

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ**

Д-Р ЕКАТЕРИНА КРАСИМИРОВА КУРТЕВА

**Нови имунологични показатели в диагностиката и
патогенетични механизми при прогресивна
системна склероза**

Научен ръководител: проф. д-р Доброслав Станимиров Кюркчиев, дмн

Официални рецензенти:

Проф. д-р Доброслав Станимиров Кюркчиев, дмн

Доц. д-р Любомир Маринов Маринчев, дм

**ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА
СТЕПЕН “ДОКТОР”**

ДОКТОРСКА ПРОГРАМА “ИМУНОЛОГИЯ”

СОФИЯ, 2019

ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:

ААт - автоантитела
АНА - антинуклеарни автоантитела
Анти-RNAP III автоантитела - анти-РНК полимераза III автоантитела
ИББ - интерстициална белодробна болест
ПАХ - пулмонална артериална хипертония
СЗСТ - системни заболявания на съединителната тъкан (колагенози)
СЛЕ - системен лупус еритематозус
РА - ревматоиден артрит
РФ - Рейно феномен

AECA - Anti-endothelial cells antibodies
ACA - Anti-centromere (CENP) autoantibodies
ACR - American College of Rheumatology
ATA - anti-DNA-topoisomerase autoantibodies
ET1R - Endothelin-1 receptor
CENP - centromere
dcSSc - diffuse cutaneous Systemic sclerosis
EULAR - European League Against Rheumatism
EUSTAR - European Scleroderma Trials and Research Group
ET_AR - Endothelin-1 Receptor Type A
IL - Interleukin
IFN- γ - Interferon gamma
lcSSc - limited cutaneous Systemic sclerosis
LR - likelihood ratio
mRSS - modified Rodnan Skin Score
NPV - negative predictive value
PBMNC - Peripheral blood mononuclear cells
PDGFR - Platelet - derived growth factor receptor
PHA - Phytohemagglutinin
PM/Scl - Polymyositis/Scleroderma
PPV - positive predictive value
SRC - Sclerodermal renal crisis
SSc - Systemic sclerosis
TCR - T cell receptor
TGF- β - Transforming Growth Factor beta
Th cell - T helper cell
TNF- α - Tumor necrosis factor α
Tregs - T regulatory cells
VEDOSS - Very early diagnosis of systemic sclerosis

СЪДЪРЖАНИЕ:

1. ВЪВЕДЕНИЕ	4
2. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	6
2.1. Дефиниция и кратка история на заболяването.....	6
2.2. Епидемиология на SSc.....	7
2.3. Клинични прояви, диагноза, диференциална диагноза и класификационни критерии за SSc.....	12
2.4. Автоимунитет при SSc.....	16
2.5. Роля на автоантителата (ААт) при SSc.....	30
3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	56
4. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	58
4.1. Клиничен материал	58
4.2. Методи на изследване	64
5. Резултати и обсъждане	92
5.1. Изследване на нови имунологични показатели в имунодиагностиката на SSc.....	92
5.1.1. Изследване на АНА в серума на болните със SSc чрез HEp-2 ИИФ – определяне на титър и тип имунофлуоресцен образ (AC - светене), съгласно Международния консенсус за АНА светения(ICAP).....	92
5.1.2. Изследване на панел от 13 SSc - асоциирани ААт чрез имуноблот метод ...	108
5.2. Проучване на нови патогенетични механизми при SSc.....	118
5.2.1. Оценка на периферния цитокинов профил в серума на пациенти със SSc в сравнителен план със здрави лица.....	118
5.2.2. Определяне на способност за активация на Т-лимфоцитите под въздействието на Phytohemagglutinin (PHA) в периферна кръв от пациентите със SSc и при здрави контроли.....	122
5.2.3. Изследване на Th17 и Tregs в периферна кръв от пациенти със SSc.....	125
5.2.4. Връзка между болестната активност, стадия на SSc, наличието на висцерално засягане и изследваните имунологични показатели.....	132
6. ИЗВОДИ	134
7. ПРИНОСИ	134
8. Публикации и участия в научни прояви във връзка с дисертационния труд:.....	136
9. Библиография	139

1. ВЪВЕДЕНИЕ

„В разгърнатата си форма, дифузната склеродермия представлява една от най-ужасните болести, които могат да сполетят човек. Подобно на Титон, който бавно вехнел и се състарявал, обезобразен и опустошен, болният човек буквално се превръща в мумия, обгърната от непрестанно свиваща се кожа, сякаш от стомана, е съдба, неописана в никоя трагедия, било то древна или модерна.” Sir William Osler, 1898

Макар и рядко срещана, прогресивната системна склероза (Systemic sclerosis, SSc) представлява тежко инвалидизиращо заболяване със системен ход и сериозно влияние върху живота на засегнатите индивиди. Въпреки че на пръв поглед наподобява други системни автоимунни заболявания на съединителната тъкан, SSc представлява уникална по своята същност нозологична единица, многолика в своята хетерогенна изява. От трудностите при поставяне на диагнозата и стратифицирането на пациентите, през терапевтичните предизвикателства, до неблагоприятната дългосрочна прогноза, SSc остава неразрешена загадка към настоящия момент, както за научноизследователските екипи, така и за клиничните специалисти. Въпреки безспорния принос на натрупаните до



момента научни данни относно имунопатогенезата на SSc, все още много въпроси остават без отговор. Сред тях са: кое точно дава началото на автоимунния процес, какви са причините за преобладаването на Т-хелперния (Th) тип 2 отговор, както и да бъдат определени имунологичните различия между дифузната и ограничената форма на SSc.

Необходимо е натрупване на допълнителни научни данни и задълбочено изследване на фенотипа на Т-клетките, въввлечени в имунопатогенезата на SSc, както и да се установи дали тези субпопулации реално са израз на транзиторни състояния или представляват терминално-диференцирани клетки, особено по отношение на проинфламаторните Th17 клетки и на регулаторните Т-лимфоцити (Tregs). Голямо предизвикателство представлява интерпретирането и обвързването на получените резултати от животинските модели на SSc и проведените *in vitro* проучвания, с възможността за осигуряване на персонализиран терапевтичен подход при пациентите със SSc.

Фокусирайки се върху имунодиагностиката на заболяването, въпреки неоспоримия напредък през последните две десетилетия, към настоящия момент остава нерешен проблемът с липсата на общодостъпни лабораторни методи за рутинно изследване на всички автоантитела, имащи диагностична стойност и/или патогенетично значение при SSc. Предвид високата добавена стойност на разходите за скъпоструващи конвенционални медикаменти и биологични средства, има смисъл здравните системи да инвестират в усъвършенстване на скрининговите алгоритми за ранно диагностициране на SSc, както и в профилактиране на възможните органни поражения, посредством подобрена и ефективна имунодиагностика.

2. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

2.1. Дефиниция и кратка история на заболяването

Прогресивната системната склероза (Systemic sclerosis, SSc, склеродермия) е рядко, системно аутоимунно заболяване на съединителната тъкан (СЗСТ, колагеноза) с кожно и мултиорганно засягане, съпътствано от промени в клетъчния и хуморалния имунен отговор. SSc се характеризира с увреждане на микроциркулацията и отлагане на съединителна тъкан в кожата и вътрешните органи, като фиброзните промени засягат и мускулно-скелетната система (Bolster et Silver 2015).

Първото убедително описание на SSc е направено от Carlo Curzio от Неапол, който през 1753 г. публикувал монография на италиански език, описваща клиничен случай на седемнадесет годишно момиче с „обширна изопнатост и уплътненост на кожата, засягащи цялото тяло”. Curzio лекувал пациентката с „кръвопускане, топло мляко и малки дози живак”. През 1754 г. монографията е преведена на английски език от Watson, а през 1962 е пресъздадена отново в класическия ръкопис на Rodnan и Benedek „An historical account of the study of progressive systemic sclerosis (diffuse scleroderma)” (Rodnan et Benedek 1962). SSc е обособена като клинична единица и получава наименованието си в средата на деветнадесети век, след като Thirial (1845 г.), Forget (1847 г.) и Grisolles (1847 г.) публикуват серия от клинични случаи (Rodnan et Benedek 1962). През 1847 г. Gintrac прави преглед на публикуваните случаи, обединявайки ги с още пет предходни доклада и нарича заболяването „sclérodémie” (склеродермия). Horteloup заимствал термина “склеродермия” в своя обзор върху SSc (1865 г.) и постепенно названието било широко възприето (Rodnan et Benedek 1962). В своя учебник „The Principles and Practice of Medicine” през 1894 г. Osler описал две форми на склеродермия - „circumscribed” (еквивалентна на морфея) и „diffuse” (еквивалентна на SSc) (Osler 1894). Година по-късно Lewin и Heller публикуват литературен обзор, включващ 507 случая на SSc (Rodnan et Benedek 1962).

В публикуваните през 19^{ти} век клинични случаи рядко се обсъжда наличието на системно засягане в хода на SSc, с изключение на Auspitz (1863 г.) и Meyer (1887г.), които изказват предположение за възможно бъбречно засягане в контекста на заболяването (Rodnan et Fennell 1962). През 1894 г. Osler съобщава, че пациентите със SSc често загиват от белодробни усложнения или нефрит (Osler 1894). Докладвано е и ставно засягане при пациенти със SSc в публикации на Forget 1847 и Osler 1898 (Rodnan¹ 1962). Въпреки публикуването на тези спорадични наблюдения, системната природа на заболяването все още не била широко

възприета, а по-скоро се отричала. През 1892 г. Wolters пише, че “според повечето наблюдения, SSc не изглежда като заболяване, което пряко заплашва живота на болните. Смъртта обикновено настъпва вследствие на множество други болести, непряко свързани със склеродермията” (Rodnan et Benedek 1962). Първи пробив в тази хипотеза прави Matsui 1924, който открива склеротични и съдови промени не само в кожата, но и във вътрешните органи (бял дроб, гастро-интестинален тракт и бъбреци) на пациенти със SSc, като доказателство, че структурните изменения в хода на заболяването далеч не се ограничават само в кожата, а ангажират множество органи и системи (Matsui 1924).

Концептуалната идея за SSc като системно заболяване е публикувана от Goetz 1945. В своя класически ръкопис той описва детайлно анамнезата и клиничните находки при пациентка с феномен на Рейно (РФ), склеродактилия и дисфагия. Групата на Farmer et al. 1960 изследва кохорта от 271 пациента, голямата част от които със засягане на вътрешните органи: с езофагеално ангажиране 64.5%, белодробно 21%, сърдечно 8.9%, бъбречно 1.5% и тънкочревно въвличане при няколко случая. Най-мощното до момента проучване при SSc е проведено от Tuffanelli et Winkelmann 1961 и включва 722 случая, публикувани през 1961 г. Описаните пациенти са предимно с ограничена форма на SSc (95%) и в съотношение жени/мъже 3:1. РФ е описан като чест ранен симптом на ограничената, но не и на дифузната склеродермия.

През 1969г. D'Angelo et al. установяват, че основната патохистологична находка при SSc е тъканна фиброза, в резултат на ексцесивно отлагане на съединителна тъкан, като Campbell et LeRoy 1975 описват хипотезата за съдовото увреждане в патогенезата на заболяването. По-късно се установява, че автоимунният процес също играе ключова роля в патогенетичния процес (Bolster et Silver, Rheumatology 2015).

2.2. Епидемиология на SSc

2.2.1. Заболеваемост и болестност

Заболяването е описано при пациенти от цял свят (Chiffot et al. 2008). Въпреки липсата на данни относно заболеваемостта сред Африканските държави, SSc е докладвана и при хора от афро-американски произход в проучвания, проведени в САЩ. Заболеваемостта варира от 1.2 до 23 случая годишно за 1 милион население (Ranque et Mouthon 2010, Barnet et Mayes 2012), като в европейската популация варира от 3.7 (Silman 1991, Barnes et Mayes 2012) до 43 случая/милион души годишно. Според натрупаните към момента епидемиологични данни, заболеваемостта в САЩ и Австралия е по-висока от тази в Европа, но остава недоизяснено дали

има тенденция към покачването ѝ с времето. Популационно проучване, проведено на територията на окръг Алегени, щата Ню Йорк, САЩ, констатира двукратно покачване на заболяемостта от 10 случая/милион население годишно, през периода 1963-1972 г., на 20 случая/милион души годишно, за периода 1973-1982 г. (*Steen² et al. 1997, Barnes et Mayes 2012*). Покачването на броя новооткрити случаи все пак е относително и може да се свърже с подобрената диагностика на SSc.

Към момента не е правено епидемиологично проучване относно заболяемостта от SSc на територията на България. Такива проучвания на Балканския полуостров има проведени в Гърция и Хърватия. Първото проучване обхваща Северозападна Гърция през периода 1981-2002, като случаите са дефинирани според класификационните критерии за SSc на Американския колеж по ревматология (The American College of Rheumatology, ACR) от 1981 г. и според критериите на Leroy/Medgser от 2001 г. Заболяемостта е определена на 11/милион/годишно, а болестността на 154/милион души (*Alamanos et al. 2005*). Данните за Хърватия са от болнично проучване, базирано в гр. Сплит, Далмация, проведено през 2008 г. Случаите са дефинирани по критериите на ACR от 1981 г., като липсват данни по отношение на заболяемостта, а болестността е определена на 156/милион души (*Radic et al. 2010*).

Тъй като SSc се счита за доживотно заболяване, болестността се влияе от заболяемостта и от процента смъртност. Оценката на болестността варира в широки граници от 31 до 350 на 1 милион души, като изключение правят две проучвания, проведени в Унгария и Южна Каролина, САЩ, където макар броят новооткрити случаи да е малък, се наблюдава относително висока болестност, достигаща съответно 910/милион и 1130/милион души (*Ranque et Mouthon 2010, Barnes et Mayes 2012*). По-нови проучвания откриват повишена болестност също и в Скандинавските държави, което “нулира“ ефекта на градиента Север-Юг, в контекста на SSc. При голяма част от пациентите със SSc, РФ е първи симптом на заболяването и рискът да развият заболяването е съответно увеличен при пациенти с РФ. Мета-анализ, публикуван през 1998, показва, че от 639 пациента с РФ, проследени за 2531 пациенто-години, 53 души (8.3%) развиват SSc, средно 10 години след изявата на РФ (*Spencer-Green 1998*).

2.2.3. Влияние на пола

SSc възниква по-често при жени, отколкото при мъже и преобладаването на пациенти от женски пол е постоянна тенденция във всички проведени проучвания (*Chiffot et al. 2008*). Съотношението жени/мъже варира от 1.1/1 до 14/1, но преобладаващо е 3/1 (*Chiffot et al. 2008*).

Най-високо отношение в полза на женския пол се наблюдава във възрастта между 25 и 65 години (*Silman and Hochberg 2009*). Тази находка се свързва основно с активната детеродна възраст при жените (*Steen² et al. 1997*), но все още остава недоизяснена ролята на женските полови хормони и паритета (*Chiffot et al. 2008*). Предилекционно засягане на женския пол се наблюдава при голям брой автоимунни заболявания и бива свързвано с асиметричната X-хромозомна инактивация, което също би могло да обясни преобладаващия женски пол при SSc (*Knudsen et al. 2009*).

2.2.4. Влияние на възрастта

SSc се изявява изключително рядко в детска възраст: деца под 16 г. са по-малко от 5% от всички регистрирани случаи, а пациентите, развиващи SSc преди 20 г. възраст, са под 10% от общия брой болели (*Zulian et Martini 2007*). Проучване, проведено в Обединеното кралство, докладва заболеваемост от 0.27 деца/годишно, която е значимо по-ниска от тази, докладвана за локализирана склеродермия - 3.4 (95% CI 2.7 до 4.1), както и от новооткритите случаи на линейна склеродермия - 2.5 (95% CI 1.8 to 3.1) (*Herrick et al. 2010*). Във възрастта над 25 години, заболеваемостта нараства и при двата пола, след което отново намалява при достигане на средна възраст, а в последващата декада засегнатите са основно жени (*Steen et al. 1997*). Нови случаи на SSc рядко се откриват и при двата пола във възрастта след 75 години (*Steen et al. 1997, Derk et al. 2006*).

Заболеваемостта при африканската раса е по-висока, отколкото при кавказката, макар да се запазва разликата в съотношението между двата пола (*Steen et al. 1997*). Понижаване на заболеваемостта в периода на средната възраст, при пациенти от афро-американски произход, настъпва с едно десетилетие по-рано, отколкото при тези от кавказки произход (*Steen et al. 1997*).

2.2.5. Влияние на генетичните фактори

Голям брой гени играят роля за възприемчивостта към SSc, но етиологията на заболяването не може да бъде обяснена единствено с наличието на генетично предразположение. Повечето изследвания, проведени при еднородни близнаци, са негативни и рядко са докладвани случаи на фамилна SSc (*Arora-Singh et al. 2010*). Тези наблюдения предполагат комплексно влияние на

генетичните фактори и ангажиране на множество генетични предразположения, в комбинация с тригериращи фактори от заобикалящата среда.

В подкрепа на това твърдение са резултатите от изследване за фамилна SSc при три кохорти пациенти от САЩ, където заболяването възниква едва при 0.4% от първородствениците на пациентите, което се доближава до данните за болестността в общата популация (*Arnett et al. 2001*). Резултатите от друго проучване при близнаци затвърждават тази тенденция: конкордантността за SSc е докладвана като ниска (4.7%) и сходна при моно- и дизиготни близнаци (*Feghali-Bostwick et al. 2003*). За сметка на това, конкордантността по отношение на продукцията на антинуклеарни автоантитела (АНА) е сигнификантно увеличена при монозиготни, в сравнение с дизиготни близнаци - 90% спрямо 40% (*Feghali-Bostwick et al. 2003*).

Направените до момента проучвания показват, че митохондриалната наследственост, редът на поява на децата, полът на първото дете, както и възрастта на родителите нямат отношение към етиологията на SSc (*Frech et al. 2014, Russo et al. 2014*). Следователно, цялостното влияние на генетичните фактори за възникването на SSc е относително ограничено.

При полигенните заболявания, множество гени индивидуално оказват сравнително малък ефект, така че очаквано, при изследване влиянието на отделни гени, докладваните резултати не са особено информативни. В скорошен обзор на данните от проведените до момента генетични проучвания, редица гени, въввлечени в имунната регулация, включително B Cell Scaffold Protein with Ankyrin Repeats 1 (BANK1), C8orf13-B lymphoid kinase (C8orf13-BLK), IL-23R, Interferon regulatory factor 5 (IRF5), Signal Transducer and Activator of Transcription 4 (STAT4), T-box transcription factor 21 (TBX21) и Tumor necrosis factor ligand superfamily member 4 (TNFSF4), са докладвани като въввлечени в етиопатогенезата на SSc (*Agarwal et Reveille 2010*). Освен това, асоциативните проучвания показват, че гените за IRF5, STAT4 и BANK1, както и гените за TBX21 и STAT4, взаимодействат по отношение на възприемчивостта към SSc (*Agarwal et Reveille 2010*).

Много от генетичните варианти, свързани с предразположение към SSc, са асоциирани и с други автоимунни заболявания като ревматоиден артрит (РА) и системен лупус еритематозус (СЛЕ) (*Agarwal et Reveille 2010*). При SSc, освен генетични, играят роля и редица епигенетични механизми (*Luo et al. 2013*). Въпреки нарастващия обем данни относно генетичните предразположения, са необходими още проучвания и натрупване на познания за правилната интерпретация на резултатите. Макар асоциативните проучвания да откриват непрекъснато нови полиморфизми, асоцииращи се със SSc (*Koumakis et al. 2016*), нито едно от проведените

до момента изследвания не представя ясни доказателства за въвличането на генетичните варианти в патофизиологията на заболяването.

2.2.6. Влияние на фактори от околната среда

Връзката между факторите на средата, професионалните рискови фактори и SSc е обстойно анализирана, макар ролята на околната среда все още да не е напълно изяснена (*Mora et al. 2009, Miller et al. 2012; Marie et al. 2017*). Основната причина за това е, че SSc е рядко заболяване. Трудността при оценката на факторите на средата и професионалните рискови фактори се корени в необходимостта от набиране на големи, представителни популационни извадки, особено ако трябва да бъдат проучени взаимодействията между гените и околната среда. Факторите на средата (табл. 1) могат да бъдат класифицирани като професионални (силициев диоксид, органични разтворители) и несвързани с професионални вредности/неинфекциозни фактори (лекарства, пестициди, силикони, тежки метали) (*Mora et al. 2009, Marie et al. 2017*). Най-силните доказателства сочат, че силициевият диоксид и органичните разтворители са рискови фактори за SSc, за разлика от експозицията на силикони (*Miller et al. 2012*), макар и противоположната теза, посочваща силиконите като тригер на автоимунитет, да е сериозно застъпена в научната литература (*Goren et al. 2015, Colaris et al. 2016, Watad et al. 2017*). Данните, относно влиянието на лекарства и пестициди, не доказват ясна причинно - следствена връзка с отключването на SSc (*Mora et al. 2009*).

Таблица 1. Рискови фактори от околната среда, асоциирани със SSc (адаптирана по *Mora et al. 2009, Marie et al. 2017*)

Силиций, силикон и силиконови деривати	
Силициев прах	Работници в златни и въглищни мини Каменоделци за дари Работещи с абразивен прах
Силиконови импланти	Силикон Парафин
Органични съединения	
Ароматни въглеводороди	Толуен Бензен Ксилен Смеси на ароматни съединения (дизел и др.)
Алифатни въглеводороди	
Хлор-съдържащи съединения	Винилхлорид Трихлоретилен Тетрахлоретилен n-хексан
Въглеводороди, несъдържащи хлор	Епоксидни смоли Биогенни амини Урея-формалдехидна смола

Лекарствени препарати
Блеомицин
Карбидопа (L-5-хидрокситриптофан)
Пентазоцин
Кокаин
Средства за потискане на апетита
Диетилпропион
Фенфлурамин хлорхидрат
Рапично олио (замърсено)
L-tryptophan
Тежки метали
Антимоний
Кадмий
Живак
Олово
Молибден
Паладий
Цинк

Обсъжда се и ролята на редица инфекциозни фактори в етиопатогенезата на SSc, във връзка с което са проведени някои функционални проучвания, относно бактериални и вирусни агенти, като парвовирус B19, цитомегаловирус, вируса на Епщайн-Бар, ретровируси и връзката им със SSc (*Randone et al. 2008*). Хомологията между вирусите и таргетните антигени предполага, че процесът на молекулярна мимикрия играе роля в инициирането на антителния отговор при различни заболявания, характеризиращи се с ендотелна дисфункция и съдово възпаление, включително при SSc (*Randone et al. 2008*). Въпреки това, все още липсват доказателства за пряка причинно - следствена връзка между инфекциите и SSc (*Randone et al. 2008, Mora et al. 2009*).

2.3. Клинични прояви, диагноза, диференциална диагноза и класификационни критерии за SSc

Промените при SSc са от съдов, имунологичен и фибротичен характер. В основата на васкулопатията е фиброинтимална пролиферация на малките съдове и вазоспастични епизоди, провокирани от излагане на студ или стрес, което от своя страна води до тъканна исхемия. Фибротичните промени при SSc са причина за органната дисфункция. Автоимунната дисрегулация при заболяването включва дисбаланс между отделните Т хелперни субпопулации, абнормна лимфоцитна активация, водеща до продукция на автоантитела (ААт), аберантно освобождаване на цитокини и хемокини, както и дисрегулация в механизмите на врождения имунен отговор (*Katsumoto et al. 2011*). Системната изява на SSc е многолика и

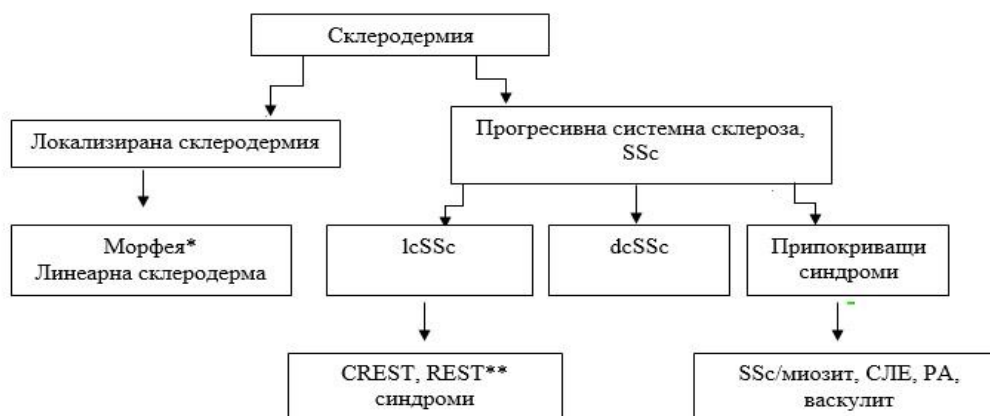
разнообразна в своята хетерогенност (табл. 2). Обикновено РФ е първата клинична изява на заболяването, като типично при пациентите с ограничена форма на SSc (limited cutaneous SSc, lcSSc) е, че РФ предшества клиничната изява на останалите симптоми с няколко години, докато при тези с дифузно кожно ангажиране (diffuse cutaneous SSc, dcSSc), най-често болестта се разгръща непосредствено след първия епизод на РФ.

Таблица 2. Патологични прояви и симптоми при SSc (no Bolster et Silver 2015)

Кожа	РФ; склеродактилия; язви по върховете на пръстите; склеродермия по крайници, лице, шия, торс, телеангиектазии; калциноза
Бял дроб	Интерстициална белодробна болест (ИББ); пулмонална артериална хипертония (ПАХ)
Сърце	Аритмии; миокардна фиброза; застойна сърдечна недостатъчност
Мускулно-скелетен апарат	Артрит/артралгии, фиброза на сухожилни влагалища; ставни контрактури; миопатия
Гастроинтестинален тракт	Езофагопатия; тънкочревен хипомотилитет
Бъбреци	Склеродермна бъбречна криза, SRC (малигнена хипертония, бързопрогресираща бъбречна недостатъчност)

При голям процент от пациентите, клиничният фенотип се асоциира със специфични АНА. Така например, наличието на АНА, насочени срещу топоизомераза I (ATA, анти-Scl70) се асоциира с dcSSc и интерстициална белодробна болест (ИББ).

Кожното засягане, наричано още склеродермия, е най-характерния клиничен симптом при SSc. Склеродермията се разделя на две основни форми - локализирана склеродермия, ограничена в кожата и подкожната тъкан и SSc, засягаща кожата и вътрешните органи (*Bolster et Silver 2015*) (фиг. 1). От своя страна, SSc се разделя на два клинични фенотипа (форми) - ограничена (limited cutaneous SSc, lcSSc) и дифузна (diffuse cutaneous SSc, dcSSc). Ограничената lcSSc се проявява със склеродермия главно на ръце, предмишници, по-малко на лице и шия и засягане на различни вътрешни органи, докато dcSSc се характеризира с дифузна кожна склероза и висцерализация (*Bolster et Silver 2015*).



Фигура 1. Класификация на склеродермията

*Морфеята се разделя на морфея плаката, дифузна морфея, *morphea profunda*, пансклеротична морфея, атрофодерма на Pasini/Pierini, нодуларна морфея;

**CREST – калциноза, синдром на Рейно, езофагит, склеродактилия, телеангиектазии; REST - синдром на Рейно, езофагит, склеродактилия, телеангиектазии;

В допълнение, пациентите могат да имат клинично припокриващи се характеристики, при които SSc е съчетана с други автоимунни заболявания, в контекста на т.нар. припокриващи (overlap) синдроми. Описва се все по-често припокриване между SSc и полимиозит, синдром на Sjögren, автоимунен тиреоидит, глютенена ентеропатия и по-рядко със СЛЕ или ПА (Elhai et al. 2013, Tseng et al. 2015, Horimoto et da Costa 2016, Knobler et al. 2017). Наблюдава се дори тенденция към търсене на нови подходи за определяне на формите на SSc, отчитайки недостатъците на сегашната класификация, основаваща се на типа кожно засягане, където субективният фактор не може да бъде пренебрегнат и има риск от погрешно стратифициране и оценка на прогнозата на пациента (Johnson et al. 2017).

Диагностичният подход към SSc се промени през последното десетилетие, с нарастващ акцент върху възможностите за много ранна диагностика на заболяването. Всички разработвани до момента класификации разграничават lcSSc от dcSSc, като това фенотипно разделение е приложимо в диагностичната практика при разгърната клинична картина, но не включва много ранните симптоми в началните фази от развитието на болестта. Поради недостатъчната чувствителност на критериите от 1980 г., Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (Masi 1980) и напредъка в познанията за SSc, Американският колеж по ревматология (ACR) и Европейската лига за борба с ревматизма (EULAR) създадоха комитет за изготвяне на съвместно предложение за нови класификационни критерии за SSc (van den Hoogen et al. 2013), които:

- 1) включват по-широк спектър от пациенти със SSc, включително такива, които са в ранен и в късен етап на болестния процес;
- 2) включват васкуларни, имунологични и фибротични прояви;
- 3) са приложими в ежедневната клинична практика;
- 4) са в съответствие с критериите, използвани за диагностициране на SSc в клинична практика (табл. 3).

Таблица 3. Класификационни критерии на ACR/EULAR при SSc (van den Hoogen et al. 2013)

Критерий	Подкритерий	Score
Уплътнение на кожата на пръстите на ръцете, простиращо се проксимално от метакарпофалангеалните стави (достатъчен критерий)	-	9
Уплътнение на кожата на пръстите (взема се предвид само по-високия score)	Puffy fingers Склеродактилия на пръстите (дистално от метакарпофалангеалните стави, но проксимално от проксималните интерфалангеални стави)	2 4
Лезии по върха на пръстите (взема се предвид само по-високия score)	Дигитални улцерации по върховете на пръстите Точковидни белези по върховете на пръстите	2 3
Телеангиектазии	-	2
Абнормна капиляроскопска картина	-	2
ПАХ и/или ИББ	ПАХ ИББ	2 2
РФ	-	3
Положителни SSc- асоциирани АНА: АСА, АТА, анти-RNAP III (максималният score е 3)	АСА АТА анти-RNAP III	3 3 3

*Тези критерии не са приложими при пациенти, при които кожното уплътнение не е засегнало пръстите, както и при болни със SSc - подобни заболявания (нефрогенна склерозираща фиброза, генерализирана морфея, еозинофилен фасциит, диабетна склеродерма, склеромикседем, порфирия, еритромиялгия, lichen sclerosis, graft-versus-host disease).

**При пациенти с общ скор ≥ 9 се поставя диагноза SSc.

Въпреки приетите през 2013 година ACR/EULAR класификационни критерии за SSc, за много ранните форми на болестта остават актуални предложените от EUSTAR (EULAR Scleroderma Trial and Research group) критерии през 2011 г. (Avouac et al. 2010).

2.3.1. Критерии на EUSTAR (2011 г.), основаващи се на резултатите от Delphi Consensus Study:

Критериите, за които се счита, че имат висока клинична значимост за много ранната диагностика на SSc:

- РФ;
- Дифузно оточни пръсти (puffy swollen fingers), с прогресия към склеродактилия;

- Абнормна капиляроскопска находка със склеродермна картина;
- Позитивни анти-центромерни антитела (анти-CENP, ACA);
- Позитивни анти-топоизомераза-1 антитела (анти-Scl70, TOPO I, ATA);

Критериите, считани за водещи за ранно насочване:

- РФ;
- Puffy fingers;
- Позитивни SSc - специфични АНА: ACA, ATA;

Предпочитани средства за диагностициране на пациенти с много ранна SSc са достъпните SSc - специфични АНА: ACA и ATA, заедно с капиляроскопията на нокътното ложе.

Диагностицирането на SSc на етап ранни промени се оказва ключово за започването на по-ранна терапия, която би подобрила дългосрочната прогноза и преживяемостта на пациентите. Приложението на критериите в ежедневната клинична практика има за цел чрез по-ранен, достъпен и надежден скрининг на лица в риск от развитие на SSc, да доведе до ранно поставяне на диагнозата, намаляване тежестта на психологическите и социално-икономическите последици, както за пациентите, така и за обществото и не на последно място - подобряване качеството на живот на болните.

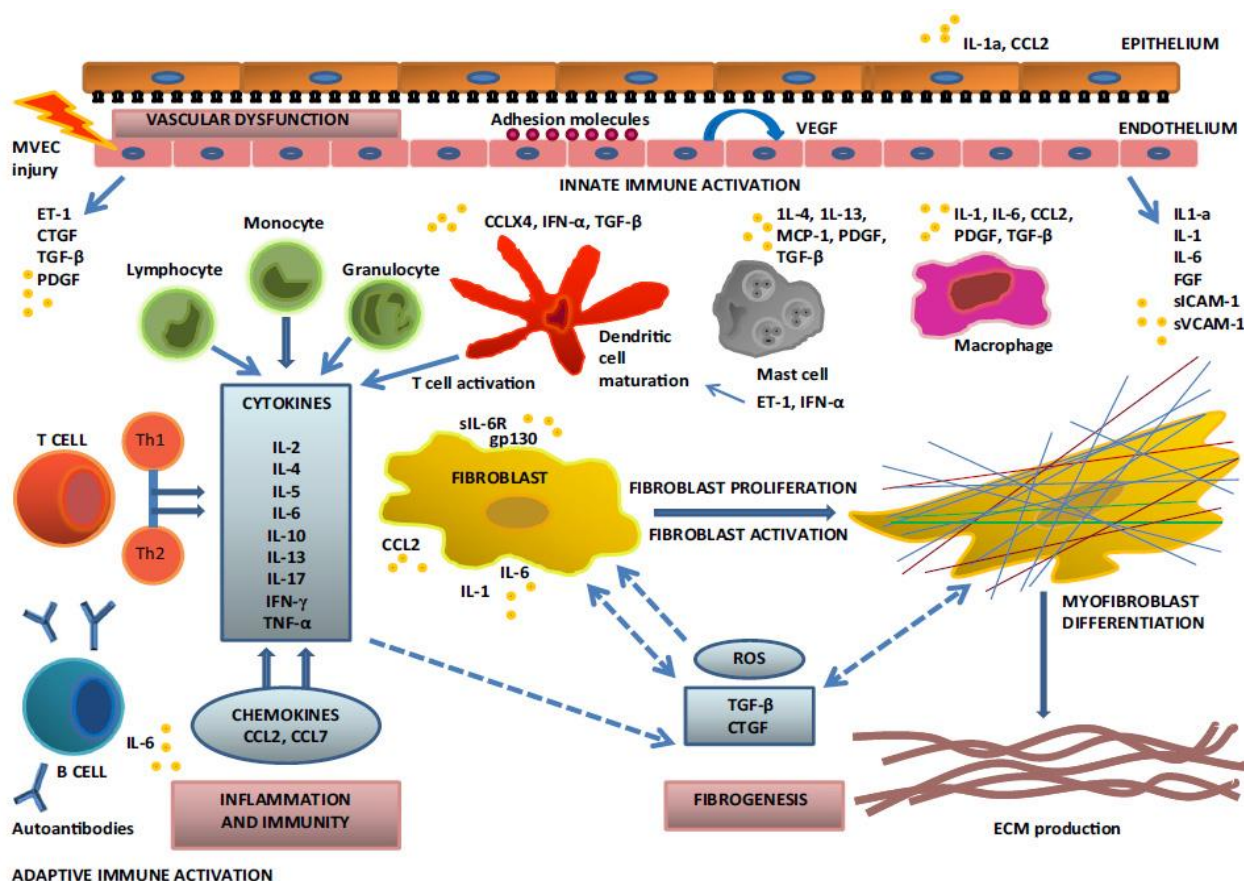
2.4. Аутоимунитет при SSc

2.4.1 Основни аспекти от патогенезата на SSc

В патогенезата на SSc са въввлечени три основни патологични процеса: увреждане на микросъдовете и развитие на васкулопатия, индуциране на аутоимунен отговор и генерализирана фиброза в кожата и вътрешните органи (*Varga et Lafyatis 2015*).

Увреждането на съдовия ендотел заема централна роля в патогенетичния процес. Описани са няколко подлежащи механизма при развиващата се васкулопатия - вазоспазъм, апоптоза на ендотелните клетки и ендотелно-мезенхимна трансформация (*Campbell et LeRoy 1975, Varga et Lafyatis 2015*). Факторите, които отключват патологичния процес в съдовия ендотел, не са ясни. Допуска се ролята на различни вируси, спазъм на микросъдовете, поради ендотелна клетъчна дисфункция, с последваща исхемия и развитие на оксидативен стрес. Установено е, че ендотелните клетки не са само пасивни реципиенти на съдовото увреждане, но и активно участват в развитието на възпалителния процес в съдовата стена (*Kahaleh 2004, Buckley et al. 2005*). Активираните ендотелни клетки експресират адхезионни молекули - Intercellular

Adhesion Molecule-1 (ICAM-1), Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), E-selectin, чрез които се осъществява взаимодействието с Т-клетките (Sollberg *et al.* 1992). Т-цитотоксичните лимфоцити, от своя страна, чрез синтезираните перфорини и гранзими, осъществяват цитотоксичен ефект върху ендотелните клетки, с последваща апоптоза (Buckley *et al.* 2005, Varga *et al.* 2015). Съдовият спазъм, заедно с развиващия се процес на исхемия - реперфузия и последващата хипоксия, допълнително индуцира апоптозата на ендотелните клетки, както и експресията на Endothelin-1 (ET-1), Vascular endothelial growth factor (VEGF) и Platelet derived growth factor (PDGF) (Raja *et al.* 2015). Процесът на реперфузия повишава синтеза на някои провъзпалителни цитокини – TNF- α , IL-6, IL-1. Съдовият спазъм, исхемията и хипоксията водят до освобождаване на различни разтворими медиатори (фиг. 2), които спомагат за съдовото увреждане при SSc (Raja *et al.* 2015). Важен акцент пада върху хиперплазията на интималния слой на малките и среднокалибрените артерии. Тя допринася за микросъдовото увреждане, с последващата тъканна исхемия и ендотелно-мезенхимната трансформация, която вероятно участва във фибротичния процес (Varga *et al.* 2015).



