозиращ спондилоартрит <input type="checkbox"/> Псориазис при възрастни и деца <input type="checkbox"/> IBD – болест на Crohn при възрастни и деца

Нашият опит с биологични препарати: Кога? Какво?

* 2003 г. – 67 болни на лечение с Infliximab (Remicade®)

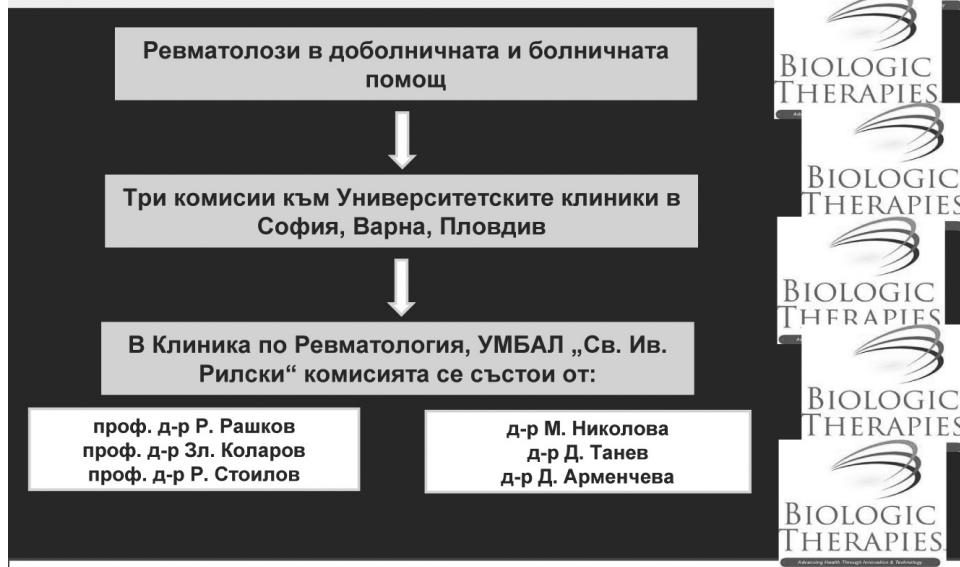
* 2010 г. – начало с бюджет от НЗОК 8 млн. лв.

* 2016 г. – 4500 болни с бюджет от НЗОК 80 млн. лв

- 11 биологични средства на пазара:** Infliximab; Etanercept; Adalimumab; Certolizumab pegol; Golimumab; биосимилар на Infliximab (Inflectra, Remsima); Tocilizumab; Ustekinumab; Secukinumab; Belimumab; Rituximab.
- От болестната популация в България се лекуват 3,5%; в Англия, Германия, Швеция – 5,5 – 7,5% от болните.
- Стръмната крива на пазара се успокоява, следват продължения, новите болни са приблизително 150 годишно = 3 млн. лв.



Нашият опит с биологични препарати. Кой предписва биологични препарати?



Нашият опит с биологични препарати. Как се предписват биологичните препарати?

- Лекарствата се изписват по протокол от НЗОК
- Болните без показания ще бъдат заменени от болни, показани за лечение
- Процедурата по изписването на биологичните средства отнема около 2 месеца
- Много болни влизат в клинични проучвания с биологични средства – около 400 годишно.

Какви са общите положения за лечение с биологични средства в световен мащаб?

- ❑ В големите държави – Англия, Германия, Франция, Швеция, Холандия има създадени регистри от 2006 година, включващи и носещи информация за хиляди болни. Подобна е ситуацията и в САЩ.
- ❑ Биологичното средство лекува само ~ 33–35% от болестта.
- ❑ Монотерапия само с Tocilizumab; Mabthera.



Общи правила при слаб ефект:



Ефикасност (Efficacy)



- 1) TNF или друг цитокин?
- 2) Антицитокин или клъстърен блокер или антисигнализатор?
- 3) Венозно или подкожно приложение?
- 4) Монотерапия или в комбинация с базисно средство – Metotrexate, Leflunomide; Sulfasalazine; Hydroxychloroquine; Chloroquine; златни соли....

Последни мнения – J. Smolen (PANLAR, 2016) постулира, че всички биологични средства имат близък, сходен ефект.

Безопасност (Safety)



1) Тумори

- Голямото опасение – солидни тумори, лимфоми (блокиране на TNF α) не се оправдаха
- Огромни регистри във Франция, Дания, Швеция, Англия, Германия, САЩ показват еднаква честота на солидни тумори/лимфоми при лекувани болни с биологична терапия и общата популация.

2) Инфекции

- Тежки инфекции, като сепсис, пневмония, ендокардит се срещат рядко
- Леки инфекции – ГДП, урогенитална система се срещат много често.

Безопасност (Safety)



3) Туберкулоза

- България е със средна заболеваемост в Европа
- ТБС инфекцията се среща като често усложнение при болни на биологична терапия
- При положителна проба Манту или положителен IGRA тест (Квантиферонов тест или T-spot TB) – необходимо е лечение

4) Алергични реакции

- Локални и общи
- От анафилактична реакция до локални еритеми и/или инфилтрати.

Собствени впечатления при лечението на възпалителните ставни заболявания

1) Ревматоиден артрит

- ❑ Infliximab (Remicade®) и Adalimumab (Humira®), Etanercept (Enbrel®) са най-продаваните препарати, особено Humira®
- ❑ Golimumab (Simponi®), приложен 1 x месечно, е подходящ при болни от далечните райони на страната
- ❑ Certolizumab pegol (Cimzia®), пегилиран TNF препарат. Установена най-ниска имуногенност и най-ниска честота на алергични реакции. Антителата срещу него в края на I-та година са между 1.5–3%.



Собствени впечатления при лечението на възпалителните ставни заболявания

1) Ревматоиден артрит

- ❑ Монотерапията е възможна само при леки форми на ревматоиден артрит и с Tocilizumab (RoActemra®).
- ❑ Комбинираната терапия с Metotrexate понижава синтеза на антитела срещу биологичния препарат на първата година
- ❑ Антитела
 - * 60% при употребата на Infliximab (Remicade®)
 - * 30% при употребата на Adalimumab (Humira®)
 - * 10% при употребата на Etanercept (Enbrel®)
- ❑ Etanercept (Enbrel®) с меко, сигурно и пълно действие. Това е препаратът на 5-о място по продажби в света.



Какво правим при ревматоиден артрит, ако ефектът не ни задоволява?

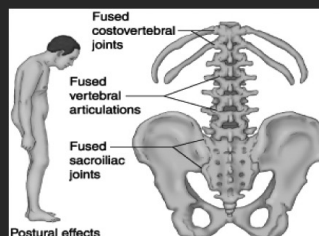
- Повишава се дозата на Metotrexate
- Изключва се инфекция, съответно на ГДП, урогенитална инфекция..
- Изчаква се 9–12 месеца
- Сменяме препарат, избира се препарат, насочен срещу друг цитокин
 - * Mab → Mab → ниска успеваемост
 - * Mab → СЕРТ → висока успеваемост 15–30%
 - * Mab → друг антицитокин (Tocilizumab) → висок процент на успех
 - * Mab → клъстърен блокер → добра успеваемост
 - * Mab → антисигнализатор (Abatacept, Orencia®) → алтернатива
- При неуспех се добавят златни соли или локална терапия.



Собствени впечатления при лечението на възпалителните ставни заболявания

2) Анкилозиращ спондилоартрит и ювенилен идиопатичен артрит

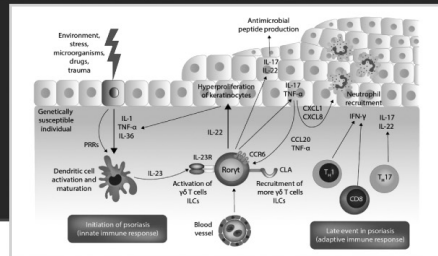
- При анкилозиращ спондилоартрит и ЮИА са най-драматични подобренията
- Биологичните средства не спират рентгенографската прогресия на болестта, но рязко подобряват клиничната картина и връщат болните в обществото
- Най-добър ефект имат TNF инхибиторите
- Антицитокините на IL-1; IL-6; IL-17; IL-23 са с по-слаб или липсващ ефект, както и Rituximab
- В продажбите водят Adalimumab (Humira®); Etanercept (Enbrel®); Infliximab (Remicade®)
- Болката изчезва, подвижността се подобрява, пациентът започва работа
- Монотерапията е възможна.



Собствени впечатления при лечението на възпалителните ставни заболявания

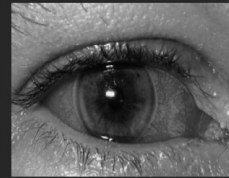
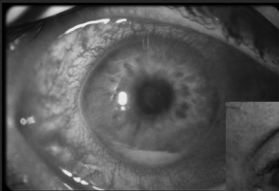
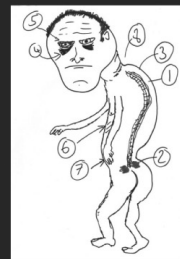
3) Псориазичен артрит/артропатия

- Едновременно лечение на псориазис и артрит, като не се наблюдава успоредност в резултатите от лечението
- Антицитокините имат своето място – Ustekinumab (Stellara®) – IL-17/IL-23 и Secukinumab (Cosentyx®) – anti-IL-17 са с доказан ефект
- TNF инхибиторите също имат добър ефект (Infliximab; Adalimumab; Golimumab; Etanercept; биосимилари)
- Ако няма ефект, се сменя таргетният цитокин
- Повлияването идва по-бавно – 9–12–15 месеца и често е непълен ефектът – върху кожата или върху ставите.



Автоимунни иридоциклити и увеити (самостоятелни или в комбинация с РА, ЮИА, АС)

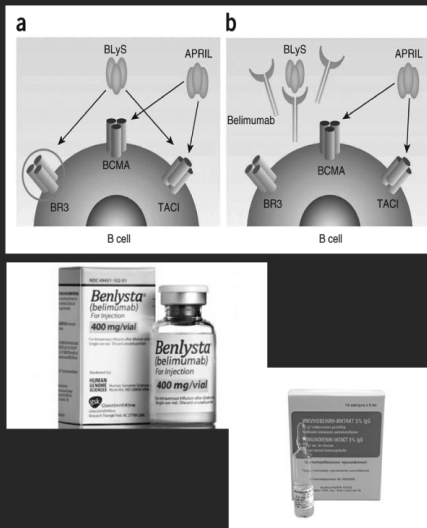
- Ефектът от биологичните средства е двупосочен 50%/50%
- При автоимунна генеза очните прояви се подобряват, докато при вирусна генеза – се влошават
- Невинаги може категорично да се заключи – автоимунен или вирусен процес, въпреки направените изследвания
- Проучени досега и използвани са само TNF антагонистите.



Собствени впечатления при лечението на системен лупус еритематозус с биологична терапия

1) Лек системен лупус еритематозус

- Добър ефект от приложението на Belimumab (Benlysta®) – моноклонално анти тяло срещу BlyS стимулатор
- Ефектът настъпва бавно, като анти тяло образуването се повлиява на втората година
- Няма данни при болни с неврологична форма на СЛЕ, както и при лупусни нефрити
- Традиционно добър ефект от поликласални имуноглобулини в доза 400 mg/kg i.v., приложени веднъж на 90–180 дни
- Atacicept – монокласално анти тяло срещу TACI-рецептора, все още в период на клинично проучване – III.



Собствени впечатления при лечението на системен лупус еритематозус с биологична терапия

2) Тежък системен лупус еритематозус

- Доказано добър ефект от поликласални имуноглобулини, в доза 800 mg/kg i.v., приложен на 90-дневни интервали
- Ефикасен при неврологични форми на СЛЕ, лупусни нефрити, васкулити, миозити
- Задължително в комбинация с базисно лечение – кортикостероид и имunosупресор (Azathioprine, Chloroquine, Hydroxychloroquine, Cyclophosphamide, Metotrexate, MMF, Leflunomide)
- Belimumab е с по-слаб ефект и не е алтернатива на поликласалните имуноглобулини
- Rituximab при неврологични форми на СЛЕ и лупусни нефрити още се проучва. Логично е неговото приложение при СЛЕ поради поликласалната В-клетъчна активация и производството на разнообразна палитра от анти тяла.

Биологична терапия и прогресивна системна склероза

Биологичното лечение се добавя, ако болният не се повлияе от терапията с D-penicillamine (Cuprenil®) или Metotrexate и кортикостероиди

- ❑ Поликлонални имуноглобулини – добри резултати в дози по-високи от 400 mg/kg i.v., приложен на 90 дневни интервали
- ❑ Tocilizumab – клинични проучвания III фаза, добри резултати на настоящия етап
- ❑ Приложение на хемопоетични стволови клетки CD34+ след приложение на 4 gr Cyclophosphamide – добри резултати.

Биологична терапия и васкулити

1) Болест на Бехчет – Infliximab i.v. – добър ефект

2) ANCA – асоциирани васкулити

Грануломатоза на Wegener
Микроскопски полиангиит
Синдром на Churg-Strauss

Rituximab 375 mg/kg² i.v. в 4
породни седмици, алтернатива на
Cyclophosphamide

3) Болест на Horton – Tocilizumab i.v., клинично проучване III фаза, добри резултати.

Биологична терапия и миозити

Биологични препарати	Таргетни молекули
• Интравенозни имуноглобулини – IVIG	➤ цитокини, комплемент, макрофаги
• Анти-В-лимфоцитни препарати – Rituximab (Mabthera®)	➤ В-лимфоцити
• Анти-TNF препарати (Infliximab, Adalimumab, Etanercept)	➤ TNF α
• Нови биологични медикаменти (Alemtuzumab, Eculizumab)	➤ Т-лимф, С5, il-2ra, il-6, IFN I, адхезионни молекули, лимф. мембрани протеини – LFA, LFA-3.

Основни предимства на терапията с IVIG



1. Поливалентни, поликлонални, кръстосано реагиращи:

- разкъсват идиотипните мрежи – идиотип-антиидиотип взаимодействие
- неутрализират автоантителата, стимулират процеса на “рецепторна ендцитоза” на Fc γ , което засилва катаболизма на антителата
- блокират ретикулоендотелната система
- супресия на цитокиновата продукция
- неутрализират бактериалните токсини – важни при тежки инфекции и септични състояния
- инхибират активираните Т-клетки
- инхибират активацията на ендотелните съдови клетки

2. Показани при неврологични, хематологични, ревматологични и кожни заболявания.

3. Режим на приложение – 3- и 6-месечни интервали.

Показания за приложение на интравенозни имуноглобулини

Приложение на IgIV при автоимунни цитопении

1. Показан при:

- ✓ Идиопатична тромбоцитопенична пурпура
 - ✓ Автоимунна хемолитична анемия
 - ✓ Автоимунна неутропения
2. Препоръчителната доза на IgIV при идиопатичната тромбоцитопенична пурпура е 1gr/kg в два последователни дни.

Приложение на IgIV при автоимунни невромускулни заболявания

1. Показан при:

- ✓ Възпалителни демиелинизиращи полиневропатии: Guillain-Barre syndrome, хронична възпалителна демиелинизираща полиневропатия, Мултифокална моторна невропатия (доказан ефект)
 - ✓ Заболявания, които засягат невромускулното предаване: миастения гравис, Lambert-Eaton syndrome (вероятен ефект)
 - ✓ Заболявания на централната нервна система: множествена склероза, болест на Alzheimer
2. Препоръчителната доза на IgIV при острите и хроничните демиелинизиращи полиневропатии е 0.4 gr/kg дневно в 5 последователни дни или 2 gr/kg приложени еднократно.

Показания за приложение на интравенозни имуноглобулини

Приложение на IgIV при болест на Kawasaki

1. Приложението на IgIV в комбинация с Aspirin предотвратява развитието на аневризми на коронарните артерии
2. Препоръчителната доза на IgIV при болестта на Kawasaki е 0.4 gr/kg дневно в 5 последователни дни или 2 gr/kg, приложени еднократно.

Приложение на IgIV при различни системни заболявания на съединителната тъкан

1. IgIV може да се прилага като допълнителна терапия при:
 - ✓ ANCA асоциирани васкулити
 - ✓ Системен лупус еритематодес
 - ✓ Антифосфолипиден синдром с повтарящи се спонтанни аборти

При ANCA-свързаните васкулити и системния лупус еритематодес IgIV е прилаган в доза 400 mg/kg, в 5 последователни дни на три месечни интервала.

При антифосфолипидният синдром IgIV е прилаган в доза 500 mg/kg ежемесечно от установяването на бременността до 28–32 г.с..

Приложение на IgIV при автоимунни кожни заболявания

1. IgIV е прилаган при:

- ✓ Токсична епидермална некролиза и синдром на Stevens – Johnson
- ✓ Пемфигус вулгарис, булозен пемфигид

При токсичната епидермална некролиза IgIV е прилаган в дози между 250–700 mg/kg в 4 последователни дни, с ефект на 24–48-ия час от приложението.

Терапия с IVIG в ревматологията

- ❑ Проф. Д. Монова и проф. Н. Беловеждов въвеждат приложението на IVIG при лупусна нефропатия
- ❑ Следват дълги години (~ 20 год.) внимателно прилагане на 250 mg/kg i.v. при системни заболявания на съединителната тъкан – СЛЕ, ПМ, васкулити – усложнени, или не с инфекции
- ❑ След 1990 год. IVIG в същите дози се въведе при антифосфолипиден синдром, особено при налична тромбоцитопения
- ❑ IVIG в доза 250 mg/kg i.v. често се прилага при имунокомплексни васкулити със или без плазмафереза.

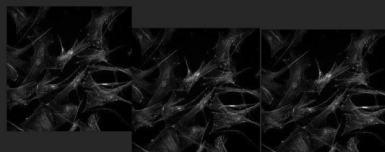
Лупусен нефрит – много важно показание

Ревматологични болести и инфекции – много добър ефект

- ❑ От около 10 години се прилагат високите дози 400–800 mg/kg i.v., като първите резултати са много добри.

Лечение с мезенхимни и хемопоеични стволови клетки

За лечението с хемопоеични стволови клетки CD34 в ревматологията съществуват публикации на групи от EULAR, които дават препоръки за приложението им в ревматологичната практика.



За лечението с мезенхимни стволови клетки засега съществуват изследвания и публикации, но още няма Европейски или друг консенсус.

Хемопоеични стволови клетки в ревматологията

Хемопоеични стволови клетки CD34 – много добри резултати при СЛЕ, ПСС, ПМ, васкулити, макар и в период на клинични проучвания сред малки групи болни

- В ревматологията групата на А. Tyndall et al. 2 пъти издават препоръки за терапия с хемопоеични стволови клетки CD34
- В Европа 23 центъра практикуват метода
- В България режимът е лицензионен, много субекти без връзка с ревматологията се опитват да участват.

Мезенхимни стволови клетки

Лечение с мезенхимни стволови клетки – все още в експеримент

- Естетична хирургия, мамология
- Целулит
- Хрущяли, кост

Надеждите са големи!

В България докторска дисертация на доц. д-р Доброслав Кюркчиев, дмн
„Периферна имунна супресия, осъществена от мезенхимни стволови клетки“

Заклучение

1. Биологичните средства реално работят.
2. Те долекуват болния точно с онези 30–35%, които го правят годен за връщане в обществото.
3. Представяват важна част от арсенала на „персонализираната“ медицина.
4. Бъдещето е тяхно.
5. Лекарите, които работят и имат опит с биологични средства, са с една класа по-добри.

Благодаря за вниманието



ИМУНОБИОЛОГИЯ НА КЛЕТКИТЕ НА SÉZARY – РОЛЯ ЗА ДИАГНОЗАТА И В-СТАДИРАНЕТО

*Д. Попова, Р. Владимирова, Е. Викентиева, И. Николов,
Р. Станчев, И. Дамянов, К. Милчева, Н. Петкова, А. Недева,
И. Киндеков, И. Гизов, Ю. Райнов*

Военномедицинска академия, МБАЛ – София

Клетките на Sézary са описани морфологично от Albert Sézary през 1938 г. и представляват клонално пролиферирани абнормни Т-лимфоцити [Sézary A, et al., 1938]. Срещат се при Mycosis fungoides (MF) и синдрома на Sézary (SS), отнасяни към Т-клетъчните лимфоми с първично кожно засягане [Yamashita T, et al., 2012; Swerdlow SH, et al., 2016], като съставляват съответно 50% и 5% от тях. Тези редки страдания се намират в около 2% от всички лимфоми, засягат по-често мъже в зряла и напреднала възраст, но MF се наблюдава и при по-млада хора, включително при деца [Swerdlow SH, et al., 2008; Pope E, et al., 2010].

Клетките на Sézary морфологично са описани като монструозни (чудовищни) клетки с по-големи размери от зрелите лимфоцити, характерни големи, налобени, церебриформни ядра и необилна базофилна агрануларна цитоплазма. По-малките клетки с подобни белези носят названието клетки на Lutzner, по-големите са класическите клетки на Sézary [Lutzner MA, et al., 1975; Leong A, et al., 2005]. Трябва да се отбележи, че клетки с подобна морфология могат да се срещнат и при други зрели Т- и В-клетъчни неоплазии, както и при не-неопластично кожно засягане.

Клинично Mycosis fungoides най-често има дълъг индолентен ход, като в около 25% от пациентите прогресира към по-агресивно протичащи лимфоми [Pulitzer M, et al., 2014; Scarisbrick JJ, et al., 2014]. Болните показват по правило добър отговор към терапията, включваща локални кортикостероиди и фототерапия. Към класическата TNM класификация на туморите при MF се включва четвърти критерий – В – свързан с кръвното ангажиране – от В0 до В2 [Agar NS, et al., 2010]. Трябва да се отбележи, че клетки на Sézary могат да не се открият в периферната кръв дори в авансиралите стадии на заболяването (В0) (Таблица 1) [Olsen EA, et al. 2011].

стадий		клетки/ml	% от лимфоцитите
В0	клетки на Sézary	< 250	≤ 5 %
	В0а – клон (-)		
	В0b – клон (+)		
В1	клетки на Sézary	250–1000	5–20 %
	В1а – клон (-)		
	В1b – клон (+)		

B2	клон в ПК И едно от:		
1.	клетки на Sézary	≥ 1000	$> 20\%$
2.	CD4 / CD8 ≥ 10 И	CD3 \uparrow ИЛИ CD4 \uparrow	ИЛИ
	CD4+ CD7- $\geq 40\%$ ИЛИ		
	CD4+ CD26- $\geq 30\%$		

Таблица 1. Критерии за кръвно ангажиране при Mycosis fungoides

При синдрома на Sézary намирането на клонални Т-лимфоцити (на Sézary) е част от основната диагностична триада, заедно с генерализираната еритродермия и лимфаденопатия. Намират се спленомегалия и вторични неоплазии. В терапевтичен план пациентите най-често са рефрактерни към лечението. По тази причина сред терапевтичните опции се включва трансплантацията на хемопоетични стволови клетки [de Masson A, et al., 2014]. Медианната преживяемост е едва три години, като до петата година доживяват едва 10–20% от пациентите. Причина за смъртта са най-често инфекциите, свързани с изразена имunosупресия.

Освен клетките на Sézary ($> 1 \times 10^9/L$) в периферната кръв при SS се среща различна по степен лимфоцитоза, с цитопении и нерядко еозинофилия. При този синдром клетките на Sézary се установяват в периферната кръв още при поставяне на диагнозата, но локализацията им е основно в дермалния слой на кожата, засягат се лимфните възли и в около 20% от случаите – костният мозък. Абнормните лимфоцити в него не са обилни и намирането им може да се пропусне.

За определяне клоналния характер на клетките на Sézary, златен стандарт представляват молекулярно-биологичните техники – основно полимеразната верижна реакция (PCR) и Southern блот. Заслужава да се отбележи фактът, че клоналност може да се докаже и флоуцитометрично при наличието на един или два V β -сегмента на Т-клетъчния рецептор, висока експресия на TCR γ/δ или антитела срещу NK-клетъчни антигени [Lima M, et al., 2003]. Към последните спадат KIR рецепторите CD158-a, -b, -e, -l, -k и C-тип лектиновите рецептори CD94 и CD161.

По отношение фенотипа на клетките на Sézary – те са зрели посттимусни лимфоцити: CD1a- / CD34- / TdT-. Най-често са CD4-положителни. При Mycosis fungoides се срещат двойно положителни CD4+ / CD8+ случаи, както и CD4- / CD8+ Т-лимфоцити [Knapp CF, et al., 2012; Nasu-Tababuchi M, et al., 2016]. Клиничният ход и прогнозата на CD8+ пациенти не се отличават от тези с положителен CD4 антиген. Срещат се по-често в детската възраст. При синдрома на Sézary по-рядко се среща CD8+ фенотип, свързан с хипопигментната форма и по-младата възраст [Nasu-Tababuchi M, et al., 2016]. Рядко се намира двойно отрицателен фенотип: CD4- / CD8-. Освен диагностично, съотношението между CD4+ / CD8+ Т-лимфоцити има прогностично и предиктивно значение по отношение чувствителността към лъчетерапия [Jiang W, et al., 2016]

Клетките на Sézary експресират класическите Т-линейно насочващи маркери, но обикновено с промяна в експресията им – CD2, CD3, CD5, CD7, Т-клетъчни рецептори (ТКР) [Lima M, et al., 2003]. Това поставя въпроса за

референтните граници на Т-лимфоцитните антигени. Резултатите от изследването на повърхностно-клетъчната им експресия са включени в таблици 2, 3 и 4 (Попова, Д. и сътр., 2011):

Антиген	CD3		CD2		CD5		CD7	
	%	x 10 ⁹ /l	%	x 10 ⁹ /l	%	x 10 ⁹ /l	%	x 10 ⁹ /l
Средна	71,976	1,306	82,172	1,483	73,608	1,328	75,001	1,366
Медианна	73,105	1,209	82,605	1,538	74,38	1,232	76,802	1,316
P25	68,198	0,876	79,562	1,006	79,588	0,912	71,972	0,861
P75	77,285	1,732	86,025	2,506	78,62	2,374	81,005	2,356
P2,5	53,624	0,572	73,688	0,726	55,896	0,589	56,394	0,645
P97,5	84,301	2,349	90,095	2,506	85,728	2,374	86,488	2,356
Брой	56	49	50	49	50	49	50	49

Таблица 2. Линейно насочващи антигени на Т-лимфоцитите на здрави лица (показани са средните стойности, медианите и персентилю P25 и P75 като граници на най-често цитираните референтни интервали. P2,5 и P97,5 дават информация за 95-процентовия обхват)

Антиген	ТКР α/β		ТКР γ/δ		CD3+ CD4+		CD3+ CD8+		CD3+4+/ CD3+8+
	%	x 10 ⁹ /l	%	x 10 ⁹ /l	%	x 10 ⁹ /l	%	x 10 ⁹ /l	
Средна	72,5	1,31	45,732	0,824	1,993	28,086	0,49	5,34	1,993
Медианна	73,6	1,23	46,53	0,756	1,88	25,8	0,406	4,89	1,88
P25	67,83	0,84	41,52	0,565	1,46	19,94	0,284	3,4	1,46
P75	78,22	1,77	51,37	1,032	2,36	30,86	0,704	6,59	2,36
P2,5	55,54	0,55	25,836	0,283	0,592	11,2239	0,182	1,35	0,592
P97,5	84,33	2,32	62,322	1,5	5,164	45,77	1,118	14,57	5,164
Брой	49	48	47	46	47	48	47	50	47

Таблица 3. Експресия на ТКР α/β и ТКР γ/δ в лимфоцитите на здрави лица. CD4+ и CD8+ Т-лимфоцити и съотношение между тях

Антиген	CD4+ CD7+		CD4+ CD7-		CD7+ CD4	CD7- % в	%CD45RA в CD4
	%	x 10 ⁹ /l	%	x 10 ⁹ /l			
Средна	36,378	0,653	10,09	0,184	77,846	22,157	45,43
Медианна	33,8	0,656	8,57	0,166	79,825	20,175	43,15
P25	29,157	0,465	6,51	0,087	69,475	12,287	36,51
P75	44,817	0,834	13,243	0,234	87,712	30,525	54,59
P2,5	16,04	0,135	2,62	0,041	46,49	6,43	11,06
P97,5	54,99	1,21	29,87	0,636	93,57	53,51	96,56

Таблица 4. Субпопулации на CD4+ Т-лимфоцити при здрави лица

При MF и SS балансът между T1- и T2-лимфоцитите е изместен в полза на T2-цитокиновата продукция. В тази посока интерес представляват лимфоцитите с фенотип CD4+ / CD7- / CD30+. Прави впечатление, че при здрави лица CD7-отрицателната субпопулация на CD4+ T-лимфоцити не надхвърля 30%.

Различни степени на понижена антигенна експресия при здрави лица се намира за следните положително експресирани T-клетъчни антигени (Таблица 5):

Антиген	Понижена експресия	Антиген	Понижена експресия
CD2	44%	CD7	96%
CD3	4%	CD8	100%
CD4	38%	TCR α/β	18%
CD5	94%	TCR γ/δ	12%

Таблица 5. Понижена експресия на T-клетъчни антигени при здрави лица (% от изследваните случаи)

Заслужава да се отбележи, че най-рядко понижена антигенна експресия се среща за маркера CD3 и за T-клетъчните рецептори за антиген.

Цел на настоящото проучване е флоуцитометричното определяне на клетките на Sézary с техните фенотипни особености и количество, което да подпомогне диагнозата, както и стадирането на Mycosis fungoides. В теоретичен аспект представлява интерес връзката между фенотипните характеристики и биологичните свойства на клетките на Sézary.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Изследвани са 67 пациенти с MF и SS, както и 45 здрави контроли.

Разпределението им по диагноза, възраст и пол е видно от Таблица 6:

	Mycosis fungoides	Синдром на Sézary	Общо MF + SS	Здрави контроли
Брой	60	7	67	45
Възраст	57,3 (7–92)	62 (29–82)	57,8 (7–92)	62 (29–82)
Мъже	42	3	45	29
Жени	18	4	22	16
Мъже / жени	2,33	0,75	2,05	1,81

Таблица 6. Разпределение на изследваните лица по диагноза, възраст (средна, минимална и максимална) и пол

Клетките на Sézary са определяни флоуцитометрично. Използван е директен имуофлуоресцентен тест в 5- и 10-параметърен анализ, съответно на апаратите FACSort и FACSCanto II (Becton Dickinson). Пробите са анализирани с програмните продукти CELLQuest и FACSDiva. Използван е разширен панел от антитела (Becton Dickinson), включващи:

- линейно насочващи/матурационни маркери: CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, TCR α/β , TCR γ/δ
- специфични антигени: CD26, CD30, CD158a, CLA
- други: CD9, CD25, CD27.
- Имунофенотипно клетките на Sézary са определяни като CD4+ CD7- или CD4+ CD26- абнормни Т-лимфоцити. За изчисление на абсолютния им брой е взет най-високият процент абнормни клетки по формулата:

$$\text{Клетки на Sézary} = \frac{\text{Левкоцити (x } 10^9/\text{l)} \times \% \text{ лимфоцити} \times \% \text{ абнормни лимфоцити}}{100 \times 100}$$

В случаите, когато антигенът CD158a е положителен, изчислението е направено по формулата:

$$\text{Клетки на Sézary} = \frac{\text{CD4+ Т-лимфоцити (x } 10^9/\text{l)} \times \% \text{ CD158a в CD4}}{100}$$

За статистическата обработка на резултатите е използвана програмата SPSS v21.

Повечето от изследваните параметри показват различно от Гаусовото разпределение, според теста на Колмогоров – Смирнов за една променлива. Поради това като мярка за централна тенденция в групите изследвани антигени се отбелязва медианната стойност, а като мярка за отклонение от централните характеристики се представят персентили 5 и 95 (P5 и P95).

Сравнението между независими групи данни е осъществено с помощта на теста на Mann – Whitney. За статистически значима се приема разликата между две групи изследвани данни, ако намерената вероятност за съвпадение $p < 0,05$ независимо от посоката на промяна.

РЕЗУЛТАТИ

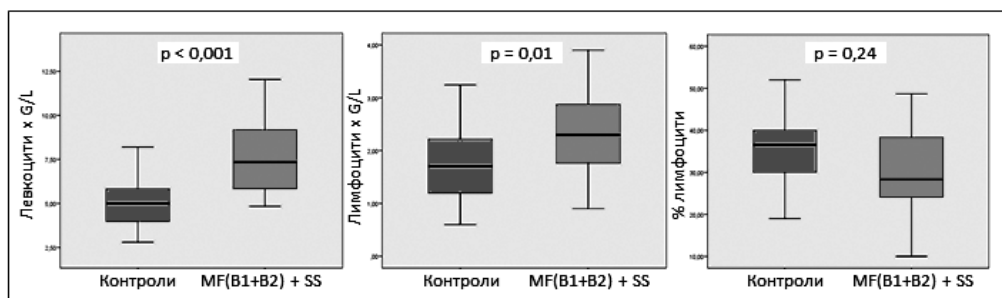
Левкоцитите на болните с MF, SS и цялата група MF/SS са статистически значимо повишени в сравнение със здравите контроли (съответно $p < 0,001$; $p = 0,004$; $p < 0,001$) (Таблица 7).

	MF	SS	MF/SS	Контроли
Левкоцити x $10^9/\text{l}$	6,42 (4,41–11,76)	8,71 (4,84–9,94*)	6,55 (4,42–11,97)	4,85 (2,82–7,6)
CD3 x $10^9/\text{l}$		1,99 (0,42–3,06*)		1,29 (0,47–2,32)
CD4 x $10^9/\text{l}$	0,86 (0,23–1,54)	1,7 (0,37–2,86*)		0,78 (0,28–1,56)

Таблица 7. Левкоцити и лимфоцити (абсолютен брой) в групите, показващи статистически значими разлики. Представени са медианните стойности (P5 – P95). *P75

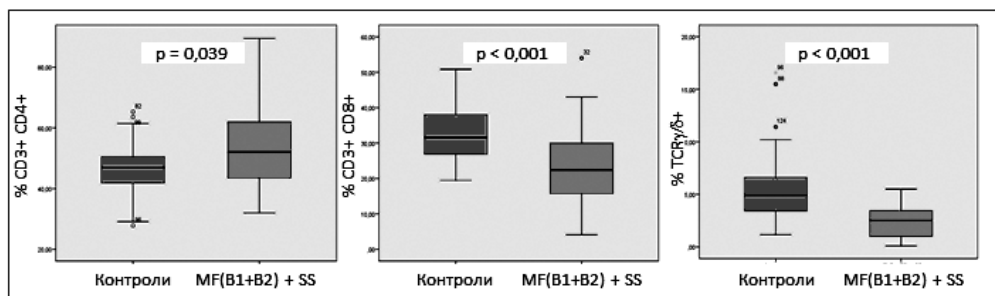
Само един пациент с MF показва лимфоцитоза ($> 4 \times 10^9/l$) – $4,17 \times 10^9/l$. CD3+ лимфоцитоза ($> 2,4 \times 10^9/l$) се намира при 5 лица (2 с MF, 2 със SS и 1 контрола), като разлика се набелязва между пациентите със SS и здравите контроли ($p=0,55$). CD4+ лимфоцитоза ($> 1,5 \times 10^9/l$) се намира при 9 индивиди (3 с MF, 4 със SS и 2 контроли). Групата със SS се отличава както от тази с MF ($p<0,001$), така и от контролната ($p=0,021$).