Фигура 2. Многопластовата роля на цитокините и други разтворими медиатори при SSc: таргетни клетки и патогенетични мрежи (адаптирана по Raja *et al.* 2015, Semin Immunopathol, 2015)

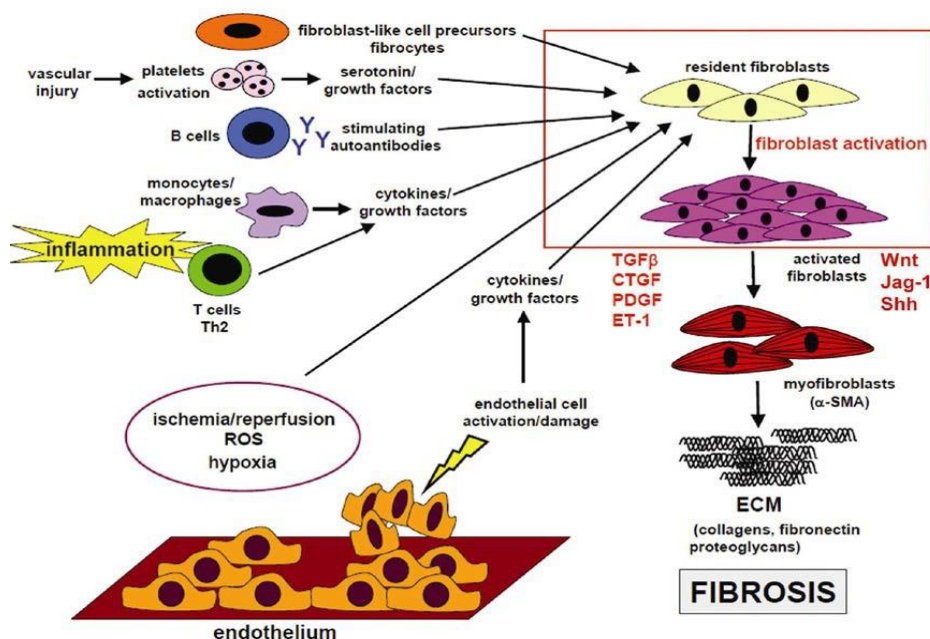
Фиброзата е процес, при който се нарушава нормалната тъканна архитектура, поради експресивно отлагане на съединителна тъкан в кожата и вътрешните органи. Нормалният екстрацелуларен матрикс е съставен от клетъчна част и ацелуларна съединителна тъкан, която от своя страна е изградена от фибрилерни и нефибрилерни колагени, фибронектин, протеоглигани, еластин, фибрилини, хрущялен олигометричен протеин (Varga et Bashey 1995). Екстрацелуларният матрикс е „резервоар“ за различни растежни фактори и сигнални молекули (табл. 4), активиращи мезенхимните стволови клетки, които от своя страна се диференцират във фибробласти, миофибробласти, продуциращи колаген и други съединително-тъканни молекули (Varga et Abraham 2007, Varga et Lafyatis 2015).

Таблица 4. Разтворими медиатори, участващи в процеса на фиброза, развиващ се при SSc (no Varga et al. 2015)

Растежен фактор	Клетъчен източник	Повишен при SSc
TGF- β	Възпалителни клетки, тромбоцити, фибробласти, макрофаги	да
PDGF	Тромбоцити, макрофаги, фибробласти, ендотелни клетки	да
IGF-1	Фибробласти	да
IL-4 и IL-13	Th2 клетки, мастоцити	да
IL-6	Макрофаги, Т и В лимфоцити, фибробласти	да
Хемокини (MCP-1, MCP-3)	Неутрофили, епителни клетки, ендотелни клетки, фибробласти	да
FGF	Фибробласти	да
Endotelin-1	Ендотелни клетки	да

TGF- β – transforming growth factor beta; IGF-1 - insulin-like growth factor-1; MCP-1 и -3 - monocyte chemoattractant protein-1 и -3; FGF – fibroblast growth factor;

Установена е повишена експресия на гени, кодиращи синтеза на колаген и други екстрацелуларни компоненти, растежни фактори, сигнални молекули при болни със SSc, в сравнение със здрави лица (Denton et al. 2006). От друга страна, при SSc е нарушен процесът на разграждане на екстрацелуларния матрикс (Denton et al. 2006). Основните клетъчни популации и разтворими медиатори, участващи във фиброзата при SSc, са представени на Фигура 3.



Фигура 3. Клетки и разтворими медиатори, участващи във фиброзата при SSc (адаптирана по Manetti et Soare, *EULAR Textbook on Systemic Sclerosis* 2013)

CTGF, растежен фактор на съединителната тъкан; ECM, extracellular matrix; ET-1, endothelin-1; PDGF, platelet-derived growth factor; α-SMA, α-smooth muscle actin;

2.4.2 Какво определя SSc като аутоимунно заболяване?

Над 95% от пациентите със SSc имат положителни аутоантитела (ААт), насочени срещу ядрени антигени, белег за аутоимунитет (Steen 2005). Освен това, някои от ААт, открити при пациенти със SSc, са специфични за заболяването и се свързват с определена форма на SSc. Така например, в голяма част от случаите ACA се асоциират с lcSSc (Chan et al. 1994). От друга страна, АТА най-често се откриват при пациенти с dcSSc (Spencer-Green et al. 1997). Наблюдава се корелация между някои ААт, характерни за SSc и определени клинични прояви. Пациенти, положителни за анти-Th/To ААт, имат по-лоша прогноза, в сравнение с болните, положителни за ACA, поради високата честота на асоциирани със SSc ПАХ, ИББ и SRC (Mitri et al. 2003). ААт срещу фибрилари (анти-U3 RNP ААт) преобладават при склеродермни пациенти с мускулно засягане (Tormey et al. 2001). Доказаните до момента клинични и серологични корелации предполагат причинно-следствена връзка между специфичния аутоимунен отговор и фенотипните прояви на заболяването.

В кожните лезии при ранна SSc се открива възпаление, характеризиращо се с периваскуларен, мононуклеарен клетъчен инфилтрат, съставен основно от активирани тъканни макрофаги и Т-клетки, с придружаващ периваскуларен едем и различна степен на изразеност на фиброзата в папиларния и ретикуларния слой на дермата. Т-клетките в кожния инфилтрат притежават олигоклонални Т-клетъчни рецептори (TCR), което предполага аутоантигенна клонална експанзия. Клетъчният инфилтрат корелира със степента на кожното уплътнение,

което повдига въпроса за евентуалната връзка между възпаление и фиброза (*Fleischmajer 1977*). Фибробластите, намиращи се в съседство с възпалителния инфилтрат, демонстрират увеличена синтетична активност, което предполага, че медиатори, секретирани от Т-клетките, могат да усилят отлагането на колаген от фибробластите. До момента има разнопосочни данни, относно конкретния антиген-специфичен репертоар на TCR при SSc (*Yurovsky 1995, Tiev et al. 2005, Pap et al. 2011, Farge et al. 2017*). В търсенето му са създадени няколко модела на клетъчно култивиране. Така например, Т-клетъчният репертоар е изследван чрез анализ на полинуклеотидните последователности, кодиращи TCR, в материал от кожни биопсии и в периферна кръв на пациенти със SSc, като промени в репертоара на TCR са намерени единствено в биопсичните проби. Авторите разширяват изследването като ко-култивират автоложни фибробласти с периферни мононуклеарни клетки (*peripheral blood mononuclear cells, PBMC*) от пациентите със SSc, като проведените експерименти показват, че се наблюдава същата Т-клетъчна експанзия както в кожните лезии на пациентите, така и след ко-култивиране с фибробласти, но не и в периферната кръв. Авторите предполагат, че фибробластите тригерират специфична локална Т-клетъчна експанзия през ранната фаза от развитието на SSc (*De Palma et al. 2006*).

В подкрепа на автоимунната генеза на SSc могат да бъдат интерпретирани предварителните данни от контролирани проучвания и публикуваните резултати от неконтролирани проучвания, съобщаващи, че прилагането на агресивна имunosупресивна терапия, последвана от автоложна трансплантация на хемопоеични стволови клетки, намалява микросъдовото увреждане и удължава общата преживяемост при пациенти с дифузна SSc (*Vonk et al. 2008, Burt et al. 2011, Shouval et al. 2018*). Наличните към момента доказателства за автоимунната природа на SSc са обобщени в Таблица 5.

Таблица 5. Преки и индиректни доказателства в подкрепа на автоимунната природа на SSc

➤	Наличие на SSc - специфични ААт;
➤	Наличие на лимфоцитен инфилтрат, състоящ се от олигоклонални Т-клетки, характерен за ранните кожни лезии;
➤	Увеличен колагенов синтез от кожните фибробласти, в съседство с богатия на Т-клетки инфилтрат;
➤	Независимите скринингови проучвания, относно генните полиморфизми, асоцииращи се със SSc, предимно откриват генни варианти, свързани със системите на вродения и придобит имуноен отговор, включително полиморфизми на гени от главния комплекс на тъканната съвместимост (<i>human leucocyte antigens, HLA</i>);
➤	Повлияване на кожното уплътнение и микроваскуларните нарушения при част от пациентите със SSc, след приложение на интензивна имunosупресивна терапия, последвана от автоложна трансплантация на хемопоеични стволови клетки;

За изясняване на процесите на имунна дисрегулация, ендотелната дисфункция и фиброзата при SSc, съществен принос имат разработените животински модели на заболяването.

2.4.3. Животински модели на SSc

Phelps et al. 1993 съобщават, че пренос на имунокомпетентни клетки от класическия миши модел за SSc (tight skin, Tsk мишки) в мишки от див тип, води до индукция на кожна склероза и усилена транскрипция на колагенови гени - убедително доказателство за въвличането на имунните клетки във фибротичния процес. Нещо повече, генетична аблация на ICAM-1 при Tsk - модела на SSc води до едновременно редуция в броя на Т-клетките и в нивата на IL-6, както и до намаляване на фиброзата. Според *Huaux et al. 2003*, свръхекспресия на IL-5 при трансгенни мишки (IL-5(TG)) и при мишки с аденовирусен генен трансфер, увеличава бленитис (BLM) - индуцираната пулмонална фиброза и води до белодробна еозинофилия. Изненадващо, третирани с BLM IL-5 – дефицитни мишки (IL-5(-/-)) също развиват пулмонална фиброза, но със значителна Т-лимфоцитна инфилтрация и при липса на еозинофилия (*Huaux et al. 2003*). Въпреки тези различия и в двата миши модела се индуцира експресия на TGF- β в белодробната тъкан. Пречистени белодробни еозинофили от третирани с BLM (IL-5(TG)) мишки, стимулират експресията на алфа-актин и колаген (*Huaux et al. 2003*). Блокиране на Т-клетъчния инфлукс чрез анти-CD3 моноклонални антитела, предотвратява развитието на белодробна фиброза, което предполага, че Т-лимфоцитите играят ключова роля във фибротичния процес (*Huaux et al. 2003*). Авторите наблюдават също, че пулмоналната фиброза при (IL-5(TG)) мишия модел се асоциира преференциално с Th-2 цитокинен отговор с образуване на IL-4 и IL-13, докато фибротичните лезии при (IL-5(-/-)) мишките се характеризират с експресия на проинфламаторни цитокини (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ) (*Huaux et al. 2003*).

Wilson et al. 2010 съобщават, че BLM - и IL-1 β - медираната белодробна фиброза, при миши модели, е строго зависима от наличието на IL-17A и TGF- β .

Друг животински модел на SSc изследва значението на транскрипционния фактор STAT4, по отношение на фибротичния фенотип, в два различни миши модела на експериментална кожна склероза (*Avouac et al. 2011*). Скорошни проучвания предполагат, че STAT4 определя генетична предразположеност към SSc при налични други тригериращи фактори. *Avouac et al. 2011* изследват STAT4 - дефицитни мишки (STAT4(-/-)) и див тип мишки (STAT4(+/+)), инжектирани с BLM, по отношение на инфилтриращи Т-клетки, В-клетки и моноцити в кожните лезии на двете групи опитни животни. Също така, *Avouac et al. 2011* определят нивата на проинфламаторни и профибротични цитокини в серум и в кожни лезии на STAT4(-/-) и STAT4(+/+) мишките. Авторите съобщават за протективно действие на дефицита на STAT4, относно BLM-индуцираната кожна склероза, със значителна редуция в степента на кожно

уплътнение. Освен това, броят на Т-клетките в кожния инфилтрат на STAT4(-/-) модела е бил значително намален, също както и нивата на TNF- α , IL-2, IL-6 и IFN- γ в лезиите (Avouac *et al.* 2011).

Изследваните до момента животински модели на SSc потвърждават автоимунната природа на заболяването и дават ценни насоки за изясняване на имунопатогенетичните механизми, движещи болестния процес, както и за бъдещи възможности за ефективна терапия. Ако си представим патогенетичния процес като музикален оркестър, то Т хелперните лимфоцити влизат в ролята на диригент, В клетките - на “концертмайстори”, продуциращи ААт, а цитокините и останалите разтворими медиатори, влизат в ролята на “водачи” на ендотелните и фибробластни “оркестрови” групи.

2.4.4. Т-хелперните клетки (Th)

Т-хелперните клетки (Th) произлизат от CD3⁺CD4⁺ Т лимфоцитни прекурсори (Th0), които могат да се диференцират в няколко фенотипа – Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tregs в зависимост от цитокиновото обкръжение.

Th1-клетките преди всичко продуцират цитокини, въввлечени в клетъчния имунен отговор, като TNF- α , IL-2 и IFN- γ . Първоначалната среща с антиген-представяща клетка, в присъствието на IL-12 и/или IFN- γ , стимулира пролиферацията на наивните Т-лимфоцити, с последваща активация на STAT3, STAT4 и секреция на IL-17, който впоследствие индуцира главния транскрипционен фактор T-bet (O'Garra *et al.* 1997).

Th2 - групата цитокини, секретирани от Th-2 клетки, се състои от IL-4, IL-13, IL-5 и IL-10. Тези цитокини стимулират В-клетъчната пролиферация и диференциация (Mosmann *et al.* 1987, O'Garra *et al.* 1997). По време на Th-2 диференциацията, IL-4 активира STAT6, като по този начин ръководи организирането на главния регулаторен протеин GATA3 (trans-acting T-cell-specific transcription factor), което води до транскрипция на IL-4, IL-5 и IL-13. Превалирането на Th-2 имунния отговор може да бъде поддържано чрез позитивна обратна, автокринна връзка от IL-4, IL-13 и STAT6 активацията (Mosmann *et al.* 1986, Rengarajan *et al.* 2000).

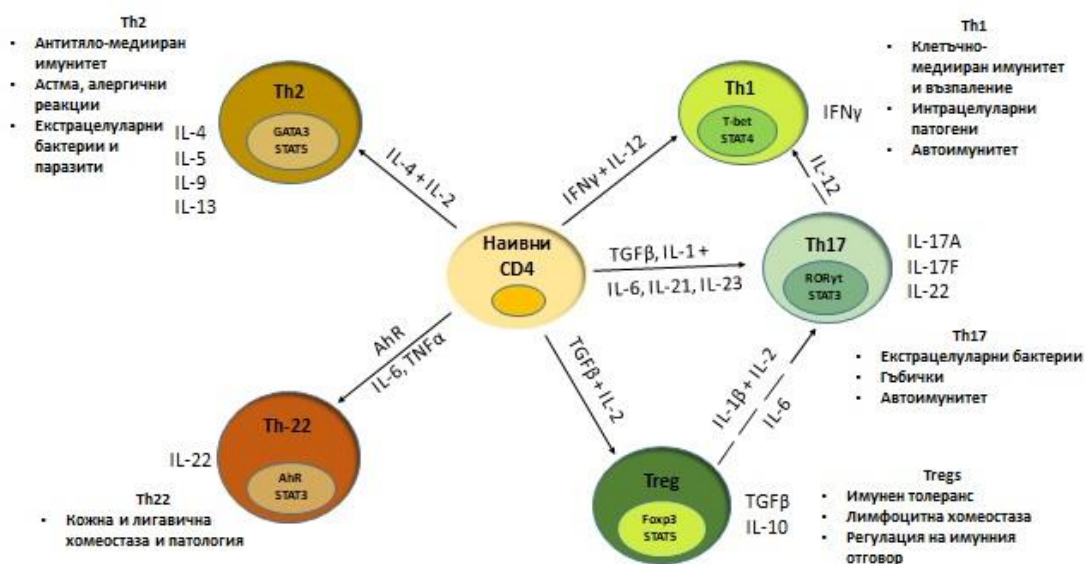
Th17 диференциацията и продукцията на IL-17 се стимулират от среща с антиген, в присъствието на проинфламаторните цитокини IL-1 и IL-6, в комбинация с TGF- β и IL-23 (Chung *et al.* 2009).

Tregs са имуносупресивна Т-клетъчна субпопулация, индуцирана от IL-2, в кооперация с TGF- β и IL-10, които конвертират наивните CD4⁺CD25⁻ Т клетки в CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs и

са отговорни за тяхната експанзия (Chen *et al.* 2003). Комбинацията IL-2/TGF- β е отговорна за установяването на имунологичен толеранс, като усилва експресията на транскрипционния фактор forkhead box protein P3 (Foxp3) (Zheng *et al.* 2007).

През последното десетилетие са открити нови Th субпопулации – Th9 (Goswami 2017) и Th22 (Eyerich *et al.* 2009), които преференциално продуцират IL-9 и IL-22 и, които също се спрягат в патогенезата на SSc (Truchetet *et al.* 2011, Ciccia *et al.* 2016, Guggino *et al.* 2017).

Всички тези Th клетки имат специфични функции, типични за определена субпопулация, както и транскрипционни фактори, и цитокини с критично значение по отношение на Т-клетъчната диференциация. Тези им характеристики отреждат определена роля на Th - клетките в различни патофизиологични процеси. Все още не е ясно дали различните Th - клетъчни субпопулации са израз на транзиторни състояния или представляват терминално-диференцирани клетки, особено по отношение на Th9, Th17, Th22 и Tregs. На Фигура 4 са представени известните към момента Th субпопулации и със стрелки с прекъснат контур са илюстрирани пътищата на преобразуване на една Th субпопулация в друга, там, където има потвърдителни данни в литературата. Този модел представя Th субпопулации по-скоро като „транзиторни Т клетъчни състояния“ (отколкото като крайно диференцирани Th клетки), които, в зависимост от цитокиновото обкръжение, могат да променят своя модел на цитокинова продукция и секреция, следователно и функцията си.



Фигура 4. Th субпопулации/транзиторни състояния; цитокини, необходими за диференциацията им от наивни CD4⁺ Т клетки; транскрипционни фактори; ключови интрацелуларни сигнални молекули и основни функции на отделните Th субпопулации. Фигурата е вдъхновена от Nicolò C. Brembilla, *EULAR Textbook on Systemic sclerosis* 2013

2.4.5. Th клетките в имунопатогенезата на SSc

Смята се, че Т-клетъчната цитокинова продукция повлиява функцията на фибробластите и ендотелните клетки, като по този начин играе централна роля в развитието на васкулопатията и фиброзата при SSc (*Raja et Denton 2015*).

Голяма част от проучванията, проведени при пациенти със SSc изследват характеристиките на Т-клетките, изолирани от периферна кръв. Въпреки това, следва да се отбележи, че невинаги Т-клетъчният отговор в периферната циркулация кореспондира с този в таргетните органи. Също така, трябва да се има предвид, че патологичните механизми, въввлечени във фибротичния процес при различните таргетни тъкани и органи не са идентични за отделните форми на SSc, като се наблюдават разлики между lcSSc и dcSSc. Промените в Т-клетъчния пул варират значително и през различните етапи от прогресията на SSc (*Chizzolini et al. 2011*). Налице е и функционална хетерогенност между Т-лимфоцитните субпопулации в периферната кръв на пациенти със SSc и в кожните лезии или засегнатите вътрешни органи.

Въпреки това, изследването на периферна венозна кръв от пациенти със SSc има и редица предимства - методът е достъпен, не е свързан с високорискови и скъпоструващи инструментални изследвания и манипулации. Освен това, предвид системната природа на заболяването и ключовото ангажиране на съдовия ендотел, промените в периферната циркулация отразяват в голяма степен еволюцията на патогенетичния процес при SSc.

2.4.5.1. Th2 поляризация при SSc

Хистологичното изследване на кожни биопсии при ранна SSc показва, че образуваия се възпалителен инфилтрат предшества процесите на фиброза и развитието на васкулопатията (*Prescott et al. 1992*). Интригуващ факт е, че синтезът на колаген, който се оценява чрез *in situ* локализирането на проколаген, изглежда по-засилен при фибробластите, в съседство с възпалителни клетки (*Kähäri et al. 1988, Scharffetter et al. 1988*). Авторите на тези проучвания издигат хипотезата, че възпалителните клетки, по-специално Т-клетките, осигуряват важни стимули за синтеза на колаген от фибробластите. В тази връзка, транскриптомен анализ при животински модели показва, че гените, участващи в процесите на заздравяване на рани и фиброза, са свързани предимно с Th2 - поляризиран отговор, отколкото с Th1 имунен отговор (*Hoffmann et al. 2001*). Th2 лимфоцитите произвеждат IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 и IL-13,

посредством което подпомагат хуморалния имунен отговор. До момента, в литературата има няколко съобщения за високи нива на Th2 цитокините IL-4 и IL-13 в серума на пациенти със SSc (*Sato et al. 2000, Higashi-Kuwata et al. 2009, Bellisai et al. 2011*). IL-4 играе ключова роля в поляризирането на имунния отговор в посока Th2, процес медиран чрез неговия рецептор и вътреклетъчни сигнални молекули, като STAT6. IL-4 не упражнява действието си самостоятелно, а в комбинация с IL-13, който също е необходим за осъществяването на адекватен Th2 имунен отговор. Th2 клетките осъществяват положителна обратна връзка, поддържаща Th2 - фенотипа и съответно секрецията на Th2 - тип фиброгенни цитокини. IL-4, IL-6 и IL-13 стимулират колагеновия синтез от човешки фибробласти (*Duncan et al. 1991, Wynn et al. 2004*). Освен това, тези Th2 цитокини усилват и продукцията на антитела от В клетките (*Hasegawa et al. 2005*).

За разлика от тях, Th1 цитокините, IFN- γ и TNF- α , потискат *in vitro* производството на колаген от фибробласти (*Wynn et al. 2004*). Следователно, относителното изместване на оста Th1/Th2 в полза на Th2 цитокините може да индуцира тъканна фиброза и производство на ААт.

2.4.5.2. Th1 / Th2 парадигмата при SSc

Редица проучвания съобщават за завишени серумни нива на Th2 цитокините IL-4, IL-6, IL-10 и IL-13 при пациенти със SSc (*White 1994, Hasegawa et al. 1997, Hasegawa 1999*). В допълнение, PBMC, изолирани от пациенти със SSc, демонстрират *in vitro* повишена продукция на IL-6 (*Hasegawa et al. 1999*). Също така, CD4⁺ Т клетъчни клонове, изолирани от кожни биопсии на пациенти със SSc демонстрират Th2 цитокинов профил (*Mavalala et al. 1997*). Класическите Th2 цитокини включват IL-4, IL-5 и IL-13.

IL-4 е мултифункционален цитокин, секретран от активирани Th2 клетки. IL-4 стимулира хуморалния имунен отговор, индуцирайки имуноглобулиновата продукция и изотипното превключване на В клетките, както и взема участие в диференциацията на наивни CD4⁺ Т клетки в Th2 лимфоцити (*Kopf et al. 1993*). Установено е, че Т клетъчното изчерпване, вследствие на третирането с анти-CD3 моноклонално антитяло при BLM - индуцирания миши модел на SSc, намалява фиброзата и заедно с това води до редукция в нивата на IL-4 (*Sharma et al. 1996*). Повишени нива на IL-4 се откриват в засегнатите тъкани на пациенти със SSc (*Salmon-Ehr 1996*). Директното стимулиране на човешки фибробласти с IL-4 води до значимо повишена експресия на колаген и фибронектин, като се има предвид, че фибробластите при SSc са по-чувствителни към такава индукция (*Postlethwaite et al. 1992*). При Tsk мишия модел на SSc,

терапията с антитела срещу IL-4 предотвратява индукцията на кожната фиброза (*Ong et al. 2003*). Освен това, при BLM-индуцирания модел на SSc, делеция в гена за IL-4 намалява фиброзата и производството на фибробластен колаген, в сравнение с див тип мишки (*Huau et al. 2003*).

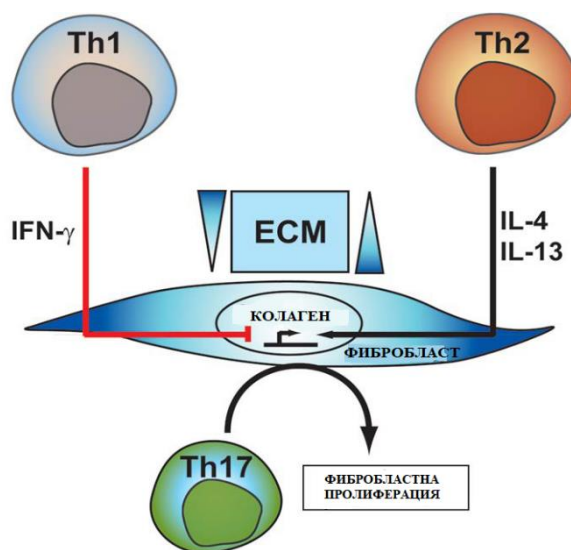
IL-13 е цитокин с имунорегулаторни функции, който се произвежда предимно от активирани Th2 клетки. IL-13 и IL-4 споделят обща IL-4 рецепторна α -верига и участват в клетъчния сигналинг посредством STAT6 (*Aversa et al. 1993*). Поради тази причина, IL-13 има сходна, макар и неидентична функционална активност, с тази на IL-4 (*Fallon et al. 2000*). Така например, IL-4 е важен за поляризирането на наивните CD4⁺ Т клетки, докато IL-13 не е необходим за този процес. Въпреки това, при модел на чернодробна фиброза е установено, че IL-13 има директен профибротичен ефект, като делеция в гена за IL-13 се асоциира с намалена способност за отлагане на колаген. IL-13 е необходим и за развитието на кожната фиброза, медирана от IL-33, като делеция в гена за IL-13, но не и в гена за IL-4, предотвратява IL-33 - медираната фиброза и отлагането на колаген и процесът е независим от експресията на TGF- β (*Rankin et al. 2010*). Плазмените нива на IFN- γ и продукцията на IFN- γ от PBMC са значително намалени при пациенти със SSc, в сравнение със здрави лица (*Kantor et al. 1992, Needleman et al. 1993*). Обобщено, цитокиновият „баланс“ при SSc по-скоро клони към Th2, а не към Th1 имунен отговор.

Въпреки натрупаните научни данни в подкрепа на горната хипотеза, някои резултати посочват, че се наблюдава силно изместване в посока към Th1-цитокينوва секреция от CD8⁺ Т клетки в периферната кръв на пациенти със SSc (*Fujii et al. 2002*), като наред с това има данни за увеличен брой IFN- γ позитивни Т клетки при такива пациенти (*Valentini et al. 2001*). Според други проучвания, увеличените серумни нива на IL-12 при пациенти със SSc могат да се свържат с активацията на Th1-клетките и с бъбречно съдово увреждане (*Sato et al. 2000*). Следователно, съществува вероятност Th1 имунният отговор, в допълнение към Th2 цитокините, също да играе роля в имунопатогенезата на SSc (фиг. 2).

2.4.5.3. Роля на Th17 клетките

Th17-клетките осигуряват масивен проинфламаторен отговор срещу патогени. Множество проучвания съобщават, че Th17 цитокините са въввлечени в патогенезата на автоимунни заболявания като астма, РА, мултипленна склероза, псориазис, graft versus host disease (GVHD) (*Afzali et al. 2007, Waite et Skokos 2012*).

IL-17 стимулира продукцията на проинфламаторни цитокини като IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α от стромалните клетки (Fossiez 1996). IL-17 е индуктор на ICAM-1 и VCAM-1-повърхностната експресия от ендотелните клетки и стимулатор на фибробластната пролиферация. Kurasawa *et al.* 2000 съобщават за свръхпродукция на IL-17 от Т-клетките, изолирани от периферна кръв, кожни и белодробни лезии при склеродермни пациенти. Счита се, че увеличената секреция на IL-17 играе ключова роля в патогенезата на SSc, особено в ранните стадии, като усилва продукцията на IL-1 и експресията на адхезивни молекули върху ендотелните клетки (фиг. 5).



Фигура 5. Схематично представяне на ефекта, упражняван от Th1, Th2 и Th17 върху продукцията на колаген тип I, пролиферацията и фиброзата при SSc (по Nicolò C. Brembilla, *EULAR Textbook on Systemic Sclerosis* 2013)

IL-21, който се секретира основно от Th17, Th2 и NK-клетки, усилва Th17-проинфламаторния отговор като амплифицира експресията на рецептора за IL-23 и инхибира Tregs (Wei *et al.* 2007). Th-клетките, намиращи се в процес на диференциация, под действието на IL-21, инхибират специфично секрецията на IFN- γ , но не и на други Th1-цитокени (като IL-2 и TNF- α).

Th17-диференциацията се благоприятства от IL-23, в кооперация с IL-6 и TGF- β , посредством увеличена продукция на IL-22. Кодираният ген за IL-23-рецептора наскоро бе докладван като определящ генетична предразположеност за развитие на SSc (Agarwal *et Reveille* 2009). Agarwal *et Reveille* 2010 съобщават, че полиморфизмите на IL-23-рецептора се асоциират с положителни АТА и с по-ниска честота на ПАХ при пациенти със SSc. Radstake¹ *et al.* 2009 демонстрират повишена експресия на IL-23-рецептора от CD4⁺, CD45Ro⁺ и CD45Ra⁺ клетките при изследваните пациенти, което се асоциира и с последваща увеличена експресия на IL-17. Същата група прави опит да разграничи фенотипно lcSSc от dcSSc, посредством флуоцитометричен анализ на CD3⁺CD4⁺ Т клетки за повърхностна експресия на CD4, CD8,

CD25, CD45Ro, CD45Ra, IL-23, GITR, CD69, както и за интрацелуларна експресия на IL-17, IFN- γ и TGF- β (Radstake¹ et al. 2009). Получените резултати показват, че пациентите със SSc имат висок процент активирани CD4⁺ Т клетки, като в допълнение, авторите намират, че CD45Ro и CD45Ra клетките са високо-експресиращи по отношение на IL-23-рецептора, което от своя страна е свързано с повишена експресия на IL-17A (Radstake¹ et al. 2009). Radstake¹ et al. 2009 намират също намалена интрацелуларна експресия на IFN- γ и TGF- β при пациентите с dcSSc, спрямо lcSSc.

Въпреки убедително доказаната от редица проучвания проинфламаторна природа на Th17 - имунния отговор, скорошно изследване на Th17 паметова клетъчна линия, въздействаща върху епителните клетки и кератиноцитите, и свързана с поддържането на кожната хомеостаза, хвърля светлина върху функционалната хетерогенност на клетъчните клонове, включени в Th17 клетъчната субпопулация (Duhon et al. 2009). Описаните клетки експресират хемокиновите рецептори CCR10, CCR6 и CCR4 и секретират IL-22, но не и IL-17 и IFN- γ . Клонове, изолирани от клетъчната популация, секретират преобладаващо IL-22, демонстрират ниска до липсваща експресия на Th17 и Th1 - транскрипционните фактори ROR γ t и T-bet (Duhon et al. 2009). Тепърва предстои да се установи ролята на тази клетъчна линия в патофизиологичния механизъм на кожната склероза.

2.4.5.4. Промени в Tregs

Натрупват се все повече данни за функционални и количествени промени в Tregs при SSc. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Т-клетки продуцират антиинфламаторни цитокини като TGF- β и IL-10. Tregs имат критично значение за установяването на имунологичен толеранс. Понижаване броя на тези клетки не само създава условия за възникване на автоимунитет, но и усилва отговора към чужди антигени. Промени в броя и функцията на Tregs се съобщават при РА и при СЛЕ (Nistala et Wedderburn 2009). При SSc са описани високи нива на TNF- α , което би могло да доведе до потискане супресивната способност на Tregs. Този ефект на TNF- α се медира посредством свързването му с рецептора TNF-R2, като блокирането на TNF- α с моноклонално хуманизирано мише IgG1 антитяло (Infliximab) възстановява супресорната активност на Tregs (Valencia 2006). Klein et al. 2010 не откриват промени в абсолютния брой на Tregs в периферна кръв от пациенти със SSc, в сравнение със здрави контроли, но получените резултати в циркулацията не кореспондират с наблюдаваните промени в кожни биопсии на същите пациенти, където Tregs са значително понижени.

Проучванията, изследващи броя и функцията на Tregs при SSc, дават противоречиви резултати. *Slobodin et al. 2010* съобщават за значителна експанзия на Tregs (достигаща до 34% от пула на Т хелперните клетки) в периферна кръв от пациенти със SSc, която корелира положително както с индекса на активност на SSc (Valentini Disease Activity Index), така и с тежестта на клиничната изява (измерена според Medsger Disease Severity Scale). Авторите обаче не откриват функционални промени в изследваните Tregs, въпреки повишения им абсолютен брой и процент в циркулацията. *Radstake² et al. 2009* също съобщават за увеличен брой Tregs в периферна кръв на пациенти със SSc, но за разлика от *Slobodin et al. 2010*, откриват компрометирана функционална активност на Tregs, свързана с понижена експресия на CD69 и TGF- β .

2.4.6. Циркулиращ цитокинов профил в периферната циркулация

Множество автори съобщават за увеличени нива на циркулиращите цитокини при SSc, както от Th1-тип (IFN- γ , TNF- α , IL-1 α , IL-2, CXCL10), така и от Th2-тип (IL-4, IL-10, IL-13, MCP-1), в сравнение със здрави контроли (*Hasegawa et al. 1997, Sato et al. 2000, Baraut et al. 2012*). *Scala et al. 2004* откриват корелация между серумните нива на IL-6, IL-8, IL-10, B-cell activating factor (BAFF), monocyte chemoattractant chemokine (MCP)-1, sCD30 и тежестта на кожната склероза, като получените стойности са по-високи при пациенти с dcSSc, в сравнение с тези с lcSSc. Според друго проучване, повишените нива на цитокините IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IFN- α в течност от бронхо-алвеоларен лаваж или в кондензирана проба издишан въздух, корелират с тежестта на ИББ при пациенти със SSc (*Matsushita et al. 2007*). При ранна SSc, серумните нива на TGF- β са открити повишени и е установена корелация между ко-експресията му с IL-17 и с IFN- γ и прогресията на заболяването (*Radstake¹ et al. 2009*). Две други проучвания откриват корелация между изявата на ИББ при SSc и повишените нива на IL-6, MCP-1, IL-15, ET-1, а proliferation-inducing ligand (APRIL) (*Matsushita et al. 2007*), както и с увеличени стойности на blood TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) в периферна кръв от пациенти със SSc (*Yanaba et al. 2009*).

2.4.7. Цитокиновият профил *in situ*

In situ експресията на TGF- β е важен маркер за кожно и белодробно засягане в ранните стадии от развитието на SSc и впоследствие корелира с тежестта на фиброзата. Експресията на

connective tissue growth factor (CTGF) и PDGF в кожния инфилтрат на пациенти със SSc може да допринесе за индукцията на колагенова свръхпродукция. Локалната кожна хипоксия при SSc, измерена чрез поларографична кислородна микроелектродна система, е свързана с повишени нива на VEGF. *In situ* експресията на IL-4, IL-17 and MCP-1 е тясно обвързана с тежестта на кожна и белодробна фиброза при SSc (Baraut et al. 2012).

Някои проучвания съобщават за увеличена *in situ* експресия на IL-17, IL-21, IL-33 mRNA и IFN- α в кожните лезии на пациенти със SSc, в сравнение със здрави контроли (Varga et Abraham 2007). Освен това, BAFF също е увеличен в кожния инфилтрат на пациенти с ранна дифузна SSc, което потвърждава участието на В-клетките в патогенезата на заболяването (Varga et Abraham 2007). Ролята на BAFF се свързва с предпазването на някои автореактивни В-клетъчни клонове от апоптоза чрез увеличаване на експресията на B-cell lymphoma (Bcl-2), както и чрез активирането на nuclear factor kappa-B (NF- κ B) (Varga et Abraham 2007).

2.5. Роля на автоантителата (AAt) при SSc

Установено е, че при SSc се индуцира както клетъчен, така и хуморален автоимунен отговор (Varga et Lafyatis 2015). Към момента обаче остава недоизяснена точната роля на ААт в патогенезата на SSc. Някои автори изразяват хипотезата, че отключеният автоимунен отговор и синтезираните ААт са само епифеномен на болестния процес (Ho et Reveille 2003). Други автори разделят ААт, откриващи се при SSc, на две групи. В първата група се включват ААт, за които е установено, че имат пряка патогенетична роля, вземайки участие в процеса на тъканното увреждане при SSc (Varga et Lafyatis 2015, Kayser et Fritzler 2015). Такива са анти-фибробластните ААт, анти-фибрилин-1 ААт, анти-матриксна металопротеиназа (MMP)-1 и -3 ААт, анти-PDGFR ААт (рецептор на тромбоцит-свързания растежен фактор), анти-ангиотензин-II тип 1-рецептор (AT1R) ААт и анти-ендотелин-1 тип А-рецептор (ET_AR) ААт (табл. 6).