Тъй като пациентите с MF и B0 стадий на кръвно ангажиране не се отличават от здравите контроли по отношение на циркулиращите клетки на Sézary, направихме сравнение между сборната група SS + MF в B1 и B2 стадий. Резултатите показват статистически значими разлики за левкоцитния и лимфоцитния брой с повишение при пациентите (Фигура 1), независимо от намаления относителен дял лимфоцити.



Фигура 1. Левкоцити и лимфоцити при контролни лица и пациенти: MF (B1 + B2) + SS

Както може да се очаква, при пациентите се намира повишен дял на CD4+ Т-лимфоцити, с намаление на CD8+ и TCR γ/δ + Т-клетки (Фигура 2).

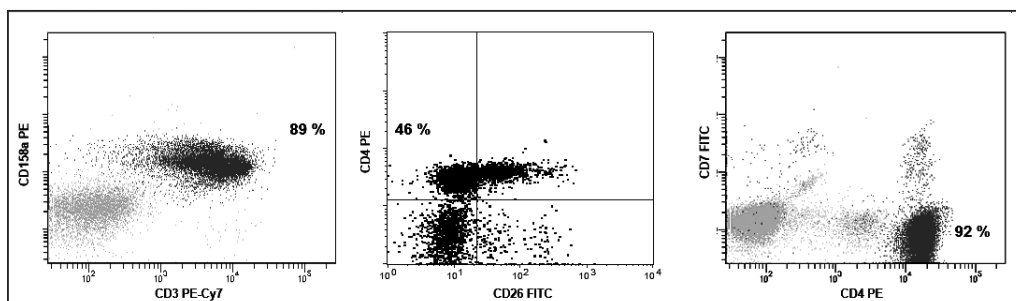


Фигура 2. Субпопулации Т-лимфоцити при контролни лица и пациенти: MF (B1 + B2) + SS

Сравненията между MF и SS намират статистически значими разлики за Т-клетъчните антигени CD3 и CD7, както и за CD4+ Т-клетки.

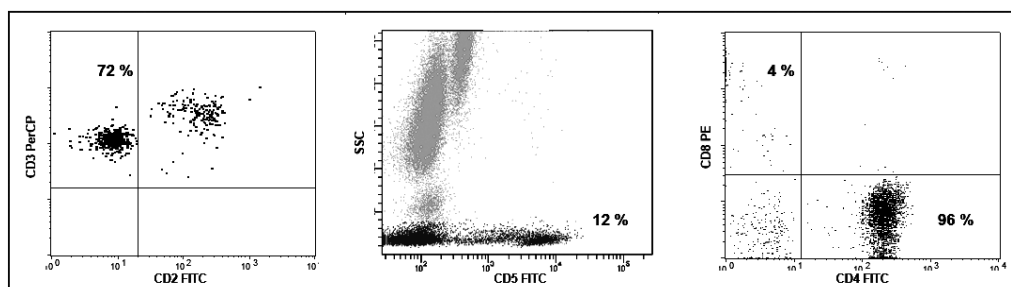
Клетките на Sézary са определяни чрез флоуцитометрия, считана за златен

стандарт в това отношение. Регистрират се отклоненията в антигенната експресия на CD4⁺ Т-лимфоцити – абнормно висока експресия на CD158a (KIR2DL1 рецептор, характерен за NK-клетките) или липсваща експресия на антигените CD26 или CD7 (Фигура 3). Абсолютният брой клетки на Sézary дефинира кръвното ангажиране. За диференциалната диагноза между SS и MF в B2 стадий, с еднакви по морфология и близки фенотипни характеристики клетки на Sézary, на помощ идват допълнителните клинични данни. При SS клетки на Sézary над $1 \times 10^9/L$ се намират при поставяне на диагнозата в съчетание с характерното кожно засягане (генерализирана еритродермия). При MF подобно кръвно ангажиране настъпва вторично.

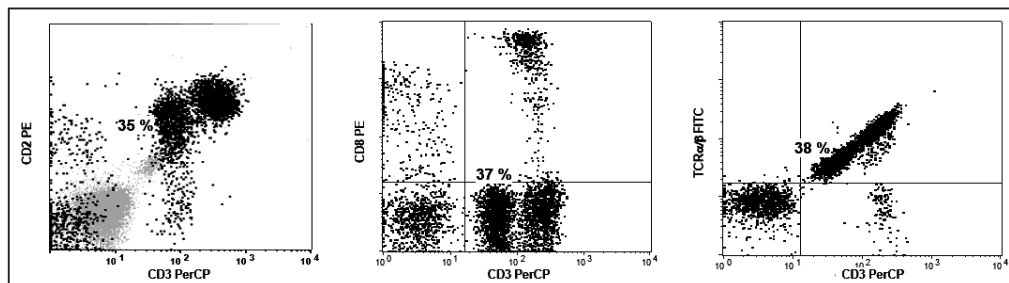


Фигура 3. Аберантна антигенна експресия на клетките на Sézary – абнормно висока експресия на CD158a и липсваща експресия на антигените CD26 и CD7

От съществено значение е променената експресия върху клетките на Sézary на класическите Т-клетъчни маркери (Фигура 4 и 5).

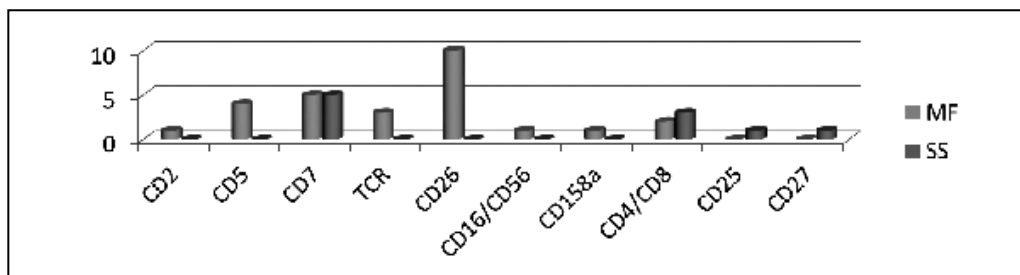


Фигура 4. Намален процент на експресия на Т-насочващи антигени (CD2, CD5 и CD8) при пациенти с MF и SS

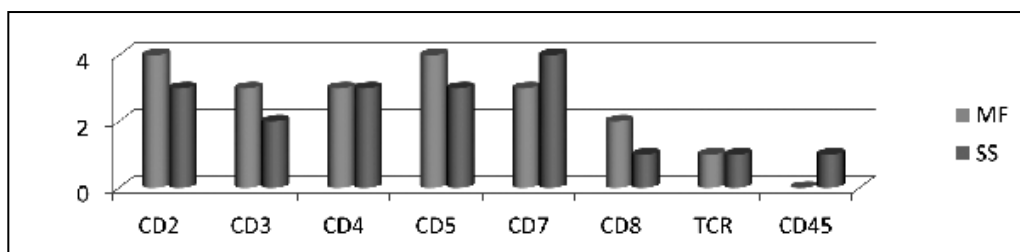


Фигура 5. Намален интензитет на експресия на Т-насочващи антигени (CD2/CD3, CD3 и TCRα/β/CD3) при пациенти с MF и SS

Антигенната експресия се приема за променена, когато са засегнати повече от 30% от изследваните Т-клетъчно насочващи антигени [Kelemen K, et al., 2010]. Промените могат да се изразят в намаление на процента положителни Т-лимфоцити (Фигура 4 и 6) или да се намира група Т-лимфоцити с по-ниска експесия от обичайната за съответния антиген в положителните Т-лимфоцити (фигура 5 и 7).



Фигура 6. Процент на намалена антигенна експресия при пациенти с MF и SS



Фигура 7. Намалена сила на антигенната експресия при пациенти с MF и SS

Обобщените данни за промените в антигенната експресия са представени в Таблицы 8 и 9.

Антигени	MF – 60 пациенти	SS – 7 пациенти
% експресия	27	15
Сила на експресия	20	18

Таблица 8. Общ брой отклонения в антигенната експресия при пациенти с MF и SS

Отделните пациенти с MF и SS се представят с различен брой аномалии (Таблица 8). Прави впечатление, че по-малко от половината болни с MF показват отклонения в антигенната експресия, докато такива се наблюдават във всички пациенти със SS, като в преобладаващата си част те са повече от 3.

Брой аномалии	MF – 60 пациента		SS – 7 пациента	
≤ 3	18	30%	2	29%
>3	4	7%	5	71%
Общо	22	37%	7	100%

Таблица 9. Брой отклонения в антигенната експресия при отделните пациенти с MF и SS

ОБСЪЖДАНЕ

При SS клетките на Sézary показват редица аномалии в антигенната експресия като изява на чуждо-линейни антигени: B- (CD20 или CD24), миелоидни (CD15s) НК-клетъчни (CD158k). Заслужава да се отбележи, че CD158k – KIR3DL2, характерен за НК-клетките, се счита за специфичен маркер за SS. С подобна роля са и молекулите CD85j, CD164 и SC5 [Nikolova M, et al., 2002; Bagherani N, et al., 2016]. Нещо повече, високата им експресия е белег за клоналност на Т-лимфоцитите. В същото време клетките на Sézary не носят класическите НК-клетъчни молекули: CD16, CD56, CD57, TIA-1. Относителна специфичност за клетките на Sézary показват цитоплазмения Т-пластин, свързан с клетъчния мотилитет и мембранныя виментин – белег за клетъчна активация [Ortolani C, 2011]. Коекспресията на CD40 и неговия лиганд CD40L свидетелстват за дефект в апоптозата на клетките на Sézary. Интерес представлява експресията на CD25 – α -верига на рецептора за IL-2, асоциирана с IL-7R. При SS тази молекула носи прогностична и предиктивна информация. Наличието ѝ се свързва с предстояща едроклетъчна лимфоцитна трансформация, а от друга страна – с чувствителност към лечението с пуринови аналози. CD25+ са регулаторните Т-лимфоцити (Treg, също FoxP3+). При някои пациенти с MF, абнормните клетки на Sézary произхождат именно от Treg, докато за SS не е ясна връзката на Treg с изходната патологична клетка [Wilcox RA, 2016]. Изявата на CD52 е предпоставка за успешна терапия с анти-CD52 антитела [Ortolani C, 2011].

За MF е известно, че в ранните стадии като необичаен маркер на клетките на Sézary може да се наблюдава CD103, докато в късните стадии понякога се намира CD158k.

Кожата, като външна телесна повърхност, е призвана да защитава организма от инфекциозните причинители на околната среда. Като орган на имунитета, тя е богата на имунни клетки, сред които над 10^9 Т-лимфоцити! Част от тях са резидентни клетки, други рециркулират през периферната кръв и кожата и имат различен фенотип [Hochheiser K, et al., 2015]. При MF и SS кожните Т-лимфоцити експресират във висока степен CCR4, докато други кожни адресни се намират с променлива честота: CCR6, CCR8, CCR10 и CLA (кожен лимфоцитен антиген), което обяснява концентрацията им в кожата и лимфните възли [Campbell JJ, et al., 2010; Bagherani N, et al., 2016]. Активиращите мутации в CCR4 са част от нарушенията, които се доказват с геномен анализ, като свидетелство за промени на участниците в сигналните пътища при SS и предполагащи идентифицирането на нови мишени за индивидуализирана таргетна терапия [Wang L et al., 2015; Vieyra-Garcia PA, et al., 2016]. При MF абнормните Т-лимфоцити не носят хемокиновия рецептор CCR7, L-селектин и CD27, което ги определя като паметови клетки на резидентните кожни ефектори (T_{EM}), оставащи трайно в кожата [Wilcox RA, 2016]. Те имат характеристиката на T2-ефекторни лимфоцити, продуциращи провъзпалителни цитокини [Dummer R, et al., 1998; Geskin LJ, et al., 2015]. Във възпалителните кожни лезии се привличат и не-малигненни Т-лимфоцити, формиращи характерните за MF петна и плаки. При SS кожните Т-лимфоцити са положителни за CCR7, L-селектин и CD27, което ги дефинира като Т-клетки на централната памет (T_{CM}). Те притежават висок пролиферативен потенциал и активно рециркулират от кожата през лимфните възли към периферната кръв и обратно в кожата. Това обяснява кръвното ангажиране още при клиничното представяне на SS, както генерализираната лимфаденопатия и характерния обрив.

Фенотипните и функционални различия на клетките на Sézary при MF и SS подсказват, че става въпрос за отделни нозологични единици, въпреки че тезата за преход на MF към SS и обратно, продължава да се дискутира [Campbell JJ, et al., 2010; Jawed SI, et al., 2014; Haverkos BM, et al., 2016].

Независимо от факта, че MF и SS спадат към лимфопрлиферативните неоплазии, с експанзия на CD4+ Т-лимфоцити, тези клетки са функционално непълноценни. По тази причина тези заболявания протичат с прояви на имунодефицитно състояние, с чести съпътстващи инфекции и автоимунни болести.

В заключение предлагаме минималният диагностичен панел да включва антитела към Т-клетъчни антигени (CD3, CD4, CD8, CD1a, CD2, CD5, CD7, TCR) и специфични антигени – CD25, CD26, CD30. Отрицателна селекция на клетките на Sézary се постига при липсата на CD26 и CD7. За предпочитане е позитивната селекция чрез CD158k, CD85j, CD94, SC5, още повече че тези молекули са подходящи за индивидуализирана таргетна терапия [Duvic M, et al., 2015; Sicard H, et al., 2015]. При отчитане на аберантната антигенна експресия (липса или абе-

рантно повишение) е необходимо да се отчита не само процентът на положителни клетки, а и промяната в силата на експресия на изследваните маркери. Въз основа на индивидуалния аберантен фенотип се мониторира ефектът от проведената терапия с доказването на минималната резидуална болест при конкретен пациент.

Така количественото определяне на клетките на Sézary има важна роля в диагностичния процес на SS и MF, В-стадирането на MF, мониторирането на минималната резидуална болест след лечение, като някои фенотипни особености на клетките на Sézary носят прогностична и/или предиктивна информация.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Попова Д, Владимирова-Андреева Р. Кръвни лимфоцитни антигени. Референтни граници за здрави лица от българската популация. София, 2011.
2. Agar NS, Wedgeworth E, Crichton S, et al. Survival outcomes and prognostic factors in mycosis fungoides/Sézary syndrome: validation of the revised International Society for Cutaneous Lymphomas/European Organisation for Research and Treatment of Cancer staging proposal. *J Clin Oncol.* 2010 Nov 1; 28(31):4730–9. doi:10.1200/JCO.2009.27.7665.
3. Bagherani N, Smoller BR. An overview of cutaneous T-cell lymphomas [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Research* 2016; 5(F1000 Faculty Rev):1882 (doi: 10.12688/f1000research.8829.1)
4. Dummer R, Geertsen R, Ludwig E, et al. Sézary syndrome, T-helper 2 cytokines and accessory factor-1 (AF-1). *Leuk Lymphoma.* 1998; 28(5–6):515–22.
5. Campbell JJ, Clark RA, Watanabe R, et al. Sezary syndrome and mycosis fungoides arise from distinct T-cell subsets: a biologic rationale for their distinct clinical behaviors. *Blood.* 2010; 116(5):767–71. doi:10.1182/blood-2009-11-251926.
6. Duvic M, Pinter-Brown LC, Foss FM, Phase 1/2 study of mogamulizumab, a defucosylated anti-CCR4 antibody, in previously treated patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Blood.* 2015; 125(12):1883–9. doi:10.1182/blood-2014-09-600924.
7. Foucar K. T-chronic lymphoproliferative neoplasms. In: Foucar K, Reichard K, Czuchlewski D editors. *Bone Marrow Pathology.* 3rd ed. Chicago: ASCP Press; 2010. vol 2, 504–521.
8. Geskin LJ, Viragova S, Stolz DB, et al. Interleukin-13 is overexpressed in cutaneous T-cell lymphoma cells and regulates their proliferation. *Blood.* 2015; 125(18):2798–805. doi:10.1182/blood-2014-07-590398.
9. Haverkos BM, Gru AA, Geyer SM, et al. Increased Levels of Plasma Epstein Barr Virus DNA Identify a Poor-Risk Subset of Patients With Advanced Stage Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2016; 16(Suppl): S181–S190.e4. doi:10.1016/j.clml.2016.02.014.
10. Hochheiser K, Bedoui S, Gebhardt T. Multilayered T-cell memory in human skin. *Ann Transl Med.* 2015; 3(20):311. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.09.16
11. Jawed SI, Myskowski PL, Horwitz S, et al. Primary cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sézary syndrome): part I. Diagnosis: clinical and histopathologic features and new molecular and biologic markers. *J Am Acad Dermatol.* 2014; 70(2):205.e1–16; quiz 221–2. doi: 10.1016/j.jaad.2013.07.049.
12. Jiang W, Abou Yehia Z, B. Dabaja, et al. CD4:CD8 Ratio in Mycosis Fungoides:

- Prognostic and Predictive Value of Circulating T-Lymphocyte Subsets for Outcomes After Total Skin Electron Beam Radiation. In: *J Rad Oncol Biol Physics*. 2016; 96(2): S20.
13. Kelemen K, White CR, Gatter K, et al. Immunophenotypic correlation between skin biopsy and peripheral blood findings in mycosis fungoides. *Am J Clin Pathol*. 2010; 134(5):739–48. doi:10.1309/AJCP7LRRLK8SLUGE.
 14. Knapp CF, Mathew R, Messina JL, et al. CD4/CD8 dual-positive mycosis fungoides: a previously unrecognized variant. *American J Dermatopathology* 2012; 34(3):e37–9. doi:10.1097/DAD.0b013e31823e25bb.
 15. Leong A, Wright D, Addi B. *Diagnostic Lymph Node Pathology*. 2005, Boca Raton, Florida: CRC Press.
 16. Lima M, Almeida J, dos Anjos Teixeira M, et al. Utility of flow cytometry immunophenotyping and DNA ploidy studies for diagnosis and characterization of blood involvement in CD4+ Sézary's syndrome. *Haematologica*. 2003; 88(8):874–87.
 17. Lutzner MA, Edelson R, Schein P et al. Cutaneous T-cell lymphomas: The Sézary syndrome, mycosis fungoides, and related disorders. *Ann Intern Med*. 1975; 83:534–552.
 18. de Masson A, Beylot-Barry M, Bouaziz JD et al. Allogeneic stem cell transplantation for advanced cutaneous T-cell lymphomas: a study from the French Society of Bone Marrow Transplantation and French Study Group on Cutaneous Lymphomas. *Haematologica*. 2014; 99(3):527–34. doi:10.3324/haematol.2013.098145.
 19. Nasu-Tababuchi M, Fujimura T, Kakizaki A, et al. Hypopigmented mycosis fungoides: An immunological investigation of tumor-infiltrating T-cells. *Dermatologica Sinica*. 2016; 34(2):96–98.
 20. Nikolova M, Musette P, Bagot M, et al. Engagement of ILT2/CD85j in Sézary syndrome cells inhibits their CD3/TCR signaling. *Blood*. 2002; 100(3): 1019–25.
 21. Olsen EA, Whittaker S, Kim YH, et al. Clinical end points and response criteria in mycosis fungoides and Sézary syndrome: a consensus statement of the International Society for Cutaneous Lymphomas, the United States Cutaneous Lymphoma Consortium, and the Cutaneous Lymphoma Task Force of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer. *J Clin Oncol*. 2011; 29(18):2598–607. doi: 10.1200/JCO.2010.32.0630.
 22. Ortolani C. *Neoplastic Diseases of Mature T and NK Cells*. In: *Flow Cytometry of Hematological Malignancies*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd; 2011. Location 9589 – 10381 of 14676. doi:10.1002/9781444398069.ch1
 23. Pope E, Weitzman S, Ngan B, et al. Mycosis fungoides in the pediatric population: report from an international Childhood Registry of Cutaneous Lymphoma. *J Cutan Med Surg*. 2010 Jan-Feb; 14(1):1–6.
 24. Pulitzer M, Myskowski PL, Horwitz SM, et al. Mycosis fungoides with large cell transformation: clinicopathological features and prognostic factors. *Pathology*. 2014; 46(7):610–6. doi:10.1097/PAT.000000000000166.
 25. Scarisbrick JJ, Kim YH, Whittaker SJ, et al. Prognostic factors, prognostic indices and staging in mycosis fungoides and Sézary syndrome: where are we now? *Br J Dermatol*. 2014; 170(6):1226–36. doi:10.1111/bjd.12909.
 26. Sézary A, Bouvrain Y. Érythrodermie avec présence de cellules monstrueuses dans le derme et le sang circulant. *Bull Soc Franc Derm Syph*. 1938; 45:254–260.

27. Sicard H, Bonnafous C, Morel A, et al. A novel targeted immunotherapy for CTCL is on its way: Anti-KIR3DL2 mAb IPH4102 is potent and safe in non-clinical studies. *Oncoimmunology*. 2015; 4(9): e1022306. doi:10.1080/2162402X.2015.1022306.
28. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al, editors. WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC; 2008.
29. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016; 127(20):2375–90. doi:10.1182/blood-2016-01-643569.
30. Vieyra-Garcia PA, Wei T, Naym DG, et al. STAT3/5-Dependent IL9 Overexpression Contributes to Neoplastic Cell Survival in Mycosis Fungoides. *Clin Cancer Res*. 2016; 22(13):3328–39. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-1784.
31. Wang L, Ni X, Covington KR, et al. Genomic profiling of Sézary syndrome identifies alterations of key T cell signaling and differentiation genes. *Nat Genet*. 2015; 47(12): 1426–34. doi:10.1038/ng.3444.
32. Wilcox RA. Cutaneous T-cell lymphoma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2016 Jan; 91(1):151–65. doi:10.1002/ajh.24233. Epub 2015 Nov 26.
33. Yamashita T, Abbade LPF, Marques MEA, et al. Mycosis fungoides and Sézary syndrome: clinical, histopathological and immunohistochemical review and update. *An Bras Dermatol*. 2012; 87(6):817–30.

ИМУНОБИОЛОГИЯ НА КЛЕТКИТЕ НА SÉZARY – РОЛЯ ЗА ДИАГНОЗАТА И В-СТАДИРАНЕТО

*Д. Попова, Р. Владимирова, Е. Викентиева, И. Николов, Р. Станчев,
И. Дамянов, К. Милчева, Н. Петкова, А. Недева, И. Киндеков, И. Гигов,
Ю. Райнов*

Т-клетъчните лимфоми с първично кожно засягане представляват около 15% от не-Ходжкиновите лимфоми, като най-чести са Mycosis fungoides (MF – 50%) и синдромът на Sézary (SS – 5%). Те протичат с клонална пролиферация на Т-лимфоцити, определяни морфологично като клетки на Sézary, а функционално като Т-клетки на централната памет (SS) и паметови резидентни кожни ефектори (MF).

Цел на изследването е определяне на имунофенотипните особености на циркулиращите клетки на Sézary и тяхното количество (В-стадиране) при диагнозата на MF и SS в светлината на биологичните им свойства.

Използвани методи: 67 пациенти с новооткрити MF (59) и SS (8), предимно мъже (мъже/жени = 2,05), са сравнени с 45 здрави лица. Златният стандарт за определяне клетките на Sézary е чрез флоуцитометрия – 3–8-цветен тест за основните лимфоцитни популации, субпопулации и допълнителните Т-клетъчни антигени CD1a, CD2, CD5, CD7, CD25, CD26, CD30, CD158a и CLA. Отчитани са процентът и абсолютният брой клетки и промените в силата на експресия на изследваните маркери.

Резултати: Намира се значимо повишение на лимфоцитния брой за сметка на CD4+ клетки при пациентите, в сравнение със здравите контроли, с придружаващо намаление на CD8+ лимфоцити. Клетките на Sézary са $0,28 \times 10^9/l$ при MF и $1,06 \times 10^9/l$ при SS (медиани). Те показват редица аномалии във всички от позитивните антигени.

При 78,9% от болните с MF лимфоцитните дефекти са до три на болен, докато в 5/8 пациента със SS те са над три (62,5%). Аберантният фенотип позволява идентифицирането на абнормните клетки, диагностичното уточняване на Т-клетъчната неоплазия и В-стадирането на болните с MF: 27 в В0 стадий (<250 клетки/ml) и 30 в стадий В1 (>250 и <1000 клетки/ml).

Заклучение: Имунофенотипизацията на клетките на Sézary при диагнозата на MF и SS, е бърза обективна процедура, част от диагностичния процес и стадирането на MF. Индивидуалният фенотипен профил е предпоставка за проследяване в динамика на остатъчната болест, на фона на качествено променения имунен отговор.

Ключови думи: клетки на Sézary, Mycosis fungoides, синдром на Sézary, имунофенотип.

Адрес за кореспонденция:

доц. д-р Дора Николова Попова, д.м.

Лаборатория по клинична имунология

Катедра по клинична лаборатория и имунология

ВОЕННОМЕДИЦИНСКА АКАДЕМИЯ

бул. „Св. Г. Софийски“ № 3

София 1606

тел. 92 25 523 / 92 25 722 / 92 25 111

GSM 0887 417 563

e-mail: popova_d@mail.bg dnpopova@gmail.com

IMMUNOBIOLOGY OF SÉZARY CELLS AND THEIR ROLE FOR DIAGNOSIS AND B-STAGING

D. Popova, R. Vladimirova, E. Vikentieva, I. Nikolov, R. Stanchev, I. Damianov,

C. Milcheva, N. Petkova, A. Nedeva, I. Kindekov, I. Guigov, J. Raynov

Military Medical Academy – Sofia

Primary cutaneous T-cell lymphomas represent around 15% of non-Hodgkin lymphomas, Mycosis fungoides (MF – 50%) and Sézary syndrome (SS – 5%) being the most frequent of them. Proliferating clonal T-lymphocytes are morphologically described as Sézary cells, whereas functionally they belong to T-central memory cells (SS) and memory resident cutaneous effector cells (MF).

The study aimed to define immunophenotypic aberrations of Sézary cells and their number (B-staging) at the time of MF and SS diagnosis, in the light of their biologic properties.

Methods: 67 newly discovered MF (59) and SS (8) patients, predominantly males (male/female ratio = 2,05), were compared to 45 healthy controls. The golden standard for Sézary cell identification is flow cytometry – 3 to 8-color test was used to find the main lymphocyte populations and subpopulations, with some supplementary T-cell antigens (CD1a, CD2, CD5, CD7, CD25, CD26, CD30, CD158a and CLA). The percentage and absolute cell count was recorded, as well as changes in antigen intensity.

Results: Significantly increased lymphocyte count was found in patients, compared to control subjects, CD4+ cells being mainly involved, and combined with decreased CD8+ lymphocytes. Sézary cells in MF were $0,28 \times 10^9/l$ and $1,06 \times 10^9/l$ in SS (medians). They presented a large variety of aberrations, affecting all positive antigens under investigation.

In 78,9% of MF patients, less than three lymphocyte abnormalities were found, whereas in 5/8 SS patients they were more than three (62,5%). Aberrant phenotypes make possible the identification of Sézary cells, which in turn aids diagnosis and B-staging in MF: 27 B0 stage patients (<250 cells/ml) and 30 stage B1 (>250 and <1000 cells/ml).

Conclusion: Immunophenotyping of Sézary cells at the time of MF and SS diagnosis, is a fast and reliable tool, helpful in their diagnosis and staging of MF. Individual phenotypic profiles are a prerequisite for residual disease monitoring in MF and SS patients, with significantly disturbed immune background.

Keywords: Sézary cells, Mycosis fungoides, Sézary syndrome, immunophenotype.

Contact address:

Assoc. Prof. Dora Nikolova Popova, MD, PhD

Lab clinical immunology

Chair of clinical laboratory and immunology

Military Medical Academy

3 St G Sofiiski str

Sofia 1606

Tel. 92 25 523 / 92 25 722 / 92 25 111

GSM 0887 417 563

e-mail: popova_d@mail.bg dnpopova@gmail.com

ВТОРИЧНА МЕМБРАНОЗНА НЕФРОПАТИЯ С ОТЛОЖЕНИЯ НА ИГА ПРИ ХОЧКИНОВ ЛИМФОМ

*И. Здравкова¹, Е. Тилкиян¹, В. Минкова², Е. Кумчев¹,
М. Колева-Иванова³*

¹МУ Пловдив – Катедра по пропедевтика на вътрешните болести, УМБАЛ „Каспела“ – Клиника по нефрология, ²ВМА София – Катедра по обща и клинична патология, ³МУ Пловдив – Катедра по обща и клинична патология

Мембранозният гломерулонефрит продължава да бъде предизвикателство за нефролога по отношение на диагнозата и лечението. През 2006 г. Lefaucher и сътрудници правят ретроспективно проучване на 240 пациенти с мембранозен гломерулонефрит и се установява, че 10% от тези гломерулонефрити са паранеопластични. Но само половината от тях са имали симптоми, свързани с онкологично заболяване при диагностициране на гломерулонефрита. При други онкологичното заболяване е диагностицирано в рамките на една година след поставянето на диагнозата мембранозен гломерулонефрит [1]. Сред паранеопластичните синдроми концепцията за паранеопластична гломерулопатия за първи път е предложена от Galloway още през 1922 г. с описанието на нефрозен синдром при Хочкинов лимфом [2].

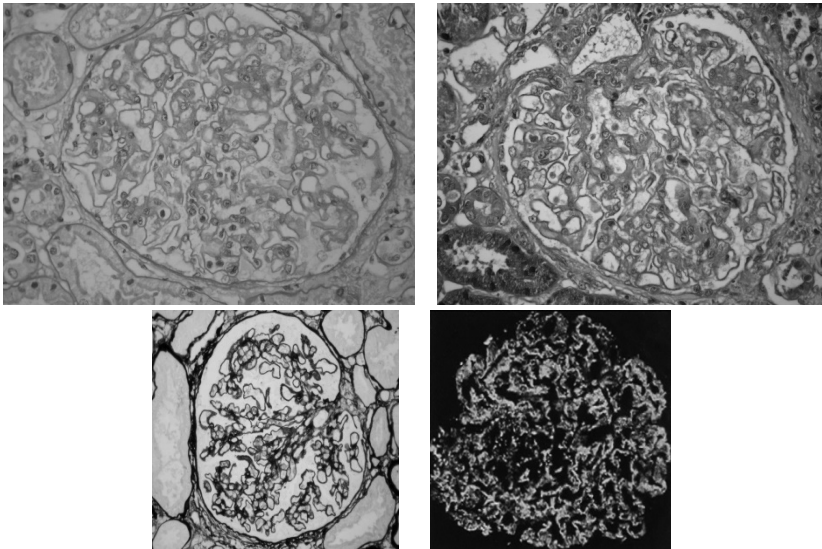
При паранеопластичните гломерулонефрити гломерулното увреждане не е директно свързано с големината на тумора, инвазията му или метастазите, а по-скоро е причинено от продуктите, секретирани от туморните клетки, такива като хормони, растежни фактори, цитокини и туморни антигени [3, 4]. Още преди 40 години Lee и сътрудници асоциират мембранозния гломерулонефрит със солидни тумори, а минималните промени с Хочкиновите лимфоми [5]. Казуистика са случаите на паранеопластичен мембранозен гломерулонефрит със субепителни отлагания на ИГА [6].

Пациентът постъпва през месец януари 2016 г. в Нефрологична клиника на УМБАЛ „Каспела“ с протеинурия, хематурия и персистиращ фебрилитет от месец май 2015. Придружаващи заболявания – артериална хипертония и дългогодишна бронхиална астма. Преди това извършени КТ на корем и бял дроб, които установяват генерализирана лимфаденомегалия. До момента на постъпването в клиниката на пациента е направена биопсия на лимфен възел с резултат – некротизиращ лимфаденит и стернална пункция, от която описват изразена еозинофилия и се отхвърля хематологично заболяване. Проведени са няколко консултации с ревматолог, който отхвърля наличието на системно аутоимунно заболяване. В Клиника по дерматология е извършена биопсия на кожна лезия на десен крайник с резултат Импетиго контагиоза, но е насрочена дата за втора биопсия. Пациентът е изследван за ТБК с квантиферонов тест- /-/ отр. По повод протеинурия и еритроцитурия е насочен към Клиника по нефрология.

Изследвания: Хб-103г/л, Левк – 7,9, ДКК – Сегм. – 65,6%; Ли – 25,2%; Мо – 9,2%, Ер – 3,83, МЦВ – 74,1, Хт – 28,4, Тр – 238, СУЕ – 98мм, Общ белтък – 82 г/л, албумин – 23 г/л, урея – 4,8 ммол/л, креатинин – 100мкмол/л, пикочна к-на – 239 мкмол/л. Отрицателен за HIV, Хепатит В и С. Отрицателни рANCA и сANCA, ANA и dsDNA. Обикновена урина: белтък- 3/+/пол, седимент – 6–8 левк, 10–16 еритроц, 3–4 гр. цил.; Протеинурия до 2 гр/24 ч. Серумни имуноглобулини: IgG, IgM – в норма, IgA – 14,95 р.г./0,7–4,5/, IgE – 3200 р.г./0–120/.

КТ на ПОС – нативно скениране: Черен дроб: уголемен, стеатозен, без патологични лезии. Панкреас: съхранен паренхим. Бъбреци с нормална топика, форма и размери, нормален паренхим. Двустранни кисти, по-голямата в десен с размер 2,5 см. Слезка уголемена, хомогенна. Данни за лимфаденопатия ретроперитонеално, около магистрални съдове, както и към хилуса на слезката. Лимфни възли с уголемяване превертебрално до крачетата на диафрагмата.

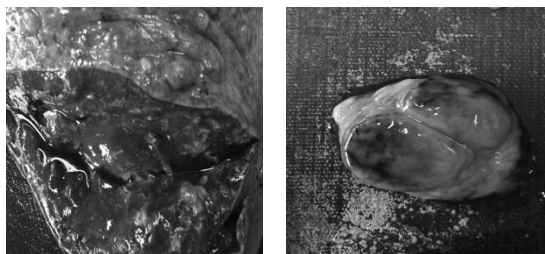
ПББ: Пункционният материал съдържа 15 гломерула, от които един е склеротичен. Останалите гломерули са нормоцелуларни с типично устроени мезангиални оси. Капилярните базални мембрани са умерено задебелени, с неравен външен контур поради образуване на шипчета. В някои участъци мембраната изглежда като верижка. От страна на тубуларния апарат се наблюдават единични атрофични и кистично разширени тубули. В интерстициума се виждат няколко умерено интензивни кръглоклетъчни инфилтратата, както и лека огнищна фиброза, включително и перигломеруларна около единични гломерули. Изследваните малки артерии са с подчертана гладкомускулна хиперплазия.



Имунофлуоресцентното изследване доказва 3+ субепително грануларно отлагане на ИгГ и С3 и много обилно субепително грануларно и псевдолинеарно отлагане на ИгА. Морфологична диагноза: Мембранозна нефропатия II–III хистологичен стадий.

Пациентът е насочен към хематология. Междувременно провежда втора кожна биопсия с резултат – Сарком на Капоши. В следващите месеци състоянието се влошава и през м. март 2016 г. завършва летално.