Таблица 6. Патогенетични ААт при SSc (*no Kayser et Fritzler 2015*)

	Честота (%) при SSc	Патогенетична роля
Анти-фибробластни ААт	26 - 58	Индукцират <i>in vitro</i> фибробластната активация
Анти-фибрилин-1 ААт	> 50	Активират <i>in vitro</i> фибробластите Стимулират освобождаването на TGF- β 1 в ECM
Анти-матриксна металопротеиназа (MMP)-1 и -3 ААт	49 - 52	Инхибират колагеназната активност на MMP Редуцират реорганизацията на ECM
Анти-ендотелно-клетъчни ААт (AECA)	44 - 84	Активират <i>in vitro</i> ендотелно-клетъчната апоптоза
Анти-PDGFR ААт	33 - 100	Активират рецептора за PDGF Стимулират продукцията на ROS и колаген Превръщат фибробластите в активирани миофибробласти
AT1R и ETAR ААт	82 - 83	Стимулират фибробластната продукция на ROS и колаген

ECM – екстрацелуларен матрикс, AT1R - анти-ангиотензин-II тип I-рецептор, ETAR - анти-ендотелин-I тип A-рецептор, PDGFR - рецептор на тромбоцит-свързания растежен фактор, ROS – reactive oxygen species;

2.5.1. Патогенетични ААт при SSc

Анти-фибробластните ААт се откриват при до 58% от пациентите със SSc и индуцират *in vitro* фибробластна активация (*Chizzolini et al. 2002*). Според друго проучване, фибробластите, стимулирани с анти-фибробластни ААт, демонстрират увеличена способност за разграждане на колагеновия матрикс и продукция на MMP-1, докато производството на колаген тип I и на тъканния инхибитор на MMP-1 (TIMP-1) остават непроменени (*Fineschi et al. 2007*).

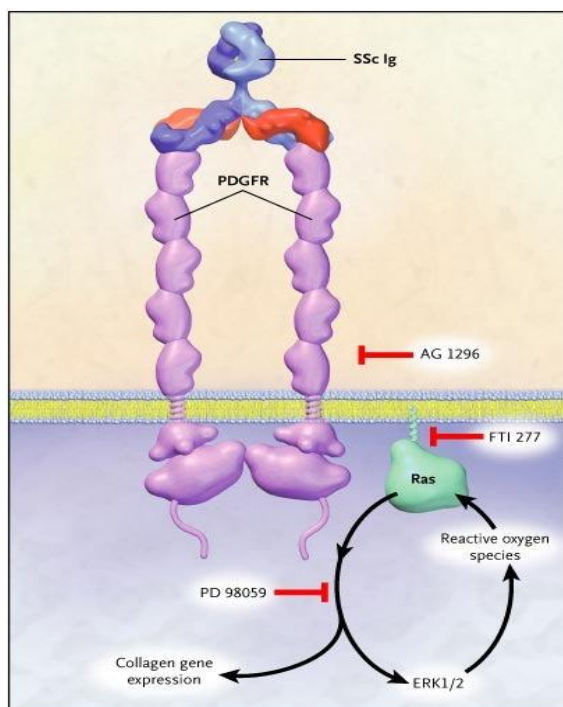
Анти-фибрилин-1 ААт са докладвани при над 50% от пациентите със SSc. Те активират фибробластите и стимулират освобождаването на TGF- β (*Abraham et al. 2006*). *Gabrielli et al. 2007* изследват анти-фибрилин-1 ААт *in vitro* и намират, че те активират нормалните фибробласти, в резултат на което се увеличава продукцията на колаген и други екстрацелуларно-матриксни (extracellular matrix, ECM) компоненти, които характерно са свръхекспресирани от фибробластите на пациенти със SSc. Неутрализирането на TGF- β от анти-TGF- β антитела сигнификантно намалява фибробластната активация, индуцирана от анти-фибрилин-1 ААт. Въпреки това, според *Brinckmann et al. 2005* все още патогенетичната роля на

анти-фибрилин-1 ААт е дискутабилна, след като авторите изследват ААт срещу неправилно нагънат фибрилин-1, но не ги откриват в серума на пациенти със SSc.

Анти-матриксна металопротеиназа (MMP)-1 и -3 ААт са докладвани при пациенти със SSc, като се смята, че са специфични за SSc ААт и предотвратяват разграждането на ексцесивно натрупаните колаген и други компоненти на ECM (*Gabrielli et al. 2007* и *Abraham et al. 2009*).

Анти-ендотелно-клетъчните ААт (AECA) се срещат при 44-84% от пациентите със SSc и се асоциират с тежки васкулитни прояви (*Gabrielli et al. 2007*). Съобщава се, че AECA при SSc индуцират *in vitro* активация и апоптоза на ендотелните клетки и задействат каспаза-3 - зависимия апоптотичен път, както при пациенти с позитивни АТА в серума, така и при АСА - положителните болни (*Ahmed et al. 2006*). Освен това, повишена генна експресия на фибрилин-1 се наблюдава в човешки дермални ендотелни клетки, стимулирани със серуми от пациенти със SSc. Имунохистохимичните изследвания на човешки дермални ендотелни клетки, направени от *Ahmed et al. 2006* също така демонстрират аберантна експресия на фибрилин-1 в апоптотични ендотелни клетки, третирани със серуми от пациенти със SSc, съдържащи AECA.

Анти-PDGFR ААт са насочени срещу рецептора на тромбоцит-свързания растежен фактор (Platelet Derived Growth Factor Receptor, PDGFR). Взаимодействието между анти-PDGFR ААт и рецептора за тромбоцитния растежен фактор задейства сигнална каскада, което води до повишен синтез и отлагане на колаген в тъканите и органите, които са в основата на патогенетичния процес при SSc (*Baroni et al. 2006, Hamaguchi et al. 2010*). ААт, насочени срещу PDGF могат да индуцират освобождаването на реактивни кислородни радикали (Reactive oxygen species, ROS) и да активират Ras-ERK1/2 сигналния път (*Baroni et al. 2006, Sundaresen et al. 1995*). Известно е, че IgG, изолиран от пациенти със SSc реагира с човешки фибробласти *in vitro* (*Chizzolini et al. 2002*). Правени са експерименти, при които са търсени Ha-Ras, ERK1/2 и ROS - стимулаторни молекули в серума на пациенти със SSc, в опит за доказване на хипотезата, че серумът на болните съдържа ААт насочени срещу рецептора за PDGF (PDGFR). Авторите доказват наличието на анти-PDGFR ААт, които действат агонистично в посока активация на Ha-Ras и ERK1/2 сигналните пътища чрез активиране на PDGFR (*Baroni et al. 2006*). Смята се, че тази каскада е отговорна основно за фибробластната активация, която е от ключово значение за патогенезата на SSc (фиг. 6).



Фигура 6. Анти-PDGFR ААт активират PDGFR, което стабилизира Ras и води до индукция на ERK1/2. Индуцирането на ERK1/2 увеличава нивата на реактивните свободни радикали (ROS). Дълго живеещите ROS и ERK1/2 като краен резултат водят до стимулация на гените, отговорни за колагеновата експресия (адаптирана по *Baroni et al. 2006*)

Анти-AT₁R и ET_AR ААт се откриват при 82-83% от серумите на пациенти със SSc и се асоциират с ИББ, ПАХ и с по-висока смъртност (*Riemekasten et al. 2011*). Анти-AT₁R и анти-ET_AR ААт се свързват специфично със съответните им рецептори върху ендотелните клетки и индуцират екстрацелуларно сигнално-

регулирано, киназа-зависимо фосфорилиране, както и увеличават експресията на гена за TGF- β в ендотелните клетки, което предполага възможното им участие в задействане на фиброзата при SSc (*Riemekasten et al. 2011*). *Kill et al. 2014* съобщават за активация на човешки микроваскуларни ендотелни клетки (HMEC-1), индуцирана от анти-AT₁R и анти-ET_AR ААт - положителни IgG, изолирани от SSc серуми (SSc-IgG). Нивата на mRNA на провъзпалителния цитокин IL-8 и на VCAM-1 са били повишени в HMEC-1 след култивирането им с анти-AT₁R и анти-ET_AR ААт - положителни SSc-IgG. Експозицията на HMEC-1 на SSc-IgG увеличава неутрофилната миграция, посредством ендотелните клетки и активация на ROS. Човешките фибробласти демонстрират повишена експресия на тип I колаген след култивирането им с анти-AT₁R и анти-ET_AR ААт - положителни SSc-IgG. Също така, *Kill et al. 2014* откриват повишен неутрофилен брой в смив от бронхоалвеоларен лаваж и структурни промени в белодробния паренхим на наивни мишки след третирането им с анти-AT₁R и анти-ET_AR ААт - положителни SSc-IgG.

2.5.2. Антинуклеарни автоантитела (АНА) при SSc

Другата група ААт при SSc включва ААт, насочени срещу различни ядрени (нуклеарни) 3 структури: Scl-70; CENP; RNA polymerase I; RNA polymerase III; нуклеоларни протеини - U3RNP, Th/To. Всяко едно от тези ААт се асоциира със специфичен клиничен фенотип,

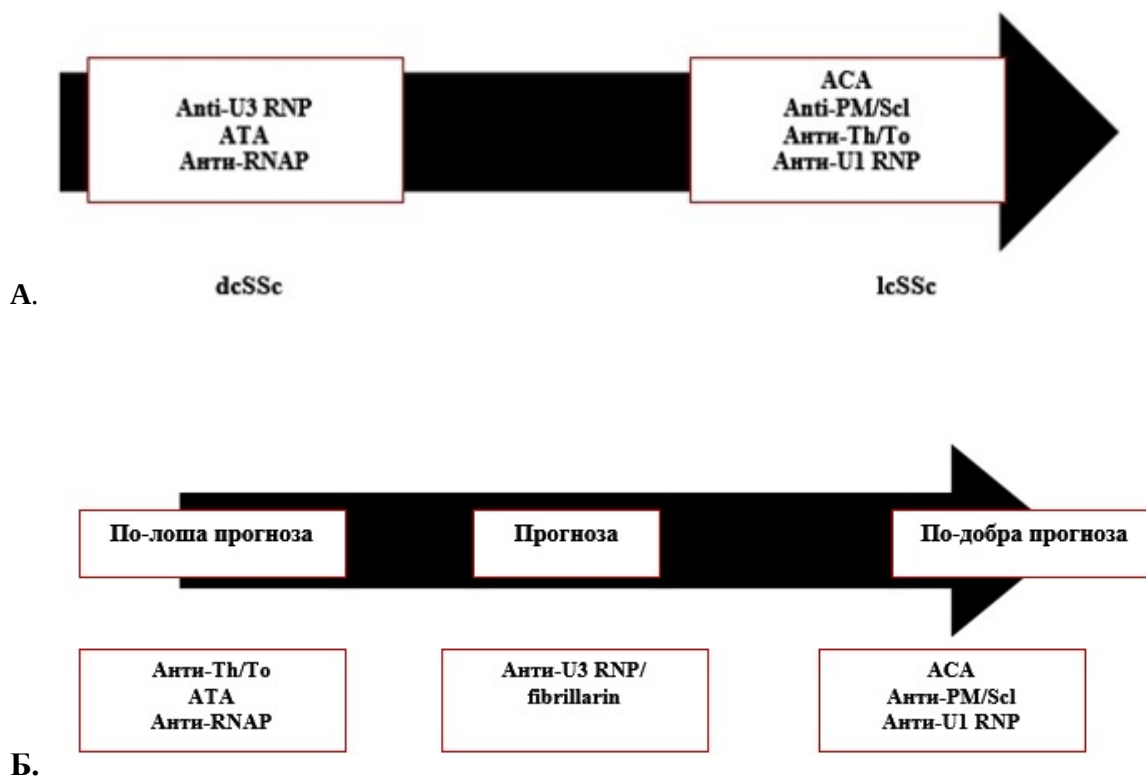
характеризиращ се с определени органни прояви (*Nihtyanova et Denton 2010*). Ролята на тези ААт в патогенетичния процес обаче не е изяснена (*Steen 2005, Kuwana 2017, Ma et al. 2017*).

От диагностична гледна точка, наличието на циркулиращи АНА е важна характеристика на имунологичните промени в хода на SSc. АНА се откриват при 90-95% от пациентите, като прицелните им молекули са жизненоважни за протиченето на процесите на транскрипция, сплайсинг и клетъчно деление (*Steen 2005, Mehra et al. 2013*). Всяко едно от тези АНА се асоциира със специфичен клиничен фенотип, характеризиращ се с определени органни прояви (табл. 7).

Таблица 7. Честота на SSc-асоциираните АНА и съответните им клинични асоциации (*no Nihtyanova et Denton 2010*)

ААт	Честота (%)	Клинични асоциации
АСА	16-39%	lcSSc ПАХ без ИББ протективна роля за SRC и ИББ
АТА	9-39%	dcSSc > lcSSc; ИББ Изразена дигитална васкулопатия
Анти-RNAP ААт	4-25%	dcSSc; SRC
Анти-Th/To ААт	1-7%	lcSSc; ИББ ПАХ
Анти-U3 RNP Аат	1-6%	dcSSc > lcSSc; мускулно засягане (миозит/миопатия) ПАХ
Анти-PM/Scl ААт	0-6%	Припокриващ синдром с миозит Артрит ИББ
Анти-Ku ААт	1-3%	Мускулно и ставно ангажиране
Анти-U1RNP ААт	5-35%	Припокриващи синдроми
Анти-U11/U12RNP ААт	1.6-5%	ИББ

АНА при SSc са важен имунологичен маркер при поставяне на диагнозата, заедно с клиничната картина, резултатите от капиляроскопията и от кожната биопсия. SSc-асоциираните АНА имат предиктивна стойност по отношение степента на кожно засягане (фиг. 7А), вида на органните поражения и изхода от болестта (фиг. 7Б) (*Nihtyanova et Denton 2010*).



**Фигура 7. А. Връзка между типа кожно ангажиране и различните ААт при SSc
Б. Прогноза и SSc-асоциирани ААт (адаптирани по Ho et al. 2003)**

Установено е, че АНА при SSc се позитивират дълго време преди развитието на клиничните симптоми (Ho et al. 2003). При малък процент от пациентите със SSc, АНА се негативират в хода на имунологичното проследяване, което се свързва с по-благоприятна прогноза (Kuwana et al. 2000). SSc-специфични АНА рядко се наблюдават при други СЗСТ и са още по-рядко срещани при неимуномедиранни заболявания или при здрави индивиди. Тези АНА обикновено се откриват за първи път още в началото на SSc и вида им рядко се променя в хода на заболяването (Steen 2005).

Основните АНА, използвани в модерната имунологична диагностика на SSc, са съответно: ACA, ATA, анти-RNAP III ААт; антинуклеоларните ААт (ANoA), включващи ААт срещу таргетните антигени: PM/Scl-75, PM/Scl-100, Th/To, B23/nucleophosmin, nucleolin, Nop52/SC6, U3-snoRNP(U3 RNP)/fibrillarin, RNAP I, huBF/NOR-90; анти-Ku ААт.

Така описаните SSc-специфични АНА могат да се разделят на две основни групи спрямо степента на кожно ангажиране: АНА, характерни за dcSSc и АНА, характерни за lcSSc (фиг. 7А), т.е. при болните със SSc освен клинична, може да бъде направена и имунологична класификация (Ho et al. 2003).

Липсата на АНА в серума на пациентите не изключва диагнозата SSc. Малка част от болните (5-9%) са АНА - отрицателни и обикновено се характеризират с отличителен клиничен фенотип, като по-често засегнати са мъжете. При тези пациенти се наблюдава по-леко изразена васкулопатия, но по-често се изявява тънкочревна засягане и прогнозата е неблагоприятна (*Salazar et al. 2015*).

2.5.3. Диагностични методи за изследване на SSc-асоциирани АНА

SSc-асоциираните АНА могат да бъдат изследвани в рутинната практика посредством 4 основни лабораторни метода: скринингово изследване за определяне на АНА посредством индиректна имунофлуоресценция (ИИФ) на HEp-2 клетъчна линия, ензимно-свързан имунсорбентен тест (ELISA) и имунодифузия (ID) за тестиране наличието на отделните SSc-асоциирани АНА; и имуноблот (IB) техника за изследване на панел от SSc-асоциирани АНА.

Изследването за АНА е широко използван скринингов метод при пациенти със СЗСТ, а методът ИИФ се е наложил като златен стандарт за определянето им. Това е и методът на избор за установяване на АНА според критериите на ACR/EULAR за множество СЗСТ, включително СЛЕ, синдром на Sjogren, SSc, смесена съединително-тъканна болест (ССТБ) (*Damoiseaux et al. 2019*). Понятието АНА е исторически термин, използван повече от 50 години. В зората на 70-те години на XX век използването на тъкани от гризачи като субстрат за АНА скрининг е постепенно изместено от обезсмъртената HEp-2 туморна, епителна клетъчна линия. Предимствата на HEp-2 клетъчната линия са много, защото тя е достатъчно стабилна, за да осигури еднородност и универсалност на субстрата при определяне на АНА (*Chan et al. 2015*). Освен за диагностика на класическите ядрени светения, използването на HEp-2 клетките дава възможност за установяване и на специфични типове цитоплазмени и митотични светения. Употребата на АНА като акроним обаче е така дълбоко утвърдено и навлязло в лабораторната и клиничната практика, че замяната му с алтернативна терминология (поради наличието на разпознаваеми, специфични цитоплазмени и митотични светения на HEp-2 субстрата) би представлявало същинско предизвикателство, а според повечето специалисти в областта, не това е същинския акцент при определянето на АНА.

Изследването на АНА чрез ИИФ върху HEp-2 клетки днес е всеобщо приет и унифициран стандарт сред световната имунологична общност. То е неделима част от АНА скрининга на системните и орган-специфичните автоимунни възпалителни заболявания. HEp-2 (CCL-23 from American Type Culture Collection) е акроним от Human epethelioma type 2 cells. Тя е обезсмъртена

клетъчна линия, която води началото си от туморна клетъчна популация, получена от човешки ларингеален карцином. През последните две десетилетия HEp-2 клетъчната линия недвусмислено се наложи като най-подходящ субстрат за АНА скрининг в рутинната практика, което се дължи на нейните безспорни предимства.

Предимства на HEp-2 клетъчната линия спрямо животински тъканни криосрезове за нуждите на ИИФ:

- Човешкият произход на HEp-2 клетъчната линия осигурява по-голяма специфичност в сравнение с животинските тъкани.
- На HEp-2 клетъчен субстрат се установяват над 200 различни АНА, както и по-голям брой специфични светения поради правилното разпределение на антигените в клетките от дадена фаза на дележния цикъл.
- HEp-2 клетъчният субстрат е монослоен, което прави всички ядра видими, без цитоплазмено припокриване (засенчване).
- Ядрата на HEp-2 клетките са по-големи от стандартните, с добре изразени вътреядрени структури, цитоплазмата е в добро съотношение спрямо ядрото, което прави флуоресцентния образ по-детайлен, с оптимална видимост на отделните органели.
- HEp-2 имат сравнително къс период на самовъзпроизвеждане, поради което в монослоя присъстват клетки в различни фази на клетъчния цикъл.
- Синхронизирането на съвременните HEp-2 тестове предоставя допълнителен брой митози на зрително поле.

Постигането на хармонизиране и стандартизиране на техниката и субстрата за АНА, типа имунофлуоресцентен образ, както и на моделите, илюстриращи даването и коментирането на АНА резултати от съответната имунологична лаборатория се превръщат в основен приоритет на специалистите по света, работещи в областта на определянето на АНА чрез ИИФ. С тази цел бива създадена групата на Международният консенсус за АНА светения (International Consensus on ANA patterns, ICAP). Инициативата стартира през август 2000 г. с провеждането на първа по рода си работна среща в гр. Гояния, Бразилия, в резултат на което е публикуван Първият Бразилски консенсусен доклад за АНА светенията през 2001 г., последван от два други реализирани през 2003 г. и 2009 г.

Няколко други доклада с акцент върху номенклатурата на имунофлуоресцентните образи, получени върху HEp-2 клетъчен субстрат (сред които и Първият Аржентински консенсус за стандартизиране на АНА образите върху HEp-2 клетъчен субстрат), са реализирани в периода

1999 - 2012 г. и също са официално признати на Първата работна среща на ICAP, респективно цитирани в първия ICAP доклад (Chan et al. 2015).

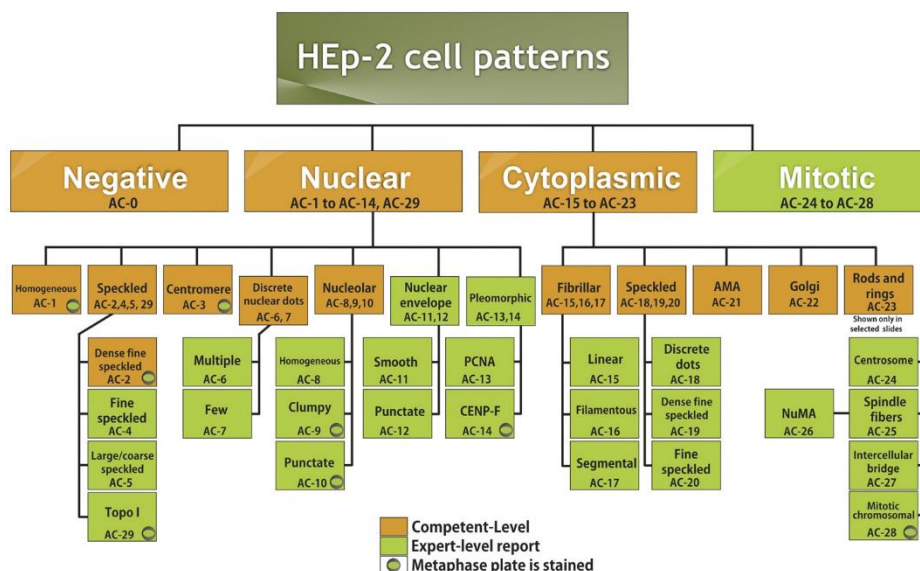
Всички тези първоначални доклади, публикувани в реферирани списания, служат като основа за осъществяване на идеята - Международен консенсус за АНА светения, който стартира като инициатива през август 2014 г. като част от Дванадесетата международна работна среща за автоантитела и аутоимунитет - Сао Паоло, Бразилия. Докладът от Първата работна среща на ICAP е публикуван в международното списание *Frontiers in immunology*. През следващите 3 години са организирани още 4 последователни работни срещи, довели до публикуването на 4 международни консенсусни доклада на ICAP (Chan et al. 2016, Herold et al. 2017, Herold et al. 2018, Andrade et al. 2019).

Първият ICAP си поставя за цел да предостави платформа за популяризиране и унифициране на АНА имунофлуоресцентните образи и достигане на хармонизиран международен консенсус в близко бъдеще. Докладът от работната среща предоставя предварителна, работна номенклатура на светенията, класификационно дърво (базирано на Бразилския консенсус) и набор от микрофотографии за всеки конкретен АНА образ, публикувани на сайта на ICAP (<https://www.anapatterns.org>), с идеята да стимулира по-нататъшни дебати на международно ниво. Специфичните имунофлуоресцентни образи, установени върху HEp-2 тестовите, са разпределени в 3 основни групи:

- Ядрени светения („истинските” АНА) - 15 специфични ИИФ образа;
- Цитоплазмени светения - 9 специфични ИИФ образа;
- Митотични светения - 5 специфични ИИФ образа.

Първото класификационно дърво за АНА имунофлуоресцентни образи включва 28-типа светене обозначени с код, представен като абривиатурното съкращение - АС означаващо anti-cell pattern (фиг. 8). Всяко светене е дефинирано и описано в детайли, като със символа -  се обозначава всеки тип светене, при който се оцветява специфично и хроматина на клетките в различна фаза на митоза. Светенията са разделени в 2 групи, оцветени в 2 цвята. Обозначените от експертите на ICAP с „бананово-оранжев” цвят светения са наречени още базови/основни (competent level). Те са 11 на брой класически, лесни за разпознаване с клинична значимост и трябва да бъдат установявани от всички специалисти по клинична и лабораторна имунология, занимаващи се с доказване на АНА чрез ИИФ. Оцветените в „зелено-маслиново” 17 АС-светения са обозначени като експертни. Те са трудни за разпознаване и повечето от тях нямат пряка клинична значимост. През 2019 г. към класификационното дърво на ICAP е добавен и

комбинираният тип имунофлуоресцентен образ, характерен за АТА, под номер АС-29, експертно ниво на разпознаване (фиг. 8).



Фигура 8. Класификационно дърво според ICAP

В ежедневната имунолабораторна практика е приложимо и изследването както на общите АНА (ELISA за изследване на ААт срещу антигенен микс, състоящ се от екстрахирани от HEp-2 клетъчни ядра антигени: dsDNA, хистони, Sm, Sm/RNP, SS-A, SS-B, Scl-70, CENP и Jo-1), така и на отделните SSc-асоциирани АНА чрез ELISA метод. Чувствителността на теста варира между 73 и 100% (Mourdjeva et al. 2011). Основен недостатък на скрининговото изследване на общите АНА чрез ELISA са сериозните вариации между отделните търговски китове по отношение на чувствителност и специфичност (обикновено дължащи се на различия в аналитичната способност и cut-off стойностите), както и необходимостта от потвърдително изследване на отделните АНА чрез ELISA или имуноблот метод (de Almeida Brito et al. 2016). Освен това, изследването на АНА чрез ИИФ има по-висока специфичност и отрицателна предсказателна стойност (NPV) за развитието на СЗСТ, в сравнение със скрининговия ELISA метод (Op De Beeck et al. 2011). Поради тези предимства на ИИФ за АНА скрининг, тя е и методът на избор за установяване на АНА според критериите на ACR/EULAR за повечето СЗСТ (Damoiseaux et al. 2019). Разбира се, като високочувствителен и специфичен метод, ELISA намира своето приложение за изследване на отделните АНА, в контекста на различните СЗСТ, в това число и на SSc.

Друг имунологичен метод, използван за доказване на АНА при SSc, е имунодифузията (преципитационен метод), базирана на реакция между антитела и антигени в подходящо съотношение и водеща до формирането на преципитат. При този процес антигените и антителата дифундират и реагират в полутвърди матрици, като агарозен гел. Анализът на взаимодействията антиген - антитяло, възникващи в гел, е с много по-висока чувствителност и разделителна способност от този, направен в течна среда, което обяснява причината за честото използване на имунопреципитационните гел-базирани техники (*Hornbeck et al. 1991*). Основният недостатък на имунодифузията е количественото натоварване за постигане на резултат от една проба, както и невъзможността да се тестват много проби едновременно. Поради тази причина през последните години тази техника е заменена от ELISA и имуноблот (*Peterson et al. 2015*).

Конкретните АНА при SSc могат да бъдат потвърдени и чрез имуноблот метод, при който различни ААт се детектират върху мембрана, натоварена със специфични имобилизирани ядрени автоантигени. Имуноблот техниката е предпочитана пред ELISA заради възможността за детекция на повече от едно SSc-асоциирано ААт едновременно, както и поради доброто съотношение полза за пациента/разходи за изследване (*Aksu et al. 2010*). Съществен недостатък на имуноблот метода са трудностите при детекцията на ААт срещу антигенни детерминанти, податливи на белтъчна деградация, като АТА и АСА (*González et al. 1997*). Поради тази причина, за идентификация на ААт, насочени срещу екстрахируеми ядрени автоантигени, за предпочитане е потвърдителното изследване чрез ELISA, поради по-високата ѝ чувствителност в сравнение с имуноблот метода (*Fritzler 2013*).

2.5.4. Характеристика на SSc - асоцииираните АНА

2.5.4.1. Класически SSc - асоцииираните АНА

➤ Анти-topoisomerase I ААт (anti-TOPO I, АТА или anti-Scl70)

ААт, насочени срещу ДНК топоизомераза I (АТА) първоначално са открити в серума на пациенти със SSc под формата на имуноглобулини, реагиращи със 70 kDa протеин при изследване чрез имуноблот, откъдето идва и първоначалното им название – анти-Scl70. При по-нататъшното проучване на АТА се открива, че 70 kDa протеин представлява само част от нативния 100-kDa протеин (*Douvas et al. 1979*). АТА се откриват при 9.4 - 71% от пациентите със SSc (данните от различните проучвания са разнородни по отношение на честотата на

разпространение на АТА) и са високо специфични за SSc (*Mehra et al. 2013, Poormoghim et al. 2013*). Предвид използваните твърдофазови имунологични методи за детекция на АТА, специфичността на това ААт достига до 99% (*Reveille et Solomon 2003*). Едновременното позитивиране на АТА, заедно с някои от останалите SSc-специфични АНА в серума на пациенти със SSc, е необичайно и се среща изключително рядко (1%) (*Kuwana 2017*). АТА дава специфичен комбиниран тип имуофлуоресцентен образ, АС-29 според класификацията на ICAP, при изследване чрез ИИФ на HEp-2 клетъчна линия (*Andrade et al. 2018*). АС-29 комбинираното светене се състои от оцветяване на 5 субклетъчни региона:

1. Изразено фино петнисто оцветяване, АС-4 на нуклеоплазмата на интерфазните клетки;
2. Плътното и силно изразено фино петнисто оцветяване на кондензирания хроматин в митотичните клетки. В зависимост от серумното разреждане, митотичният хроматин може да свети хомогенно;
3. Ярکو светене на двойките точки от т.нар. региони на нуклеоларния организатор (NOR), присъединени към кондензирания хроматин в митотичните клетки.
4. Слабо цитоплазмено светене на интерфазните (и митотичните) клетки, изобразяващо деликатната мрежа, излъчваща се от перинуклеарната област към плазмената мембрана;
5. Вариращо оцветяване на нуклеолите, което може да се визуализира като пунктатно нуклеоларно или перинуклеоларно светене в интерфазните клетки. Нуклеоларното светене не е универсален белег на АС-29 (*Andrade et al. 2018*);

Преобладаващата част от пациентите с АТА са с dcSSc, но с по-бавно прогресираща фиброза, в сравнение с пациентите с анти-RNAP III ААт (*Hamaguchi et al. 2015*). АТА се асоциират с повишен риск от развитие на ИББ, която понастоящем е водеща причина за смъртност при SSc (*Cappelli et al. 2015, Hasegawa 2016*). Пациентите с положителни АТА са с повишен риск от бъбречно увреждане, SRC, тежко изразена гастроинтестинална и сърдечна фиброза (*Ho et al. 2003*). Образуването на флексионни контрактури също се свързва с АТА (*Radic et al. 2006*). Други проучвания съобщават за асоцииране на АТА с увеличен риск от възникване на хронични дигитални улцерации в резултат на микросъдовата увреда, както и от въвлечането на големите съдове в патогенетичния процес (*Bohelay et al. 2018*). Пациентите със SSc, които в хода на болестта не позитивират АТА в серума, имат по-бавна прогресия на заболяването и по-висока преживяемост (*Wirz et al. 2016*). Въпреки тясната връзка между АТА и dcSSc (55-91% при dcSSc), АТА се откриват и в серума на 15% от пациентите с lcSSc (*Poormoghim et al. 2013, Srivastava et al. 2015*). Болните с lcSSc и положителни АТА се отличават с характерен клиничен фенотип: при тях се наблюдава по-кратък времеви интервал между първия епизод на РФ и другите клинични симптоми на SSc. Нещо повече, тази група пациенти са с висок риск от развитие на ИББ (с което се доближават фенотипно до dcSSc с положителни АТА), но от друга страна се наблюдава повишена честота на ПАХ, което е

характерно за класическата lcSSc (*Mierau et al. 2011, Srivastava et al. 2015*). Все още остава непотвърдено дали АТА имат патогенетична роля при SSc. Въпреки това, проучвания съобщават за абнормна активност на ензима Topoisomerase I при пациенти със SSc и се обсъжда възможността за терапевтично повлияване на SSc чрез приложение на топоизомеразни инхибитори (*Rudnicka et al. 1996*).

➤ Анти-центромерни, Анти-CENP ААт (ACA)

Таргетните антигени на ACA са центромерни протеини (CENP) с молекулно тегло от 17 (CENP-A), 80 (CENP-B) и 140 kDa (CENP-C). CENP-B се смята за първичния автоантигенен протеин с няколко епитопа, разпознавани от ACA (*Saito et al. 2012*). ACA се асоциират с класическото описание на lcSSc и се откриват при 20-40% от пациентите със SSc (*Mehra et al. 2013*). ACA дават характерен центромерен тип светене при изследване чрез ИИФ (*Mariz et al. 2011, Chan et al. 2015*). ACA се откриват и при пациенти с първичен синдром на Sjogren, СЛЕ, РА и първичен билиарен холангит (първична билиарна цироза, PBC) (*Gelber et al. 2006, Lleo et al. 2017*). ПАХ се развива по-често, отколкото при пациенти с други видове АНА и се среща в 10–20% от ACA - позитивните пациенти в хода на SSc. Съществува и повишена вероятност от чревно засягане, като особено забавеният гастроинтестинален пасаж се свързва с ACA. При пациентите с ACA рядко се развива dcSSc. Тежко изразена ИББ, кардиомиопатия или бъбречно засягане е рядкост при ACA-позитивни индивиди (*Steen 2005, Denton et Khanna 2017*). Освен това, ACA са свързани с по-дълъг времеви прозорец от появата на РФ до развитието на други симптоми (обикновено няколко години) на заболяването, по-редки мускулно-скелетни прояви, както и по-ниска честота на поява на дигитални улцерации в сравнение с АТА - позитивните пациенти (*Walker et al. 2007*). Едновременното присъствие на ACA и АТА в серума е много рядко срещано (едва при 0,6% от пациентите със SSc). „Двойно позитивните” пациенти демонстрират клиничен фенотип и ход на прогресията на SSc, които не се отличават от тези при АТА - позитивните индивиди (*Heijnen et al. 2013*).

➤ Анти-RNA polymerase (анти-RNAP) III ААт

Транскрипцията представлява процес на пренос на генетичната информация от ДНК към РНК, който се извършва чрез синтез на РНК върху ДНК матрица. Процесът се катализира от ензима ДНК-зависима РНК полимераза (или само РНК полимераза, RNA polymerase, RNAP).

Ензимът се движи по матричната верига на ДНК, която има 3'-5' поляритет. Прокариотната клетка използва една РНК полимераза за разлика от еукариотната клетка, която оперира с три различни РНК полимерази - РНК полимераза I, РНК полимераза II и РНК полимераза III.

Анти-RNA polymerase III (RNAP III или RNAP11/RNAP155) ААт се откриват при 9% от пациентите със SSc и са единствените анти-RNAP ААт, достъпни за изследване с диагностични цели, посредством ELISA и имуноблот метод. Прави впечатление, че дебюта на SSc при пациенти с положителни анти-RNAP III ААт е на по-късна възраст, в сравнение с болните, които са отрицателни за това ААт (44 г. срещу 38.5 г.). При изследване на серума чрез ИИФ, анти-RNAP III ААт дават AC-5 - ядрен едро петнист (ядрен матрикс) имунофлуоресцентен образ, но е възможно да се наблюдава и смесен образ в комбинация с AC-10 - петнисто нуклеоларно светене, при наличие и на анти-RNAP I ААт в серума (*Sato et al. 1994*).

През последните години усилено се проучва връзката между анти-RNAP III ААт и риска от развитие на тумори. Проучванията показват, че анти-RNAP III - позитивните пациенти със SSc са със значително повишен риск от развитие на злокачествено заболяване, особено в рамките на 36 месеца от дебюта на SSc, при отношение на шансовете, OR 7.38 (*Lazzaroni et al. 2017*). Най-често срещаният тумор при тези пациенти е карциномът на гърдата, следван от хематологични злокачествени заболявания, стомашно-чревни и гинекологични тумори (*Lazzaroni et al. 2017*). Според част от проведените изследвания, честотата на злокачествените заболявания е сходна при пациенти със SSc и анти-RNAP III ААт, ACA или ATA, но времевият интервал между появата на първите симптоми на SSc и онкологичната диагноза е най-кратък при пациентите с анти-RNAP III ААт (*Shah et al. 2010*). Тесният времеви прозорец между изявата на SSc и появата на онкологично заболяване дава основание анти-RNAP III-положителните SSc пациенти да се разглеждат като паранеопластична подгрупа на SSc (*Joseph et al. 2013*).

2.5.4.2. Анти-нуклеоларни автоантитела (ANoA) при SSc

При SSc, освен трите SSc-специфични АНА (ACA, ATA, анти-RNAP III ААт), са описани още една група АНА, които и към момента са обект на засилено проучване (*Mahler et Fritzler 2014, Mehra et al. 2013*). Антигените, срещу които са насочени тези АНА са разположени в ядърцата (нуклеолите) на клетъчните ядра и включват: polymyositis/scleroderma (PM/Scl) нуклеоларния комплекс (известен още като човешката екзозома) (*Mahler et Fritzler 2014, Mehra et al. 2013*), U3-snoRNP/fibrillarin (*Mahler 2010*), Th/To автоантигените, B23 (известен още като

numatrin, No38 или Nucleophosmin) (Mahler et Fritzler 2014), RNA polymerase (RNAP) I и Nop52 (табл. 8). При изследване на човешки серум посредством ИИФ на HEp-2 клетъчна линия, се различават три основни вида нуклеоларни (ядърцови) светения AC-8, 9, 10 (експертно ниво на разпознаване на АНА ИИФ) според класификационното дърво на ICAP: AC-8 - хомогенно нуклеоларно светене, с таргетни антигени PM/Scl-75, PM/Scl-100, Th/To, B23/nucleophosmin, nucleolin, Nop52/SC6; AC-9 - туфесто нуклеоларно светене с таргетен антиген U3-snoRNP/fibrillarin; AC-10 – петнисто/пунктатно нуклеоларно светене с таргетни антигени RNAP I, huBF/NOR-90 (Chan et al. 2016, Damoiseaux et al. 2019).