Патологоанатомична епикриза: След анализа на клиничните данни и от получените при обдукцията резултати за основно заболяване се приема Хочкиновият лимфом IV „В“ стадий (намериха се множество уголемени лимфни възли от двете страни на диафрагмата с плътна консистенция; микроскопски – наличие на диагностични клетки – на Хочкин и Щернберг), инфилтрация в слезката и черния дроб.



Основното заболяване и развилият се сепсис са предизвикали възникването на асцит, жълтеница, огнищна абсцедираща пневмония, двустранни плеврални изливи, васкулит и микроинфаркти в слезката и изява на полиорганна недостатъчност, която е непосредствена причина за настъпването на смъртта. В материалите от кожните лезии не се намират убедителни морфологични данни за сарком на Капоши. Морфологичната картина – пролиферация на съдове и лимфоцитарен околосъдов възпалителен инфилтрат, е съпоставима с васкулит. Патологоанатомична диагноза: Хочкинов лимфом IV „В“ стадий.

През последните години диференцирането на мембранозните гломерулонефрити на първични и вторични стана възможно не само по клиничното представяне, но и по имунологични критерии – установяването и навлизането в практиката на антифосфолипаза А2 рецепторните антители и данните от хистологичното и имунофлуоресценто изследване. Значение имат типът и мястото на отлагане на имуноглобулините и комплемента [7, 8, 9, 10, 11 – Таблица 1, 7].

Като възможни механизми за възникването на паранеопластичния мембранозен гломерулонефрит се обсъждат:

1) Формиране на имунни комплекси *in situ*: антители се формират срещу туморните антигени и към подоцитен антиген, който е идентичен или подобен на туморния антиген.

2) Туморните антигени могат да формират циркулиращи имунни комплекси, които впоследствие се отлагат субепително в гломерулните капилляри.

3) Външни фактори, като инфекции с онкогенни вируси или увредената имунна функция, които причиняват и двете, онкологичното заболяване и мембранозния гломерулонефрит [7, 12].

Таблица 1.

Разлики между първичен и вторичен тумор – асоцииран мембранозен гломерулонефрит [7]		
	Първичен мембранозен ГН	Вторичен тумор-асоцииран мембранозен ГН
Анамнестични данни	Млада възраст, без анамнеза за пушене	Възраст над 65 г., пушене – 20 пакета-години
Серологични маркери	Наличие на циркулиращи anti-PLA2R антители в серума	Липса на anti-PLA2R антители в серума
Хистопатологични данни от бъбречната биопсия	Гломерулни депозити на предимно IgG4 депозити. Повишено гломерулно PLA2R оцветяване. Наличие на по-малко от осем възпалителни клетки на гломерул	Предимно IgG1/ IgG2 отлагане в гломерулите Нормално PLA2R оцветяване Наличие на повече от осем възпалителни клетки на гломерул

Представеният случай е типичен по отношение на клиничната картина – фебрилитет с генерализирана лимфаденопатия и протеинурия. Затруднения в поставянето на диагнозата са произлезли от нетипичната хистологична картина на биопсирания лимфен възел, кожната биопсия и миелограмата. Интерес представлява хистологичният резултат от бъбречната биопсия – мембранозен гломерулонефрит с предимно отложение на имуноглобулини А субепително. Такъв тип мембранозен гломерулонефрит е изключително рядък. Описани са единични случаи, като само при един се обсъжда възможността за първичен мембранозен гломерулонефрит, но и при този случай има анамнеза за Карцином на стомаха, опериран 14 години преди изявата на нефрита [6]. При представения пациент хистологичният резултат от бъбречната биопсия потвърди вторичния характер на нефропатията, което се доказва и от аутопсионния протокол.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Lefaucheur C, Stengel B, Nochy D, Martel P, Hill GS, Jacquot C, Rossert J; GN-PROGRESS Study Group. Membranous nephropathy and cancer: Epidemiologic evidence and determinants of high-risk cancer association. *Kidney Int.* 2006 Oct; 70(8):1510-7. Epub 2006 Aug 30.
2. Galloway J. Remarks on Hodgkin's disease. *Br Med J* 1922;(2):1201-4.
3. Ronco PM. Paraneoplastic glomerulopathies: new insights into an old entity. *Kidney Int.* 1999; 56:355-377.
4. Lien YH, Lai LW. Pathogenesis, diagnosis and management of paraneoplastic glomerulonephritis. *Nat Rev Nephrol.* 2011 Feb; 7(2):85-95. doi.
5. Lee JC, Yamauchi H, Hopper J Jr. The association of cancer and the nephrotic syndrome. *Ann Intern Med.* 1966 Jan; 64(1):41-51.
6. Kobayashi M, Usui J, Sakai K, Mase K, Iwabuchi S, Nagata M, Kobayashi M, Yamagata K. Membranous nephropathy with solitary immunoglobulin A deposition. *Intern Med.* 2015; 54(9):1081-4. doi: 10.2169/internalmedicine. 54.3655. Epub 2015 May 1.

7. Divya Monga and Kenar D. Jhaveri. Glomerular Diseases and Cancer. American Society of Nephrology. Onco-Nephrology Curriculum. Chapter 6: Glomerular Diseases and Cancer.
8. Beck LH, Jr., Bonegio RG, Lambeau G, Beck DM, Powell DW, Cummins TD, Klein JB, Salant DJ. M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy. *New Engl J Med* 361:11–21, 2009.
9. Qin W, Beck LH, Jr., Zeng C, Chen Z, Li S, Zuo K, Salant DJ, Liu Z. Antiphospholipase A2 receptor antibody in membranous nephropathy. *JAm Soc Nephrol* 22:1137–1143, 2011.
10. Hoxha E, Kneissler U, Stege G, Zahner G, Thiele I, Panzer U, Harendza S, Helmchen UM, Stahl RA. Enhanced expression of the M-type phospholipase A2 receptor in glomeruli correlates with serum receptor antibodies in primary membranous nephropathy. *Kidney Int* 82:797–804, 2012.
11. Ohtani H, Wakui H, Komatsuda A, Okuyama S, Masai R, Maki N, Kigawa A, Sawada K, Imai H. Distribution of glomerular IgG subclass deposits in malignancy-associated membranous nephropathy. *Nephrol Dialysis Transplant* 19:574–579, 2004.
12. Takeda S, Chinda J, Murakami T, Numata A, Iwazu Y, Akimoto T, Hamano Y, Muto S, Takahashi M, Kusano E. Development of features of glomerulopathy in tumor-bearing rats: A potential model for paraneoplastic glomerulopathy. *Nephrol Dialysis Transplant* 27:1786–1792, 2012.

ВТОРИЧНА МЕМБРАНОЗНА НЕФРОПАТИЯ С ОТЛОЖЕНИЯ НА ИГА ПРИ ХОЧКИНОВ ЛИМФОМ

*И. Здравкова¹, Е. Тилкиян¹, В. Минкова², Е. Кумчев¹,
М. Колева-Иванова³*

¹МУ Пловдив – Катедра по пропедевтика на вътрешните болести, УМБАЛ „Каспела“ – Клиника по нефрология, ²ВМА София – Катедра по обща и клинична патология, ³МУ Пловдив – Катедра по обща и клинична патология

Пациент на 66 години постъпва в клиника по нефрология с протеинурия, хематурия и персистиращ фебрилитет. До момента на постъпването на пациента е направена биопсия на лимфен възел с резултат – некротизиращ лимфаденит и стернална пункция, на която се описва изразена еозинофилия и се отхвърля хематологично заболяване. Отхвърлено е и наличието на системно аутоимунно заболяване и предвид протеинурия и еритроцитурия е насочен към клиника по нефрология. От проведената пункционна бъбречна биопсия, данни за Мембранозна нефропатия II–III хистологичен стадий, като имунофлуоресцентното изследване доказва 3+ субепително грануларно отлагане на ИгГ и С3 и много обилно субепително грануларно и псевдолинеарно отлагане на ИгА. Приехме, че се касае за вторичен мембранозен гломерулонефрит и пациентът е насочен за уточняване на основното заболяване. След няколко месеца пациентът завършва летално, а от проведената аутопсия резултатът е Хочкинов лимфом IV „В“ стадий.

Ключови думи: ИгА, мембранозен гломерулонефрит, лимфом

Адрес за кореспонденция:

проф. д-р В. Минкова

Катедра по обща и клинична патология

ВМА – София

SECONDARY MEMBRANOUS NEPHROPATHY WITH IMMUNOGLOBULINE A DEPOSITS IN HODJKIN LYMPHOMA

I. Zdravkova, E. Tilkiyan, V. Minkova, E. Kumchev, M. Koleva-Ivanova

There are single cases of Membranous glomerulonephritis with subepithelial IgA deposits.

Usually these are cases of secondary nephropathy. We present a 66 years old male who was admitted in a Nephrology department with a history of fever, proteinuria and hematuria for over 6 months. CT scan had revealed generalized lymphadenopathy. Lymph node histology showed necrotizing lymphadenitis and myelogram revealed marked eosinophilia. Kidney biopsy was performed and proved Membranous glomerulonephritis II–III stage with predominant IgA granullary subepithelial deposits. A biopsy of a skin lesion at the right ankle suspected Caposi sarcoma. The patient died 10 months after the start of the symptoms. The pathological examination proved Hodjkin lymphoma IV „B“ stage. This case reveals the importance of a precise histological diagnosis of membranous nephropathy to differentiate idiopathic and secondary forms and guide further diagnostic and therapeutic approach.

Keywords: IgA, membranous glomerulonephriteis, lymphoma.

Contact address:

Prof. V. Minkova, MD, PhD

Chair of Pathology

Military Medical Academy – Sofia

ПЕРСИСТИРАЩА Т-LGL ПРОЛИФЕРАЦИЯ ПРИ EBV ИНФЕКЦИЯ: ЛЕВКЕМИЯ ИЛИ РЕАКТИВНА ЛИМФОЦИТОЗА?

*Е. Викентиева, Р. Владимирова, Д. Попова, И. Николов,
Р. Станчев, Р. Михайлова, К. Плочев, Ю. Райнов*

Военномедицинска академия – София

Т-клетъчната левкемия с големи гранулирани лимфоцити (Т – LGL) е описана за първи път през 1977 г. от McKenna и кол. [19]. Характеризира се с клонална пролиферация на CD3+/CD8+ Т-цитотоксични лимфоцити, неутропения, анемия и/или тромбоцитопения. Често се съчетава с различни аутоимунни болести, повтарящи се бактериални инфекции или други лимфопролиферативни състояния.

Реактивна LGL пролиферация на „нормални“ CD8+ Т-лимфоцити често се наблюдава при различни аутоимунни или инфекциозни състояния. В повечето случаи процесът е преходен, като броят на LGL клетките в периферната кръв (ПК) се нормализира до 6 месеца – спонтанно или след лечение на основното заболяване. Инфекцията с вируса на Епщайн – Бар (EBV) обикновено е самоограничаващ се и контролиран от Т-клетъчния отговор процес. При продължително хронично дразнене обаче може да настъпи дисрегулация в имунния отговор и клонална пролиферация на клетки с фенотип много сходен с този при Т-LGL, което представлява реално диагностично предизвикателство.

КЛИНИЧЕН СЛУЧАЙ

Касае се за мъж на 41 години, приет в Клиниката по хематология за оценка на персистираща (над 2 години) лимфоцитоза. Клиничните симптоми при постъпването са нощно изпотяване, фебрилитет (38,5°C), загуба на тегло и мускулни болки. Физикалният преглед установява лимфаденомегалия и умерено изразена хепатоспленомегалия. От анамнезата за придружаващи и минали заболявания – хипертония, аденом на черния дроб и хронична EBV инфекция с 4-годишна давност. Пациентът споменава за чести инфекции, налагащи многократни хоспитализации. *Лабораторни данни:* левкоцитоза – $16,2 \times 10^9/l$; лимфоцитоза – $6,03 \times 10^9/l$; неутрофили – $2,0 \times 10^9/l$ на долна референтна граница; нормални тромбоцити, еритроцити и хемоглобин. От направените вирусологични тестове се установи положителен резултат за антитела срещу EBV от IgM изотип и отрицателни резултати за цитомегаловирус (CMV), хепатит В (HBV), хепатит С (HCV) и HIV (Таблица 1).

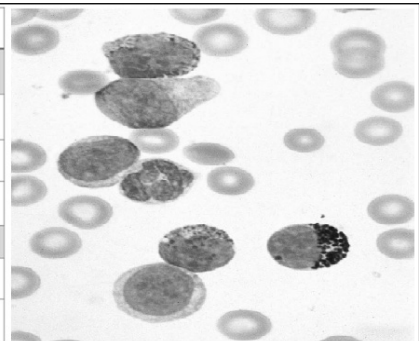
Клинични прояви	Лабораторни данни					
	Показател	Намерени стойности	Референтни стойности	Показател	Намерени стойности	Референтни стойности
Нощни изпотявания	WBC	16.2 x 10 ⁹ /л	3.5 - 10.5 x 10 ⁹ /л	АсАТ	231 УЛ	< 40 УЛ
Фебрилитет 38°C	Neu	2.0 x 10 ⁹ /л	2.0 - 6.4 x 10 ⁹ /л	АлАТ	375 УЛ	< 41 УЛ
Спленомегалия	%Ly	61.0%	20 - 48 %	Гама-ГТ	603 УЛ	< 60 УЛ
Хепатомегалия	Ly	6.03 x 10 ⁹ /л	1.1 - 3.8 x 10 ⁹ /л	АФ	662 УЛ	40 - 130 УЛ
Лимф аденопатия (шийни и аксиларни ЛВ до 10 mm)	Plt	209 x 10 ⁹ /л	130 - 420 x 10 ⁹ /л	ЛДХ	538 УЛ	240 - 480 УЛ
	Hb	150 g/l	135 - 180 g/l	ПК	436 μmol/l	202 - 416
Резултати от допълнителни изследвания						
Микробиология	не се изолира патогенна флора			Вирусология	анти-EBV IgM (+)	

Таблица 1. Пациент – клинични и лабораторни данни

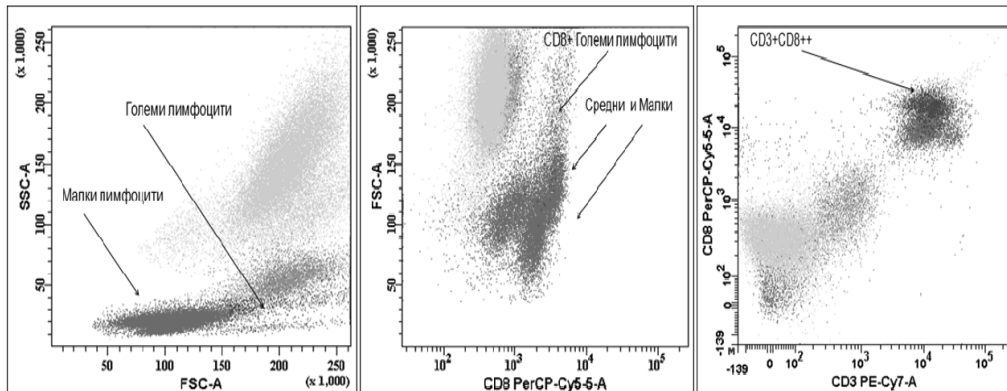
От натривката се намират 6% лимфоцити с морфология на големи гранулирани клетки (Фигура 1). Флоуцитометрично се намират имунофенотипни данни за наличие на клонална популация от цитотоксични Т-лимфоцити – 4,41 x 10⁹/л в периферна кръв с фенотип: CD3^{high+} / CD4⁻ / CD2^{high+} / CD5^{dim+} / CD7^{-/+} / CD8^{high+} / CD16⁺ / CD25⁺ / CD26⁺ / CD56⁻ / CD57⁻ / CD158a^{high+} / HLA-DR^{high+} / CD1a⁻ / CD30⁻ / TCRα/β⁺ / granzyme B⁺ / Perforin⁻ и 8% лимфоцити в костен мозък с фенотип, идентичен на установения в ПК (Таблица 2 и Фигура 2, 3 и 4).