Таблица 8. Преглед на основните анти-нуклеоларни автоантитела (ANoA)

Таргетен антиген	(Основни) клинични асоциации	Изследователски методи	Диагностични методи	Описани за първи път
Нуклеоларен	SSc [^] , CJE, ЗИ*	IIF	IIF	1962
PM/Scl	PM, SSc	IP, WB, ALBIA	LIA, ELISA, FEIA, ALBIA	1977
Th/To	SSc	IP, WB, CIA	LIA	1983
Fibrillarin	SSc	IP, WB	LIA, FEIA	1985
B23/numatrin	SSc	IP, WB, ALBIA	няма	1988
RNAP I	SSc	IP	няма	1987
RNAP II/III	SSc	IP	LIA, ELISA, FEIA**	1993
Nop52	Неизвестни	WB	няма	1987
NOR90	Неспецифични	WB	LIA	1987
C1D	PM, SSc	WB, ELISA	няма	1997

ALBIA: addressable laser bead immunoassay; CIA: chemiluminescent immunoassay; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; FEIA: fluorescence enzyme-immunoassay; LIA: line immunoassay; WB: Western blot, PM – polymyositis; ЗИ – здрави индивиди;

[^] само във високи титри

** в ниски титри*

*** само RNAP III*

ААт срещу PM/Scl и U3-snoRNP/fibrillarin са включени в референтната серумна банка за АНА към Центровете за контрол и превенция на заболяванията (Centers for Disease Control and Prevention, CDC), САЩ (Chan et al. 2007). Въпреки че се срещат често при пациенти със СЗСТ, антинуклеоларните ААт (ANoA) не са патогномонични. В скорошно проучване ANoA са докладвани и при 6.1% от здравите лица с положителни АНА, като не се наблюдават никакви социо-демографски асоциации или корелации с атипични (фрустни) форми на СЗСТ (Satoh et al. 2012). Въпреки това, в изследваните серуми не са намерени анти-Th/To, анти-U3-RNP, нито анти-PM/Scl ААт (Satoh et al. 2012), което предполага, че е необходимо допълнително

задълбочено изследване на останалите ANoA. ANoA, намерени в серумите на здрави лица биха могли да представляват еквивалент на анти-dense fine speckled 70 (DFS70) ААт, които се срещат преобладаващо при здрави лица и към момента се смятат за протективни по отношение на СЗСТ (Mahler et al. 2012). Когато ANoA се разглеждат в контекста на SSc, е важно да се отбележи, че честотата, с която се срещат различните ANoA зависи сигнификантно от етноса и/или генетичния терен при отделните форми на SSc (Krzyszczak et al. 2011). Не на последно място, настоящите мултиплекс и скринингови тестове демонстрират задоволителни характеристики по отношение диагностиката на ССТБ, синдрома на Sjögren и автоимунните инфламаторни миопатии, но все още не са достатъчно сензитивни относно SSc, поради липсата на диагностични тестове за част от таргетните антигени на ANoA.

➤ Молекулярни и функционални характеристики на ядърцата (нуклеолите)

При визуализация чрез електронна микроскопия, се вижда, че ядърцата са организирани в три различни области: (а) грануларен (зърнест) компонент, съставен от частици с размер 15 - 20 nm; (b) фибриларен (нишовиден) център, изграден от фибрили с дължина от 5 - 10 nm; и (c) плътен фибриларен компонент, обграждащ фибриларния център (O'Sullivan, 2013). Тези нива на нуклеоларна организация са причината за различния имунофлуоресцентен образ, който дават различните ANoA. Транскрипцията на рибозомалната ДНК се осъществява в плътния фибриларен компонент, който съдържа протеина fibrillarin, играещ ключова роля в зреенето на рибозомната РНК. Грануларният компонент съдържа протеина nucleophosmin/B23, който също взема участие в рибозомната биогенеза. Въпреки че обикновено не повече от една или две нуклеоли могат да бъдат видяни, човешките диплоидни клетки притежават 10 нуклеоларни организационни региона (nucleolus organizer regions, NORs) и съответно могат да имат повече нуклеоли. Обикновено няколко NORs участват във всяка нуклеола (Dubois et al. 2016).

➤ Анти-RNA polymerase (анти-RNAP) ААт

Част от пациентите със SSc позитивират ААт срещу една или повече RNAP (Kuwana et al. 1993, Okano 1993). Специфично явление при SSc е, че анти-RNAP I и III ААт много често съществуват съвместно при болните. Някои пациенти, с позитивни анти-RNAP I имат също и положителни анти-RNAP II ААт (Kuwana et al. 1993, Okano 1993). Анти-RNAP II ААт светят нуклеоларно на ИИФ, но не са специфични за SSc, тъй като се откриват и при СЛЕ, и при overlap

синдроми. Копродукцията на анти-RNAP I и III е специфична за SSc, а чувствителността ѝ е приблизително 20% (*Reveille et Solomon 2003*). Наличието на анти-RNAP I и III, в съчетание с или без анти-RNAP II, се асоциира с дифузно кожно засягане и повишен риск от развитие на SRC (*Denton et al. 2009, Denton et Steen 2011, Hamaguchi et al. 2015*). Резултатите от скорошно проучване потвърждават високата честота на SRC (25%) при пациентите с анти-RNAP, в сравнение останалите пациенти с dSSc (12%) (*Steen 2005*). За сметка на това, в тази подгрупа рядко се наблюдава ИББ, но конкретно анти-RNAP III ААт са рисков фактор за стомашна антрална съдова ектазия (gastric antral vascular ectasia - GAVE, watermelon стомах) (*Ghrénassia et al. 2013*). Въпреки високата честота на бъбречно засягане, преживяемостта при пациенти с анти-RNAP ААт е по-добра, отколкото при тези с АТА или анти-U3 RNP (*Steen 2005*). Това може да се обясни с факта, че макар при пациентите с анти-RNAP ААт да се наблюдава dcSSc, ниската честота на ИББ, в комбинация със съвременните възможности за ранно лечение на SRC с ACE инхибитори, водят до подобрена преживяемост: 10-годишната кумулативна преживяемост от момента на поставяне на диагнозата SSc е 75% за анти-RNAP III, 65% за АТА и 61% за анти-U3 RNP ААт (*Steen 2005*).

➤ Анти-Th/To ААт

Анти-Th/To (7-2 RNP, 8-2 RNP) ААт са насочени срещу субединици на човешките митохондриални рибонуклеаза и рибонуклеаза Р рибонуклеопротеинови комплекси. При изследване чрез ИИФ, анти-Th/To ААт дават хомогенно нуклеоларно светене, AC-8 (*Chan et al. 2015*). Този тип ААт се откриват при 2 - 5% от пациентите със SSc (*Okano et Medsger 1990, Steen 2005*). Важно е да се отбележи, че анти-Th/To са най-често срещаните SSc-асоциирани АНА при пациенти, тествани чрез ELISA и имуноблот метод, където анти-Th/To дават фалшиво - отрицателен резултат (*Mahler et al. 2014*). Тези ААт са свързани с по-кратък времеви прозорец между първия епизод на РФ и дебюта на SSC, в сравнение с пациентите с положителни АСА (< 2 години срещу > 2 години) (*Okano et Medsger 1990*). Въпреки че краткият времеви интервал между началното уплътняване на пръстите на ръцете и първите прояви на РФ е характерен за dcSSc, пациентите с анти-Th/To ААт не са рискова група за развитие на dcSSc или бъбречно увреждане (*Mitri et al. 2003*). Подобно на други ANoA (анти-U3 RNP, анти-PM/Scl), анти-Th/To антители се асоциират с ИББ, ПАХ и възпалителни мускулни заболявания (*Steen 2003, Steen 2005*). Разликата между двете групи пациенти с lcSSc, с положителни АСА и такива с положителни анти-Th/To ААт е, че анти-Th/To - позитивните пациенти обикновено развиват

както ИББ, така и ПАХ. Освен това, белодробното засягане е значително по-често при пациентите с анти-Th/To ААт, отколкото при АСА-позитивните пациенти (съответно 74% спрямо 51%). За сметка на това, гастроинтестиналното засягане е с по-голяма честота при АСА-положителните, в сравнение с анти-Th/To - позитивните пациенти (съответно 87% срещу 62%) (Mitri *et al.* 2003). Поради високата честота на белодробно засягане, преживяемостта на пациентите с анти-Th/To е намалена в сравнение с останалите групи пациенти с lcSSc, позитивиращи други АНА (Steen 2005). Анти-Th/To - положителните пациенти има най-ниска преживяемост в пула на lcSSc: кумулативната 5- и 10-годишна преживяемост са съответно: 78 и 65% (Steen 2005).

➤ Анти-U3-snoRNP (U3 RNP)/fibrillarin ААт

Анти-U3 RNP ААт са доказани за пръв път през 1985 г. в серума на пациенти със SSc. Таргетната молекула на анти-U3 RNP ААт е фибрилариин (34-kDa fibrillarin и U3 RNA) - рибонуклеопротеин, част от нуклеоларния U3-рибонуклеопротеинов комплекс. ААт срещу фибрилариин демонстрират туфесто нуклеоларно светене, AC-9 на HEp-2 клетки при ИИФ (Nihtyanova *et Denton* 2010, Chan *et al.* 2015). Анти-U3 RNP ААт са доказани при 4 - 10% от пациентите със SSc и са особено чести при пациенти от афро-американски произход: 27% срещу 5% от кавказки произход (Aggarwal *et al.* 2009). Предполага се, че са SSc-специфични АНА, въпреки че са описани и при други СЗСТ (Van Eenennaam *et al.* 2002). Характерна особеност на SSc с анти-U3 RNP ААт е класическа dcSSc и мултиорганна висцерализация, въпреки че ААт срещу фибрилариин се наблюдават и при пациенти с lcSSc, макар и по-рядко (Steen 2005, Wirz *et al.* 2015). Анти-U3 RNP ААт са предиктор за тежко белодробно засягане, свързано както с ИББ, така и с ПАХ, подобно на анти-Th/To ААт (Steen 2005). За разлика от последните, обаче, анти-U3 RNP ААт при lcSSc нямат предиктивна стойност по отношение развитието на ПАХ (Tormey *et al.* 2001). При болните с dcSSc и положителни анти-U3 RNP ААт съществува повишен риск от развитие на ПАХ (Tormey *et al.* 2001, Aggarwal *et al.* 2009). Струва си да се подчертае, че ПАХ при тази група пациенти обикновено е с остро начало и е непропорционално тежко изразена спрямо тежестта на ИББ, поради което анти-U3 RNP ААт се считат за независим рисков фактор за развитието на ПАХ (Steen 2003, Steen 2005). ПАХ е най-честата причина за смърт при пациенти с анти-U3 RNP ААт (30% спрямо 10% при анти-U3 RNP-негативните пациенти) (Aggarwal *et al.* 2009). Освен това се съобщава, че тежко гастроинтестинално засягане, включително чревна обструкция и нарушения в тънкочревната

абсорбция, е свързано с наличието на анти-U3 RNP антитела, особено през първите 2 години от началото на заболяването (*Nishimagi et al. 2007*). Установена е положителна връзка с мускулното засягане, развиващо се в хода на SSc. Миозит/миопатия е диагностициран при 25 - 33% от болните с положителни анти-U3 RNP ААт (*Aggarwal et al. 2009*).

Периферните невропатии, които се срещат рядко при пациенти със SSc, са свързани с наличието на анти-U3 RNP ААт (*Steen 2005*).

В публикации от последните няколко години е описано, че антифибриларините ААт се срещат по-често при мъже, най-вече сред африканската раса - при 16 - 22% от болните със SSc. *Aggarwal et al. 2009* установяват, че анти-U3 RNP ААт са асоциирани с по-тежко клинично протичане (dcSSc, периферна васкулопатия с дигитални улцерации и гангрена) и по-лоша прогноза сред пациентите от африкански произход. Предполагана е връзка между анти-U3 RNP ААт и развитието на SRC и сърдечно засягане, но тази връзка не е потвърдена от съвременни публикации (*Aggarwal et al. 2009*). Кумулативната 5- и 10-годишна преживяемост (съответно 80 и 76%) е подобна на тази при пациенти с АТА (*Kuwana et al. 2017*).

➤ Анти-NOR 90/hUBF

Първото описание на анти-NOR90 показва, че тези ААт са насочени срещу областите на нуклеоларните ядрени организатори (*Jimenez-Garcia et al. 1989*). По-нататъшни изследвания разкриват, че антигенът на анти-NOR90 ААт е човешки upstream binding factor (hUBF), който се състои от дублетни полипептиди с големина 93 и 89 kDa, участващи в транскрипцията на RNAP I (*Chan et al. 1991*). При ИИФ се наблюдава пунктатно нуклеарно светене, AC-10 (*Imai et al. 1994, Chan et al. 2015*). Анти-NOR 90 ААт могат да бъдат намерени в серума на 4.8% от пациентите със SSc (*Villalta et al. 2012*). Анти-NOR 90 ААт могат да бъдат положителни не само в контекста на SSc, но се откриват и при други автоимунни заболявания като РА, СЛЕ и синдром на Sjogren (*Fujii et al. 1996*). Тези ААт се откриват също и в серуми на пациенти с хепатоцелуларен карцином (*Imai et al. 1992*). Въпреки липсата на големи клинични проучвания, според натрупаните литературни данни, ААт срещу NOR90 насочват към lcSSc и са благоприятни по отношение на висцерализация (*Dagher et al. 2002*).

• Анти-U11/U12 RNP (RNA binding region containing 3, RNPC3) ААт

Анти-U11/U12 RNP ААт са насочени срещу малките ядрени рибонуклеопротеини (snoRNP) U11 и U12 на сплайсозомата, които катализират сплайсинга на информационната РНК (*Tarn et*

Steitz 1996). Първоначално са идентифицирани чрез РНК имунопреципитационен тест като ААт, реагиращи едновременно срещу U11 и U12 (*Fertig et al. 2009*). При изследване чрез ИИФ дават петнист нуклеоларен имуофлуоресцентен образ, AC-10 и се откриват при 3% от пациентите със SSc (*Fertig et al. 2009, Chan et al. 2015*), като се наблюдават както при lcSSc, така и при dcSSc (*Kuwana 2017*). При пациентите с положителни анти-U11/U12 RNP ААт често се наблюдава остро начало и динамично развиваща се ИББ (79%). Проучванията показват, че пациентите с анти-U11/U12 RNP ААт и ИББ са с 2.25 пъти по-висок риск за настъпване на летален изход в сравнение с болните с ИББ, позитивиращи някое от останалите SSc-специфични АНА, така че към момента анти-U11/U12 RNP ААт се считат за маркер за тежко белодробно засягане при SSc (*Fertig et al. 2009*). В този контекст, скрининговото изследване на анти-U11/U12 RNP ААт с прогностична цел, по отношение на риска от ИББ, е разумен подход, който би повлиял и върху клиничното решение за започване на по-ранна и агресивна терапия. До началото на 2019 липсваше достъпен имунодиагностичен метод за рутинното им изследване в Европа, поради което предстои да се провери сензитивността, специфичността, положителната и отрицателната предсказателна стойност на анти-U11/U12 RNP ААт при изследването им в ежедневната лабораторна практика.

- **Анти-PM/Scl (Polymyositis/Scleroderma) ААт**

Главните антигенни компоненти на PM/Scl (PM-1) антигените се състоят от между 11 и 16 полипептида, свързани с два протеина с молекулно тегло съответно от 75 и 100 kDa. При изследване чрез ИИФ, демонстрират хомогенно нуклеоларно светене, AC-8 (*Brouwer et al. 2002, Chan et al. 2015*). Повече от 25% от пациентите със SSc, положителни за тези ААт, са диагностицирани едновременно и с припокриващ синдром с миозит, като се има предвид, че общата им честота в популацията със SSc възлиза на едва 2%. Анти-PM/Scl ААт могат да бъдат открити в серума на пациенти с поли- и дерматомиозит (*Brouwer et al. 2001*). Клиничните асоциации на анти-PM/Scl ААт включват мускулно и ставно засягане и припокриващи синдроми (*Maddison 2000, Gunawardena 2017*). Подкожна калциноза се наблюдава при до 58% от пациентите с положителни анти-PM/Sc ААт спрямо 30% при пациентите, които не позитивират тези ААт. ИББ се открива значително по-рядко при анти-PM/Scl - положителните болни, в сравнение с останалите пациенти със SSc (15% спрямо 34%) и прави впечатление по-ранната възраст на дебют на SSc при тази група болни (средно 39 години спрямо 45 години), в сравнение с анти-PM/Scl - негативните индивиди (*D'Aoust 2014*). Типично, в групата на анти-

PM/Scl - положителните пациенти, първият епизод на РФ предхожда с години разгръщането на клиничната картина на SSc. Анти-PM/Scl ААт се асоциират с lcSSc без значима висцерализация, поради което пациентите са с благоприятна прогноза (D'Aoust 2014).

➤ Анти-B23 (numatrin, nucleophosmin) ANoA

Nucleophosmin (NPM), познат още като nucleolar phosphoprotein B23 или numatrin, е 40-kDa ядрен фосфопротеин, тясно свързан с ядрения матрикс (Feuerstein et al 1988). Бърза прогресия в синтеза на B23, в ранна G1 (пресинтетичен период) интерфаза от клетъчния цикъл, тясно корелира с рецептор-медираната индукция на клетъчната пролиферация, предизвикана от различни митогени. Завишени нива на numatrin се откриват в туморни клетки, което предполага, че B23 вероятно играе важна роля в клетъчния растеж както при нормални соматични клетки, така и при туморни клетъчни линии. Проведени са по-нататъшни експерименти с цел сравнение на биохимичните характеристики на numatrin с тези на други добре проучени протеини, свързани с клетъчната митогенност. Сравнение между електрофоретичната подвижност на numatrin и cell nuclear antigen/cyclin показва, че двата протеина не са идентични. Въпреки това, при провеждане на двупосочна гел електрофореза, numatrin демонстрира идентична електрофоретична подвижност с тази на по-рано описания в литературата ядрен протеин B23 (Feuerstein et al. 1988). Feuerstein et al. 1988 доказват, че ¹²⁵I-белязан B23 има идентична карта на трипсинова протеолиза с тази на numatrin при изследването им посредством тънкослойна хроматография или двупосочна електрофореза. Последващо клетъчно маркиране с ³²P показва, че numatrin е главен фосфопротеин, описван до момента като B23. След изолиране и пурификация на numatrin от нуклеолите на HL-60 клетъчна линия авторите изработват две поликлонални антитела, насочени срещу този протеин - 303 и 339. При последващ експеримент авторите провеждат ELISA и доказват, че numatrin се разпознава както от анти-B23 моноклонално антитяло, така и от поликлоналните антитела 303 и 339. В същото време, анти-numatrin поликлоналните антитела реагират кръстосано с B23 при провеждане на имуноблот анализ. Всички тези резултати, обобщено, доказват идентичността на numatrin с нуклеоларния протеин B23.

Антитялото срещу B23 е описано при пациенти със SSc, като има данни, че анти-B23 ААт се асоциира с ПАХ и често се открива в комбинация с други SSc-специфични АНА (Ulanet² et al. 2003, Mehra et al. 2013). Освен това анти-B23 ААт са описани и при пациенти без SSc, като е установена асоциация с хепатоцелуларен карцином (Ulanet¹ et al. 2003). Към момента, анти-

B23 няма практическо приложение при поставяне на диагнозата SSc и при проследяване на пациентите, което най-вече се свързва с липсата на широко достъпен имунодиагностичен метод за детекцията му.

2.5.4.3. Други SSc - асоциирани ААт

- **Анти-Ku ААт**

Антигенът Ku (p70/p80) е ДНК - свързващ протеин, участващ в репарацията на ДНК, както и в регулиране процесите на фосфорилиране на множество ядрени протеини, включително на ензими и транспортни фактори (*Mimori 2002*). Анти-Ku ААт се срещат при SSc с честота, варираща от 1.5 до 5 % (*Cavazzana et al. 2008, Rozman et al. 2008*). При изследване чрез ИИФ, анти-Ku ААт светят фино петнисто, AC-4. Асоциират се често с overlap синдром със СЛЕ (*Mimori 2002, Hoa et al. 2016*), както и с миозит и неспецифични хистологични промени при провеждане на мускулна биопсия (*Rozman et al. 2008, Cavazzana et al. 2013*). До момента, асоциации с тригеминална невралгия и автоимунен тиреоидит не са съобщавани при нито едно от останалите SSc-специфични АНА, освен при пациенти с положителни анти-Ku ААт, като процентът варира от 2.6 до 13.6 % от пациентите (*Hoa et al. 2016*). Анти-Ku - положителните пациенти са по-възрастни при дебюта на SSc, в сравнение с негативните за анти-Ku ААт (средна възраст 51.5 спрямо 45.3 години), по-често са с lcSSc (77% спрямо 63%), освен това, в сравнение с останалите, не страдат от дигитални улцерации (0% спрямо 15%) (*Hoa et al. 2016*). Рядко при тези пациенти се наблюдава висцерализация, но когато я има, преобладават ИББ и ПАХ (*Mimori 2002, Hoa et al. 2016*). По отношение на асоциациите с тумори, по литературни данни, анти-Ku - положителните болни по-често имат анамнеза за прекарано туморно заболяване към момента на поставяне на диагнозата SSc, в сравнение с негативните пациенти (27% спрямо 8%, OR 4.6). Най-чести съобщения има за кожен меланом, карцином на гърдата и сквамозен кожен карцином (*Hoa et al. 2016*). Въпреки това, пациентите с анти-Ku ААт не са със значимо повишен риск от настъпване на преждевременна смърт според данните от анализ на преживяемостта (*Hoa et al. 2016*). Смята се, че туморите тригерират автоимунния процес в някои случаи на SSc посредством механизмите, въввлечени в анти-туморния отговор, молекулярната мимикрия и epitope spreading (*Shah et al. 2015*).

- **Анти-RuvBL1/2 ААт**

Анти-RuvBL1/2 ААт са насочени срещу двоен хексамер, разположен в нуклеоплазмата, състоящ се от RuvBL1 и RuvBL2, които са въввлечени в редица важни клетъчни процеси като

транскрипция, репарация на ДНК, ремоделиране на хроматина и сглобяване на малките ядрени нуклеоларни RNP комплекси (Zaarur et al. 2015). Тези ААт са рядко срещани по принцип и сред пациентите със SSc се откриват едва при 1 - 2% от болните (Pauling et al. 2018). Анти-RuvBL1/2 ААт имат фино петнист имунофлуоресцентен образ, AC-4 при изследване чрез ИИФ (Herold et al. 2018). Анти-RuvBL1/2 - положителните пациенти са описвани като характерен SSc фенотип - с dcSSc, припокриваща се с миозит, което е нетипично за SSc, в контекста на което и да е от останалите SSc-асоциирани АНА. В литературата липсват данни за тежко изразена органна фиброза, въпреки че има докладвани случаи на сериозни миокардни усложнения. Средната възраст на дебют на заболяването при анти-RuvBL1/2-положителните пациенти е по-висока (58 г.) и процентът на засегнатите пациенти от мъжки пол е значително по-висок, в сравнение с негативните за тези ААт изследвани мъже със SSc (50 % спрямо 16 %) (Kaji et al. 2014).

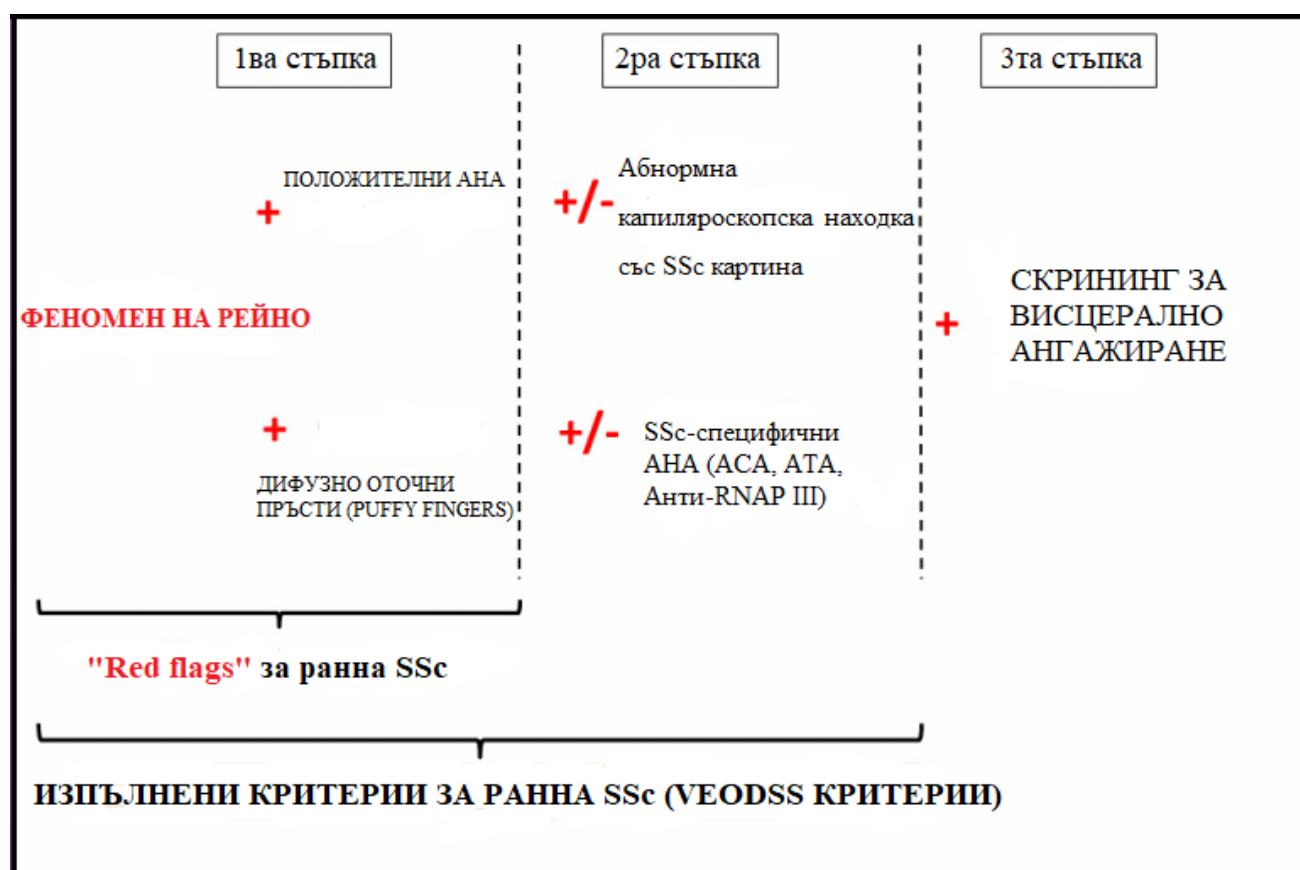
- **Анти-Eukaryotic Initiation Factor-2B (анти- eIF2B) ААт**

Анти-eukaryotic initiation factor 2B (анти-eIF2B) ААт са цитоплазмени SSc-специфични ААт, които се откриват в АНА - отрицателни серуми. Тези ААт имат характерен имунофлуоресцентен образ: цитоплазмено фино петнисто светене, AC-20, при негативни ядра на HEp-2 клетките (Herold et al. 2018). Анти-eIF2B ААт бяха открити съвсем скоро и са първите описани SSc-специфични анти-цитоплазмени ААт (Pauling et al. 2018). Те са насочени срещу eukaryotic initiation factor 2B, който е ключов за инициацията и регулирането на протеиновия синтез във всички еукариотни клетки (Pavitt 2005). Анти-eIF2B се откриват при 1% от пациентите със SSc (Betteridge et al. 2016) и се асоциират с dcSSc и ИББ (Pauling et al. 2018). Има предположения, че образуването на анти-eIF2B ААт може да се свърже с процес на молекулярна мимикрия при пациенти със SSc, инфектирани с Epstein-Barr вируса (Fattal et al. 2014).

2.5.5. Къде е мястото на АНА в диагностиката на ранната SSc?

Макар към момента да липсват доказателства за патогенетичното значение на АНА при SSc, SSc-асоциираните АНА са важен имунологичен маркер на заболяването и имат прогностично значение по отношение на вътрешното органно засягане (Steen 2005, Kuwana 2017, Ma et al. 2017).

Друг важен акцент, относно диагностичното значение на АНА при SSc, са резултатите от знаковото мултицентрово web - базирано проучване Delphi exercise, проведено от The EULAR Scleroderma Trials and Research Group (EUSTAR), което включва голям брой SSc експерти (Avouac et al. 2011). Като резултат от това проучване бива разработен двустъпален модел за ранна диагностика на SSc (very early disease onset of systemic sclerosis, VEDOSS) (фиг. 9). Като първа стъпка, наличието на РФ, оточно уплътнени пръсти на ръцете (puffy fingers) и положителни АНА се идентифицират като „червени знамена“ („red flags“), които да привлекат вниманието на личния лекуващ лекар, който от своя страна да насочи пациента към третичен ревматологичен център, където да бъде извършена втората стъпка от диагностичния подход - провеждане на капиляроскопия на нокътното ложе и изследване на SSc-специфични АНА от компетентна имунологична лаборатория (фиг. 9).



Фигура 9. Двустъпален алгоритъм за диагностика на ранна SSc (VEDOSS Criteria), Delphi exercise multicenter web-based trial, EUSTAR (no Avouac et al. 2011)

Заклучение

През последните години е постигнат огромен напредък по отношение на опитите за разкриване на имунните механизми, въввлечени в патогенезата на SSc. Създадените през последното десетилетие животински модели на SSc и проведените *in vitro* проучвания подчертават как разстройването на фината регулация между имунните клетки и техните медиатори, може да доведе до неадекватен придобит имунен отговор, който от своя страна да поддържа индуцираното възпаление и да промотира развитието на васкулопатия и фиброза.

Т клетките играят ключова роля в патогенетичния процес при SSc. Цитокините, секретирани от Т хелперните субпопулации, оказват ефект върху ендотелните клетки и фибробластите, като стимулират/инхибират процесите на васкулопатия и фиброза. Преобладаващият Th2 - отговор, медиран от IL-4 и IL-13 стимулира колагеновия синтез от фибробластите, докато IFN- γ демонстрира инхибиторен ефект.

Повечето проучвания съобщават за увеличение на абсолютния брой на Th17 клетките в кожния инфилтрат на пациенти със SSc. Tregs, изследвани в кожни лезии и в периферна кръв на болни със SSc, показват отклонения както по отношение на броя, така и що се касае до супресорната им активност.

Въпреки безспорния принос на натрупаните до момента научни данни относно имунопатогенезата на SSc, все още много въпроси остават без отговор. Сред тях са кое точно дава началото на автоимунния процес, какви са причините за преобладаването на Th2 - отговора, както и определянето на имунологичните различия между дифузната и ограничената форма на SSc. Необходимо е натрупване на още научни данни и задълбочено изследване на фенотипа на Т-клетките, въввлечени в патогенезата на SSc, както и дали тези субпопулации са израз на транзиторни състояния или представляват терминално-диференцирани клетки, особено по отношение на Th17 и Tregs.

Голямо предизвикателство за изследователите, както и за клиничните специалисти ще представлява обвързването на получените резултати с възможността за осигуряване на персонализиран подход в терапията на пациентите с това тежко инвалидизиращо заболяване, каквото е SSc.

Фокусирайки се върху имунодиагностичния аспект, АНА трябва да бъдат изследвани при всеки пациент с клинично съмнение за SSc. И въпреки, че не е ясно дали АНА имат директна патогенетична роля, изследването на имунологичния профил сред пациентите със SSc и доказването на определени АНА има предиктивна стойност по отношение развитието на определени органни поражения, тежестта на клиничната изява и преживяемостта на пациентите

със SSc. И все пак следва да се има предвид, че макар да съществуват доказани асоциации между АНА и определен клиничен фенотип, специфичността и чувствителността на описаните АНА по отношение развитието на различните органни поражения не е 100%. Друг важен акцент е, че при пациентите с вече поставена диагноза SSc е необходимо да бъде мониторирана функцията на вътрешните органи, които предилекционно се засягат от SSc, въпреки позитивирането на АНА с доказана протективна стойност по отношение на някои органни поражения.

На настоящия етап в масовата ревматологична практика не само в България, но и в Европа, при клинично съмнение за SSc се изследват основно ACA, ATA, анти-RNAP III и анти-PM/Scl AAt. В това отношение, Лаборатория по клинична имунология на УМБАЛ „Св. Иван Рилски” прави изключение, като от няколко години рутинно изследва широк панел от SSc-специфични и асоциирани със SSc AAt.

Внедряването на широк имунологичен панел от SSc-асоциирани AAt от повече имунологични лаборатории от една страна би улеснило диагностицирането на SSc. От друга страна, без съмнение, би допринесло за по-прецизно фенотипно класифициране на различните форми на SSc и насочване вниманието на клиничните специалисти към засягане на определени таргетни органи, основавайки се на индивидуалния имунологичен профил на пациента, както и за по-ефективното мониториране на прогресията на SSc.

3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на дисертационния труд е да се изследват някои нови имунологични показатели в диагностиката на прогресивната системна склероза (SSc), които да се валидират в клиничната практика за диагностициране и проследяване хода на болестта, както и да се проучат нови аспекти в имунопатогенезата на заболяването.

За постигане на целта си поставихме следните задачи:

➤ *По отношение изследването на нови имунологични показатели:*

1. Проспективен подбор и охарактеризиране на пациенти с доказана SSc и *de novo* диагностицирани болни със SSc, съгласно класификационните критерии на ACR/EULAR (2013 г.). Набиране на контролна група от пациенти с други системни заболявания на съединителната тъкан. Събиране и съхраняване на биологичен материал – кръвен серум от пациентите със SSc и от контролната група.
2. Изследване на антинуклеарни автоантитела (АНА) в серума на пациентите със SSc чрез златния стандарт за определяне на АНА - индиректна имунофлуоресценция на HEp-2 клетъчна линия и определяне на титъра на АНА и типа имунофлуоресцен образ (AC - светене) съгласно Международния консенсус за АНА светения (ICAP).
3. Проучване на панел от 13 асоциирани със SSc автоантитела чрез имуоблот метод, включващ автоантитела срещу следните таргетни антигени: Scl-70, CENP-A, CENP-B, RNAP-11, RNAP-155 (RNA polymerase III), U3 RNP/fibrillarin, NOR90/hUBF, Th/To, PM/Scl-100, PM/Scl-75, Ku, PDGFR, Ro52.
4. Определянена чувствителността, специфичността, положителната и отрицателната предсказателна стойност на изследваните автоантитела и установяване на диагностичната и предиктивната им стойност по отношение на органното засягане при SSc.

➤ *По отношение проучването на нови патогенетични механизми при SSc:*

1. Провеждане на пилотно проучване с проспективен подбор и охарактеризиране на група пациенти с доказана SSc и *de novo* диагностицирани болни със SSc, съгласно класификационните критерии на ACR/EULAR (2013 г.), както и на референтна контролна група от здрави лица. Събиране и съхраняване на биологичен материал - пълна периферна венозна кръв и кръвен серум от пациентите със SSc и от здравите лица, включени в проучването.

2. Оценка на периферния цитокинов профил чрез изследване на цитокиновата продукция на свързаните с Th17 и Tregs цитокини (IL-6, IL-17A, IL-23, IL-10, TGF- β 1) в серума на пациенти със SSc и на здравите лица.
3. Флоуцитометрично определяне на способност за активация на Т-лимфоцитите под въздействието на Phytohemagglutinin (PHA) в периферна кръв от пациентите със SSc и при здравите лица.
4. Флоуцитометрично изследване на процент Th17 и Т регулаторни клетки (Tregs) в периферна кръв от пациентите със SSc и при здравите лица.
5. Статистическа обработка на получените резултати.
6. Сравняване на получените стойности при пациенти със SSc, с тези на здравите лица и анализиране на връзката им с формата, стадия и активността на SSc.

4. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

4.1. Клиничен материал

4.1.1. Изследвани лица

В дисертационния труд са включени общо 169 лица, разпределени в следните групи:

➤ **По отношение на изследването на нови имунологични показатели:**

- Пациенти с доказана SSc и *de novo* диагностицирани болни със SSc, съгласно класификационните критерии на ACR/EULAR (2013 г.): 91 пациента, от които 82 (90%) жени и 9 (10%) мъже, на средна възраст 51 ± 12 г. (25 - 74 г.). От изследваните 91 пациента, 59 (64%) са с lcSSc и 32 (36%) с dcSSc.
- Контролна група от пациенти с други СЗСТ (болнична патологична контролна група) - 38 пациента, от които 33 (86%) жени и 5 (14%) мъже, на средна възраст 48 ± 12 г. (23 - 74 г.), със следното разпределение: СЛЕ - 14 пациента, полимиозит/дерматомиозит - 8 пациента, overlap синдроми - 14 пациента, еозинофилен фасциит - 2 пациента.

➤ **По отношение на проучването на нови патогенетични фактори при SSc:**

- Пациенти с доказана SSc и *de novo* диагностицирани болни със SSc, съгласно класификационните критерии на ACR/EULAR (2013 г.) - 24 пациента, на средна възраст 47.1 ± 13.2 г. (28 - 64 г.), от които 23 (95.8 %) са жени и 1 (4.2%) мъж. От изследваните 24 пациента, 11 (45.8%) са с lcSSc, а 13 (54.2%) с dcSSc.
- Контролна група от лица без СЗСТ, възпалителни ставни заболявания и без данни за други хронични тежки придружаващи заболявания - 16 лица, на средна възраст 43 ± 12 г., (26 - 55 г.), от които 12 (75%) са жени и 4 (25%) са мъже. В дисертационния труд те ще бъдат означавани като „зdravi“.

➤ **Критерии за включване на пациентите със SSc:**

- Пациенти на възраст ≥ 18 години с поставена диагноза или *de novo* диагностицирани със SSc, съгласно класификационните критерии на ACR/EULAR (2013 г.);
- Подписали информирано съгласие за вземане на биологичен материал – периферна венозна кръв;

➤ **Критерии за включване на пациентите от референтната група със СЗСТ:**

- Пациенти на възраст ≥ 18 години с поставена диагноза СЛЕ, полимиозит/дерматомиозит, еозинофилен фасциит и overlap синдроми;

- Подписали информирано съгласие за вземане на биологичен материал - периферна венозна кръв;
- **Критерии за включване на здрави лица от контролната група:**
 - Възраст ≥ 18 години;
 - Подписали информирано съгласие за вземане на биологичен материал - периферна венозна кръв;
 - Липса на СЗСТ или възпалително ставно заболяване и без данни за други хронични тежки придружаващи заболявания;
- **Критерии за изключване, валидни за всички лица, включени в проучването:**
 - Лица на възраст под 18 години;
 - Тежки съпътстващи, хронични физически заболявания;
 - Пациенти, които показват познавателни или психични увреждания;

Подборът на пациентите беше извършен в Клиника по Ревматология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, гр. София, в периода от 04.2016 до 04.2018 г. Всички пациенти са диагностицирани според обединените класификационните критерии за SSc на ACR/EULAR, 2013 г. (*van den Hoogen et al. 2013*).

Клиничните данни на пациентите бяха любезно предоставени от д-р Десислава Калинова, д-р Владимира Бояджиева, д-р Николай Стоилов и д-р Цветелина Йонева, със съгласието и активното участие на Ръководителя на Клиниката по Ревматология, проф. д-р Рашо Рашков, дмн.

Всички участници в изследванията бяха запознати с целите на проучването, очакваните резултати, рискове и ползи от включването им в проучването. Всички участници са подписали писмено Информирано съгласие, съгласно изискванията на Комисията по етика на научните изследвания към МУ – София (КЕНИМУС). Личните данни и резултатите от изследването са съхранявани, обработвани и представяни в съответствие със Закона за защита на личните данни в сила от в сила от 01.01.2002 г. изм. ДВ. бр.57 от 13 Юли 2007 г. и с Регламент (ЕС) 2016/679 на Европейския парламент и на Съвета, от 27 април 2016 година, относно защитата на физическите лица във връзка с обработването на лични данни и относно свободното движение на такива данни. Резултатите от проучването за всеки пациент поотделно са съхранявани в съответствие с действащия в момента Кодекс на професионалната етика - Раздел IV - Лекарска тайна - чл.51 - чл.55.

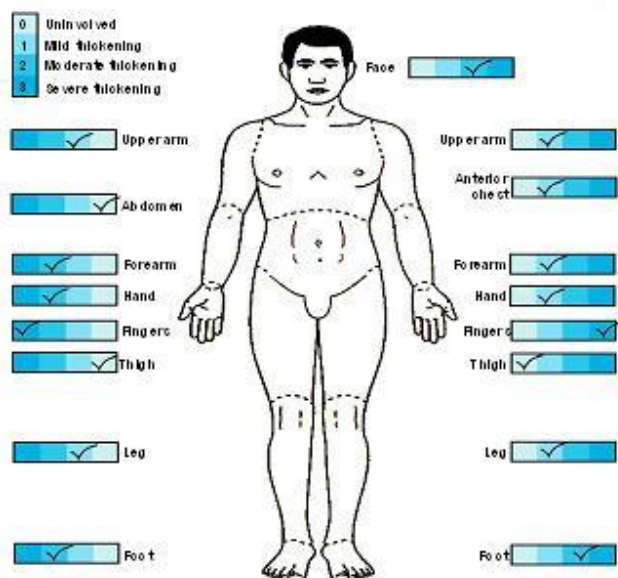
На Таблица 9 са представени демографските характеристики на изследваните групи лица.

Таблица 9. Демографска структура на отделните групи от изследвани лица. Данните са представени като брой (%) или средна стойност $\pm$ SD

	Пациенти със SSc		Пациенти с други СЗСТ	Здрави лица
Брой	91	24	38	16
Възраст	25 - 74 г. (51 ± 12 г.)		28 - 64 г. (47.1 ± 13.2 г.)	23 - 74 г. (48 ± 12 г.)
Жени/Мъже	82/9 (90% / 10%)		23/1 (95.8%/4.2%)	33/5 (86% / 14%)
lcSSc	59 (64%)		11 (45.8%)	12/4 (75% / 25%)
dcSSc	32 (36%)		13 (54.2%)	

При всички изследвани пациенти със SSc:

- Степента на кожно уплътнение беше оценена чрез използване на модифицирания Rodnan skin score (modified Rodnan skin score, mRSS), която използва скала от 0 - 3 за оценка на кожното уплътнение в 17 области, съответно: 0 - нормална кожа; 1 - леко уплътнение; 2 - умерено уплътнение; 3 - тежко уплътнение. Общият брой точки беше сумиран за всеки пациент при максимален брой точки - 51т. (17 области x 3) (фиг. 10).



Фигура 10. modified Rodnan skin score (mRSS) - точкова система за изчисление на степента на кожното ангажиране при SSc, използвана както в диагностичен аспект, така и за целите на клиничните проучвания

- Органните поражения бяха оценени по следния начин:
 - Кожа - изчисляване на mRSS;

- Бял дроб - високоразделителна компютърна томография; функционално изследване на дишането с дифузия на газове (diffusing capacity of the lungs for carbon monoxide, DLCO, известен още като transfer factor for carbon monoxide или TLCO);
- Сърце - ехокардиография, оценка на налягането в а. pulmonalis;
- Бъбреци - оценка на бъбречна функция, чрез изследване на урея, креатинин, креатининов клирънс, белтък в 24 часова урина;
- Мускулно-скелетна система: стави - рентгенография на засегнатите стави; мускули - серумни нива на креатинфосфокиназа и електромиография;
- Малки съдове - капиляроскопия на нокътното ложе;
- При клинични симптоми от страна на гастроинтестиналния тракт провеждане на фиброгастроскопия с последващо хистологично изследване.

Данните за разпределението на органното засягане на пациентите, включени в имунодиагностичната част от дисертационния труд, са представени в Таблица 10.

Таблица 10. Кожно и органно засягане при изследваните пациенти със SSc

Клинична находка	Брой SSc пациенти	% SSc пациенти
lcSSc	59	64
dcSSc	32	36
ИББ	58	64
ПАХ	11	13
Сърдечно засягане	36	39
ГИТ засягане	36	39
Бъбречно засягане	32	36
SRC	3	3
Мускулно засягане	7	8
Васкулит	56	62

За целите на проучването на нови патогенетични фактори при SSc, пациентите бяха разделени на две групи спрямо степента на кожното засягане - 13 пациента с dcSSc и 11 - с lcSSc (табл. 11). В зависимост от годините от дебюта на заболяването, пациентите и от двете групи бяха стадираны както следва (по *Medsgger et al. 2003*):

➤ Пациенти с dcSSc:

- Ранна dcSSc (< 3 години от появата на първите симптоми);
- Интермедиерна dcSSc (3 - 6 години);
- Късна dcSSc (6+ години);

➤ Пациенти с lcSSc:

- ранна lcSSc (< 5 години от дебюта на SSc);
- интермедиерна lcSSc (5 - 10 години);
- късна lcSSc (10+ години).

Активността на SSc беше оценена според Revised Activity Criteria for SSc, Preliminarily Revised EUSTAR Activity Index (Valentini *et al.* 2016). Клиничните данни на пациентите са представени в Таблица 11.

Таблица 11. Демографски и клинични характеристики на изследваните пациенти със SSc

Пациент	Пол	Възраст	Форма	Стадий	Активност	Висцерално засягане	АС-светене	Терапия
1	М	50	dcSSc	интермедиерен	Да	ЕД	АС-4	PMP
2	Ж	49	dcSSc	късен	Не	ЕД	АС-29	MTX
3	Ж	55	dcSSc	интермедиерен	Не	ЕД	АС-4	MP
4	Ж	58	dcSSc	късен	Да	ИББ	АС-29	PMP, PCYP
5	Ж	44	dcSSc	ранен	Да	ИББ	АС-29	DPA, MP
6	Ж	27	lcSSc	ранен	Да	Не	АС-29	DPA, MP, TCZ
7	Ж	48	dcSSc	ранен	Да	ИББ	АС-29	DPA, MP
8	Ж	37	lcSSc	ранен	Да	Не	АС-4	CHQ
9	Ж	65	dcSSc	ранен	Не	Не	АС-3	MP, CHQ
10	Ж	36	lcSSc	интермедиерен	Да	Не	АС-4	PMP, PCYP, DPA
11	Ж	47	dcSSc	ранен	Да	SRC	АС-29	PMP, PCYP
12	Ж	32	lcSSc	ранен	Да	ИББ	АС-4	MP, TCZ
13	Ж	62	dcSSc	ранен	Да	Не	АС-4	PMP, PCYP
14	Ж	27	lcSSc	късен	Да	Не	АС-8	MTX
15	Ж	73	lcSSc	интермедиерен	Не	ИББ	АС-4	MP, MTX
16	Ж	32	dcSSc	късен	Да	ИББ	АС-8, АС-29	PMP, PCYP
17	Ж	60	dcSSc	късен	Да	Не	АС-4	PMP, PCYP

Пациент	Пол	Възраст	Форма	Стадий	Активност	Висцерално засягане	АС- светене	Терапия
18	Ж	34	dcSSc	ранен	Да	Не	АС-29	MP, MTX
19	Ж	56	lcSSc	късен	Не	ЕД	АС-3	MP
20	Ж	53	lcSSc	ранен	Да	Не	АС-8	MP, AZA
21	Ж	30	lcSSc	късен	Да	Не	АС-4	MP, DPA
22	Ж	61	dcSSc	късен	Не	ЕД, ИББ, ПАХ	АС-29	MP
23	Ж	39	lcSSc	ранен	Не	Не	АС-3	MTX
24	Ж	56	lcSSc	интермедиерен	Не	ЕД	АС-4	MP, MTX

Използвани съкращения: Ж, жена; М, мъж; ЕД, езофагеален дисмотилитет; MP, methylprednisolone; PMP, pulse MP; MTX, methotrexate; CYP, cyclophosphamide; PCYP, pulse CYP; DPA, D-penicillamin; CHQ, chloroquine; TCZ, tocilizumab; AZA, azathioprine;

4.1.2. Биологичен материал от изследваните лица

➤ За целите на изследването на нови имунологични показатели при SSc:

От пациентите със SSc и от контролната група болни със СЗСТ беше събиран биологичен материал - кръвен серум. За целите на проучването бе направена рутинна венепункция и взета периферна венозна кръв с вакутейнер за серум (BD Vacutainer®, CATREF 367955, 5 ml). Кръвните проби на всички пациенти бяха изследвани в Лаборатория по клинична имунология към УМБАЛ „Св. Иван Рилски“. Серумите бяха отделени съобразно стандартната оперативна процедура в лабораторията, описани и съхранявани на -70° C, според изискванията за добра лабораторна практика и според инструкциите на търговските китове.

➤ За целите на изследването на нови патогенетични механизми при SSc:

От пациентите със SSc и от контролната група здрави лица беше събиран биологичен материал - пълна периферна венозна кръв и кръвен серум. За целите на проучването бе направена рутинна венепункция и взета периферна венозна кръв с вакутейнери за пълна кръв (K2E BD-Plymouth. PL67BP. UK, 5 ml) за серум (BD Vacutainer®, CATREF 367955, 5 ml).

Кръвните проби на всички лица бяха изследвани в Лаборатория по клинична имунология към УМБАЛ „Св. Иван Рилски“. Серумите бяха отделени съобразно стандартната оперативна процедура в лабораторията, описани и съхранявани на -70°C , според изискванията за добра лабораторна практика и според инструкциите на търговските китове.

4.2. Методи на изследване

4.2.1. Определяне на АНА чрез ИИФ на HEp-2 клетъчна линия

За установяване на АНА чрез индиректна имуофлуоресценция бе използван АНА-HEp-2 тест (IIFT: HEp-2, EUROIMMUN AG, Germany). Серумните проби на пациентите, както и положителната, и отрицателната контроли от всяка серия, бяха изработени съобразно инструкциите на фирмата производител. Анализирането на имуофлуоресцентните образи с определяне на титър и тип светене, спрямо номенклатурата на ICAP както и определянето на титъра на АНА, бе извършено с флуоресцентен микроскоп Nikon Eclipse Ci-L и с помощта на софтуерна програма NIS - Elements Analysis D.

➤ Използвана апаратура и други технически средства

1. Флуоресцентен микроскоп с възбудим филтър 495nm и емисионен филтър 525 nm за FITC визуализиране - микроскоп Nikon Eclipse Ci-L и софтуерна програма за обработка и съхранение на получените имуофлуоресцентни образи NIS - Elements Analysis D .
2. Хладилник ($2-8^{\circ}\text{C}$).
3. Водна камера.
4. Хистологични кювети.
5. Покривни стъкла 24x60 мм.
6. Вариабилни автоматични пипети от 50, 100 и 1000 μl .
7. Връхчета за автоматични пипети.
8. Адсорбираща хартия.

➤ Необходими реактиви и консумативи.

- **Кат. No на диагностичния набор**
FA 1520-1010 HEp-2 10 x 10 (100 стъкла)
- **Съдържание на диагностичния набор:**

6. 0.1M фосфатен буфер с pH 7.4 съдържащ: 0.1M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 0.1M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;
7. Фосфатно-буфериран физиологичен разтвор (PBS), съдържащ 0.1M фосфатен буфер, pH 7.4 и 0.9 %NaCl, в съотношение 1:10;
8. FITC маркиран анти-човешки IgG кози серум, готов за употреба;
9. Монтираща среда: 90% разтвор на глицерин в PBS или REF44694, 1x3ml, EUROIMMUN AG;
10. Покривни стъкла (62 mm x 23 mm);
11. Книжка с инструкции на производителя;
12. АНА - положителна контрола: серум от пациент подбран след неколнократно тестване и проучване на клиничната диагноза;
13. АНА - отрицателна контрола-серум;

Съхранение: Реагентите се съхраняват в хладилник на 2 - 8°C до 1 месец от приготвянето им.

➤ **Начин на приготвяне.**

Реактиви:

- ✧ 90% глицерол - 90 ml глицерол + 10 ml PBS;
- ✧ 0.1M фосфатен буфер с pH 7.4:
 1. разтвор №1- 3.12 гр. NaH_2PO_4 се разтварят в 200 ml дестилирана H_2O ;
 2. разтвор №2- 16.019 гр. Na_2HPO_4 се разтварят в 900 ml дестилирана H_2O ;
 3. След пълното им разтваряне, се смесват 192 ml от разтвор №1 с 808 ml от разтвор №2. Ако е необходимо се корегира до pH 7.4 на pH-метър.
 4. Съхранява се на 2 - 8°C.
- ✧ Фосфатно-буфериран физиологичен разтвор (PBS). Към 450 ml 0.9% NaCl се прибавят 50 ml 0.1M фосфатен буфер pH 7.4.

➤ **Изпълнение на метода:**

Тестът беше извършен съгласно инструкциите на производителя.

- Слайдовете се изваждат от хладилника и се темперират за 15 мин. на стайна температура.
- Разреждат се серумите на пациентите за скрининг 1:80 с PBS (10µl серум + 800µl PBS). За определяне на титъра на положителните серуми, се правят двукратно падащи

разреждания (от 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280), също с PBS. Положителният контролен серум се разрежда в 3 разредки- 1:80, 1:160 и 1:320, а отрицателният серум - 1:80.

- Стъклата се маркират с индекса на пациента и съответния титър на разреждане.
- Накапват се по 25µl от разредените серуми и контролите върху съответните кладенчета на слайда. Инкубират се за 30 мин. на стайна температура (15-30°C), във влажна камера.
- Слайдовете първоначално се промиват на слаба струя и след това се оставят за по 5 мин. (трикратно) в хистологични кювети с PBS, като след последното миене следва внимателно подсушаване с адсорбираща хартия.
- Накапват се по 25µl от готовия за употреба античовешки FITC маркиран кози серум.
- Препаратите се инкубират за 30 мин. във влажна камера на стайна температура.
- Повтаря се стъпка 5.
- Измитите и подсушени предметни стъкла се накапва по 20µl монтираща среда (90% глицерин) и се поставя покривно стъкло, като се внимава да не се образуват мехурчета.
- Отчитането на флуоресценцията се извършва на флуоресцентен микроскоп Nikon Eclipse Ci-L с увеличение 250 - 400 пъти. Препоръчително е слайдовете да бъдат отчетени непосредствено след стъпка 9.
- Полуколичественото определяне на АНА се осъществява чрез титриране на серума. Серумният титър се определя като най-високото разреждане, даващо положителен резултат.
- В резултата се описва и типа на имунофлуоресцентното оцветяване на ядрата според класификацията на ICAP.

➤ **Вътрешен качествен контрол**

Провежда се във всяка серия изследвания. Използват се приготвени в лабораторията контроли: АНА - положителен и АНА - отрицателен човешки серуми, които се изследват разредени 1:80 или при по-голям титър на разреждане. Обикновено положителните контролни серуми се подбират с различно имунофлуоресцентно оцветяване на ядрата, например: АС-1, АС-4, нуклеоларно светене и т.н. Контролните серуми са подбрани след неколkokратно тестиране и проучване на клиничната диагноза. Те са разфасовани във фиолки по 50 µl и са замразени на -20°C. Използват се в рамките на 3 месеца.

➤ **Аналитичен cut off титър:**

Като АНА положителен (+) се определя резултат с титър над 1:160. Като АНА отрицателен резултат (-) се определя липса или наличие на флуоресценция с титър под 1:160.

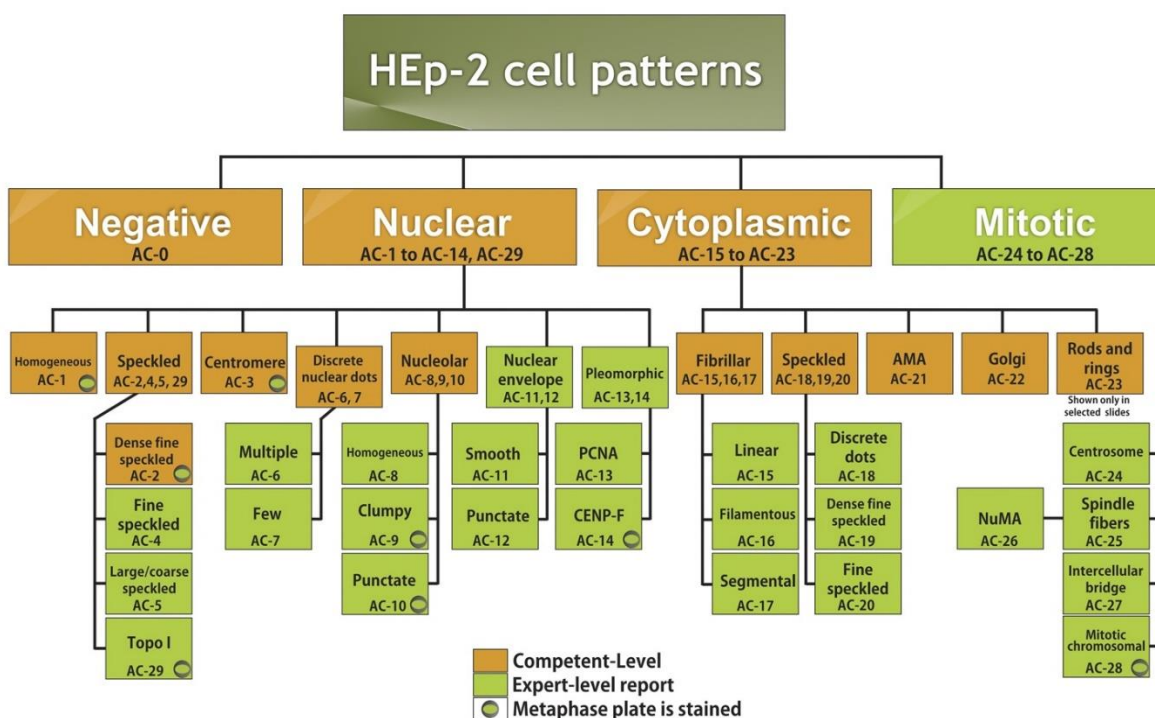
➤ **Анализ на имунофлуоресцентния образ посредством флуоресцентна микроскопия (по Е. Иванова - Тодорова и сътр. 2018)**

Флуоресцентната микроскопия е основен инструмент за наблюдение на клетъчната анатомия и физиология. При нея изучаваната проба се явява източник, излъчващ енергия, която може да бъде открита като видима светлина, когато е облъчвана със светлина с определена дължина на вълната. Пробата може или да има естествена флуоресценция като хлорофила и някои минерали, или да бъде третирана с флуоресциращи вещества. Традиционните флуоресцентни микроскопи са конструирани за максимална гъвкавост и най-добре могат да бъдат сравнени с летенето с реактивен самолет – има бутони и лостове, които контролират почти всеки аспект на устройството. Тук се използва фактът, че излъчената светлина е с по-ниска енергия и има по-дълга дължина на вълната. Основният процес на флуоресценция включва абсорбиране на светлинна енергия от атом, който се възбужда, и електрон от неговата обвивка скача на по-високо енергийно ниво. Това явление се улавя от индикатор на флуоресцентния микроскоп. Скоро същият електрон се връща обратно в основното си състояние, излъчвайки фотон (или пакет светлина) – атомът флуоресцира. Следва излъчване на част от тази светлинна енергия няколко наносекунди по-късно. Тъй като в този процес се губи известно количество енергия, излъченият фотон има по-малко енергия от абсорбирания. Следователно излъчваната светлина обикновено има по-дълга дължина на вълната от тази на абсорбираната (възбуждащата) светлина. Тази промяна се нарича Stokes shift. Флуоресцентната светлина се осигурява от живачна лампа, халогенна лампа или светодиод (LED). Лампата с живачен изпарител осигурява най-силната светлина, но има ограничен живот от около 100- 200 часа, което трябва да се наблюдава с таймер. Флуоресцентният микроскоп трябва да се намира в т.нар. „тъмна стая”, тъй като обкръжаващата светлина може да изкриви получения флуоресцентен образ. Съвременните флуоресцентни микроскопи не изискват напълно тъмно помещение. Изключването на светлината и покриването на прозорците със завеси/щори обикновено е достатъчно. Извършване на флуоресцентна микроскопия при температури над 23 - 25° C не е препоръчително. Стаята трябва да бъде постоянно климатизирана както за удобство на оператора, така и за предпазване на микроскопа от растеж на плесени, особено когато влажността е висока.

Анализът за наличие на АНА се извършва с увеличение 250-400 пъти. Внимателно се подбира тази област от готовите НЕР-2 проби, попадаща в зрителното поле, която се намира между центъра и периферията на всяка една проба. Това се налага поради често случващото се явление на центрофужно разпределение на конюгата върху субстрата, в резултат на което флуоресцентният образ в периферната и централната област не е специфичен и не съответства на точния титър на АНА в изследвания серум. Следователно интензитетът на флуоресценцията в тези области не трябва да бъде вземан предвид при интерпретирането на получените резултати. Също така наблюдателят трябва да подбере тази част от зрителното поле, в която НЕР-2 клетките са хомогенно разпределени върху предметното стъкло и имат сравнително еднаква сила на светене (с изключение на наблюдаваните плеоморфни типове светене). Последният етап от флуоресцентната микроскопия - анализът на АНА, се извършва задължително от минимум двама обучени специалисти, независимо един от друг, с цел да се избегне субективната преценка на човешкото око. Определянето на титъра на АНА (при силно положителните проби след съответните разреждания) се извършва, като за резултат се приема този титър на разреждане на пробата, при който тя свети със специфичен флуоресцентен образ над нивото на светене на негативната контрола на теста. Впоследствие се интерпретира и типът светене.

➤ Номенклатура и класификационно дърво според ICAP

Класификационното дърво за АНА ИИФ образи включва 29-типа светене, обозначени с код представен като абривиатурното съкращение - АС, означаващо anti cell pattern. Всяко светене е дефинирано и описано в детайли, като със символа -  се обозначава всеки тип светене, при който се оцветява специфично и хроматина на клетките в различна фаза на митоза. Светенията са разделени в 2 групи, оцветени в 2 цвята. Обозначените от експертите на ICAP с „бананово-оранжев” цвят светения са наречени още базови/основни (competent level). Те са 11 на брой класически, лесни за разпознаване, с клинична значимост и трябва да бъдат установявани от всички специалисти по клинична и лабораторна имунология, занимаващи се с доказване на АНА чрез ИИФ. Оцветените в „зелено-маслиново” 18 АС светения са обозначени като експертни. Те са трудни за разпознаване и повечето от тях нямат пряка клинична значимост.



Фигура 11. Класификационно дърво на специфичните имунофлуоресцентни образи според ICAP, наблюдавани при изследване на човешки серуми върху HEp-2 клетъчна линия.

Основната разлика между базово ниво и експертно ниво на разпознаване на АНА ИИФ се базира на два вида съображения:

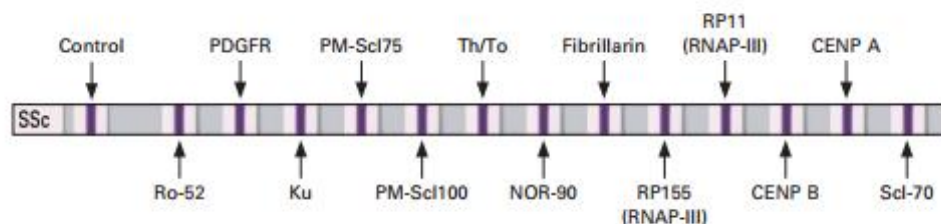
- Клиничната значимост и приложимост на типа светене за доказване на конкретно АНА анти тяло.
- Лесна разпознаваемост на светенето, дори и клиничната значимост да не е ясна към този момент.

На този етап, тези две съображения не са постоянна величина и търпят промени във времето. На Фигура 11 е представено първото класификационното дърво на ICAP.

4.2.2. Изследване на разширен панел от SSc-асоциирани ААт чрез имуноблот метод

Беше използват тест: EUROLINE Systemic Sclerosis (Nucleoli) Profile (IgG) (EUROIMMUN AG, Germany). Всяка една тест-лента съдържа панел от 13 различни склеродермни антигени: Scl-70, CENPA, CENPB, RNAP-III (11kDa), RNAP-III (155 kDa), Fibrillarin (U3-RNP), NOR90,

Th/To, PM/Scl-100. PM/Scl-75, Ku, PDGFR, Ro52 (фиг.12). Серумните проби на пациентите, както и положителната и отрицателната контроли на всяка серия, бяха изработени съобразно инструкциите на фирмата производител. Резултатите бяха отчетени и анализирани чрез софтуерна програма EUROLinScan.



Фигура 12. Разширен имуноблот тест за изследване на SSc – асоциирани ААт

- Необходими реактиви и консумативи
 - **Кат. No на диагностичния набор**
DL 1532 G EUROLINE Systemic Sclerosis (Nucleoli) Profile
 - **Съдържание на диагностичния набор:**
 - Тест ленти (16 бр.) натоварени със следните антигени: Scl-70, CENP-A, CENP-B, RNAP-11, RNAP-155 (RNA polymerase III), U3 RNP/fibrillarin, NOR90/hUBF, Th/To, PM/Scl-100. PM/Scl-75, Ku, PDGFR, Ro52. Готови за употреба.
 - Анти-АНА контроли: Отрицателна (NC), Cutoff контрола (CC, B), Положителна контрола (PC), човешко IgG, 100x концентрат, 1x0.02ml;
 - Буфер за разреждане на пробите, готов за употреба, 1x100 ml;
 - Ензимен конюгат, козе анти-човешко IgG, маркирано с алкална фосфатаза, 10x концентрат, 1x3 ml;
 - NBT/BCIP субстратен разтвор, готов за употреба;
 - Миещ разтвор, 10x концентрат, 1x50 ml;
 - Инкубационни ванички 2x8 канала.
- **Съхранение:**
Наборът се съхранява на 2 - 8°C.
- **Стабилност:** Китът е стабилен при температура 2 - 8 °C до изтичане срока на годност.
- **Начин на приготвяне:**

- Приготвяне на миеш разтвор - необходимият обем за 1 тест лента се получава чрез разреждане 1:10 с дестилитана вода (1ml миеш разтвор концентрат + 9 ml дестилирана вода). Приготвен работен буфер може да се съхранява до 1 месец в хладилник на 2-8°C.
- Пробите за изследване се разреждат 1:101 с буфера за разреждане на проби (15 µl серум + 1.5 ml буфер за проби). Смесват се добре на вортекс, а не се пипетират.
- Положителна контрола 100x концентрат: (15 µl PC + 1.5 ml буфер за проби).
- Ензим конюгат 10x: за една тест лента (0.15 ml ензим конюгат + 1.35 ml буфер за проби).

➤ Калибрация

Тестът е калибриран спрямо международно признато референтни серуми CDC-ANA 1-10 от „Центърът за контрол на заболяванията” Атланта, САЩ. Граничният титър за получаване на резултат е разреждане 1:101 на пробите.

➤ Качествен контрол

➤ Вътрешен качествен контрол се провежда във всяка серия.

Тестът е валиден ако:

1. Контролната ивица на всяка тест лента има силна цветна реакция (+++).
2. Върху положителната контрола се визуализират ленти, указани като брой и интензивност на цветната реакция в Сертификата за качествен контрол, приложен във всеки кит.

Ако някой от тези критерии не е изпълнен, серията се счита за невалидна и трябва да се повтори.

➤ Изпълнение на метода

Преди започване на процедурата на анализ целият кит се темперира за 30 мин на стайна температура (18 - 25° C).

1. Тест лентите се изваждат и поставят в инкубационните канали с означената маркировка нагоре. Накапват се по 1.5 ml буфер за проби във всеки от каналите върху тест лентите, за да се активират.
2. Инкубират се за 5 минути на стайна температура (20 - 28° C), на шейкър.
3. Течността се аспирира с вакуум помпата.
4. Накапва се по 1.5 ml от предварително разредените проби и положителна контрола.
5. Инкубират се за 30 минути на стайна температура (20 - 28° C), на шейкър.
6. Течността се аспирира с вакуум помпата и тест лентите се измиват 3x5 мин с по 1.5 ml миеш разтвор на шейкър.

7. Накапват се по 1.5 ml приготвения ензим конюгат. Инкубират се за 30 минути на стайна температура, на шейкър.
8. Течността се аспирира с вакуум помпата и тест лентите се измиват 3x5 мин с по 1.5 ml миеш разтвор на шейкър.
9. Накапват се по 1.5 ml субстратен разтвор. Инкубират се за 10 минути на стайна температура, на шейкър.
10. Течността се аспирира с вакуум помпата и тест лентите се измиват 3 пъти с по 1.5 ml дестилирана вода за стопиране на цветната реакция.
11. Анализ и оценка на получените резултати: чрез EUROLinScan софтуер.

➤ Изчисление

EUROLINE Systemic Sclerosis (Nucleoli) Profile е качествен метод и се определя по следния начин (табл. 12):

Таблица 12. Отчитане на резултата чрез софтуерна програма EUROLinScan, спрямо интензитета на отчетения сигнал

EUROLinScan софтуер отчитане на резултата	Интензитет на сигнала, отчетен чрез EUROLinScan софтуер	Резултат
(-) сигнал/липса на цветна ивица	0-5	0 Отрицателен
Изкл. слабо оцветена ивица	6-10	(+) Граничен
Средно или силно оцветена ивица	11-25 или 26-50	+, ++ Положителен
Изкл. силно оцветена ивица	>50	+++ Силно положителен

➤ Референтни интервали и начин на представяне на резултата:

Тестовите резултати се отчитат качествено като положителни, отрицателни или гранични за наличието на SSc – асоциирани ААт:

0 - Отрицателен

(+) - Граничен

+, ++ - Положителен

+++ - Силно положителен

4.2.3. Имуноензимни методи за определяне на цитокини в кръвен серум

За количествено определяне на IL-6, TGF-β1, IL-10, IL-17A и IL-23, в серумите на изследваните лица, използвахме търговски китове Human ELISA kit (Gene probe, Diaclone, France).

➤ **Общи принципи на метода:**

За по-голяма прегледност ще бъде представен общият принцип, на който се основават изброените имуноензимни методи. Методът е твърдо-фазова „сандвич” ELISA за *in vitro* количествено определяне на цитокини в биологични материали.

Гнездата на съответната микротитърна плака са натоварени с високоспецифични антитела срещу търсения цитокин. По време на първия инкубационен период се извършва свързване на цитокина, ако присъства в биологичния материал, към фиксираните върху гнездата на плаката антитела. През първия инкубационен етап или на следващ етап, в зависимост от спецификата на кита, се добавя второ биотинилирано анти-антитяло. Излишъкът от биологичния материал и второто антитяло се измиват. Следва инкубация с античовешко антитяло, белязано с конюгат (horse-radish peroxidase (HRP)-стрептавидин) и отново измиване на гнездата на плаката. Ензимната реакция се осъществява посредством добавяне на тетраметилбензидин (TMB)-субстрат с образуване на цветен продукт. Ензимната реакция се стопира, след което се извършва спектрофотометрично отчитане. Интензитетът на цветния продукт е правопропорционален на количеството цитокин в биологичната проба. Построява се стандартна крива според калибраторите на всеки кит и по нея се определя количеството на цитокин в тестваните проби.

➤ **Вътрешен качествен контрол и интерпретация на резултатите**

Вътрешният качествен контрол беше извършен посредством сравняване на получените стойности на калибраторите и контролите с приложените към всеки кит стойности. Тъй като за цитокините няма определени референтни граници нито в серум, нито в други биологични материали, стойностите на всяка проба са определени в pg/ml, без да се категоризират като положителни или отрицателни. Получените числа са използвани за последваща статистическа обработка.

4.2.3.1. Определяне на IL-6 чрез ELISA

За определяне на IL-6 в серум използвахме Human IL-6 ELISA kit (Gene probe, Diaclone, France). По данни на производителя аналитичната чувствителността на теста за детекция на IL-6 е 2 pg/ml.

- **Материали, предоставени в търговския набор**

96-гнездова микротитърна плака, два броя фолио за покриване на плаката, лиофилизиран стандарт с концентрация след възстановяването 200 pg/ml, една лиофилизирана контрола, 10-

пъти концентриран Standard Diluent Buffer, биотинилирано второ анти тяло и неговия дилуент, HRP-стрептавидин и неговия дилуент, 200-пъти концентриран Wash buffer, TMB-субстрат и стоп разтвор (H_2SO_4).

➤ **Изпълнение на метода**

Следвахме инструкциите на производителя, приложени в кита.

Работен протокол:

1. Разреждане на Standard Diluent Buffer 1:10 (1 ml Standard Diluent Buffer + 9 ml дестилирана вода).
2. Лиофилизираният стандарт се възстановява чрез добавяне на 1.44 ml от разредения Standard Diluent Buffer, което дава работна концентрация 200 pg/ml Приготвят се падащите разреждания на стандарта в отделни фиолки - съответно – 100, 50, 25, 12.5 и 6.25.
3. Лиофилизираната контрола се приготвя чрез добавяне на 1 ml разреден Standard Diluent Buffer. Пациентските проби не се разреждат.
4. Приготвяне на Wash разтвор (10 ml от концентрата се разтварят в 2 l дестилирана вода).
5. Приготвя се биотинилираното анти-анти тяло (240 µl от концентрата в 6360 µl от специалния за него дилуент).
6. 96-ямковата плака се накапва в повторения с по 100 µl от Standard Diluent Buffer (Blank), стандартите, контролата и пациентски проби.
7. Към всяко гнездо се добавят по 50 µl от предварително приготвеното биотинилирано анти тяло. Покрива се с фолио и се инкубира 1 час. 10 минути преди изтичане на времето се приготвя стрептавидина. Към едната фиолка (5 µl) се добавят 500 µl от специалния дилуент за него. В нова епруветка с капачка се прави последващо разреждане на стрептавидина - 10 ml от дилуента се смесват със 150 µl от разредения стрептавидин.
8. Измиване на плаката 3 пъти с по 300 µl във всяко гнездо и подсушаване.
9. Добавяне на 100 µl от разредения стрептавидин във всяко гнездо, покриване с фолио и инкубиране за 30 минути.
10. Измиване на плаката 3 пъти с по 300 µl във всяко гнездо и подсушаване.
11. Добавяне по 100 µl от готовия за употреба субстратен разтвор и инкубиране за 15-20 минути на тъмно.
12. Стопиране на ензимната реакция с по 100 µl стопиращ разтвор.
13. Отчитане на спектрофотометър при дължина на вълната 450/630 nm.
14. Построяване на стандартна крива и отпечатване на резултатите

Резултатите бяха отчетени на ELISA четец Stat fax 2100 на 450/630 nm и програма PGM с 6 стандарта и Blank. Получените стойности на оптична плътност на всяко гнездо бяха преизчислени като концентрация (pg/ml) съгласно построената калибрационна крива.

4.2.3.2. Определяне на TGF- β 1 чрез ELISA

За определяне на TGF- β 1 в серум използвахме Human TGF- β 1 ELISA kit (Gene probe, Diacclone, France). По данни на производителя аналитичната чувствителност на теста за детекция на TGF- β 1 е 9 pg/ml

27 Материали, предоставени в търговския набор

96-гнездова микротитърна плака, два броя фолио за покриване на плаката, лиофилизиран стандарт с концентрация след възстановяването 2000 pg/ml, 20-пъти концентриран Assay Buffer Concentrate, биотинилирано второ антитяло и неговия дилуент, HRP-стрептавидин и неговия дилуент, 20-пъти концентриран Wash Buffer Concentrate, TMB-субстрат, стоп разтвор (фосфорична киселина), 1N HCl, 1N NaOH, синьо, зелено и червено багрило.