Т-КЛЕТЪЧНИ АНТИГЕНИ						
CD3++	CD4-	CD2++	CD5 ^{dim+}	CD7 ^{-/+}	CD8++	TCRαβ+
NK-КЛЕТЪЧНИ / ЦИТОТОКСИЧНИ МАРКЕРИ						
CD11b+	CD16+	CD56-	CD57-	CD158a++	Granzyme B+	Perforin-
ЦИТОКИНОВИ РЕЦЕПТОРИ И АКТИВАЦИОННИ МАРКЕРИ						
CD25+	HLA-DR++					
МАТУРАЦИОННИ МАРКЕРИ						
CD1a-	CD26+	CD30-				

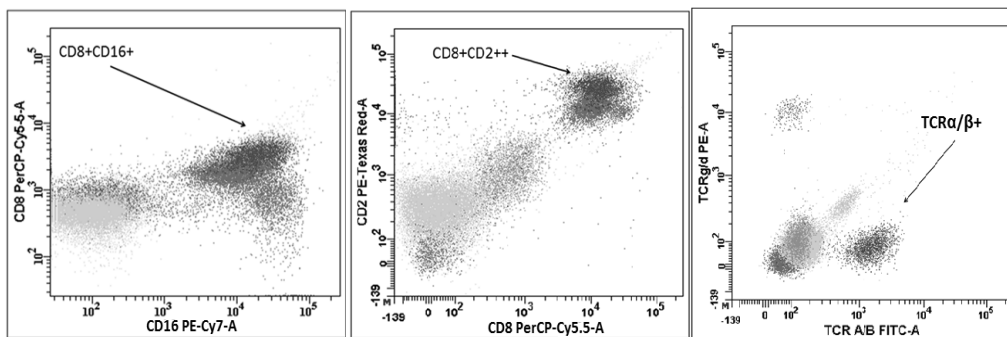
Табл. 2. Имунофенотипни характеристики на патологичната популация



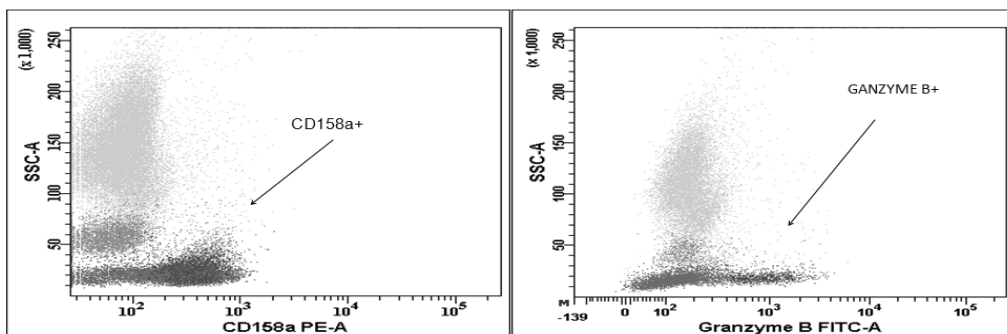
Фиг. 1. Лимфоцити с морфология на LGL клетки



Фигура 2. CD3+/CD8+ T-LGL клетки – флоуцитометричен образ:
 а. FSC / SSC и б. CD8 / FSC (LGL популация – идентифициране по физични параметри)
 в. Dot-plot CD3/CD8 (LGL популация – CD3+/CD8^{high+})



Фигура 3. T-LGL клетки – флоуцитометричен образ:
 а. Dot-plot CD8 / CD16 и б. Dot-plot CD8 / CD2 (LGL популация CD8+/CD16+/CD2^{high+})
 в. Dot-plot TCRα/β / TCRγ/δ (LGL популация: TCR+)



Фигура 4. T-LGL клетки – флоуцитометричен образ:
 а. CD158a / SSC и б. Granzyme B / SSC (>90% от LGL клетките са CD158a+/Granzyme B+)

ДИСКУСИЯ

T-LGL е левкемия на възрастните. Средната възраст при диагностициране е 60 г. По-рядко се развива при млади лица или деца. Не са установени различия в разпределението по пол, като и двата пола са засегнати приблизително в еднаква степен. Съставлява 2–3% от всички зрели лимфопротлиферативни неоплазии и около 10% от T- и NK-клетъчните [13, 15, 27].

Около 1/3 от пациентите са асимптомни към момента на диагнозата. При половината от тях физикално се установява умерена спленомегалия, при 25% хепатомегалия, рядко лимфаденопатия [16, 17]. Една част от лицата с T-LGL биват диагностицирани по повод често повтарящи се бактериални инфекции (белодробни, перианални абсцеси) вследствие на настъпила неутропения или лесна уморяемост в резултат на анемия. В някои случаи са налице Б-симптоми (фебрилитет, загуба на тегло, нощни изпотявания) [9, 21, 28].

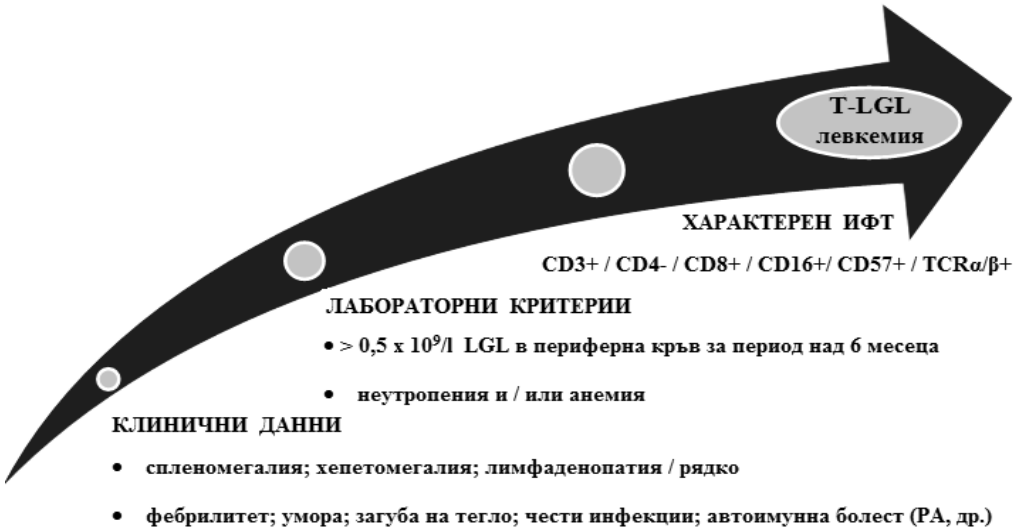
В 85% от пациентите се установява неутропения, като при 50% от тях абсолютният брой на неутрофилите е под 500 кл/μl ($< 0,5 \times 10^9/l$). Анемия се доказва в 50% от случаите на T-LGL, а 20% са с умерена и много рядко тежка тромбоцитопения. Към момента на диагностициране преобладаващата част от пациентите са с умерена лимфоцитоза (7000–8000 кл/μl). Според различни изследователски колективи най-често броят на LGL клетките при диагностициране е над 4000 кл/μl при референтни стойности между 223 ± 99 кл/μl [3, 4, 14, 18]. По-нови данни сочат, че 25% до 30% от новодиагностицираните пациенти с T-LGL имат под $0,5 \times 10^9/l$ LGL-клетки, като много често този брой е около 400 кл/μl, което налага приемането на нови критерии относно броя им в ПК и осъвременяване на дефиницията. Според последно приетата такава за диагнозата T-LGL левкемия е необходимо наличие на над $0,5 \times 10^9/l$ LGL-клетки в ПК за период, по-дълъг от 6 месеца с уговорка, че случаите с по-нисък брой на T-LGL клетки, чиято клоналност е доказана молекулярногенетично и пациентите покриват редица други клинични и лабораторни критерии, биват класифицирани като T-LGL левкемия, без задължително изчакване на период от 6 месеца [2, 14, 15, 26].

Поради честото съчетание с редица автоимунни болести (най-често ревматоиден артрит), се установяват отклонения и в различни серологични маркери, като ревматоиден фактор, антинуклеарни антитела, антитромбоцитни антитела, антинеутрофилноцитоплазмени антитела, хипер-/хипогамаглобулинемия, повишен β2-микроглобулин [17].

T-LGL трябва да се подозира при всеки пациент с необяснима цитопения и повишен брой LGL клетки в периферната кръв, доказани морфологично и/или флуоцитометрично. Около 10–15% от перифернокръвните мононуклеарни клетки са с размер 15–18 μm и обилна цитоплазма с фини или едри азурофилни гранули, съдържащи протеини с роля в цитолизата (перфорин, гранзим В и др.), бърбековидно или кръгло ядро [14]. При нормални условия преобладаващата част от тях са CD3-/CD8+ клетки, принадлежащи към NK-клетъчната редица. Значително по-малък е дялът на CD3+/CD8+ или т.нар. T-лимфоцити със суп-

ресорно-цитотоксични функции. Класическият имунофенотип на Т-клетките при T-LGL е CD3+/CD4-/CD8+/CD16+/CD56-/CD57+/TCR α/β + в над 95% от случаите [5, 7, 14]. Редките варианти включват CD4+, CD4-/CD8- и TCR γ/δ + (под 10%) [5, 7, 14].

За диагнозата T-LGL е необходимо покриването на редица диагностични критерии (Фигура 5) [14, 27].



Фигура 5. T-LGL – диагностични критерии (съобразено с дефиницията на WHO)

Не всяка LGL-клетъчна експанзия обаче е неопластична. При редица латентни вирусни инфекции (CMV, EBV, HBV, HCV, HIV), колагенози, миелодиспластичен синдром (MDS), хемофагоцитарен синдром, пароксизмална нощна хемоглобинурия (PNH), състояния след спленектомия, алогенна костномозъчна трансплантация, трансплантация на солидни органи и при някои солидни тумори може да настъпи разрастване на реактивни (неклонални) LGL клетки. и по-рядко на моно и/или олигоклонални [1, 6, 8–11, 16, 18, 20, 22, 23–25, 28].

Представеният от нас случай покрива критериите на WHO за диагнозата T-LGL левкемия. Наличие на моноклонална популация от големи гранулирани лимфоцити в периферна кръв над 2 x 10⁹/l за период над 6 месеца с имунофенотип, много близък до характерния (Таблица 3), умерена лимфоцитоза (6,03 x 10⁹/l), неутрофилни гранулоцити на долна референтна граница, чести инфекции, умерена хепатоспленомегалия, лимфаденопатия, фебрилитет, нощни изпотявания и загуба на тегло.

МАРКЕР	T-LGL (нормални)	T-LGL (левкемични)	T-LGL (пациент)
CD2	+ bright	+bright / dim или -	+ bright
CD3	+ bright	+ bright	+ bright
CD5	+ bright	+ bright / dim или -	+ dim
CD7	+ bright	+ bright / dim или -	- / +
CD4	-	"-" (2% от случаите "+")	-
CD8	+ bright	+	+ bright
CD11c	+	+	+
CD16	-	+	+
CD25	+	-	+
CD56	-	- или +	-
CD57	-	+	-
TCR α/β	+	+	+
TCR γ/δ	-	"-" (20% от случаите "+")	-

Таблица 3. T-LGL – имунофенотипни характеристики в норма и патология

Данните от вирусологичните изследвания, сочещи хронична активна EBV инфекция, поставят въпроса за коректното класифициране на случая като клонопатия при EBV инфекция с неясно значение или T-LGL левкемия. Определянето на реаранжимент в гена за TCR е задължително условие за потвърждаването на клоналност с категоричност [14]. Експресията в над 90% от LGL-клетките на CD158a, представляващ трансмембранен гликопротеин от семейството на Killer cell Immunoglobulin – like Receptor (KIR) и характерен предимно за NK-клетките и една малка субпопулация от Т-лимфоцити, е белег за пролиферация на специфичен Т-клетъчен клон. От друга страна, е известно, че левкемичните LGL клетки експресират конститутивно IL-2R β (p75, CD122), но не експресират IL-2R α (p55, CD25) [14], което е едно от фенотипните различия в представения от нас случай и аргумент в полза на EBV клонопатия.

EBV е лимфотропен вирус с изразена трансформационна способност по отношение на лимфоидните клетки и висок онкогенен потенциал. Принадлежи към сем. Herpesviridae, подсем. Gammaherpesvirinae.

Нормално EBV инфекцията е В-лимфоцит рестрикцирана, като естественият ѝ ход включва няколко фази – литична фаза (първична инфекция), фаза на В-лимфоцитна колонизация и вирусна репликация, фаза на латентна инфекция. При определени обстоятелства намиращите се в покой инфектирани паметови В-лимфоцити, които са част от общия пул на паметовите В-клетки, могат да навлязат отново в литичен цикъл с развитие на нов инфекциозен процес (хронична активна EBV инфекция, CAEBV). При имунокомпетентни лица защитните механизми включват клетъчно-медириани имуноенни отговори, насочени срещу първичната инфекция с цел ерадиране. Основни участници в процесите, свър-

зани с елиминиране на вирус-инфектираните клетки, са CD4+ Т-лимфоцити, НК клетки и EBV-специфични CD8+ Т-цитотоксични лимфоцити.

САЕВВ е изключително рядко състояние с вариабилна тежест на клиничната картина и често е причина за висок морбидитет и морталитет. Може да индуцира клонална експанзия на различен тип лимфоцитни популации – В-, Т- или НК. Най-рядка е В-клетъчната, сравнена с Т- и НК-клетъчната [12]. Пациенти с САЕВВ се представят с фебрилитет, спленомегалия, лимфаденопатия, чернодробна дисфункция и панцитопения [12]. В периферната кръв се доказват високи нива на вирусна ДНК [6, 12]. При докладвания от нас случай голяма част от клинично-лабораторни характеристики на САЕВВ са налице, без панцитопенията.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Описаният случай е пример за клонална пролиферация на LGL, най-вероятно като следствие от дисрегулация на имунния отговор спрямо силни антигени, като EBV.

При процеси, свързани с хронично възпаление поради продължително антигенно дразнене, се стига до абнормна активация и пролиферация на клетъчни клонове, които не са в състояние да отстранят патогена. Нормалният процес на елиминиране на активираните Т-лимфоцити е чрез Fas-медирана апоптоза, на която обаче LGL клетките са резистентни.

Тънката разграничителна линия между левкемичната и реактивната клонална експанзия се дължи на факта, че Т-LGL притежават редица фенотипни и функционални характеристики типични за нормалните цитотоксични ефекторни Т-клетки, поради което за коректната диагноза се изисква съвкупност от клинични, имунопатологични и молекулярни данни.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Alekshun TJ, et al. Diseases of large granular lymphocytes. *Cancer Control*. 14, 141–50, 2007.
2. Bateau B., et al. Analysis of a French cohort of patients with large granular lymphocyte leukemia: a report on 229 cases. *Haematologica*. 95(9):1534–1541, 2009.
3. Bartlett NL, Longo DL. T-Small lymphocyte disorders. *Semin Hematol*. 36:164–170, 1999.
4. Berliner N. T gamma lymphocytosis and T cell chronic leukemias. *Hematol Oncol Clin North Am*. 4:473–487, 1990.
5. Bourgault-Rouxel AS, et al. Clinical spectrum of gamma/delta+ T cell LGL leukemia: Analysis of 20 cases. *Leuk Res*. 32:45–8, 2008.
6. Cohen JJ, et al. Epstein-Barr virus associated lymphoproliferative disease in non-immunocompromised hosts: a status report and summary of an international meeting, 8–9 September 2008. *Ann Oncol*. 20:1472–1482; 2009.
7. Chen YH, et al. Clinical, morphologic, immunophenotypic, and molecular cytogenetic

- assessment of CD4-/CD8- $\gamma\delta$ T-cell large granular lymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol.* 136:289–99, 2011.
8. Dennis P. T-cell large granular leukemia and related proliferation. *Am J Clin Pathol.* 127:850–859, 2007.
 9. Dhodapkar MV, et al. Clinical spectrum of clonal proliferations of T-large granular lymphocytes: a T-cell clonopathy of undetermined significance? *Blood.* 84:1620–1627, 1994.
 10. Halwani F., et al. Identification of natural suppressor cells in long-term renal allograft recipients. *Transplantation.* 54:973–977, 1992.
 11. Kelemen E., et al. Permanent large granular lymphocytosis in the blood of splenectomized individuals without concomitant increase of in vitro natural killer cell cytotoxicity. *Clin Exp Immunol.* 63:696–702, 1986.
 12. Kimura H., et al. Clinical and virologic characteristics of chronic active Epstein-Barr virus infection. *Blood.* 98:280–286, 2001.
 13. Lamy T., Loughran TP Jr. Current concepts: large granular lymphocyte leukemia. *Blood Rev.* 13:230–240, 1999.
 14. Lamy T., Loughran TP Jr. How I treat LGL leukemia. *Blood.* 117:2764–2774, 2011.
 15. Liang R. State of art on T cell lymphomas: the epidemiology. *Hematol Rep.* 2(13):1–3, 2006
 16. Loughran TP Jr, Clark EA, Price TH, et al. Adult-onset cyclic neutropenia is associated with increased large granular lymphocytes. *Blood.* 68:1082–1087, 1986.
 17. Loughran TP Jr, Starkebaum G. Large granular lymphocyte leukemia: report of 38 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore).* 66:397–405, 1987.
 18. Loughran Jr TP, et al. Clonal diseases of large granular lymphocytes. *Blood.* 82, 1–14, 1993.
 19. McKenna RW, et al. Chronic lymphoproliferative disorder with unusual clinical, morphologic, ultrastructural and membrane surface marker characteristics. *Am J Med.* 62:588–96, 1977.
 20. Mohty M., et al. Features of large granular lymphocytes (LGL) expansion following allogeneic stem cell transplantation: a long-term analysis. *Leukemia.* 16:2129–2133, 2002.
 21. Pandolfi F., et al. Clinical course and prognosis of the lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. A multicenter study. *Cancer.* 65:341–348, 1990.
 22. Qingqing Cai, et al. Epstein-Barr virus-positive T/NK-cell lymphoproliferative disorders. *Experimental Molecular Medicine.* 47, e133; doi:10.1038/emm.2014.105, 2015.
 23. Renato Z., Gianpietro S. Large granular lymphocytosis. *Haematologica.* 83:936–942, 1998.
 24. Rose MG, Berliner N. T-cell large granular lymphocyte leukemia and related disorders. *Oncologist.* 9:247–58, 2004.
 25. Smith PR, et al. Benign monoclonal expansion of CD8⁺ lymphocytes in HIV infection. *J Clin Pathol.* 53:177–181, 2000.
 26. Sokol L., Loughran T. Large granular lymphocyte leukemia. *The Oncologist.* 11:263–273, 2006.
 27. Swerdlow SH, et al. WHO Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC; 2008.
 28. Tefferi A., et al. Chronic natural killer cell lymphocytosis: a descriptive clinical study. *Blood.* 84:2721–2725, 1994.

ПЕРСИСТИРАЩА T-LGL ПРОЛИФЕРАЦИЯ ПРИ EBV ИНФЕКЦИЯ: ЛЕВКЕМИЯ ИЛИ РЕАКТИВНА ЛИМФОЦИТОЗА?

Е. Викентиева, Р. Владимирова, Д. Попова, И. Николов, Р. Станчев, Р. Михайлова, К. Плочев, Ю. Райнов
Военномедицинска Академия – София

Наличието на моноклонална популация от големи гранулирани лимфоцити (LGL) в периферната кръв над $2 \times 10^9/l$ за период над 6 месеца според класификацията на Международната здравна организация (WHO) се дефинира като T-клетъчна левкемия с големи гранулирани лимфоцити (T-LGL) [27]. Същевременно процеси, свързани с хронично активиране на T-клетки от автоантиген или вирусен антиген, са в състояние да стимулират разрастването на поли-/олиго- и по-рядко моноклонални LGL клетки.

Представяме мъж на 41 години, приет в клиниката по хематология за оценка на персистираща (над 2 години) лимфоцитоза. Клиничните симптоми при постъпването, физикалната находка и данните от лабораторните изследвания покриват критериите на WHO за диагнозата T-LGL левкемия. От друга страна, индолентният ход и подлежащата инфекция с вируса на Епщайн – Бар (EBV) поставят въпроса за коректното му класифициране – като T-LGL левкемия или T-клетъчна клонопатия с неясно значение, асоциирана с EBV инфекция. Тънката разграничителна линия между левкемичната и реактивна клонална експанзия се дължи на факта, че T-LGL притежават редица фенотипни и функционални характеристики, типични за нормалните цитотоксични ефекторни T-клетки. Описаният от нас случай е пример за клонална пролиферация на LGL като следствие от дисрегулация на имунния отговор спрямо силни антигени, като EBV.

Ключови думи: T-LGL, Епщайн – Бар инфекция, лимфоцитоза.

Адрес за кореспонденция:

д-р Елена Викентиева, д.м.

Лаборатория „Клинична имунология“

Катедра „Клинична лаборатория и имунология“

Военномедицинска академия

ул. „Св. Георги Софийски“ 3, 1606 София

elivikentieva@gmail.com

PERSISTENT T-LGL PROLIFERATION IN EBV INFECTION: LEUKEMIA OR REACTIVE LYMPHOCYTOSIS?

*E. Vikentieva, R. Vladimirova, D. Popova, I. Nikolov, R. Stanchev, R. Mihaylova,
K. Plochev, J. Raynov*
Military Medical Academy – Sofia

According to the WHO classification, persistent (>6 months) increase in the number of peripheral blood (PB) monoclonal large granular lymphocytes (LGL) greater than $2 \times 10^9/l$ is required for the diagnosis of T-cell large granular lymphocytic leukemia (T-LGL) [27]. At the same time chronic activation of T-cells with autoantigens or viral antigens has been suggested as an important stimulus leading to expansion of polyclonal / oligoclonal or rarely monoclonal transient reactive LGLs.

We report a case of 41-year old man who was referred to the Hematology Department for evaluation of lymphocytosis, persisting for over 2 years. Clinical, physical and laboratory findings at presentation, fulfilled the WHO criteria for T-LGL leukemia. Indolent clinical course and underlying EBV infection raised the question whether this case should be diagnosed as true T-LGL leukemia or as T-cell clonopathy of unclear significance, associated with Epstein-Barr virus infection. The border between leukemic and reactive clonal expansion of T-LGLs is narrow because clonal T-LGL cells retain many phenotypic and functional properties of normal cytotoxic effector T-cells. The described case is an example that monoclonal proliferation of LGLs may be a consequence of the dysregulated reaction of the immune system to strong antigens such as EBV.

Keywords: T-LGL, EBV infection, lymphocytosis.

Contact address:

Elena Vikentieva, M.D., PhD
Lab of Clinical Immunology
Dpt of Clinical Laboratory and Immunology
Military Medical Academy
3 G. Sofiiski Str.
1606 Sofia, Bulgaria
elivikentieva@gmail.com

ПЪРВИЧНА БИЛИАРНА ЦИРОЗА – ОЦЕНКА НА РАЗЛИЧНИ ИМУНОЛОГИЧНИ ПОДХОДИ ЗА ДИАГНОСТИКА: КЛИНИЧЕН СЛУЧАЙ

**Екатерина Иванова Иванова-Тодорова¹, Цветелина Веселинова
Великова¹, Калина Динкова Тумангелова-Юзеир¹,
Екатерина Красиминова Куртева¹, Калоян Павлинов Павлов²,
Румяна Гергова Митова², Радислав Венциславов Наков²,
Йордан Георгиев Генов², Борислав Георгиев Владимиров²,
Доброслав Станимиров Кюркчиев¹**

¹Лаборатория по клинична имунология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, Медицински университет – София

e-mail: katty_iv@yahoo.com, +3592 8527 046

²Клиничен център по гастроентерология УМБАЛ „Царица Йоана – ИСУЛ“, Медицински университет – София

ВЪВЕДЕНИЕ

Първичната билиарна цироза (ПБЦ) е автоимунно чернодробно заболяване с неизвестна етиология като 80–90% от пациентите са жени на възраст между 20 и 60 години [1]. Заболеваемостта от ПБЦ в световен мащаб се движи между 4.6 – 402 /1 000 000 души [1].

Заболяването се характеризира с прогресивно разрушаване на малките интрахепатални жлъчни пътища от възпалителен имунен процес, водещ до фиброза и последваща цироза. Патогенезата на заболяването е неясна, но е установена повишена експресия в жлъчните каналчета на някои адхезионни молекули, HLA клас II антигени, рецептор за IL-2 и пируват дехидрогеназа. Изброените молекули биха могли да станат таргет за Т-лимфоцити (CD4+ и CD8+), което да доведе до тъканно увреждане [2]. Ролята на генетичната предразположеност при ПБЦ не е категорично доказана, което навежда на мисълта, че значение имат и факторите на околната среда. Нарастващото значение на това заболяване и подобреният достъп до диагностични тестове, особено имунологичните такива, доведоха до по-честа и по-ранна диагноза на ПБЦ. В диагностичните критерии на болестта се включват освен клинични симптоми (умора, сърбеж, болка в горната част на коремната област, сиса синдром) и лабораторни критерии с не по-малко значение [3]. Последните включват увеличение на алкална фосфатаза (АФ) и гамаглутамилтрансептидаза (ГГТП), увеличение на имуноглобулин М (IgM), хиперхолестеролемия, еозинофилия и автоантитела. Тези автоантитела са насочени основно срещу структури от вътрешната митохондриална мембрана, принадлежащи предимно към Е2-субединицата на пируват дехидрогеназния ензимен комплекс (PDC-E2) – антимитохондриални антитела (АМА), дефинирани като анти-М2 [2].

Тези антитела се срещат в 95% от пациентите с ПБЦ, докато 5% остават АМА негативни. Освен класическите АМА при 50–72% от болните (включително и при половината от АМА-негативните пациенти – 2.5%) се откриват болестно-специфични антинуклеарни антитела (ANA) [4]. Те биват антитела срещу „ядрени точки“ (anti-Sp100, PML), срещу „ядрената мембрана“ (anti-gp210) и антитела срещу центромерни протеини, като последните се срещат предимно при пациенти с припокриваща се със системна склероза ПБЦ [5, 6]. Рядко се срещат и други видове автоантитела, като антигладкомускулни антитела (ASMA).

Диагнозата на ПБЦ може да бъде поставена достатъчно убедително при наличие на увеличени маркери за холестаза (напр. увеличена АФ) в продължение на повече от 6 месеца и установяване на АМА при отсъствие на друго обяснение за тяхното покачване. От една страна, голяма част от пациентите са безсимптомни и търсят лекарска помощ по друг повод, а от друга страна, част от тях са АМА-негативни. Това създава диагностични затруднения, което би могло да доведе до късно поставяне на диагнозата и забавяне започването на лечението.

Целта на настоящата статия бе да направим оценка в сравнителен план на различни имунологични техники за диагностика на специфични видове АМА и ANA и да се определи най-надеждният скрининг за пациенти с ПБЦ.

МЕТОДИ

АМА-M2 и ASMA бяха определени чрез индиректна имуофлуоресценция (IIF) на криостатни срези (Autoantibodies-RL/RK/RS, Biosystems, Spain), а за скринингово изследване за ANA е използвана IIF на Hep-2 клетъчен субстрат (Antinuclear antibodies Hep2, Biosystems, Spain). За потвърждаване и определяне на видовете специфична АМА и ANA е използвана имуоблот техника със софтуер за обработка на данни (Euroline, Autoimmune liver diseases IgG, Euroimmun, Germany; Antibodies against nuclear antigens IgG, Euroimmun, Germany).

ОПИСАНИЕ НА КЛИНИЧНИЯ СЛУЧАЙ И РЕЗУЛТАТИ

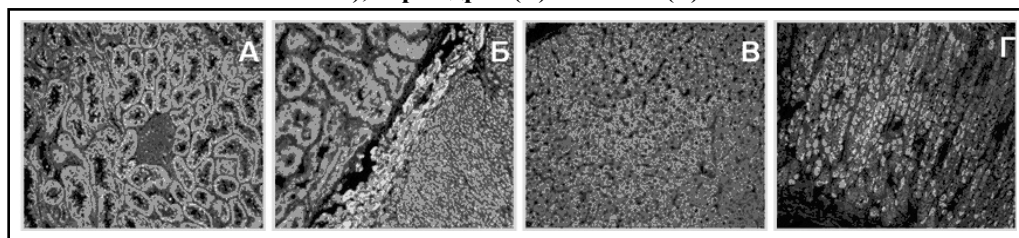
Представяме клиничен случай на 59-годишна жена с изразена холестаза (ГГТП до 10 пъти над горна референтна граница и АФ до 8 пъти над горна референтна граница), дискретна цитολиза (АСАТ и АЛАТ до 3–4 пъти над горна референтна граница), иктер, сърбеж по кожата и астенодинамия с давност от 1 година и придружаващи заболявания тиреоидит на Хашимото, обезитас, дислипидемия. Като *фамилна обремененост съобщава за майка със захарен диабет тип 2, а за рисков фактори отрича. Пациентката е с алергия към хлор*. Анамнестично се получават данни за прекарани хепатит А и В в млада възраст, тотална мастектомия на лява млечна жлеза по повод карцином. Пациентката е провеждала химиотерапия, лечелечение и хормонотерапия. Болната бе хоспитализирана в Клиничен център по гастроентерология към УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“ в добро общо състояние, с иктерична кожа и склери и следи от ексориации по кожата. Наблюдавани бяха още палмарен еритем и лимфадем на лява ръка и ляв крак. Към момента на

постъпване пациентката е на лечение с урзодезоксихолева киселина (UDCA) в доза 1000 mg/дневно п.о. от месец, довело до известна позитивна лабораторна динамика.

Резултатите от имунологични тестове показаха повишени нива на IgM (4,92 g/L при норма между 0.40–2.63 g/L) и положителни резултати за: AMA-M2 в титър 1:1280 (норма <1:20), ASMA в титър 1:160 (норма <1:40) и ANA в титър 1:1280 (норма <1:80). IgA (1.24 g/L) и IgG (15.55 g/L) бяха в референтни граници.

Повсеместното разпространение на AMA-M2 антигените на криостатния плъши срез показаха специфично грубо гранулирано цитоплазмено оцветяване на клетките на дистални и проксимални бъбречни каналчета (Фигура 1А, Б), на хепатоцитите (Фигура 1В) и на париеталните клетки на стомаха (Фигура 1Г).

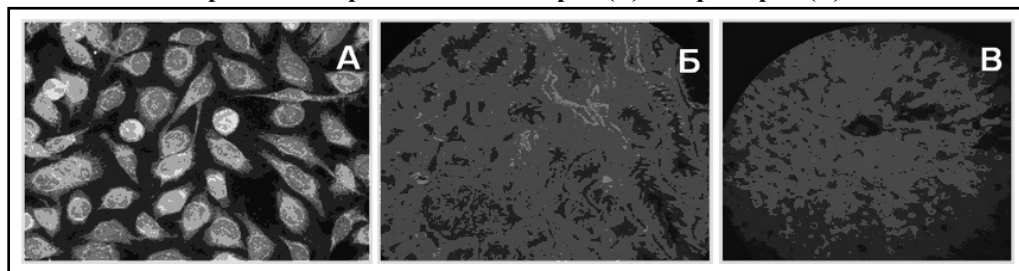
Фигура 1. Индиректа имунофлуоресценция на криостатен срез от плъши бъбрек (А, Б), черен дроб (В) и стомах (Г)



AMA също така беше установена и като нишковидно, гранулирано оцветяване на цитоплазмата на Her-2 клетъчна линия (Фигура 2 А).

ANA на Her-2 субстрат като „златен стандарт“ и средство на първи избор при рутинен скрининг показаха типична флуоресценция за ПБЦ-специфични антинуклеарни антитела (множество ядрени точки). Установени са няколко типа светене: наличие на „ядрени точки“ (Фигура 2А) и ядрено мембранно-рингово светене (Фигура 2А, Б, В).

Фигура 2. Индиректа имунофлуоресценция на Her-2 клетъчна линия (А) и на криостатен срез от плъши бъбрек (Б) и черен дроб (В)



Установените специфични флуоресцентни образи дадоха основание да се определят и типът субспецифичности на AMA, и ANA на имуноблот. Положителни антитела се установиха срещу следните антигени: AMA-M2, 3E(BPO), gp210, Sp100 и PML.

При пациентката бяха установени още серологични данни за HBV инфекция в миналото (Hbcor total положителни, anti-HBs във висок титър), които не налагаха изследване на вирусната репликация. На ехографското изследване се установи увеличен черен

дроб с хипоехогенна структура без огнища – образ, отговарящ на дифузен паренхимен процес в черния дроб, както и данни за хипердинамичен кръвоток, дилатирана v. lienalis и гранични размери за v. portae. Горноендоскопското изследване установи I-ва степен варици на хранопровода и портална хипертензивна гастропатия в IV стадий.

Прие се диагноза ПБЦ и се продължи лечението с UDCA, но в увеличена доза – 1200 mg/дневно. Добавени бяха и холестирамин 2–3x2 g/дневно. Пациентката подлежи на редовно наблюдение и проследяване.

ДИСКУСИЯ

Конвенционално, диагнозата на ПБЦ стъпва на набор от клинични, биохимични, имунологични и хистологични находки. И докато клиничните, биохимичните и хистологичните методи за доказване не са се изменили в последните десетилетия, то специализираните имунологични изследвания търпят сериозен прогрес и развитие. Описаният клиничен случай на пациентка с ПБЦ, тествана с широк имунологичен панел за автоимунни чернодробни заболявания, цели да направи оценка в сравнителен план на различни имунологични техники за диагностика на специфични видове АМА и АНА и да се определи най-надеждният скрининг за пациенти с ПБЦ.

По отношение на имунологичната диагностика установяването на АМА чрез ИФ на криостатни срези от плъщи черен дроб, стомах и бъбрек се счита като първи метод на избор за скрининг. Първоначалният скрининг за АМА и болестно-специфични АНА при пациенти със съмнение за ПБЦ би трябвало да включва първоначално ИФ на 2-вида субстрат (Таблица 1) и в зависимост от получения резултат – откриване на специфични за ПБЦ – АМА и АНА чрез имуноензимни методи. От таблицата е видно, че на Her2 клетъчна линия биха могли да бъдат наблюдавани всички изброени антители, докато на криостатен срез от плъх – само АМА-М2 и М2-3Е (ВРО), които обаче задължително се доказват на този субстрат.

Таблица 1. Имунофлуоресцентни образи на ПБЦ антигени

ПБЦ – специфични антигени	Криостатен срез от плъщи черен дроб, бъбрек, стомах	Her-2 клетъчна линия
АМА-М2	Грубо, гранулирано, цитоплазмено светене	Нишковидно, гранулирано цитоплазмено светене
М2-3Е (ВРО)	Грубо, гранулирано, цитоплазмено светене	Нишковидно, гранулирано, цитоплазмено светене
Sp-100 (PBCNA)	Не е описано и не е метод на избор	Множество ядрени точки
PML	Не е описано и не е метод на избор	Множество ядрени точки
gp210	Ядрено, мембранно-рингово светене	Ядрено, мембранно-рингово светене

Сега се знае, че АМА-М2 са насочени срещу протеини от α -кето дехидрогеназния комплекс. Основните таргетни антигени от този комплекс са: РНД-пируват дехидрогеназа; ВСОАДС-разклонена верига на окси киселия дехидрогеназен комплекс; ОGDC-2-оксиацид глутарат дехидрогеназен комплекс. Всеки от тези три антигена е съставен от 3 субединици (Е1, Е2, Е3), като имунодоминантният епитоп се намира в Е2 субединиците и на 3-те антигена. Наличието на тези антитела в серума на пациенти, дори без наличие на белези за холестаза и/или чернодробно възпаление, се считат като предсказващ белег за развитие на ПБЦ [7]. АМА се откриват в 95% от случаите на пациенти с ПБЦ и описаният пациент в настоящия клиничен случай не прави изключение от правилото. При останалите 5%, или т.нар. АМА-негативни ПБЦ пациенти, 2.5% имат болестоспецифични антитела, а 2.5% нямат автоантитела. Представеният случай е уникален с големия набор от положителни антитела, конкретно при тази пациентка.

На Таблица 2 са представени различните антитела, установени на имуноблот теста за автоимунни чернодробни заболявания и съответната им клинична значимост. При нашата пациентка бяха установени положителни резултати за антитела срещу следните антигени: АМА-М2, 3Е(ВРО), gp210, Sp100 и РМL, които резултати биха имали значение при проследяването на болната.

От Таблицата е видно, че АМА-М2 имат предсказателна стойност за ПБЦ, но се срещат и при други автоимунни заболявания, като лупус, ревматоиден артрит, CREST синдром. Към момента пациентката няма белези, насочващи към някое от тях, но тя би могла да бъде проследявана в тази насока поради възможността да настъпи припокриване между ПБЦ и някое от изброените заболявания [6]. Антителата срещу Sp100, които се срещат сравнително рядко, също са белег за припокриване с друго автоимунно заболяване [5, 6]. Тези антитела се наблюдават на ИF като специфичен образ – множествени нуклеарни точки, и имат 97% специфичност, но 30% чувствителност по отношение на ПБЦ. Наблюдават се при около 48% от АМА-негативните пациенти с клинично и хистологично потвърдена ПБЦ [5]. Рядко се срещат при други заболявания, като например автоимунен хепатит, първичен склерозиращ холангит, ревматоиден артрит, лупус, системна склероза, синдром на Съогрен, когато са белег на припокриване с други автоимунни заболявания.