➤ Изпълнение на метода

Следвахме инструкциите на производителя, приложени в кита. За улеснение при извършване на имуноензимния метод към кита са приложени и три бои - синя (за добавяне към Assay Buffer, с който ще бъдат разредени пробите. Те са съответно – 200 μ l синя боя към 50 ml буфер, който е предназначен за разреждане на пробите; зелена за добавяне към Assay Buffer, с който ще бъде разредено биотинилираното антитяло - 120 μ l зелена боя с 12 ml буфер и червена за добавяне към Assay Buffer, с който ще бъде разреден стрептавидина - 48 μ l червена боя с 12 ml буфер. Друга особеност на методиката е претретирането на пробите на пациентите.

Работен протокол:

1. Приготвяне на работна концентрация от Assay Buffer (5 ml + 95 ml дестилирана вода).
2. Пробите на пациентите се обработват по следния начин. Първоначално всяка проба се разрежда 1:10 с работния Assay Buffer, предварително оцветен със синьо багрило (180 μ l буфер + 20 μ l проба). Към 200 μ l от всяка така разредена проба се добавя по 20 μ l 1N HCl, като подкиселените проби престояват за 1 час на стайна Т. След това подкиселените проби се неутрализират с добавяне на 20 μ l 1N NaOH. Така пробите получават начално разреждане 1:10.
3. Лيوфилизираният стандарт се възстановява чрез добавяне на 0.40 ml от дестилирана вода, което дава работна концентрация 2000 pg/ml Приготвят се падащите разреждания на стандарта в отделни фиолки, съответно - 1000, 500, 250, 125, 62.5 и 31.25 pg/ml.

4. Приготвяне на работен Wash разтвор (50 ml от концентрата се разтварят в 950 ml дестилирана вода).
5. Първоначално плаката се измива петкратно с по 300 μ l Wash разтвор и след подсушаване се наcapва в повторения с по 100 μ l от разреждения и obагрeн в синьо Assay Buffer (Blank) и приготвените стандарти. В гнездата, предвидени за пациентските проби се наcapват по 60 μ l от разреждения и obагрeн в синьо Assay Buffer. Към пациентските гнезда се наcapват по 40 μ l от претретираните пациентски проби. Това дава крайно разреждане на пробите 1:30.
6. Плаката се покрива с фолио и се инкубира за 2 часа на ротатор със скорост 100 rpm на стайна T. 10 минути преди изтичане на времето за инкубация се приготвя биотинилираното анти-антитяло (120 μ l от концентрата в 11.88 ml от зелено obагрения Assay Buffer).
7. Измиване на плаката 5 пъти с по 300 μ l във всяко гнездо и подсушаване.
8. Към всяко гнездо се добавят по 100 μ l от предварително приготвеното биотинилирано анти-антитяло. Покрива се с фолио и се инкубира за 1 час на ротатор. 10 минути преди изтичане на времето за инкубация се приготвя стрептавидина (120 μ l от концентрата в 11.88 ml от червено obагрения Assay Buffer).
9. Измиване на плаката 5 пъти с по 300 μ l във всяко гнездо и подсушаване.
10. Добавяне на 100 μ l от разреждения стрептавидин във всяко гнездо, покриване с фолио и инкубиране за 1 час на ротатор със скорост 100 rpm на стайна T.
11. Измиване на плаката 5 пъти с по 300 μ l във всяко гнездо и подсушаване.
12. Добавяне по 100 μ l от готовия за употреба субстратен разтвор и инкубиране за 30 минути на тъмно, на ротатор, със скорост 100 rpm, на стайна T.
13. Стопиране на ензимната реакция с по 100 μ l стопиращ разтвор.
14. Отчитане на спектрофотометър при дължина на вълната 450/630 nm
15. Построяване на стандартна крива и отпечатване на резултатите.

Отчетохме плаката на ELISA четец Stat fax 2100 на 450/630 nm и програма PGM със 7 стандарта и Blank. Получените стойности на оптична плътност на всяко гнездо бяха преизчислени като концентрация (pg/ml) съгласно построената калибрационна крива и след това умножени по 30 предвид направените разреждания в процедурата.

4.2.3.3. Определяне на IL-10 чрез ELISA

За определяне на IL-10 в серум използвахме Human IL-10 ELISA kit (Gene probe, Diaclone, France). По данни на производителя аналитичната чувствителност на теста за детекция на IL-10 е 5 pg/ml.

➤ Материали, предоставени в търговския набор

96-гнездова микротитърна плака, два броя фолио за покриване на плаката, лиофилизиран стандарт с концентрация след възстановяването 400 pg/ml, една лиофилизирана контрола, 10-пъти концентриран Standard Diluent Buffer, биотинилирано второ анти тяло и неговия дилуент, HRP-стрептавидин и неговия дилуент, 200-пъти концентриран Wash buffer, TMB-субстрат и стоп разтвор (H_2SO_4).

➤ Изпълнение на метода:

Следвахме инструкциите на производителя, приложени в кита.

Работен протокол:

1. Разреждане на Standard Diluent Buffer 1:10 (1 ml Standard Diluent Buffer + 9 ml дестилирана вода).
2. Лيوфилизираният стандарт се възстановява чрез добавяне на 0.90 ml от разредения Standard Diluent Buffer, което дава работна концентрация 400 pg/ml. Приготвят се падащите разреждания на стандарта в отделни фиолки – съответно – 200, 100, 50, 25 и 12.5.
3. Лيوфилизираната контрола се приготвя чрез добавяне на 1 ml разреден Standard Diluent Buffer. Пациентските проби не се разреждат.
4. Приготвяне на Wash разтвор (10 ml от концентрата се разтварят в 2 l дестилирана вода).
5. Приготвя се биотинилираното анти-анти тяло (240 µl от концентрата в 6360 µl от специалния за него дилуент).
6. 96-ямковата плака се накапва в повторения с по 100 µl от Standard Diluent Buffer (Blank), стандартите, контролата и пациентски проби.
7. Към всяко гнездо се добавят по 50 µl от предварително приготвеното биотинилирано анти тяло. Покрива се с фолио и се инкубира за 2 часа. 10 минути преди изтичане на времето се приготвя стрептавидина. Към едната фиолка (5 µl) се добавят 500 µl от специалния дилуент за него. В нова епруветка с капачка се прави последващо разреждане на стрептавидина – 10 ml от дилуента се смесват със 150 µl от разредения стрептавидин.
8. Измиване на плаката 3 пъти с по 300 µl във всяко гнездо и подсушаване.
9. Добавяне на 100 µl от разредения стрептавидин във всяко гнездо, покриване с фолио и инкубиране за 30 минути.

10. Измиване на плаката 3 пъти с по 300 μ l във всяко гнездо и подсушаване.
11. Добавяне по 100 μ l от готовия за употреба субстратен разтвор и инкубиране за 15-20 минути на тъмно.
12. Стопиране на ензимната реакция с по 100 μ l стопиращ разтвор.
13. Отчитане на спектрофотометър при дължина на вълната 450/630 nm
14. Построяване на стандартна крива и отпечатване на резултатите.

Резултатите бяха отчетени на ELISA четец Stat fax 2100 на 450/630 nm и програма PGM с 6 стандарта и Blank. Получените стойности на оптична плътност на всяко гнездо бяха преизчислени като концентрация (pg/ml) съгласно построената калибрационна крива.

4.2.3.4. Определяне на IL-17A чрез ELISA

За определяне на IL-17A в серум използвахме Human IL-17A ELISA kit (Gene probe, Diaclone, France). По данни на производителя аналитичната чувствителност на теста за детекция на IL-17A е 2.3 pg/ml.

➤ **Материали, предоставени в търговския набор**

96-гнездова микротитърна плака, два броя фолио за покриване на плаката, лиофилизиран стандарт с концентрация след възстановяването 100 pg/ml, 10-пъти концентриран Standard Diluent Buffer, биотинилирано второ антителио и неговия дилуент, HRP-стрептавидин и неговия дилуент, 200-пъти концентриран Wash buffer, TMB-субстрат и стоп разтвор (H_2SO_4).

➤ **Изпълнение на метода**

Следвахме инструкциите на производителя, приложени в кита.

Работен протокол:

1. Разреждане на Standard Diluent Buffer 1:10 (1 ml Standard Diluent Buffer + 9 ml дестилирана вода).
2. Леофилизираният стандарт се възстановява чрез добавяне на 0.89 ml от разреждения Standard Diluent Buffer, което дава работна концентрация 100 pg/ml Приготвят се падащите разреждания на стандарта в отделни фиолки – съответно – 50, 25, 12.5, 6.25 и 3.125. Контрола в кита няма.
3. Пациентските проби се разреждат в отделни фиолки 1:2 (120 μ l от пробата се в 120 μ l от разреждения Standard Diluent Buffer).
4. Приготвяне на Wash разтвор (10 ml от концентрата се разтварят в 2 l дестилирана вода).

5. 96-ямковата плака се наcapва в повторения с по 100 μl от Standard Diluent Buffer (Blank), стандартите и разредените пациентски проби. Покрива се с фолио и се инкубира 2 часа на стайна Т. 10 минути преди изтичане на времето за инкубация се приготвя биотинилираното анти-антитяло (240 μl от концентрата в 6360 μl от специалния за него дилуент.
6. Измиване на плаката 3 пъти с по 300 μl във всяко гнездо и подсушаване.
7. Към всяко гнездо се добавят по 50 μl от предварително приготвеното биотинилирано антитяло. Покрива се с фолио и се инкубира 1 час. 10 минути преди изтичане на времето се приготвя стрептавидина. Към едната фиолка (5 μl) се добавят 500 μl от специалния дилуент за него. В нова епруветка с капачка се прави последващо разреждане на стрептавидина – 10 ml от дилуента се смесват със 150 μl от разредения стрептавидин.
8. Измиване на плаката 3 пъти с по 300 μl във всяко гнездо и подсушаване.
9. Добавяне на 100 μl от разредения стрептавидин във всяко гнездо, покриване с фолио и инкубиране за 30 минути.
10. Измиване на плаката 3 пъти с по 300 μl във всяко гнездо и подсушаване.
11. Добавяне по 100 μl от готовия за употреба Субстратен разтвор и инкубиране за 15-20 минути на тъмно.
12. Стопиране на ензимната реакция с по 100 μl стопиращ разтвор.
13. Отчитане на спектрофотометър при дължина на вълната 450/630

Резултатите бяха отчетени на ELISA четец Stat fax 2100 на 450/630 nm и програма PGM с 6 стандарта и Blank. Получените стойности на оптична плътност на всяко гнездо бяха преизчислени като концентрация (pg/ml) съгласно построената калибрационна крива. Получената концентрация на пробите беше умножена по дилуентен фактор 2 поради първоначалното разреждане.

4.2.3.5. Определяне на IL-23 чрез ELISA

За определяне на IL-23 в серум използвахме Human IL-23 ELISA kit (Gene probe, Diaclone, France). По данни на производителя аналитичната чувствителност на теста за детекция на IL-23 е 20 pg/ml.

➤ Материали, предоставени в търговския набор

96-гнездова микротитърна плака, два броя фолио за покриване на плаката, лиофилизиран стандарт с концентрация след възстановяването 400 pg/ml, 10-пъти концентриран Standard Diluent Buffer, биотинилирано второ антитяло и неговия дилуент, HRP-стрептавидин и неговия дилуент, 200-пъти концентриран Wash buffer,

ТМВ-субстрат и стоп разтвор (H_2SO_4).

➤ **Изпълнение на метода:**

Следвахме инструкциите на производителя, приложени в кита.

Работен протокол:

1. Разреждане на Standard Diluent Buffer 1:10 (1 ml Standard Diluent Buffer + 9 ml дестилирана вода).
 2. Лиофилизираният стандарт се възстановява чрез добавяне на 0.90 ml от разредения Standard Diluent Buffer, което дава работна концентрация 5000 pg/ml. Приготвят се падащите разреждания на стандарта в отделни фиолки – съответно – 2500, 1125, 625, 312.5 и 156.2 pg/ml. Пациентските проби не се разреждат.
 3. Приготвяне на Wash разтвор (10 ml от концентрата се разтварят в 2 l дестилирана вода).
 4. Приготвя се биотинилираното анти-антитяло (240 μ l от концентрата в 6360 μ l от специалния за него дилуент).
 5. 96-ямковата плака се накапва в повторения с по 100 μ l от Standard Diluent Buffer (Blank), стандартите, контролата и пациентски проби.
 6. Към всяко гнездо се добавят по 50 μ l от предварително приготвеното биотинилирано антитяло. Покрива се с фолио и се инкубира за 2 часа. 10 минути преди изтичане на времето се приготвя стрептавидина. Към едната фиолка (5 μ l) се добавят 500 μ l от специалния дилуент за него. В нова епруветка с капачка се прави последващо разреждане на стрептавидина – 10 ml от дилуента се смесват със 150 μ l от разредения стрептавидин.
 7. Измиване на плаката 3 пъти с по 300 μ l във всяко гнездо и подсушаване.
 8. Добавяне на 100 μ l от разредения стрептавидин във всяко гнездо, покриване с фолио и инкубиране за 30 минути.
 9. Измиване на плаката 3 пъти с по 300 μ l във всяко гнездо и подсушаване.
 10. Добавяне по 100 μ l от готовия за употреба Субстратен разтвор и инкубиране за 15-20 минути на тъмно.
 11. Стопиране на ензимната реакция с по 100 μ l стопиращ разтвор.
 12. Отчитане на спектрофотометър при дължина на вълната 450/630 nm
 13. Построяване на стандартна крива и отпечатване на резултатите.
- Резултатите бяха отчетени на ELISA четец Stat fax 2100 на 450/630 nm и програма PGM с 6 стандарта и Blank. Получените стойности на оптична плътност на всяко гнездо бяха преизчислени като концентрация (pg/ml) съгласно построената калибрационна крива.

4.2.4. Флоуцитометрично определяне на способност за активация на Т-лимфоцитите под въздействието на Phytohemagglutinin (PHA)-М в периферна кръв

В патогенезата на множество автоимунни заболявания се доказва участието на активирани Т лимфоцити в имунния отговор, както и прояви на някои патологични функционални изменения. Маркер за такава ранна активация е повърхностната експресия на молекулата CD69. Този маркер не се наблюдава при лимфоцити в покой, а е повърхностен маркер за ранна активация и пролиферация на Т, В-лимфоцити и NK клетки, който функционира като сигнал предаващ рецептор, за активация на клетката. Появява се на клетъчната повърхност 3-4 часа след стимулация с различни митогени, какъвто е и Phytohemagglutinin (PHA).

➤ Материал за изследване

2 ml пълна периферна венозна кръв.

➤ Изисквания на преданалитичния етап

Кръвта трябва да се маркира в рамките на 12 часа след вземането.

➤ Изисквания към пробовземането

Кръвта се взема асептично, чрез венепункция в LH 68 I.U. (зелена капачка) или хепаринов BD Vacutainer® (REF 368884) – 4ml. Може да се използва и цитрат-фосфат-декстозна епруветка.

➤ Начин на съхраняване

Антикоагулираната кръв може да се съхранява до 12 часа на стайна температура преди маркирането. Предварително фиксирани и запазени клетки не трябва да се използват.

➤ Аналитичен принцип

Чрез стимулация на хепаринизирана кръв *in vitro* с PHA в рамките на кратко време (4 часа) може да се докаже функционалната способност на лимфоцитите да се активират, като се определи чрез флоуцитометрия експресията на ранния повърхностен маркер на активация CD69. Когато към пълна човешка кръв се добави анти-CD3 (FITC маркирано)/CD69 (PE-маркирано) моноклонални антитела, флуорохром-маркираните антитела се свързват специфично към повърхностните лимфоцитни антигени. Оцветените проби се третираат с лизиращ разтвор за лизиране на еритроцитите, промиват се и се фиксират преди флоуцитометричен анализ. Пробите се отчитат, чрез Cell Quest software, като се преброяват 20 000 събития.

➤ **Използвана апаратура и други технически средства**

1. Флоуцитометър FACSCalibur.
2. Ниско оборотна центрофуга.
3. Вортекс миксер.
4. Полистиренови тест епруветки 12x7.5 mmBDFalcon.
5. Автоматични вариабилни пипети и мултипипетор.
6. CO2 инкубатор.

➤ **Необходими реактиви и консумативи:**

➤ ***Kat. No на диагностичния набор***

- PHA-M, Roche Diagnostics GmbH, L9132, Lot: 9008-97-3, Germany;
- Mouse anti-Human CD3 (FITC-маркирано), Cat: 556619, LOT 2240666, BD Pharmingen, USA;
- Mouse anti-CD69 (PE-маркирано) Cat: 557050, Lot: 2359712, BD Pharmingen, USA;
- BD FACS Lysing Solution, REF 349202 BD Pharmingen, USA;
- Фиксиращ разтвор- CellFIX (1 % разтвор на параформалдехид), pH 7.4. REF: 340181, Lot 1103401018.

➤ **Начин на приготвяне:**

Пригответените по описания по-долу начин лизиращ и фиксиращ разтвор, са използвани и за целите на всички останали флоуцитометрични изследвания.

➤ **10x концентриран лизиращ разтвор**

Реагентът съдържа 10x концентриран лизиращ разтвор с по-малко от 50% диетилен гликол и по-малко от 15% формалдехид. Съхранява се на 2 - 25° C. При употреба, се разрежда 1:10 с двойно дестилирана вода (Т 20 - 25° C). Ако се съхранява в стъклен контейнер на стайна температура, реагентът е стабилен за 1 месец.

➤ **10x концентриран фиксиращ разтвор**

Съхранява се на 20 - 25° C. При употреба, разрежда 1:10 с двойно дестилирана вода (Т 20 - 25° C). Ако се съхранява в стъклен контейнер на стайна температура реагентът е стабилен за 1 месец.

➤ Калибрация

Апаратът флуоцитометър е калибриран фабрично, но всеки ден при работа се препоръчва проверка на тази калибровка и чувствителност, както и евентуална настройка на фотомножителите чрез използването на набора CaliBRITE и програмата AutoCOMP, FACSCComp.

➤ Качествен контрол

Качественият контрол трябва да се провежда веднъж дневно при започване на работа (калибровка) и при изследването на всяка проба (вътрешна контрола за стабилност). При аквизиране трябва да се спазват следните критерии: минимум 2% от всички събития трябва да са Т лимфоцити. Трябва да има добро разграничаване между положителна и отрицателна популации на CD3 положителните клетки. Препоръчва се визуален контрол на оператора върху FSC/SSC и FL1/FL2 dotplot като се осигури коректно гейтиране на Т лимфоцитите.

➤ Процедура на анализа:

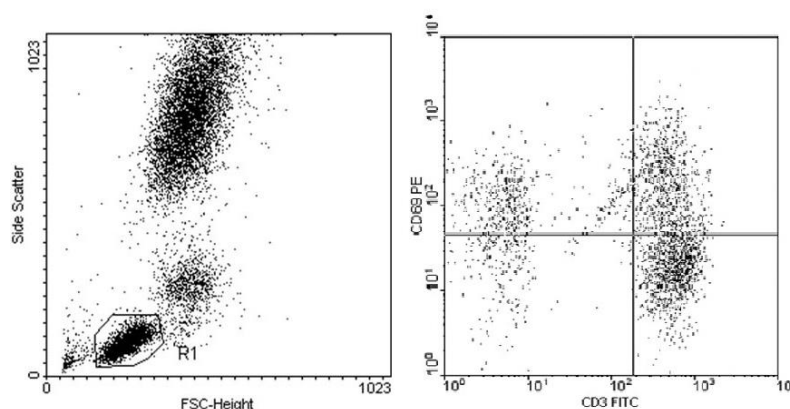
Инкубиране с РНА-М, маркиране и фиксиране на клетките

1. В две епруветки се накапват по 1 ml цяла кръв. Само към едната (стимулирана проба) се добавят 20µl РНА-М (20 µg/mL), предварително размразено. Другата е т.нар. нестимулирана проба.
2. Инкубиране за 4 часа на 37°C, 5% CO₂ в CO₂ инкубатор. Мануално разбъркване на всеки час.
3. 100 µl кръв от всяка епруветка се маркират с 20 µl CD3/FITC и 20 µl CD69/PE. Пробите се вортексират и инкубират за 20 минути, на стайна температура, на тъмно.
4. Лизиране с 2 ml Lysing разтвор (предварително разреден 1:10 в дестилирана вода), за 10 минути, на стайна температура, на тъмно.
5. Центрофугиране на 300 g /5мин. Отливане. Вортексиране.
6. Измиване с 2 ml Cell Wash разтвор (BD). Центрофугиране за 5 минути на 300 g на 20 – 25°C.
7. Декантиране на супернатантите. Вортексиране за 3 сек. на ниски обороти (3 пъти x 1 секунда).
8. Добавят се 250 µl CellFIX. Вортексиране за 3 сек. на ниски обороти.

Така приготвените проби могат да се съхраняват на 2 - 8°C, до 24 часа преди отчитането им с флуоцитометър. Преди анализа се вортексират добре.

➤ Флуоцитометрия

1. Флуоцитометърът се приготвя и калибрира с CaliBRITE частички и програма FACSCComp, като се нагласят PMT волтажите, флуоресцентната компенсация и чувствителността на детекторите.
2. Продължава се с двуцветна флуоцитометрия, като се използва CellQuest software. За да се определи процента на Т лимфоцитите, експресиращи CD69, гейт R1 се поставя върху лимфоцитния облак. Определя се % на CD3⁺CD69⁺ лимфоцити, съответно за стимулираната и нестимулираната проба на пациента (фиг.13).



Фигура 13. Определяне на Т клетките, експресиращи CD69. Първоначално се гейтира върху лимфоцитния облак, определен по физични параметри (R1, ляво). R1 се поставя в/у лимфоцитния облак. Определя се % на CD3⁺CD69⁺ лимфоцити, съответно за стимулираната и нестимулираната проба на изследваното лице. Т клетките, които експресират на повърхността си CD69, са дефинирани като активирани Т лимфоцити (горен десен квадрант на R2).

➤ Изчисление индекса на стимулация на Т клетките:

ИС - Индекс на стимулация:

$$\text{ИС} = \frac{\% \text{ активирани от РНА лимфоцити}}{\% \text{ спонтанно активирани Т лимфоцити}}$$

➤ Начин на представяне на резултата:

ИС – Индекс на стимулация:

1. ИС < 6.5 - намалена активация;
2. ИС > 6.5 - нормална активация;

➤ **Референтни интервали:**

6.5-30.2

Референтните интервали за индекса на стимулация на Т лимфоцитите са определени в Лаборатория по Клинична имунология през 2013 г. след изследване на 50 здрави лица.

4.2.5. Флоуцитометрично изследване на процент Th17 лимфоцити

➤ **Материал за изследване**

2 ml пълна периферна венозна кръв.

➤ **Изисквания на преданалитичния етап:**

Кръвта трябва да се маркира в рамките на 12 часа след вземането.

➤ **Изисквания към пробовземането:**

Кръвта се взема асептично, чрез венепункция в K2E BD-Plymouth. PL67BP. UK, 5 ml.

➤ **Начин на съхраняване**

Антикоагулираната кръв може да се съхранява до 12 часа на стайна температура преди маркирането. Предварително фиксирани и запазени клетки не трябва да се използват.

➤ **Използвана апаратура и други технически средства:**

1. Флоуцитометър FACSCalibur.
2. Ниско оборотна центрофуга.
3. Вортекс миксер.
4. Полистиренови тест епруветки 12x7.5 mm BD Falcon.
5. Автоматични вариабилни пипети и мултипипетор.

➤ **Необходими реактиви и консумативи:**

➤ Кат. No на диагностичния набор:

1. Mouse anti-Human CD3 (FITC-маркирано), Cat: 556619, LOT 2240666, BD Pharmingen, USA;
2. Mouse anti-Human CD4 (PerCP-маркирано), Cat: 347324, LOT 43969, BD Pharmingen, USA;
3. Mouse anti-Human CD161 (PE-маркирано) Cat: 556081, LOT: 6336962, BD Pharmingen, USA;
4. Mouse anti-Human CD196 (CCR6) (AlexaFluor647-маркирано) Cat: 556619, LOT: 5139987, BD Pharmingen, USA.

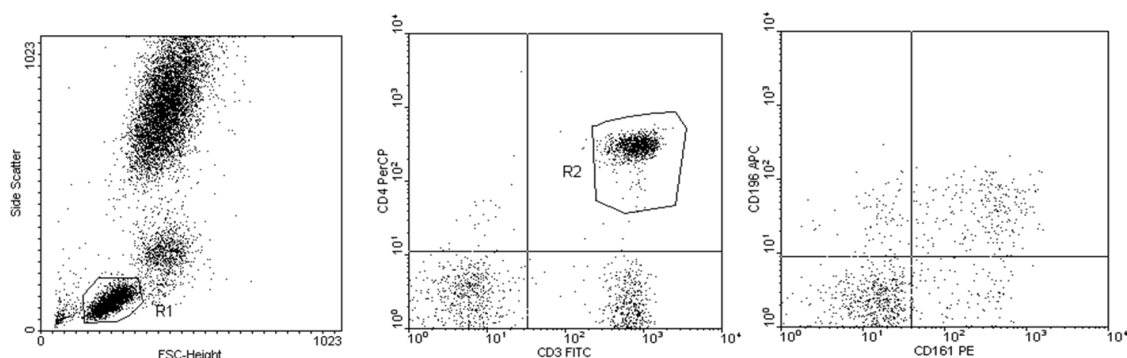
5. BD FACS Lysing Solution, REF 349202 BD Pharmingen, USA.
6. CellFix фиксиращ разтвор (1 % разтвор на параформалдехид), pH 7.4. REF: 340181, LOT: 1103401018.

➤ Изпълнение на метода:

Във флоуцитометрична епруветка се накапват по 20 μ l от всяко от четирите антитела CD3 (FITC), CD4 (PerCP), CD161 PE, CD196 Alexa Fluor (CCR6), заедно със 100 μ l пълна кръв. В контролната епруветка се накапват по 20 μ l CD3 (FITC) и 20 μ l CD4 (PerCP) и се добавя 100 μ l пълна кръв. Инкубиране за 30 минути на стайна температура, на тъмно. Добавят се по 2 ml лизиращ разтвор, след което следва 10 минути инкубация на тъмно. Следва центрофугиране на 1200 оборота, за 5 минути, отливане и вортиксиране. Миене с по 2 ml Wash разтвор, центрофугиране 1200 об/5 минути, отливане и вортиксиране. Добавяне на 200 μ l фиксиращ разтвор, а към контролната епруветка се добавят 400 μ l Fix. Отчитане на флоуцитометър.

➤ Отчитане на резултатите

Резултатите са отчетени на FACSCalibur флоуцитометър, като се преброяват 20 000 събития. За последващ анализ се използва софтуерна програма BD Cell Quest (фиг. 14)



Фигура 14. Фенотипно определяне на Th17 лимфоцити. На фигурата е представен репрезентативен пациент с IcSSc. Първоначално се гейтира върху лимфоцитния облак, определен по физични параметри (вляво). Вторият гейт се поставя върху CD3⁺CD4⁺ клетките (в средата). Т-хелперните клетки, които двойно експресират на повърхността си CD161 и CD196 (R3, горен десен квадрант), са дефинирани като Th17 лимфоцити.

➤ Калибрация

Апаратът флоуцитометър е калибриран фабрично, но всеки ден при работа се препоръчва проверка на тази калибровка и чувствителност, както и евентуална настройка на фотомножителите чрез използването на набора CaliBRITE и програмата AutoCOMP, FACSComp.

➤ Качествен контрол

Качественият контрол трябва да се провежда веднъж дневно при започване на работа (калибровка) и при изследването на всяка проба (вътрешна контрола за стабилност). При аквизиране трябва да се спазват следните критерии: минимум 2% от всички събития трябва да са Т лимфоцити. Трябва да има добро разграничаване между положителна и отрицателна популации на CD3положителните клетки. Препоръчва се визуален контрол на оператора върху FSC/SSCи FL1/FL2 dotplot като се осигури коректно гейтиране на Т лимфоцитите.

4.2.6. Флоуцитометрично определяне на процент на Tregs

➤ Материал за изследване

2 ml пълна периферна венозна кръв.

➤ Изисквания на преданалитичния етап

Кръвта трябва да се маркира в рамките на 12 часа след вземането.

➤ Изисквания към пробовземането

Кръвта се взема асептично, чрез венепункция в K2E BD-Plymouth. PL67BP, UK, 5 ml.

➤ Начин на съхраняване

Антикоагулираната кръв може да се съхранява до 24 часа на стайна температура преди маркирането. Предварително фиксирани и запазени клетки не трябва да се използват.

➤ Използвана апаратура и други технически средства:

1. Флоуцитометър FACSCalibur.
2. Ниско оборотна центрофуга.
3. Вортекс миксер.
4. Полистиренови тест епруветки 12x7.5 mmBD Falcon.
5. Автоматични вариабилни пипети и мултипипетор.

➤ **Необходими реактиви и консумативи:**

➤ ***Кат. No на диагностичния набор:***

1. Mouse anti-Human CD4 (PerCP-маркирано), Cat: 347324, LOT 43969, BD Pharmingen, USA;
2. Mouse anti-Human CD25 (FITC-маркирано), Cat: 345796, LOT 5139987, BD Pharmingen, USA.
3. Mouse anti-Human FoxP3 (PE-маркирано) Cat: 556619, LOT: 5139987, BD Pharmingen, USA.
4. Human FoxP3 Buffer A (10x), Cat: 51-9005451, LOT: 6356789, BD Pharmingen, USA.
5. Human FoxP3 Buffer B (50x), Cat: 50-9005450, LOT: 7153902, BD Pharmingen, USA.
6. BD FACS Lysing Solution, REF 349202, BD Pharmingen, USA.
7. CellFix фиксиращ разтвор (1 % разтвор на параформалдехид), pH 7.4. REF: 340181, LOT: 1103401018.

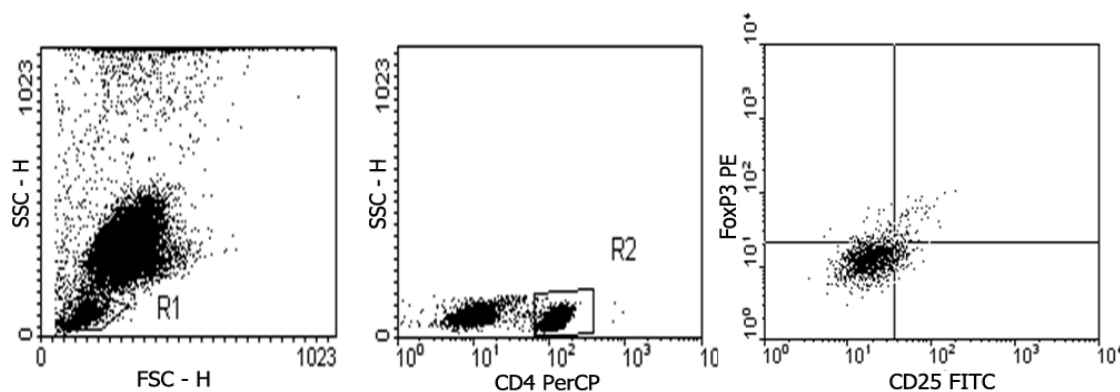
➤ **Изпълнение на метода:**

1. В епруветка се накапват по 20 µl CD4 (PerCP) и 20 µl CD25 (FITC), заедно със 100 µl пълна кръв. Контролната епруветка се приготвя по същия начин.
2. Инкубиране за 30 минути на стайна температура, на тъмно.
3. Добавят се по 2 ml лизиращ разтвор, след което следва 10 минути инкубация на тъмно. Следва центрофугиране на 1200 оборота, за 5 минути, отливане и вортексиране.
4. Миене с по 2 ml Wash разтвор, центрофугиране 1200об/5 минути, отливане и вортексиране.
5. Буфер А (1:10): за 2 епруветки: 4.5ml dH₂O + 500 µl буфер А. Към всяка епруветка се добавят по 2 ml от приготвения буфер А. Оставащият буфер А се използва на по-късен етап. Ресуспендиране с пипета. Инкубиране 20 минути, на стайна температура, на тъмно.
6. Центрофугиране на 1600об/ 5 мин. Отливане, ресуспендиране.
7. Миене с по 2 ml Wash разтвор. Центрофугиране на 1600об/5 мин. Отливане.
8. Ресуспендиране с пипета.
9. Буфер В (1:50): за 2 епруветки 20µl буфер В в 800 µl буфер А. От работния разтвор на буфер В във всяка епруветка се добавя по 0,5 ml. Ресуспендиране с пипета. Инкубиране 30 мин ,на стайна Т, на тъмно.
10. Ресуспендиране с пипета. Добавяне на 2 ml Wash разтвор. Центрофугиране на 1600об/5 мин. Отливане. Ресуспендиране с пипета.
11. Миене с по 2 ml Wash разтвор. Центрофугиране на 1600об/ 5 мин. Отливане.
12. Ресуспендиране с пипета.

13. Добавяне на 10µl анти-FoxP3 антитяло (PE). В контролната епруветка не се добавя антитяло срещу FoxP3. Инкубиране 30 мин, на стайна Т, на тъмно.
14. Ресуспендиране с пипета Добавяне на 2 ml Wash разтвор. Центрофугиране на 1600об/ 5 мин. Отливане. Ресуспендиране с пипета
15. Миене с по 2 ml Wash разтвор. Центрофугиране на 1600об/5 мин. Отливане. Ресуспендиране с пипета
16. Добавяне на 200µl фиксиращ разтвор, а към контролната епруветка се добавят 400µl Fix разтвор.
17. Отчитане на флуцитометър.

➤ Отчитане на резултатите

Резултатите са отчетени на FACSCalibur флуцитометър, като се преброяват 20 000 CD4⁺ клетки. За последващ анализ се използва софтуерна програма BD Cell Quest (фиг. 15).



Фигура 15. Фенотипно определяне на CD4⁺CD25^{+/-}FoxP3⁺ Т лимфоцити. На фигурата е представен репрезентативен пациент с dcSSc. Първоначално се гейтира върху лимфоцитния облак, определен по физични параметри (вляво). Вторият гейт се поставя върху CD4⁺ клетките (в средата). Десният плот е гейтиран по логичен гейт, направен чрез комбинация между гейт едно и гейт две. Наблюдават се (вдясно) две субпопулации CD4⁺FoxP3⁺ клетки, като се счита, че класическите Tregs са с висока експресия на CD25 (CD25 high, горен десен квадрант).

➤ Калибрация

Апаратът флуцитометър е калибриран фабрично, но всеки ден при работа се препоръчва проверка на тази калибровка и чувствителност, както и евентуална настройка на фотомножителите чрез използването на набора CaliBRITE и програмата AutoCOMP, FACSComp.

4.2.7. Статистически методи

Статистическият анализ на суровите данни беше извършен със специализирана програма за биостатистическа обработка на данни IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp. Released 2012 и MedCalc Software. Графичните изображения, представящи статистическите данни, са изготвени с помощта на SPSS Version 21.0 и GraphPad Prism 7.

4.2.7.1. Дескриптивна статистика

Използвахме методите на дескриптивната статистика за описание на демографската и клинична характеристика на пациентите, както и за представяне на данните от изследваните имунологични параметри с показателите на централната тенденция.

4.2.7.2. Тестове за определяне нормалността на разпределението (Kolmogorov–Smirnov, Shapiro-Wilk)

Извършихме проверка за нормалност на разпределението, тест за съответствие между емперичното и непрекъснато теоретично разпределение, използвайки тест на Kolmogorov–Smirnov и тест на Shapiro Wilk. Тестовите за определяне на вида разпределение бяха използвани за проверка дали данните за определен имунологичен параметър са с нормално разпределение. Видът разпределение определя дали ще бъдат използвани параметрични или непараметрични тестове за сравнение на извадки.

4.2.7.3. Параметрични тестове за свързани извадки (Т-тест на Student) и несвързани извадки (unpaired T-тест на Student)

Проведохме параметрични тестове за несвързани извадки при сравняване на серумните нива на цитокините TGF- β 1, IL-10, IL-23, както и при сравняване на процента активирани CD3⁺CD69⁺ клетки, Th17 клетки и Tregs, при пациенти и контролна група, както и между пациентите с dcSSc и lcSSc.

4.2.7.4. Непараметрични тестове за несвързани извадки (Mann-Whitney)

Непараметрични тестове за несвързани извадки бяха проведени (в случаите с данни за разпределение, различно от нормалното) при сравняване на серумните цитокинови нива на IL-6 и IL-17A между пациенти и контролна група, както и между пациентите с dcSSc и lcSSc.

4.2.7.5 Корелационен анализ: за изследване на зависимост между количествени величини

За данни с параметрично разпределение използвахме Pearson correlation coefficient, а за данни с непараметрично разпределение беше приложен Spearman's rank correlation coefficient.

4.2.7.6 Непараметрични методи за анализ на номинални данни: Използвахме тестове за асоциации: χ^2 (хи-квадрат) тест за независимост и пермутационен тест на Фишер.

4.2.7.7 Дисперсионен анализ - За да определим зависимост между категорийни и количествени признаци, използвахме ANOVA анализ.

4.2.7.8. Биноминален логистичен регресионен анализ

За да оценим връзката между определени фактори (наличие на ААт в серума на пациентите) и зависимата променлива (форма на SSc и вид органно засягане) приложихме логистичен регресионен анализ. Изчислихме отношението на шансовете (Odds Ratio, OR), което представлява приблизителна мярка на рисковото отношение за попадане в съответната категория. Стойностите на отношението на шансовете (OR) са представени със съответния 95% доверителен интервал (95% CI).

4.2.7.9. Определяне на чувствителност (SE), специфичност (SP), положителна (PPV) и отрицателна предсказателна стойност (NPV), отношение на положителна вероятност (LR⁺), отношение на отрицателна вероятност (LR⁻)

При определяне на SE, SP, PPV, NPV, LR⁺, LR⁻, на изследваните имунологични параметри, използвахме формулите (адаптирани по *Fundamentals of Biostatistics, Eight edition, Bernard Rosler, Harvard University, 2016*):

$$SE = \frac{\text{Бр. пациенти с положителен резултат}}{\text{Бр. пациенти с пол. резултат} + \text{Бр. пациенти с отр. резултат}} \times 100$$

$$SP = \frac{\text{Бр. здрави лица с отрицателен резултат}}{\text{Бр. здрави с пол. резултат} + \text{Бр. здрави с отр. резултат}} \times 100$$

$$PPV = \frac{\text{Бр. пациенти с положителен резултат}}{\text{Бр. пациенти с пол. резултат} + \text{Бр. здрави лица с пол. резултат}} \times 100$$

$$NPV = \frac{\text{Бр. здрави лица с отрицателен резултат}}{\text{Бр. здрави лица с отр. резултат} + \text{Бр. пациенти с отр. резултат}} \times 100$$

$$LR^+ = \frac{\text{Чувствителност}}{1 - \text{Специфичност}}$$

$$LR^- = \frac{1 - \text{Чувствителност}}{\text{Специфичност}}$$

5. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

5.1. Изследване на нови имунологични показатели в имунодиагностиката на SSc

5.1.1. Изследване на АНА в серума на болните със SSc чрез HEp-2 ИИФ – определяне на титър и тип имуофлуоресцен образ (АС - светене), съгласно Международния консенсус за АНА светения (ICAP)

В ниски титри АНА могат да се срещнат и при здрави хора, което повдига въпроса над какъв титър следва АНА да се приемат за положителни. Исторически, първоначалният титър, приеман за cut off, е бил 1:40, но с времето се е наложил постепенно 1:80, наречен още конвенционален титър. С натрупването на данни с литературата относно клиничната значимост на АНА, в контекста на системните автоимунни заболявания, започва преценка и на този титър, като все повече лаборатории в световен мащаб приемат, че 1:160 е реалният аналитичен титър, разграничаващ отрицателни от положителни резултати. Без да отрича факта, че 1:80 е твърде нисък cut off титър, други лаборатории намират 1:160 за прекалено висок праг. Поради това избират междинни титри като 1:100 или 1:120. Лаборатория по Клинична имунология на УМБАЛ „Св. Иван Рилски” дълго време използваше конвенционалния титър 1:80 за cut off титър. С натрупването на дългогодишен опит, екипът прецени клиничната значимост на АНА титъра и се спря на диагностичен cut off 1:160. За да се постигне синхронизиране на резултатите между всички университетски лаборатории по клинична имунология, този въпрос бе предмет на обсъждане на Общо събрание, организирано от Българската асоциация по клинична имунология през декември 2017г.

Предвид гореизложеното, в настоящия дисертационен труд, при определяне наличието на АНА в серумите на пациентите със SSc и на здравите лица, за cut off титър бе приет 1:160. Наличието на АНА над серумно разреждане 1:160 бе възприето за положителен резултат. Проби с титър < 1:160 бяха тълкувани като отрицателни за АНА.

Положителни АНА бяха намерени при 86 (94.5%) от пациентите със SSc (табл.13), което отговаря на докладваните до момента резултати от литературата (Steen 2005, Walker et al. 2007, Mehra et al. 2013). Villalta et al. 2012 съобщават за положителни АНА при 89% от изследваната италианска кохорта от пациенти със SSc, а при Liaskos et al. 2017 процентът на АНА - положителните пациенти достига до 97.7%, при проведено проучване в гръцката популация от пациенти със SSc. От 86-те АНА – положителни пациента, 77 (89.5%) имат потвърдени чрез имуоблот метод SSc - специфични АНА. Останалите 9 пациента (10.5%) имат следното

разпределение: при 7 болни (8.1% от всички АНА - положителни пациенти със SSc) не се открива нито едно SSc-специфично или друго АНА, изследвано чрез имуноблот метод; при останалите 2-ма болни (2.3% от всички АНА - положителни пациенти със SSc, единственото положително АНА е анти-Ro52, като прави впечатление фенотипното сходство между пациентите - женски пол, lcSSc и наличие на ИББ.

Подробна разбивка на АНА титъра и видовете имунофлуоресцентен образ (АС-светене), според ICAP, при изследваните от нас пациенти със SSc, е представена в Таблица 13. Прави впечатление, че мнозинството от пациентите (84) са с висок титър на АНА 1:640 или $\geq 1:1280$, а едва 2 (2.2%) от изследваните болни имат слабо положителни АНА.

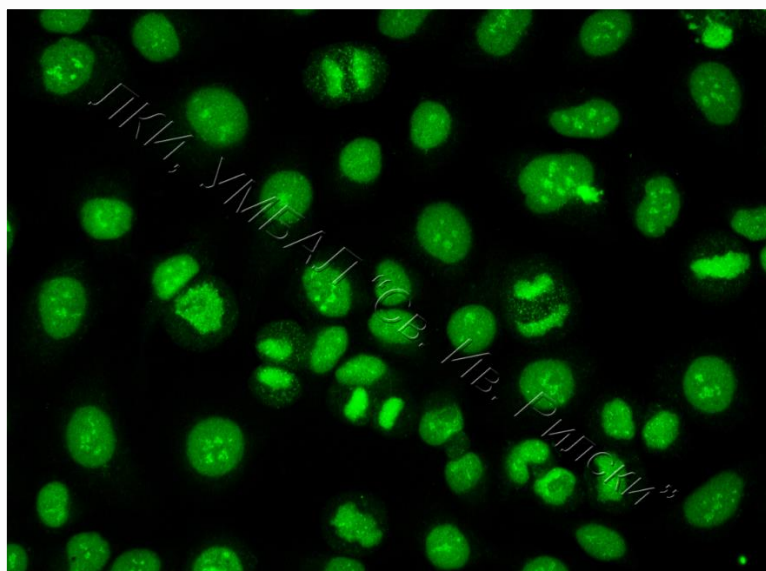
Таблица 13. АНА титър и имунофлуоресцентен образ при пациентите със SSc. Данните са представени като брой (%)

АНА	Брой SSc пациенти	% SSc пациенти
АНА $\leq 1:160$ (отрицателни)	5	5.5%
АНА $>1:160$ (положителни)	86	94.5%
Сред АНА положителните:		
АНА 1:320	2	2.3% (2.2% от всички SSc пациенти)
АНА 1:640	9	10.5% (9.9% от всички SSc пациенти)
АНА $\geq 1:1280$	75	87.2% (82.4% от всички SSc пациенти)
ИИФ образ според ICAP:		
АС-3	13	14%
АС-4	8	9%
АС-5	10	11%
АС-8	17	19%
АС-9	5	5.5%
АС-10	3	3%
АС-29	27	30%
Смесен ИИФ образ	8	8.5%

По отношение на наблюдаваните имунофлуоресцентни образи, най-често наблюдавахме наскоро добавения в номенклатурата на ICAP комбиниран тип светене АС-29, който открихме при 30% от изследваните пациенти със SSc и е характерен за АТА (фиг. 16). АС-29 комбинираният образ се състои от оцветяване на 5 субклетъчни региона:

- Изразено фино петнисто оцветяване, АС-4 на нуклеоплазмата на интерфазните клетки;
- Плътено и силно изразено фино петнисто оцветяване на кондензирания хроматин в митотичните клетки. В зависимост от серумното разреждане, митотичният хроматин може да свети хомогенно;
- Ярво светене на двойките точки (2) от т.нар. региони на нуклеоларния организатор (NOR), присъединени към кондензирания хроматин в митотичните клетки;

- Слабо цитоплазмено светене на интерфазните (и митотичните) клетки, изобразяващо деликатната мрежа, излъчваща се от перинуклеарната област към плазмената мембрана;
- Вариращо оцветяване на нуклеолите, което може да се визуализира като пунктатно нуклеоларно или перинуклеоларно светене в интерфазните клетки. Нуклеоларното светене не е универсален белег на AC-29 (Andrade et al. 2018);

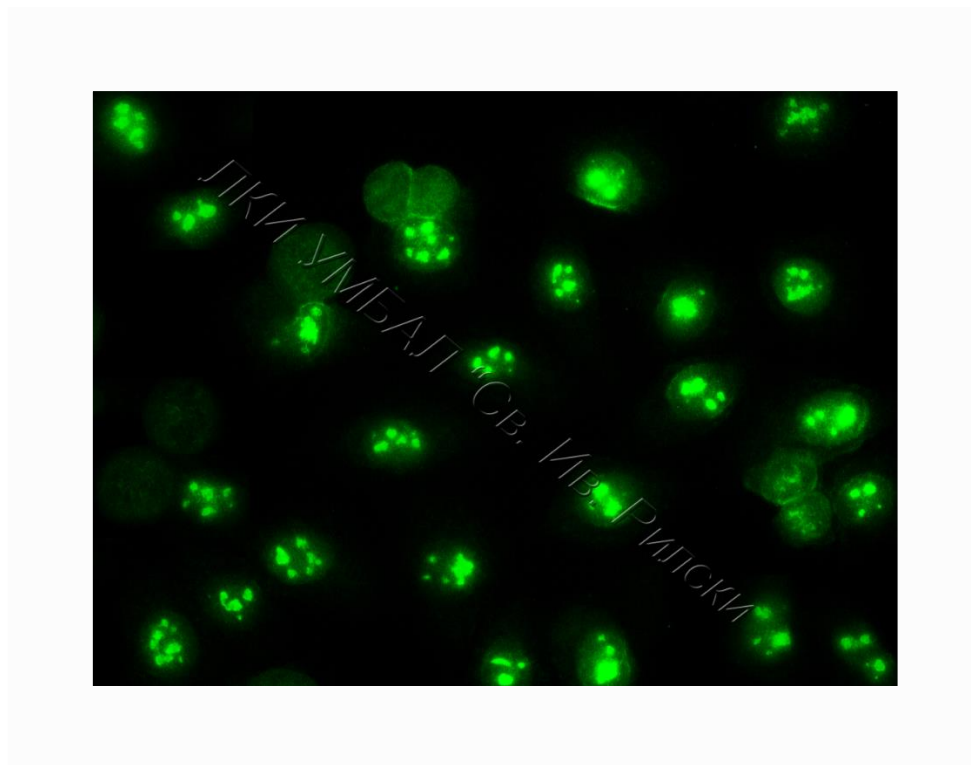


Фигура 16. AC-29 тип светене. Представеният серум от пациент със dcSSc, съдържа АТА, увеличение 40х/0,65

Вторият по честота ИИФ образ при пациентите със SSc беше хомогенното нуклеоларно светене, което наблюдавахме при 19% от изследваната кохорта, класифицирано като AC-8 според ICAP (фиг. 17):

- Дифузно оцветяване на ядрцата (нуклеолите) на ядрата на всички интерфазни клетки;
- Позитивни нуклеоли;
- Негативни клетки в митоза (метафаза, анафаза, телофаза);
- Негативен митотичен апарат;
- Негативна цитоплазма при всички клетки;

Таргетни аутоантигени: PM/Scl-75, PM/Scl-100, Th/To, B23/nucleolin, Nop52/SC6;

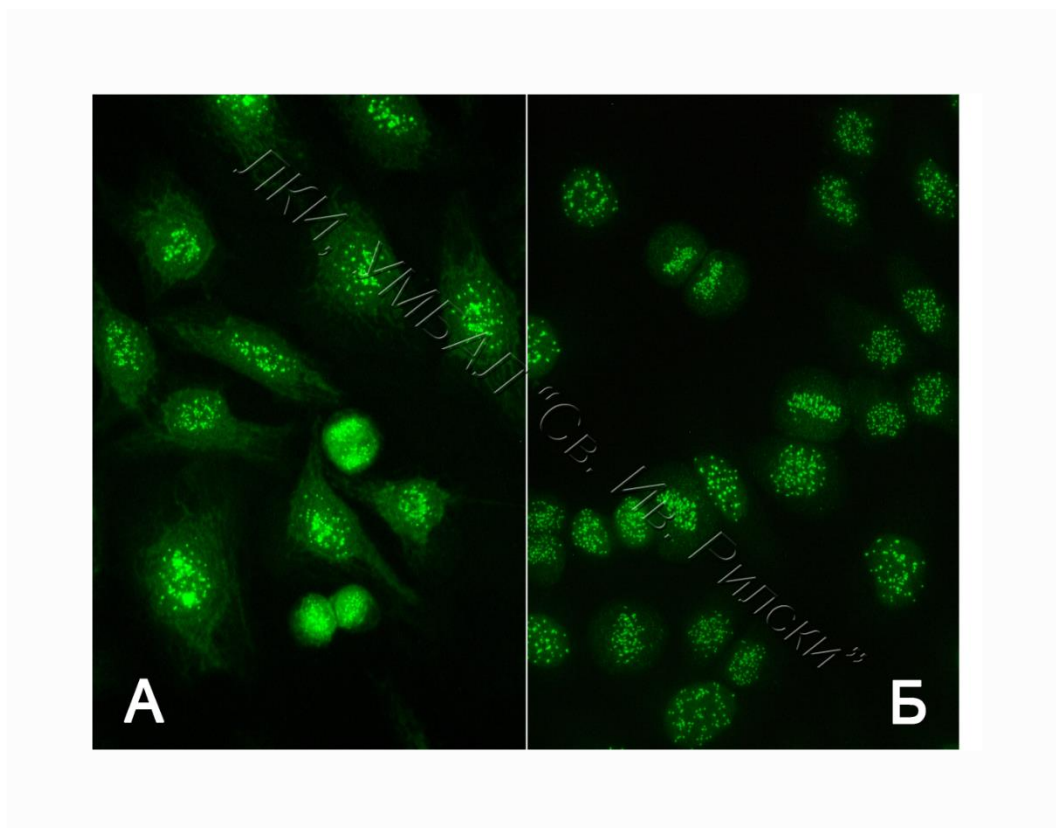


Фигура 17. AC-8 тип светене. Представеният серум от пациент със SSc съдържа анти-Th/To ААт, увеличение 40х/0,65

Следващ по честота сред изследваната от нас кохорта от SSc пациенти беше центромерният (кинетохорен) тип оцветяване, класифициран като AC-3 според ICAP (фиг. 18) и притежаващ следните характеристики:

- Дискретни, едри точки (40-80 на клетка), разпилени в ядрата на интерфазните клетки;
- Негативни нулеоли;
- Клетки в митоза (метафаза, анафаза, телофаза): Дискретни, едри точки (40-80/клетка), подредени спрямо митотичния апарат на клетките в митотична фаза (метафаза, анафаза, телофаза);
- Негативен митотичен апарат;
- Негативна цитоплазма при всички клетки;

Таргетни аутоантигени: CENP-A/B;

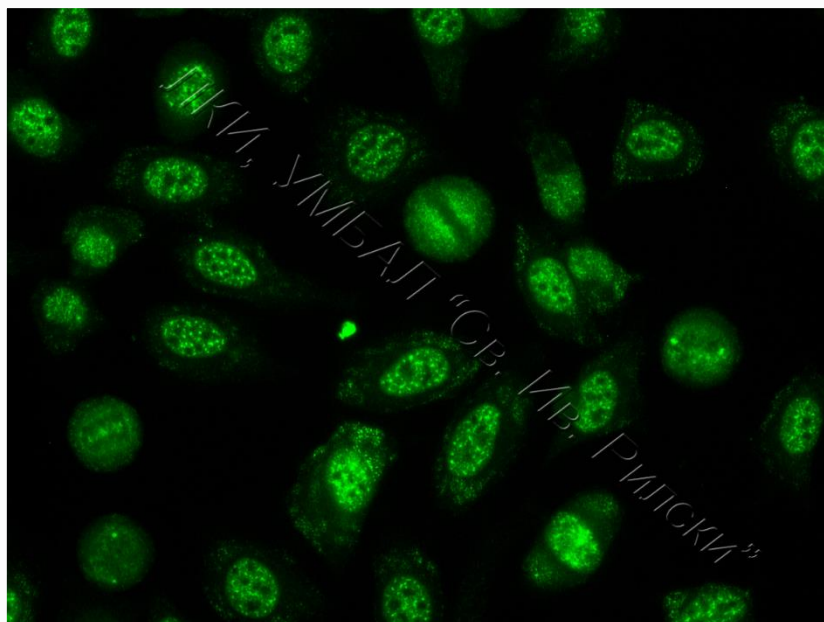


**Фигура 18. AC-3 тип светене. А - Пациент със SSc и положителни анти-CENP-A ААт;
Б - Пациент със SSc и положителни анти-CENP-B ААт, увеличение 40x/0,65**

При 11% от болните със SSc наблюдавахме ядрено едро петнисто (ядрен матрикс) светене, AC-5 според класификацията на ICAP (фиг. 19), което се характеризира по следния начин:

- Едро, грубо петнисто светене на ядрата на всички ядра.
- Ядърца: Негативни/позитивни нуклеоли;
- Липса на оцветяване на хроматина в различните фази на митозата. Наличие на „призрачни“ клетки.
- Негативен митотичен апарат;
- Негативна цитоплазма при всички клетки;

Таргетни аутоантигени: *hnRNP, U1RNP, RNP/Sm, Sm, RNA polymerase III*;

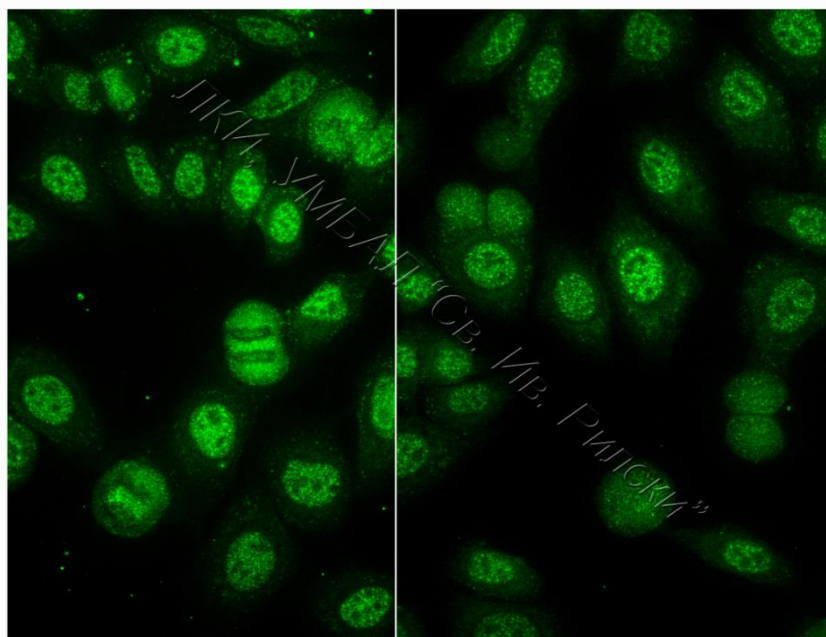


Фигура 19. AC-5 тип светене. Представеният серум е на пациент с dcSSc и съдържа анти-RNAP III ААт, увеличение 40х/0,65

При 9% от изследваните пациенти наблюдаваният ИИФ образ беше ядреното фино петнисто (фино гранулирано) осветяване, класифицирано като AC-4 според ICAP (фиг. 20) и характеризиращо се с:

- Фино петнисто светене на всички ядра на интерфазните клетки с малък размер на точките;
- Негативни ядърца;
- Клетки в митоза (метафаза, анафаза, телофаза): Липса на оцветяване на хроматина на клетките в митоза. Наличие на „призрачни“ клетки;
- Негативен митотичен апарат;
- Негативна цитоплазма при всички клетки;

Таргетни аутоантигени: *SS-A/Ro 60, SS-B/La, Mi-2, TIF1 γ , TIF1 β , Ku;*

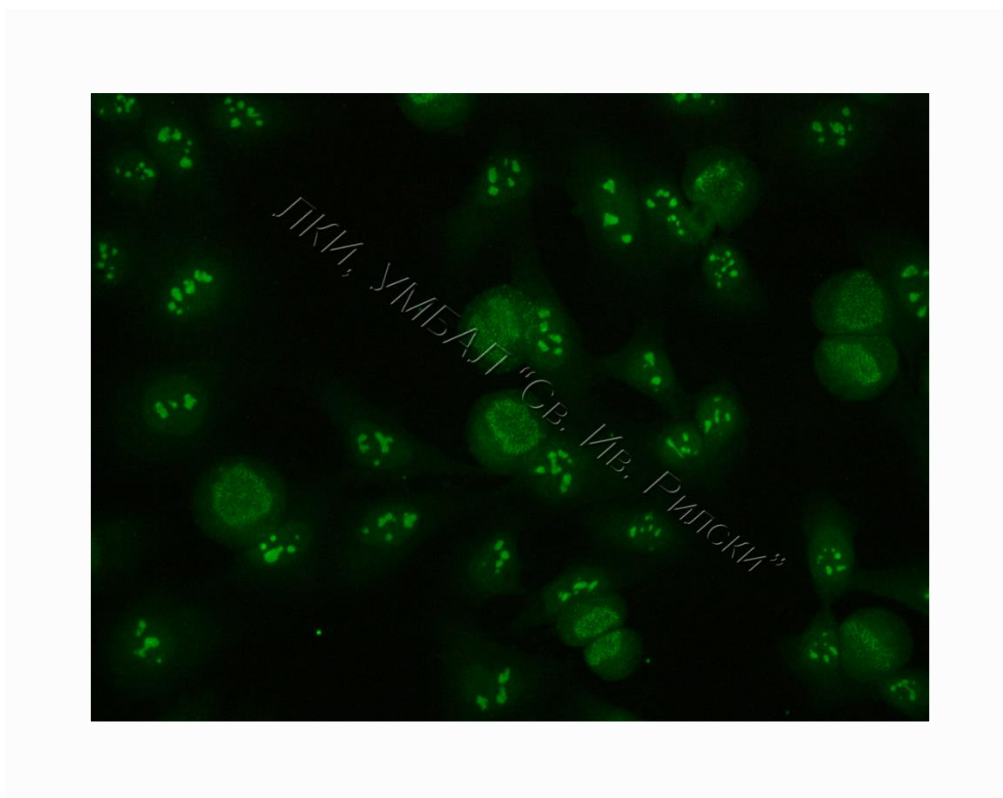


Фигура 20. AC-4 тип светене. Представеният серум е на пациент със lcSSc и съдържа анти-Ku и анти-Ro52 ААт, увеличение 40x/0,65

При 5.5% от пациентите със SSc се наблюдаваше туфесто нуклеоларно оцветяване, класифицирано като AC-9 според ICAP, (фиг. 21) което се определя по следния начин:

- Ядра на интерфазните клетки: Неравномерно оцветяване на ядърцата в ядрата на интерфазните клетки и наличие на телца на Cajal;
- Позитивни нуклеоли;
- Перихромозомно оцветяване на метафазните плочки на клетките в митоза;
- Негативен митотичен апарат;
- Негативна цитоплазма при всички клетки;

Таргетни аутоантигени: U3-snoRNP/fibrillarin;

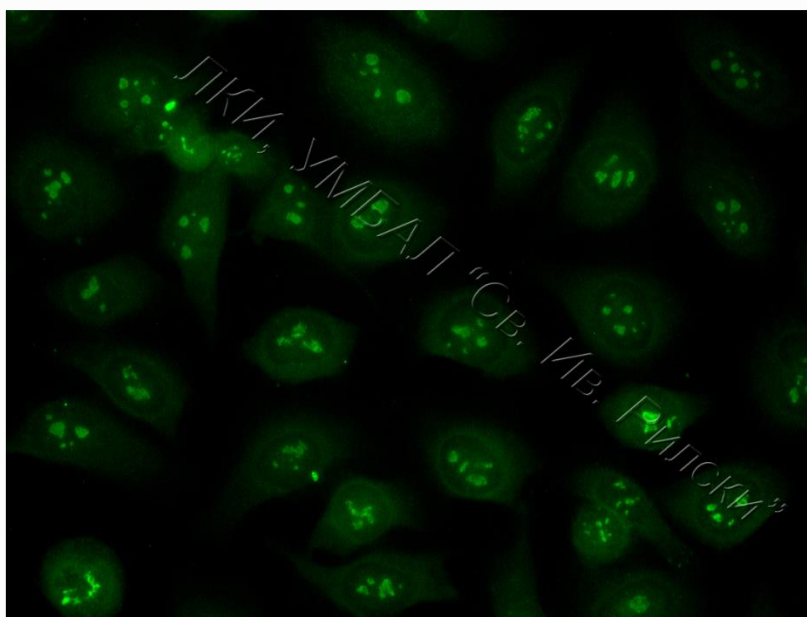


Фигура 21. AC-9 тип светене. Представеният серум е на пациент с dcSSc и съдържа антитела срещу U3-snoRNP/fibrillarin ААт, увеличение 40х/0,65

При 3% от пациентите със SSc наблюдавахме петнисто нуклеоларно оцветяване на ядрата на HEp-2 клетките, класифицирано като AC-10 според номенклатурата на ICAP (фиг. 22), със следните характеристики:

- Ядра на интерфазните клетки: Ясно видими точки, наблюдавани в нуклеолите на интерфазните клетъчни ядра;
- Позитивни ядърца;
- В метафазните митотични клетки могат да се видят до 5 ярки двойки точки от т.нар. области на нуклеоларния организатор (NOR);
- Негативен митотичен апарат;
- Цитоплазмата на митотичните клетки може да бъде леко положителна;

Таргетни автоантигени: RNAP I, huBF/NOR90;

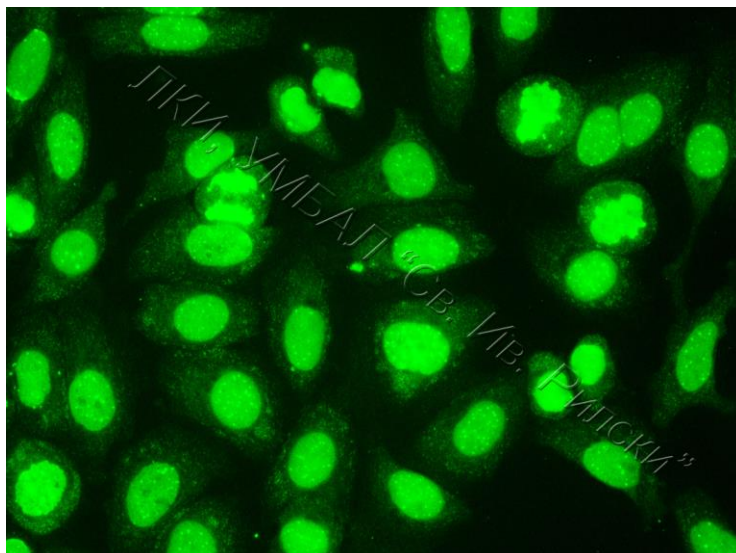


Фигура 22. AC-10 тип светене. Представеният серум е на пациент с lcSSc и съдържа анти-NOR90 ААт, увеличение 40х/0,65

При останалите 8.5% от АНА - положителните пациенти със SSc, наблюдавахме смесен имунофлуоресцентен образ, съставен от поне два вида ядрено оцветяване. Смесеният тип светения представляват предизвикателство дори и за най-опитните специалисти, тъй като предполага да бъдат разпознати различни класически AC-светения, които формират смесен образ, в това число цитоплазмения митотични, особено при съпоставим титър на отделните ААт. Допълнителна комплексност внасят и случаите на т. нар. „прозонов ефект“ на ниските разреждания, дължащ се на голямо количество ААт, както и когато таргетните автоантигени са локализирани в една и съща клетъчна структура от ядрото или цитоплазмата на клетките. В серумите на изследваните от нашия екип SSc пациенти, бяха наблюдавани смесени ИИФ образи, сред които:

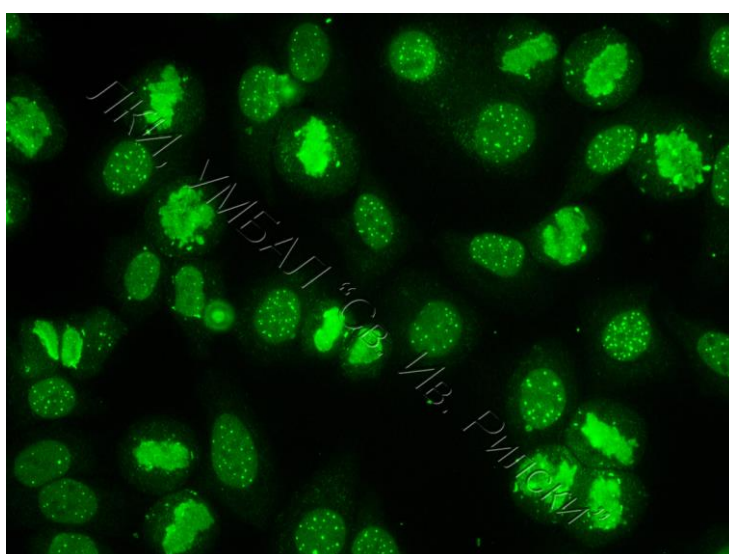
- **Смесен тип светене включващ: AC-1, AC-6, AC-29**

Доказани специфични АНА: ATA, dsDNA, promyelocytic leukaemia protein (PML), soluble acidic protein 100 kDa (sp100);



Фигура 23. ИИФ на HEp-2 клетки, увеличение 40x/0,65. Микрофотографията демонстрира смесен тип светене включващ: AC-1, AC-6, AC-29, разреждане 1:80

При скрининговото разреждане 1:80 (фиг. 23) на дадения серум в интерфазните ядра се наблюдава, както хомогенно оцветяване, дължащо се анти-dsDNA ААт и на АТА (съответно AC-1 и AC-29), така и ясно се отграничават множество добре очертани точки, типични за AC-6 (анти-PML, анти-sp100). Клетките в различен стадий на митоза показват образ, характерен за AC-1 и комбинирания тип светене AC-29. Наблюдава се слабо (фино петнисто) цитоплазмено оцветяване без доказан автоантиген.

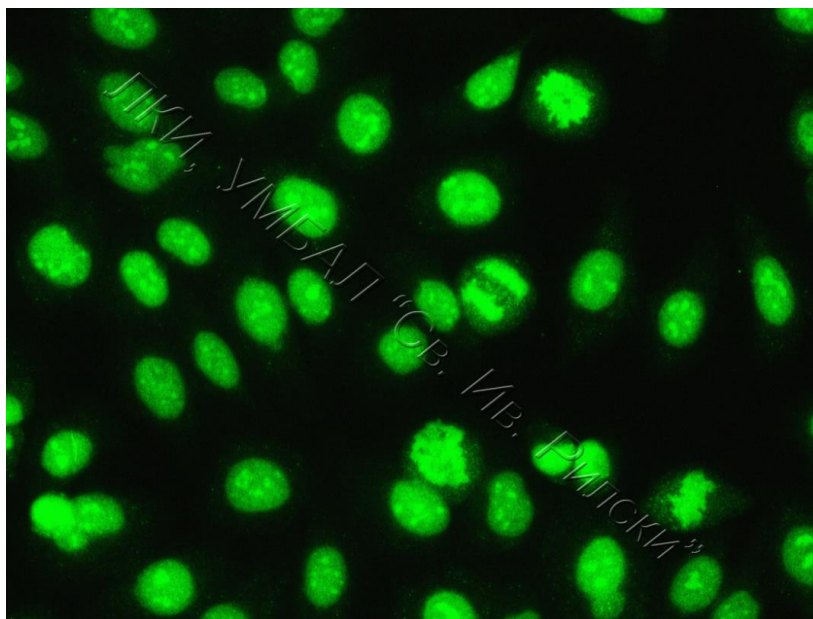


Фигура 24. ИИФ на HEp-2 клетки, увеличение 40x/0,65. Микрофотографията демонстрира смесен тип светене включващ: AC-1, AC-6, AC-29, разреждане 1:320

При разреждане 1:320 на същия серум се наблюдава отслабване на хомогенния, AC-1 тип светене и акцентиране на множеството точки (AC-6) в ядрата на интерфазните клетки (фиг. 24). Продължава силното хиалиноподобно оцветяване на клетъчния хроматин в различен стадий на митоза. Това е много характерен белег за AC-1 и AC-29, като обикновено се наблюдава при високи титри на разреждане и се характеризира с изчерпване на флуоресцентното светене на интерфазните ядра, дори и под нивото на негативната контрола. При този титър на разреждане вече липсва наблюдаваното при титър 1:80 оцветяване на цитоплазмата. На този етап, конкретният пациент беше с поставена диагноза SSc и нямаше данни за развитие на PBC. По литературни данни, ААт срещу PML и sp100 могат да се открият в нисък процент при различни СЗСТ: 5% при SSc, 10% при СЛЕ, 2% при синдром на Sjogren и 3% при РА (Muratori P. et al. 2002, Chan et al. 2015). Положителна предсказателна стойност на анти-PML и анти-sp100 ААт се коментира само относно появата на PBC.

- **Смесен тип светене включващ: AC-29 и анти-Ro52 - подобно светене**

Доказани специфични ААт срещу: Scl-70, Ro52;



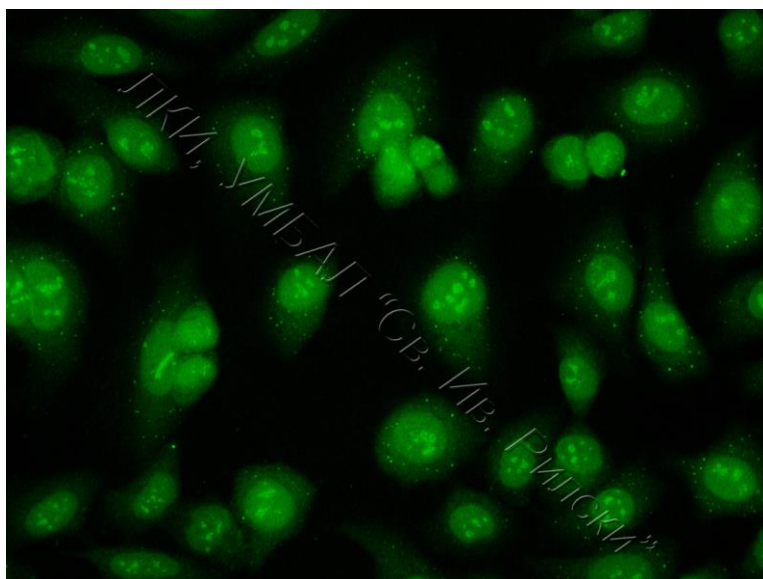
Фигура 25. ИИФ на HEp-2 клетки, увеличение 40x/0,65. Микрофотографията демонстрира смесен тип светене включващ: AC-29 и анти-Ro52 – подобно светене, разреждане 1:80

При скрининговото разреждане 1:80 на дадения серум в интерфазните ядра се наблюдава фино петнисто оцветяване с подчертаване на ядърцата, дължащо се на високата стойност на АТА (фиг. 25). Във фино петнистото оцветяване най-вероятно вземат участие и анти-Ro52 ААт (които имат много висока стойност, потвърдени чрез имуоблот метод), но това твърдение все

пак е спекулативно, защото тези ААт могат да бъдат и негативни при изследване чрез Нер-2 ИИФ. Впечатление прави леко „замъгления“ образ на интерфазните ядра, което също може да се дължи на много високите стойности на анти-Ro52 ААт. Позитивирането на последните зависи от вида на субстрата, използваните фиксатори, вида на конюгата и рН на разтворите. Клетките в различен стадий на митоза показват комбиниран образ, характерен за AC-29. Конкретният пациент беше с верифицирана диагноза SSc, със силно изразена васкулитна компонента и хронични дигитални улцерации.

- **Смесен тип светене включващ: AC-1, AC-9, AC-18, AC-19**

Доказани специфични ААт срещу: dsDNA, fibrillarin, Rib-P

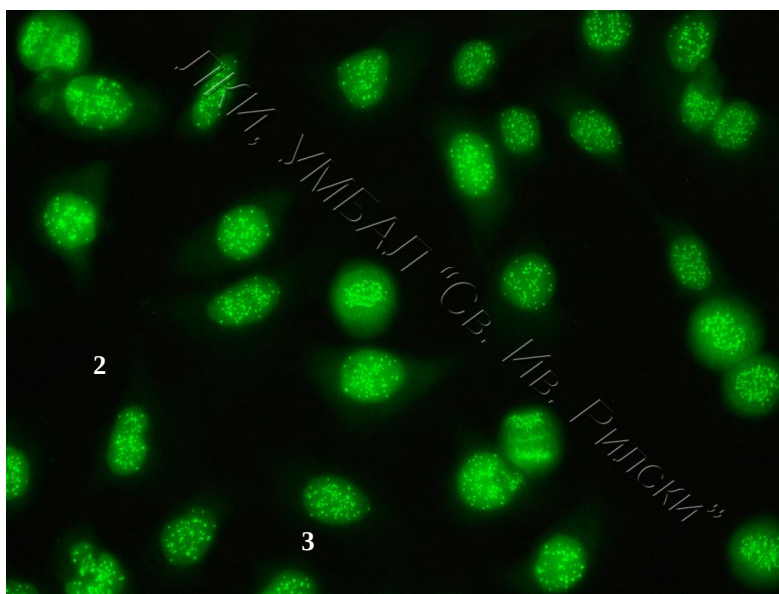


Фигура 26. ИИФ на Нер-2 клетки, увеличение 40x/0,65. Микрофотографията демонстрира смесен тип светене включващ: AC-1, AC-9, AC-18, AC-19, разреждане 1:80

При скрининговото разреждане 1:80 на дадения серум в интерфазните ядра се наблюдава комбинация от типичното хомогенно светене, дължащо се на анти-dsDNA ААт (AC-1) и неравномерно оцветяване на ядърцата (нуклеолите) с наличие на телца на Cajal (фиг. 26). В цитоплазмата се наблюдава типичното „облачно“ - фино петнисто светене, характерно за антителата срещу Rib-P, но и наличието на GW телца. В миналото антителата срещу тези телца са наричани анти-лизозомални и се срещат при пациенти с РВС, СЗСТ, неврологични и други автоимунни болести. Конкретният пациент, към момента на изследването, бе единствено с диагноза SSc.