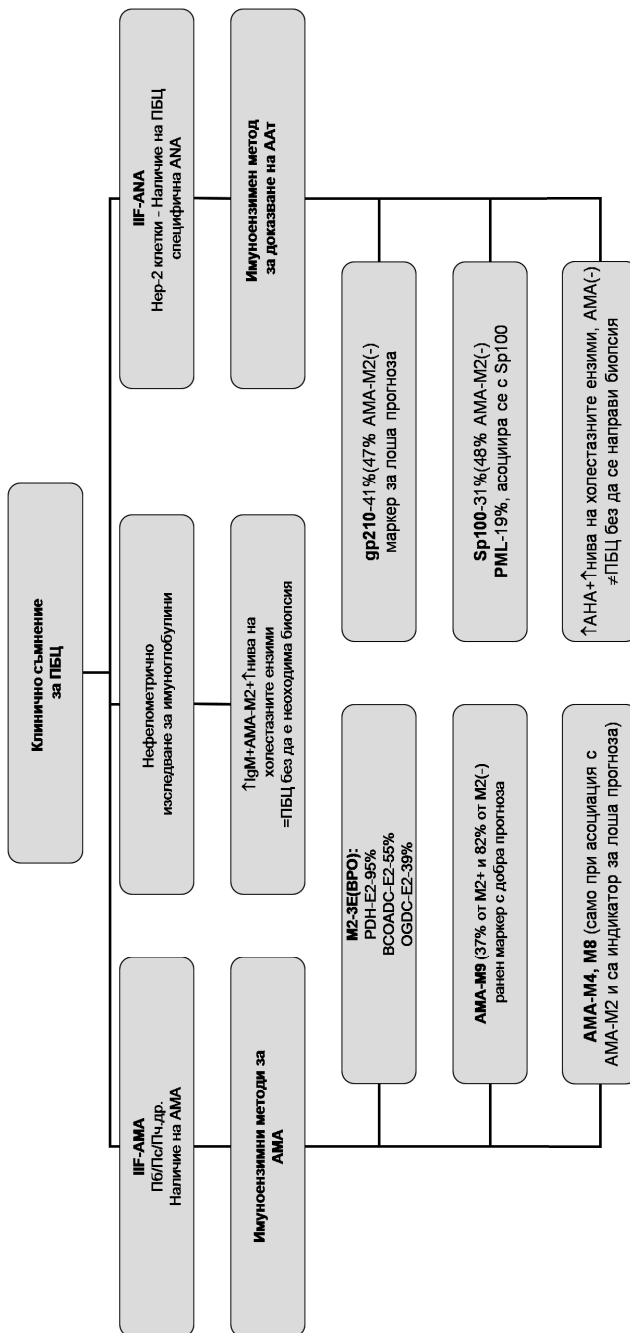
Антителата срещу gp210, които също се срещат по-рядко, са асоциирани с лоша прогноза и по-тежко протичане на болестта [5, 8]. Специфичността на anti-gp210 антителата е 99.5%, като те се срещат изключително рядко при автоимунен хепатит, ревматоиден артрит, полимиозит, синдром на Съогрен [5]. Наличието им при ПБЦ пациенти често се асоциира с извънчернодробно засягане – напр. артрит [5]. Нещо повече, антителата срещу Sp100 и gp210 персистират при пациенти с ПБЦ дори след чернодробна трансплантация [9], което поставя под въпрос дефинитивността на постигнатото „излекуване“ от ПБЦ след трансплантация, както и обуславя невъзможността те да бъдат използвани като маркер за последващо обостряне на болестта.

Антителата срещу М2-3Е (ВРО) също биха могли да бъдат изявени години преди настъпване на клиничните симптоми на ПБЦ [5]. Антителата срещу РМL са с най-ниска чувствителност (едва 19%) [5], но и те са установени при нашата пациентка.

Таблица 2. Видове антигени, представени в имуноблот теста и клиничната им значимост

Автоантитела срещу	Автоантигени	Клинична значимост
Ro-52	Рекомбинантен протеин – E3 убиквитин лигаза	Среща се при пациенти със системни автоимунни заболявания, неонатален СЛЕ, антисинтетазен синдром
SLA/LP	Разтворим чернодробен антиген/чернодробно-панкреатичен антиген (UGA-супресорен серин tRNA асоцииран протеин)	При пациенти с АИХ тип 3
LC-1	Чернодробен цитозолен антиген-1 (формиминотрансфераза циклодеаминаза)	При пациенти с АИХ тип 2, предимно при деца и често се асоциират (в 50-60%) с анти-LKM-1 антителата и в 12% от пациентите с хронична хепатит С инфекция Корелират с активността на АИХ.
LKM-1	Чернодробно-бъбречен микрозомален протеин (цитохром P450 2D6)	При пациенти с АИХ тип 2 – предимно в детска възраст. В 6-10% от пациентите с хронична хепатит С инфекция, но се разпознава различен епитоп в сравнение с АИХ.
gp210	Нуклеопорин, част от ядрената мембрана	21-47% от от АМА-негативните пациенти с ПБЦ, маркер за лоша прогноза и протичане на болестта. Среща се много рядко при АИХ, артрит, с-м на Съогрен, полимиозит
PML	Промиелоцитен левкемия асоцииран ядрен протеин.	19% от пациентите с ПБЦ
Sp100	PBCNA – синоним	48% при АМА негативни пациенти с ПБЦ. Много рядко при АИХ, ПСХ (припокриване на заболяванията с ПБЦ)
M2-3E (BPO)	Общ АМА-M2 комплекс включващ протеини от α -кето-деhidрогеназния комплекс на вътрешната страна на митохондриалната мембрана.	Имат предсказателна стойност-появяват се години преди изява на клиничните симптоми на ПБЦ.
АМА-M2	E2-субединицата на пируват дехидрогеназа, имунодоминантен епитоп за АМА	90-95% от случаите на ПБЦ. Имат предсказателна стойност. АМА-M2 антителата се срещат и при CREST с-м, АИХ, ПСХ, РА, СЛЕ и в повечето случаи са предиктивен белег за припокриване на заболяванията с ПБЦ

На база проведените разширени имунологични изследвания бихме могли да предложим следния алгоритъм при пациенти със съмнение за ПБЦ (Фигура 3).



Фигура 3. Алгоритъм за имунологична диагностика на ПБЦ

На първия етап препоръчваме скринингови изследвания за наличие на АМА чрез ИФ върху криосрези от плъши бъбрек и черен дроб и АНА чрез ИФ върху Her2 клетъчен субстрат, и нефелометрично определяне на серумните имуноглобулини. При установяване на АМА те могат да бъдат изследвани допълнително чрез имуноензимни методи за установяване на различните видове АМА: АМА-М2-3Е(ВРО) алфа-кетодехидрогеназния комплекс, споменати по-горе, АМА-М9, който е ранен маркер с добра прогноза, и АМА-М4, М8, които са антигени от външната митохондриална мембрана, показват корелация със сравнително активен ход на заболяването. От друга страна, асоциация на АМА-М2 с АМА-М4, М8 са индикатор за лоша прогноза. АМА-М9 се детектират при 37% от пациентите с АМА-М2 позитивна ПБЦ, както и при 82% от АМА-М2 негативните пациенти. Смята се, че АМА-М9 се асоциират с добра прогноза по отношение на ПБЦ. АМА-М9 могат да бъдат установени чрез ELISA с пречистени антигени или на Western blot.

Повишените серумни имуноглобулини от клас М в комбинация с АМА-М2 и увеличените нива на холестаазните ензими пък от своя страна са достатъчни за поставяне на диагнозата ПБЦ, без да е необходимо да се извършва вземане на чернодробна биопсия (Фигура 3).

При установяване на положителен резултат за наличие на АНА на Her2 клетъчен субстрат следващата стъпка е доказване на субспецифичностите на АНА чрез имуноензимни методи (ELISA, имуноблот). Наличието на антитела срещу gp210, макар и при 41% от болните, е маркер за лоша прогноза, докато Sp100 и PML. Важна особеност на ПБЦ-специфичната АНА е, че наличието ѝ заедно с високи нива на холестаазните ензими, дори при негативен резултат за АМА, също насочва към поставяне на диагноза ПБЦ, но е необходимо потвърдително вземане на чернодробна биопсия.

Не бива да се забравя обаче, че около 2.5% от пациентите с ПБЦ, изявились всички типични симптоми, нямат никакви известни досега автоантитела, което открива възможност за търсене на нови имунологични маркери за поставяне на тази диагноза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

АМА и ПБЦ-специфични АНА, установени чрез ИФ, могат да бъдат използвани като първа линия за изследване поради много добрата диагностична специфичност ~100% и чувствителност ~95%. Специфични имуноензимни методи, използващи рекомбинантни антигени, се препоръчват като втора линия на изследване и потвърждаване на специфични автоантитела при ПБЦ, защото тяхната висока чувствителност може да доведе до фалшиво положителни резултати поради наличието на нисък титър естествено съществуващи АМА антитела. Използването на рекомбинантни антигени може да доведе и до фалшиво отрицателни резултати, защото АМА могат да бъдат насочени и срещу конформационни епитопи.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Poupon, R. Primary biliary cirrhosis: a 2010 update. *Journal of hepatology*, 2010, 52, 745–58.
2. Алтънкова И, Балтаджиева Д. Автоимунни болести в клиничната практика. 2015 г. Университетско издателство „Св. Климент Охридски“, София, 195–205.
3. Lindor K, Gershwin M, Poupon R, Kaplan M, Bergasa N, Heathcote E. Primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2009, Vol. 50(1):291–308.
4. Feuchtinger M, Christ S, Preuss H. detection of novel non-M2-related antimitochondrial antibodies in patients with anti-M2 negative primary biliary cirrhosis. *Gut* 2009, Vol. 58:983–989.
5. Conrad K, Schoessler W, Hiepe F, Fritzler. Autoantibodies in Organ Specific autoimmune diseases. A diagnostic reference. Autoantigens, autoantibodies, autoimmunity 2011, Vol. 8. Pabst Science Publishers.
6. Conrad K, Schoessler W, Hiepe F, Fritzler. Autoantibodies in Systemic autoimmune diseases. A diagnostic reference. Autoantigens, autoantibodies, autoimmunity 2015, Vol. 2, third ed. Pabst Science Publishers.
7. Tanaka A , Miyakawa H , Luketic VA , Kaplan M , Storch WB , Gershwin ME. The diagnostic value of anti-mitochondrial antibodies, especially in primary biliary cirrhosis. *Cellular and Molecular Biology* 2002, Vol. 48(3):295–299
8. Valour F, Durupt S, Khenifer S, Durieu I. Diagnostic value of anti-gp210 antibodies in primary biliary cirrhosis: a case-base review. *BMJ Case Rep* 2013, pp:1–4.
9. Luettig B, Boeker KN, Schoessler W, Will H, Loges S, Schmidt E, Worman HJ, Gershwin ME, Manns MP. The antinuclear antibodies Sp100 and gp210 persist after orthotopic liver transplantation in patients with primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 1998. Vol. 28(5):824–8.

**ПЪРВИЧНА БИЛИАРНА ЦИРОЗА – ОЦЕНКА НА РАЗЛИЧНИ
ИМУНОЛОГИЧНИ ПОДХОДИ ЗА ДИАГНОСТИКА: КЛИНИЧЕН
СЛУЧАЙ**

*Екатерина Иванова Иванова-Тодорова¹, Цветелина Веселинова Великова¹,
Калина Динкова Тумангелова-Юзеир¹, Екатерина Красиминова Куртева¹,
Калоян Павлинов Павлов², Румяна Гергова Митова², Радислав Венциславов
Наков², Йордан Георгиев Генов², Борислав Георгиев Владимиров², Доброслав
Станимиров Кюркчиев¹*

*¹Лаборатория по клинична имунология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, Медицински
университет – София*

e-mail: katty_iv@yahoo.com, +3592 8527 046

*²Клиничен център по гастроентерология УМБАЛ „Царица Йоана – ИСУЛ“,
Медицински университет – София*

Първична билиарна цирроза (ПБЦ) е автоимунно чернодробно заболяване, асоциирано с наличие на антимитохондриални антитела (АМА), както и със специфични антинуклеарни антитела (АНА).

Цел: Да се направи оценка в сравнителен план на различни имунологични техники за диагностика на специфичните видове АМА и АНА и да се определи най-надежден скрининг за пациенти с ПБЦ.

Методи: Установяване на АМА чрез индиректна имунофлуоресценция (ИФ) на препарат от плъщи черен дроб, стомах и бъбрек и АНА чрез Нер-2 клетки се считат за техниката на избор за рутинен скрининг. За определяне на видовете специфична АМА и АНА е използвана имуноблот техника със софтуер за обработка на данни.

Описание на клиничния случай и резултати: Представяме случай на 56-годишна жена с хронична холестаза, дискретен цитолиза, жълтеница, сърбеж по кожата и астено-динамия и диагноза ПБЦ. Резултатите от имунологични тестове показаха повишена IgM и положителен АМА, антигладкомускулни антитела (ASMA) и АНА. Бяха установени и типа АМА и АНА: АМА-М2, ЗЕ(ВРО), анти-gp210, анти-SP100 и анти-PML.

Заклучение: АМА и ПБЦ-специфичната АНА, установени чрез ИФ, могат да бъдат използвани като първа линия на анализ. Но в около половината от пациентите с АМА анти-М2 са отрицателни. В такива случаи може да се установи АНА, която не се открива на криостатни срези от плъх, а само на Нер2 клетки или специфични имуноензимни методи, използващи рекомбинантни антигени. Намерени в около 50% от пациентите, АНА трябва да се търсят при силно подозрение за ПБЦ, особено при АМА негативни пациенти, тъй като те са много специфични за заболяването и обикновено се свързват с по-агресивен ход.

Ключови думи: първична билиарна цирроза, ИФ, АМА, АМА-М2, anti-gp210, anti-SP100, anti-PML

PRIMARY BILIARY CIRRHOSIS – EVALUATION OF DIFFERENT IMMUNOLOGICAL SCREENING APPROACHES FOR DIAGNOSIS: A CASE REPORT

Ekaterina Ivanova Ivanova-Todorova¹, Tsvetelina Veselinova Velikova¹, Kalina Dinkova Tumangelova-Yuzeir¹, Ekaterina Krasimirova Kurteva¹, Kaloyan Pavlinov Pavlov², Romyana Georgieva Mitova², Radislav Ventsislavov Nakov², Yordan Georgiev Genov², Borislav Georgiev Vladimirov², Dobroslav Stanimirov Kyurkchiev¹

¹Laboratory of Clinical Immunology „St. Ivan Rilski“ University Hospital, Medical University – Sofia

e-mail: katty_iv@yahoo.com, +3592 8527 046

²Clinical Centre of Gastroenterology „Tsaritsa Ioanna – ISUL“ University Hospital, Medical University – Sofia

Primary biliary cirrhosis (PBC) is an autoimmune liver disease usually associated with anti-mitochondrial antibodies (AMA). Moreover, several types of antinuclear antibodies (ANA) have been associated with PBC.

Aim: To make a comparison between different immunological techniques for the diagnosis of different AMA and ANA types and to determine the most reliable screening for patients with PBC.

Methods: AMA detection by indirect immunofluorescence (IIF) on sections of rat kidney, stomach and liver and ANA, which can be visualized on Hep-2 cells are considered to be the technique of choice for routine screening. Specifying the type of AMA and ANA were used immunoblot with data processing software.

Clinical case presentation and results: We present the case of a 56-years-old woman with chronic cholestasis, discreet cytolysis, jaundice, itchy skin and astenoadinamiya, led to the diagnosis of PBC. The results of immunological tests revealed elevated IgM and positive AMA, anti-smooth muscle (ASMA) and ANA, with presence of AMA-M2, 3E(BPO), anti-gp210, anti-sp100 and anti-PML antibodies.

Concussion: AMA and PBC specific ANA detection by IIF could be proposed as first-line assay. But in about half of the patients AMA/anti-M2 is negative and specific ANA can be observed. These can not be detected by IIF on cryostat sections but only by IIF on Hep2-cells or by specific immunoenzyme methods using the applicable recombinant antigens. Found in 50% of patients, these ANA must be sought before a strong suspicion of PBC especially in AMA negative patients, as they are highly specific of the disease and generally associated with a more aggressive form of PBC.

Keywords: primary biliary cirrhosis, IIF, AMA, AMA-M2, anti-gp210, anti-SP100, anti-PML.

БЪЛГАРСКА АСОЦИАЦИЯ ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ

Председател:

проф. д-р Елисавета Наумова, д.м.н.

Управителен съвет:

проф. д-р Богдан Петрунов, д.м.н.

проф. д-р Искра Алтънкова, д.м.н.

проф. д-р Марта Балева, д.м.н.

доц. д-р Петрунка Петрова, д.м.

Редколегия:

проф. д-р Марта Балева, д.м.н.

доц. д-р Даниела Балтаджиева, д.м.

доц. д-р Дора Попова, д.м.

Рецензенти:

проф. д-р Богдан Петрунов, д.м.н.

проф. д-р Христо Тасков, д.м.н.

ГОДИШНИК на БАКИ 2016

Българска
Първо издание

Книгоиздател ПАВЕЛ СЛАВЯНСКИ
Предпечат МАРИАНА ХРИСТОВА
Коректор СТЕЛА ЗИДАРОВА

Формат 70/100/16
Печатни коли 11

© Издателство „Лице“, 2016
e-mail: litse@abv.bg
0888 56 54 39

ISSN 1313-47-52