- Смесен тип светене включващ: АС-3 и неклассифицирано светене, вероятно дължащо се на анти-Ro52 ААт

Доказани специфични ААт: CENP-B, Ro52



Фигура 27. ИИФ на HEp-2 клетки, увеличение 40x/0,65. Микрофотографията демонстрира смесен тип светене включващ: АС-3 и неклассифицирано светене, вероятно дължащо се на анти-Ro52 ААт, разреждане 1:80

При скрининговото разреждане 1:80 на дадения серум на HEp-2 клетките се наблюдава анти-CENP-B-подобно (АС-3) светене с добре акцентирани центромери, както в интерфазните ядра, така и при различните митотични фази. Добре се визуализират центромерите в профаза (1), ранна метафаза (2), и анафаза (3) (фиг. 27). Наблюдава се и фоново хомогенно светене на интерфазните ядра, без характерното за него хиалиноподобно оцветяване на хроматина в дележните форми на HEp-2 клетките и с негативни резултати за специфични ААт, класифицирани според ICAP като АС-1. В литературата няма данни за асоциация на такъв тип хомогенно-подобно светене с анти-Ro52 ААт. Конкретният пациент е с lcSSc.

По отношение на изследваната контролна група от пациенти с други СЗСТ, АНА - положителни бяха серумите на 18 лица (47%), като разпределението на резултатите по титър на серумно разреждане, са представени на Таблица 14. При сравняване на процента АНА - положителни серуми, между двете групи изследвани пациенти, се наблюдаваше сигнификантна разлика в полза на пациентите със SSc (88% спрямо 47%, $p = 0.001$, $r = 0.63$). Тук следва да се

отбележи, като лимитация на използвания от екипа ни подход, че изследваната контролна група от пациенти с други СЗСТ не беше равностойна по големина на групата от пациенти със SSc, както и, че не може да бъде възприета за репрезентативна, по отношение на всички СЗСТ, тъй като не бяха представени всички системни колагенози. Въпреки това, големината на ефекта (r) бе по-голяма от типичната, съгласно класификацията на Cohen, което говори за добра статистическа значимост на получения резултат. Прави впечатление, че, за разлика от пациентите със SSc, мнозинството от които (87.2% от всички АНА – положителни болни със SSc) имаха висок титър на АНА в серума, в контролната група, едва 11 (28.9%) бяха с АНА 1:640 или $\geq 1:1280$. При пациентите със SSc, само 2.2% имаха слабо положителни АНА (титър 1:320), докато в контролната група този процент възлизаше на 23.7%. В групата болни със SSc процентът на АНА – отрицателните серуми възлизаше на 5.5%, спрямо сигнификантно по-висок процент АНА – негативни серуми в контролната група (5.5% спрямо 47.4%, $p < 0.0001$).

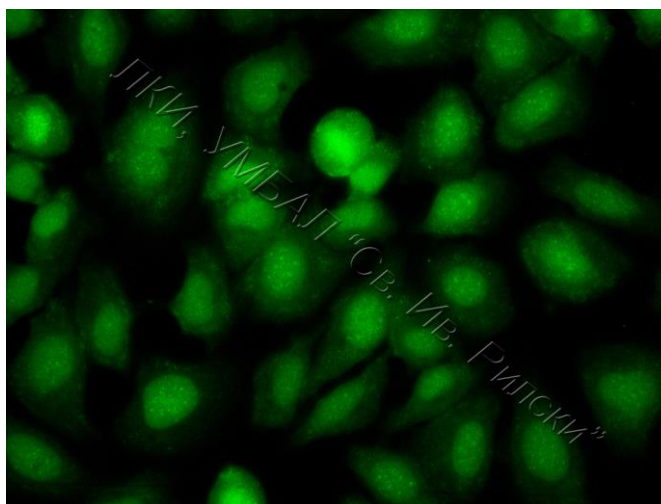
Таблица 14. АНА титър при изследваната контролна група пациенти със СЗСТ. Данните са представени като брой (%)

Диагноза	$\leq 1:160$	1:320	1:640	$\geq 1:1280$
СЛЕ	4 (10.5%)	4 (10.5%)	1 (2.5%)	5 (13%)
Миозит	3 (7.9%)	2 (5.3%)	2 (5.3%)	1 (2.5%)
Overlap	9 (24%)	3 (7.9%)	0	2 (5.3%)
ЕФ	2 (5.3%)	0	0	0

По отношение на ИИФ образ, според класификацията на ICAP, разпределението на видовете АС-светене в контролната група беше, както следва: 5 (25%) от АНА – положителните серуми на пациентите бяха с АС-1 (хомогенно ядрено светене); 5 (25%) серума бяха с АС-4; 3 (15%) серума демонстрираха АС-8, а останалите 7 (35%) серума имаха смесен тип образ. В серумите на изследваната от нашия екип контролна група, бяха наблюдавани смесени ИИФ образи, сред които:

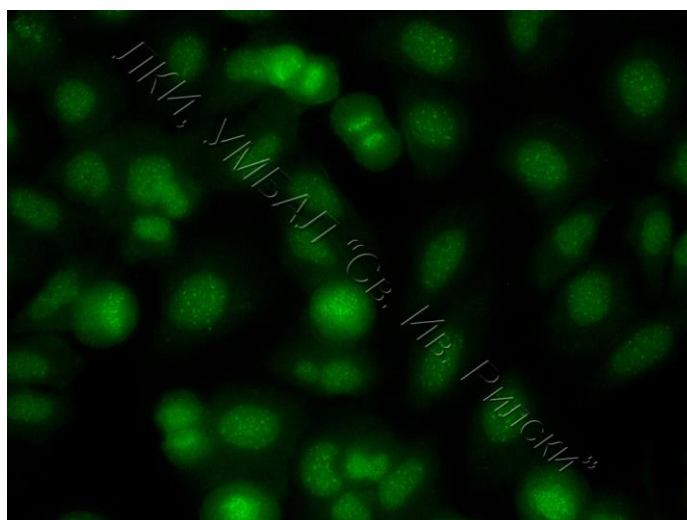
- **Смесен тип светене включващ: АС-3, анти-Ro52 – подобно светене**

Доказани специфични ААт срещу: CENP-B, Ro52



Фигура 28. ИИФ на HEp-2 клетки, увеличение 40x/0,65. Микрофотографията демонстрира смесен тип светене включващ: AC-3 и анти-Ro52 – подобно светене, разреждане 1:80

При скрининговото разреждане 1:80 на дадения серум общият изглед на флуоресцентния образ не беше типичен за AC-3: лесно разпознаваем и изискващ „основно/базисно” ниво на компетентност. На фона за „замъглени” интерфазни ядра, само при увеличение 40x/0,65 се виждат множество фини точки, нетипични за AC-6 тип светене (множество точки) (фиг. 28). За разлика от класическия AC-6 образ, тук точките са по-фини и повече на брой, което подсказва за AC-3. Няма ясно разграничаване на центрoмерните точки в митотичните клетки, но от друга страна липсват и типичните за AC-6 „призрачни клетки“. Един от възможните варианти за този „мъгляв“ образ беше високата стойност на анти-Ro52 антителата, при липсата на останалите специфични АНА, класифицирани като хомогенно или фино петнисто светене според ICAP, които показаха отрицателна стойност при изследване с имуноблот метод.

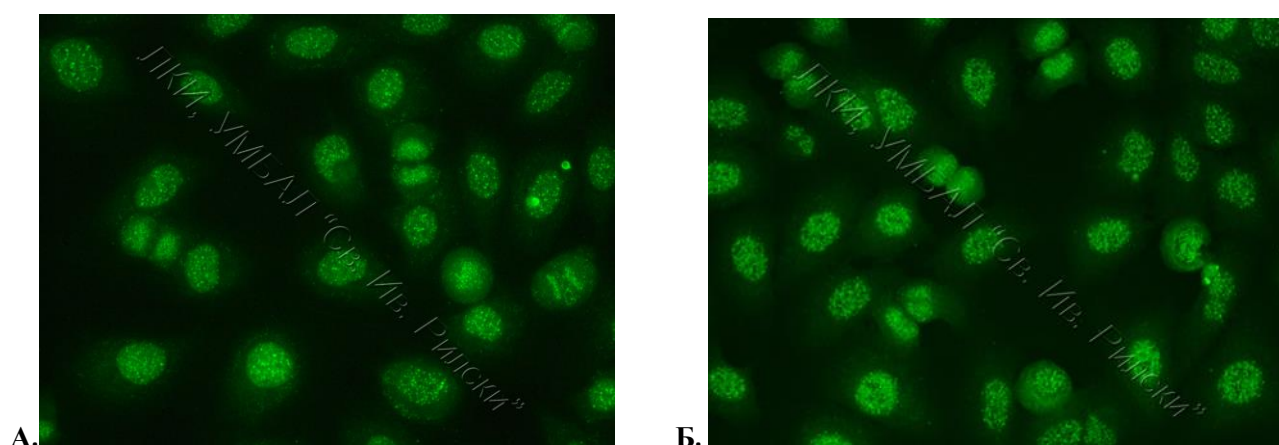


Фигура 29. ИИФ на HEp-2 клетки, увеличение 40x/0,65. Микрофотографията демонстрира смесен тип светене включващ: AC-3и анти-Ro52 – подобно светене, разреждане 1:320

При разреждане 1:320 на същия серум се наблюдаваше отслабване на фоновото светене на интерфазните ядра и клетките в различен стадий на митоза, като се прояви типичният за AC-3 образ на метафазните плочки (фиг. 29). Наблюдаваното „избистряне“ на образа при титър на серума 1:320, се дължи на високия АНА титър AC-3 $\geq 1:1280$. Конкретният пациент е с overlap синдром между SSc и глутенова ентеропатия, с доказани ААт срещу тъканна трансглутаминаза (анти-tTG ААт). В подкрепа на припокриващия синдром беше и наличието на високи стойности на анти-Ro52 ААт, които се описват при пациенти с подобни автоимунни състояния.

- **Смесен тип светене включващ: AC-1, AC-3, AC-4**

Доказани специфични ААт срещу: dsDNA, CENP-B, Ro52, Ro60



Фигура 30. ИИФ на HEp-2 клетки, увеличение 40x/0,65. А. Микрофотографията демонстрира смесен тип светене включващ: AC-1, AC-3, AC-4, разреждане 1:80; Б. Микрофотографията демонстрира смесен тип светене включващ: AC-1, AC-3, AC-4, разреждане 1:320

При скрининговото разреждане 1:80 на дадения серум общият изглед на флуоресцентния образ не е типичен за AC-3, въпреки разграничимите в част от митотичните клетки типични центромерни точки в кондензирания хроматин (фиг. 30). “Замъгленият” изглед на клетките, както в интерфаза, така и при дележните форми се дължи на анти-dsDNA и анти-Ro60 ААт (съответно AC-1 и AC-4), за които представеният серум е силно положителен. Интензивността на AC-3 - подобното светене е слаба, в сравнение с характерния си образ и високите титри, неспадаци и след терапия.

При разреждане 1:320 на същия серум, не се наблюдава AC-1 образа, който по правило най-бързо се изчерпва. Тук обаче, паралелно с центомерния тип светене, се наблюдава и типичния за AC-4 дребнопетнист изглед на интерфазните ядра (фиг. 31), дължащ се на високите

стойности на анти-Ro60 ААт и т.нар. „прозонов ефект“ на ниските разреждания. Конкретният пациент е с overlap синдром между SSc и синдром на Sjogren.

Резултатите от така направеното скринингово изследване за АНА чрез ИИФ при пациентите със SSc, в сравнение с контролната група пациенти с други СЗСТ, демонстрират висока чувствителност на метода (94.5%), за сметка на умерена специфичност (52.6%). Този резултат потвърждава докладваните към момента литературни данни (*Steen 2005, Mehra et al. 2013, Denton et Khanna 2017*). Въз основа на получените данни, екипът ни намира за напълно адекватен подходът за изследване на АНА чрез ИИФ, като първа стъпка в контекста на имунодиагностичното уточняване на пациенти със съмнение за SSc, което кореспондира и с предложения от EUSTAR алгоритъм за диагностициране на ранна SSc (*Avouac et al. 2011*). Макар специфичността на АНА HEp-2 ИИФ да не е висока, методът остава незаменим към момента по отношение на SSc-асоциирани АНА, за които все още няма разработени рутинни методи за изследване и, където характерният тип АС-светене може да даде ценни насоки на ревматолозите за очаквания вид SSc - асоциирани АНА.

5.1.2. Изследване на панел от 13 SSc - асоциирани ААт чрез имуноблот метод

Често пъти, при изследване на пациенти със съмнение за SSc и/или припокриващи синдроми с други СЗСТ, екипът ни се натъкваше на ситуация, при която резултатът от АНА скрининга е положителен, във висок титър и с характерен имунофлуоресцентен образ, но класическите SSc-асоциирани АНА (ATA, ACA) са били негативни. Това важи с особена сила за ANoA, както става видно и от гореописаните резултати - общо 27.5% от АНА положителните SSc пациенти, включени в настоящото проучване, имат нуклеоларен тип АС-светене (АС-8, АС-9 и АС-10), като в мнозинството от случаите конкретното ААт не би могло да бъде уточнено посредством наличните до 2016 г. за рутинно изследване ELISA и имуноблот панели. До 2016 г. в България имаше възможност за изследване на ACA и ATA посредством ELISA метод, а чрез имуноблот метод, в рамките на няколко различни диагностични панела, можеха да се открият следните SSc-асоциирани АНА: ACA, ATA, анти-PM/Scl-75, анти-PM/Scl100 и анти-Ku ААт. Изследването на голяма част от ANoA бе практически невъзможно, а за повечето от тях имаше вече достатъчно литературни данни, в подкрепа на значимостта им за типа кожно и органно засягане, както и за дългосрочната прогноза на пациентите. Всички тези съображения ни накараха да проведем пилотно за българската популация проучване на разширен панел от 13

асоциирани със SSc ААт, в комбинация с провеждането на АНА скрининг чрез ИИФ, резултатите от което са поместени по-долу.

Серумите на всички 91 пациента с диагноза SSc, заедно с контролната вътреболнична група, наброяваща 38 души, бяха изследвани за панел от 13 SSc-асоциирани ААт, чрез имуноблот метод Systemic Sclerosis (Nucleoli) Profile (IgG). За всяко едно от изследваните ААт беше изчислена чувствителност (SE), специфичност (SP), положителна (PPV) и отрицателна предсказателна стойност (NPV), отношение на положителна вероятност (LR+), отношение на отрицателна вероятност (LR-), отношение на шансовете (OR) и критерия „хи квадрат“ на Пирсън (χ^2) за проверка на хипотези, като резултатите са представени в Таблица 15.

На фона на ниската чувствителност по отношение на отделните ААт, варираща от 6.6% за анти-NOR90 до 34.1% за АТА, всички SSc-асоциирани ААт, с изключение на анти-Ro52 (SP = 60.5%), показаха висока специфичност по отношение на SSc (от 84.2% за анти-PM/Scl-75 до 100% за анти-RNAP11, анти-NOR90, анти-fibrillarin и анти-Ku ААт) (табл. 7).

След направена подробна литературна справка в базите данни PubMed, PubMed Central и Google Scholar, нашият екип установи, че към настоящия момент са проведени общо 5 проучвания, изследващи разширен панел от SSc-асоциирани ААт при пациенти със SSc, 2 от които са за европейската популация: италианска кохорта, състояща се от 210 пациента (*Villalta et al. 2012*) и гръцка кохорта, наброяваща 131 пациента (*Liaskos et al. 2017*). Останалите 3 проучвания включват 238 пациента от САЩ (*Shanmugam et al. 2011*), западно-малайзийска кохорта, състояща се от 31 пациента със SSc (*Sujau et al. 2014*) и австралийска кохорта, наброяваща 505 пациента (*Patterson et al. 2015*). Проведеното от нашия екип проучване на разширен панел от 13 SSc-асоциирани ААт при пациенти със SSc, е първо по рода си за българската популация. Съобразявайки се с расови, географски, както и с етническите особености на българското население, сме се спрели основно върху сравнителен анализ с италианската и гръцка кохорти от пациенти със SSc. От осъществените към момента 5 проучвания, единствено *Villalta et al. 2012* представят данни, относно чувствителността, специфичността, положителната и отрицателна предсказателна стойност на изследвания разширен панел от SSc-асоциирани ААт.

Таблица 15. Предиктивна стойност на всяко едно от изследваните SSc - асоциирани ААт

	SE (%) (CI 95%)	SP (%) (CI 95%)	PPV (%) (CI 95%)	NPV (%) (CI 95%)	LR+ (CI 5%)	LR- (CI 95%)	OR (CI 95%)	χ^2	p
ATA	34.1% (25-45)	97.4 (87-99.9)	96.9 (81-99.5)	38.9 (35-43)	13.3 (1.9-94)	0.68 (0.58-0.8)	18.621 (2.43-34.6)	13.762	0.00
Анти-CENP-A	23.1 (14.9-33)	95 (83-99.4)	91.3 (72-98)	35.2 (32-38)	4.62 (1.2-19)	0.81 (0.71-0.9)	3 (0.96-9.52)	3.887	0.04
Анти-CENP-B	23.3 (15-33.4)	95 (83-99.4)	91.3 (72-98)	35.5 (33-39)	4.67 (1.2-19)	0.81 (0.7-0.9)	6.4 (1.42-28.8)	7.287	0.00
Анти-RNAP155	18.7 (11.3-28)	97.4 (87-99.9)	95 (70-99)	34 (31-36.4)	7.3 (1-53)	0.83 (0.8-0.96)	10 (1.3-78)	6.966	0.00
Анти-RNAP11	9.9 (4.6-18)	100 (96-100)	100 [^]	52.6 (51-54)	-	0.9 (0.8-0.96)	*	-	0.03
Анти-PM/Scl-75	13.2 (7-22)	84.2 (68.8-94)	66.7 (44.8-83)	28.8 (26-32)	0.84 (0.3-2)	1 (0.9-1.2)	-	-	Ns.
Анти-PM/Scl-100	9.9 (4.6-18)	86.8 (72-95.6)	64.3 (39.2-83)	28.7 (26-32)	0.75 (0.3-2.)	1 (0.9-1.2)	-	-	Ns.
Анти-NOR90	6.6 (2.5-13.8)	100 (91-100)	100 [^]	31 (30-32)	-	0.93 (0.9-0.99)	-	-	Ns.
Анти-TifTo	15 (10-16)	97 (89-99)	93 (67-99)	36 (33-37)	6.42 (0.9-13)	0.87 (0.84-1)	7.4 (0.93-58.6)	4.779	0.02
Анти-U3 RNP	7.7 (3.2-15.2)	100 (91-100)	100 [^]	31.2 (30-32.4)	-	0.92 (0.9-0.98)	-	1.632	Ns.
Анти-Ki	12.1 (6.2-20.6)	100 (91-100)	100 [^]	32.2 (31-34)	-	-	**	-	0.016
Анти-Ro52	19.8 (12-29.5)	60.5 (43.4-76)	54.6 (40.4-68)	24 (19-29)	0.50 (0.3-0.9)	1.3 (1-1.8)	-	1.654	Ns.
Анти-PDGFR***	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*Изчислението за отношението на шансовете не може да се извърши, тъй като в серума на нито един от 38-те пациента от контролната група със СЗСТ не бяха установени анти-RNAP11 ААт. Проверката на хипотезата с екзактния тест на Фишер, показва сигнификантен резултат.

**Изчислението за отношението на шансовете не може да се извърши, тъй като в серума на нито един от 38-те пациента от контролната група със СЗСТ не бяха детектирани анти-Ki ААт. Проверката на хипотезата с екзактния тест на Фишер, показва сигнификантен резултат.

***Серумът на нито един от изследваните пациенти не беше положителен за анти-PDGFR ААт.

По отношение на чувствителността на използвания имуноблот метод, *Villalta et al. 2012* също съобщават за ниска чувствителност на отделните ААт (варираща от 0.48% за анти-fibrillarin ААт до 30.5% за анти-CENP-B ААт). От този резултат произтича обаче и първата съществена разлика между италианското и нашето проучване - чувствителността за ААт срещу fibrillarin в българската кохорта възлиза на 7.7%. Втората съществена разлика е по отношение на ААт с най-висока диагностична чувствителност от изследваните - за българската кохорта това ААт е АТА, докато за италианската - анти-CENP-B ААт. Относно специфичността на отделните ААт, най-високо специфични за изследваната от нашия екип SSc популация са анти-RNAP11, анти-NOR90, анти-fibrillarin и анти-Ku ААт, като при италианската кохорта е получен идентичен резултат относно анти-fibrillarin и анти-RNAP11 ААт, но е намерена 100% специфичност и за анти-PDGFR ААт, за които има данни, че са въввлечени и в имунопатогенезата на SSc. Повечето литературни източници (*Baroni et al. 2006, Gabrielli et al. 2007, Mehra et al. 2013*) съобщават за 100% специфичност на анти-PDGFR ААт, но за ниска чувствителност при изследването им посредством имуноблот метод. При нашето проучване, нито един от изследваните 91 пациента не даде положителен резултат за наличие на анти-PDGFR ААт в серума, поради което бе невъзможно да се пресметнат чувствителността и специфичността за това ААт, нито да бъде анализирана връзката му с кожното и органното засягане при SSc.

При 79 (91.9%) от серумите на пациентите със SSc, изследвани от нашия екип, поне 1 от 13-те SSc-асоциирани ААт беше положително. При изследване на АНА чрез ИИФ, 86 (94.5%) от същите пациенти имаха положителен АНА титър $\geq 1:160$, т.е. 7 от SSc пациентите имаха положителен резултат за АНА на ИИФ, но изцяло отрицателен имуноблот. Макар тези 7 пациента да не могат да послужат за репрезентативна извадка и без каквито и да били претенции за статистическа значимост, на екипа ни направи впечатление, че 5 от тези 7 отрицателни по отношение и на 13-те SSc-асоциирани ААт, имаха висок АНА титър $>1:1280$, АС-4 светене и пациентите споделяха сходен клиничен фенотип - lcSSc, ИББ, начална ПАХ и силно изразен васкулит с трудно повлияващи се терапевтично дигитални улцерации. Останалите 2-ма пациенти имаха АНА $>1:1280$, нуклеоларен тип светене и lcSSc без данни за висцерализация към момента на изследването. При гръцката кохорта, 83.3% от негативните при изследване чрез имуноблот пациенти са АНА - положителни на ИИФ. Логично обяснение на тази тенденция би дал фактът, че HEp-2 клетъчната линия съдържа 100 - 150 автоантигена, поради което фалшиво-отрицателни резултати при пациенти с клинично изявени системни колагенози са редки (*Eissfeller et al. 2005*). При италианската кохорта, изследвана от *Villalta et*

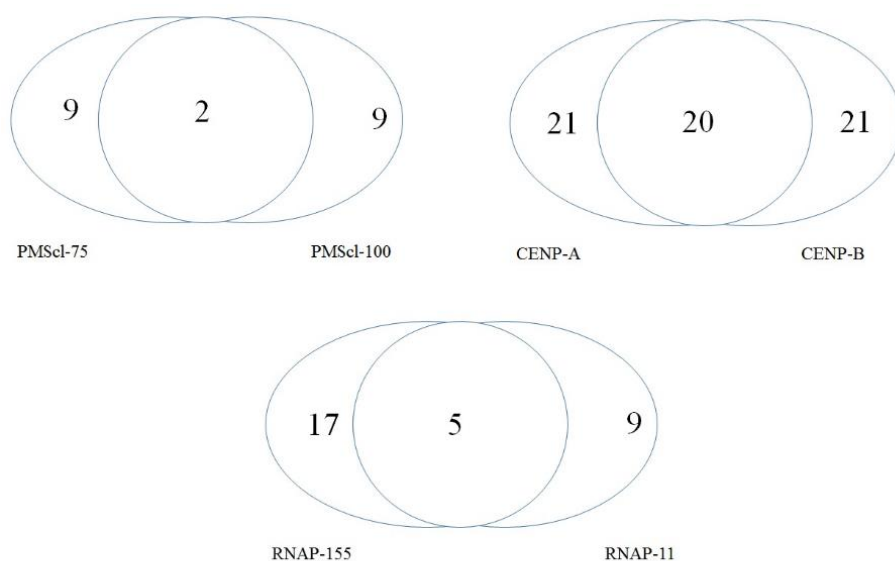
et al. 2012, 75.7% от пациентите са били положителни за поне едно от 13-те SSc-асоциирани ААт на имуноблот, а 89% са били с положителен АНА титър на ИИФ, което демонстрира сходна тенденция с получените от нашия екип резултати. Прави впечатление по-ниския процент пациенти, положителни за изследваните SSc-асоциирани ААт в италианската, спрямо българската кохорта. Резултатите на *Liaskos et al.* 2017 най-много се доближават до получените от нашия екип. При гръцката кохорта 92.4% от SSc пациентите имат поне едно положително SSc-асоциирано ААт на имуноблот, а 97.9% от болните са АНА - положителни при изследване чрез ИИФ. При 3 (2.3%) пациента се наблюдава отрицателен АНА скрининг и изцяло отрицателен имуноблот, тенденция, потвърдена и от нашите резултати: 5 (5.5%) от нашите пациенти са „двойно-отрицателни“ за наличие на SSc - асоциирани АНА в серума (както при изследване чрез HEp-2 ИИФ, така и чрез имуноблот панел).

По отношение на най-често изследваните в ревматологичната практика SSc-асоциирани ААт - АТА и АСА, и в българската, и в италианската кохорта, процентът положителни болни възлиза точно на 50.5% (46 от нашите пациенти) и сходна тенденция се наблюдава и при гръцките пациенти със SSc. От тези 46 пациента, само 2-ма са „двойно-положителни“ и за АСА, и за АТА, като и двамата пациента са с характерните за АТА ИББ и dcSSc. При няколко проведени проучвания, използващи ИИФ, имунопреципитация и имунодифузия, само за много малка част от SSc серумите е установено, че съдържат повече от едно от специфичните SSc-асоциирани ААт. (*Jarzabek-Chorzelska et al.* 1990, *Heijnen et al.* 2013). В проучване на 180 SSc пациенти, използващо АНА HEp-2 ИИФ, имунодифузия и имуноблот за откриване на АТА и АСА, едва 10 серума са намерени „двойно-положителни“ за АСА и АТА, изследвани и по трите метода. Изследваните пациенти са имали хетерогенни клинични прояви, като 6 от 10-те пациента са били с dcSSc (*Jarzabek-Chorzelska et al.* 1990). Наскоро съвместното съществуване на АСА и АТА беше анализирано при 4 687 пациенти от базата данни на EUSTAR. Двадесет и девет пациента (0.6%) са били документирани като „двойно-положителни“ за АСА и АТА. Серуми от 14 от изследваните 29 пациента са били на разположение за повторно тестване чрез ИИФ, ELISA и имуноблот метода, за да се потвърди наличието на двете ААт, като при 8 души осем резултатите потвърждава, че съдържат и АСА, и АТА. Преобладаването на dcSSc и висцерални прояви при „двойно-позитивните“ пациенти е сходно със засягането при болни, позитивиращи единствено АТА (*Heijnen et al.* 2013) - резултат, който кореспондира напълно и с получените от нашия екип данни.

LR+, което представлява вероятността пациент със SSc да има положителен резултат за даденото ААт, сравнена с вероятността същият положителен резултат да бъде наблюдаван и

при пациент без SSc, беше висока за АТА (13.3 пъти), анти-RNAP155 (7.3 пъти), анти-Th/To (6.42 пъти) и умерена за АСА (4.62 пъти за анти-CENP-A и 4.67 пъти за анти-CENP-B). При гръцката кохорта, много висока LR+ е съобщена за АТА, анти-RNAP11, анти-PDGFR и анти-CENP-B, висока за анти-CENP-A, анти-fibrillarin и анти-RNAP155 и умерена по отношение на PM/Scl-100. От друга страна LR- не е сигнификантна за нито едно от тестваните ААт (близо до 1) както в българската, така и в италианската кохорта. Изчислената за анти-Ro52 ААт LR- беше по-голяма от единица (LR- = 1.3). Тълкуването на изчислената за анти-Ro52 ААт стойност на LR-, показва с 30% по-голяма вероятност пациент със SSc да бъде негативен за анти-Ro52 ААт спрямо контролната група пациенти. По това анти-Ro52 ААт се различаваше от всички останали SSc-асоциирани ААт.

По отношение на ААт, насочени срещу различни субединици на един и същи таргетен автоантиген, нашият екип откри при 2-ма пациента едновременно наличие на анти-PM/Scl-75 и анти-PM/Scl-100 ААт, 20 от пациентите бяха едновременно положителни за анти-CENP-A и анти-CENP-B ААт и при 5 от болните се наблюдаваше припокриване на ААт, насочени срещу RNAP-11 и RNAP-155 субединиците на RNAP III комплекса (фиг. 32).



Фигура 32. Диаграма на Вен, илюстрираща едновременното наличие при част от SSc пациентите на ААт срещу двата таргетни епитопа на PM/Scl комплекса, RNAP III комплекса и АСА комплекса

Обикновено, специфичните за заболяването ААт при SSc са взаимно изключващи се, което се потвърждава и от проучването на *Villalta et al. 2012*, с изключение на анти-PM/Scl-75 ААт, които авторите откриват да се “припокриват” заедно с АСА, при част от пациентите. В изследваната от нашия екип кохорта се наблюдава по-мощно „припокриване“ между

отделните SSc-асоциирани ААт (табл. 16) Бихме могли да спекулираме, че това явление се дължи на различен генетичен терен при българските пациенти или специфични епигенетични промени, но получените от нас резултати предполагат бъдещо задълбочено изследване на възможните етиологични фактори.

Таблица 16. В табличен вид е представен броя серуми на пациентите със SSc, положителни за SSc-асоциирани ААт. Представено е и едновременното наличие („припокриване“) на повече от едно SSc-асоциирани ААт в серумите на пациентите

	АТА	Анти- CENP-A	Анти- CENP-B	Анти- RNAPI55	Анти- RNAPI11	Анти- PM/Scl-75	Анти- PM/Scl-100	Анти- NOR90	Анти- TbTo	Анти- U3 RNP	Анти- Ku	Анти- Ro52
АТА	27											
Анти- CENP-A	2	21										
Анти- CENP-B	2	20	21									
Анти- RNAPI55	1	4	4	17								
Анти- RNAPI11	1	1	0	5	9							
Анти- PM/Scl-75	5	2	2	3	1	9						
Анти- PM/Scl-100	1	2	2	3	1	2	9					
Анти- NOR90	6	3	3	3	-	-	-	6				
Анти- TbTo	2	6	6	7	1	3	3	4	13			
Анти- U3 RNP	-	1	2	3	1	1	1	1	4	7		
Анти-Ku	1	1	1	3	2	1	2	1	3	1	11	
Анти- Ro52	3	7	7	3	1	3	3	3	4	1	2	18
Анти- PDGFR ⁺	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*Серумът на нито един от изследваните пациенти не беше положителен за анти-PDGFR ААт.

Най-голям брой от тестваните серуми бяха положителни за АТА: 27 (29%). АТА бяха установени в комбинация с почти всички автоантитела с изключение на анти-fibrillarin и анти-PDGFR ААт. Най-голям брой от АТА - положителните серуми бяха едновременно положителни и за анти-NOR90 ААт: 6 (22%) и за анти-PMScI-75 ААт - 5 (18%). Следващи по

честота бяха анти-CENP-A - 21 (23%) и анти-CENP-B - 21 (23%) положителните серуми. Двадесет серума бяха позитивни едновременно за анти-CENP-A и анти-CENP-B ААт.

Най-голям брой от анти-CENP-A и анти-CENP-B положителните серуми „припокриваха“ ААт срещу Th/To - 6 (29%) и анти-Ro52 - 7(33%). 17 (18%) от тестваните пациентски серуми бяха положителни за анти-RNAP155 ААт. Най-голям брой от тях бяха едновременно положителни и за анти-Th/To ААт - 7 (41%). Серумите, положителните за анти-Ro52 бяха 18 (19%). 13(14%) от изследваните пациентски серуми бяха положителни за ААт срещу Th/To, а по 9 (10%) от изследваните пациентски серуми бяха положителни за наличието на анти-RNAP11, анти-PMSc175 и анти-PMSc100. Анти-RNAP11, анти-PMSc175 и анти-PMSc1-100 се комбинираха с почти всички ААт, освен с анти-NOR90 ААт.

По отношение на клиничните асоциации между отделните SSc-асоциирани ААт, при изследваните от нашия екип пациенти, АТА се асоциира с риск от dcSSc и бъбречно засягане, но има протективен ефект за ГИТ - засягане. Паралелно, в изследваната италианска кохорта от *Villalta et al. 2012*, авторите откриват също значима корелация между АТА и dcSSc, както и с ИББ, но не намират асоциации между нито едно от изследваните ААт и ГИТ - засягане, нито по отношение на бъбречното увреждане и SRC. В гръцката кохорта, *Liaskos et al. 2017* намират положителна корелация между АТА и ИББ, както и между АТА и ИББ - асоциираната ПАХ, но не и с изолирана ПАХ.

В таблица 17 са представени изследваните от нашия екип асоциации между SSc-асоциираните ААт, кожното и органното засягане при SSc. Представените отношения на шансовете (OR) са коригирани по пол и възраст, т.е. отразяват промяната в относителния шанс за наличието на определена кожна форма или органно засягане при пациент, положителен за даденото ААт, спрямо пациент от същия пол и на същата възраст, но отрицателен за същото ААт.

Нашите резултати показват, че АСА, в частност анти-CENP-B, се асоциират негативно с ИББ и са протективни по отношение на белодробното засягане, което се потвърждава и при *Liaskos et al. 2017*. Намерихме положителна асоциация между АСА (anti-CENP-A и анти-CENP-B) и lcSSc, с което потвърдихме получените до момента литературни данни (*Jaeschke Ret al. 1994, Villalta et al. 2012, Liaskos et al. 2017*).

Предвид факта, че АСА и АТА биват положителни при половината от болните със SSc, представляват сериозен интерес клиничните асоциации между останалите SSc-асоциирани ААт и различните форми на заболяването, както и с възможните таргетни органи. Нашите резултати показаха различни клинични асоциации за ААт, насочени срещу двете субединици на RNAP

III: анти-RNAP11 се асоциира със сърдечно засягане, докато анти-RNAP155 се свързва с бъбречно засягане. С бъбречно засягане също се асоциира анти-fibrillarin ААт, както и анти-PM/ScI-100.

Таблица 17. Асоциация между двете форми на кожно засягане, както и между видовете органно засягане, с изследваните SSc-асоциирани ААт

ААт	lcSSc	dcSSc	Бъбречно засягане	ИББ	ПАХ	Сърдечно засягане	ГИТ засягане
	OR (CI 95%) <i>p</i> value*	OR (CI 95%) <i>p</i> value*	OR (CI 95%) <i>p</i> value*	OR (CI 95%) <i>p</i> value*	OR (CI 95%) <i>p</i> value *	OR (CI 95%) <i>p</i> value *	OR (CI 95%) <i>p</i> value*
АТА		13.1 (4.9-26) < 0.0001 ^a	4.8 (1.6-14) 0.006 ^a	Ns.	Ns.	Ns.	0.19 (0.038-0.948) 0.043 ^b
Анти- CENP-A	12.7 (2.3-21) < 0.0001 ^a	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.
Анти- CENP-B	12.9 (2.4-21.2) < 0.0001 ^a	Ns.	Ns.	0.17 (0.06-0.54) 0.003 ^b			Ns.
Анти- RNAP155	Ns.	Ns.	5.3 (0.87-32) 0.069 ^a	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.
Анти- RNAP11	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	8 (0.0-70) 0.061 ^a	Ns.
Анти- PM/ScI-75	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.
Анти- PM/ScI-100	Ns.	Ns.	12 ^a (1.53-20) 0.19	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.
Анти-NOR90	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.
Анти-ThTo	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	20 ^a (10-30) 0.029
Анти-U3RNP	Ns.	Ns.	0.5 ^b (0.3-0.7) 0.038	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.
Анти-Ku	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.
Анти-Ro52	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.
Анти- PDGFR***	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.

*Two-tailed *p* value (Wald test).

^a Положителна сигнификантна асоциация

^b Отрицателна сигнификантна асоциация

Ns. Несигнификантна разлика

Прави впечатление, че и при анти-PM/Scl ААт, както и при тези срещу RNAP III и ACA, двете субединици имат различни клинични корелации. Лимитация на проведеното от нашия екип проучване е броя включени пациенти със SSc, като теоретично е възможно, при увеличаване на броя болни, да се промени тенденцията различни субединици на един и същи таргетен автоантиген, да се асоциират с различно органно засягане. Последната значима асоциация, която открихме, е тази между анти-Th/To ААт и ГИТ - засягане, която може да се определи като особено силна. Подобна клинична асоциация не е съобщавана до момента в литературата и този факт донякъде се дължи на ниската честота на разпространение на анти-Th/To ААт. В гръцката кохорта на Liaskos и сътрудници няма нито един положителен от общо 131 изследвани болни, а в италианската кохорта на Villalta *et al.* 2012 едва 7/210 са положителни за анти-Th/To ААт. При изследваните от нас пациенти, 13 (14%) от пациентите позитивират ААт срещу Th/To, което, макар и косвено, дава основание да се спекулира, че честотата на разпространение на това ААт сред българската популация, е по-висока.

Както споменахме по-горе, ACA и ATA са важни ААт за поставяне на диагнозата и определяне на прогнозата при SSc, но се позитивират при само около 50-55% от пациентите. При ACA- и ATA-отрицателните SSc пациенти могат да се открият други ААт. По литературни данни, при 15–40% от пациентите има наличие на ANoA в серума (Steen *et al.* 1988, Bernstein *et al.* 1981) и специфичните ААт, отговорни за нуклеоларния тип оцветяване при ИИФ, изглежда играят роля в класификацията на SSc и в прогнозиране ангажирането на отделни вътрешни органи (Ho *et al.* 2003, Cavazzana *et al.* 2009). За съжаление, доскоро тестването за наличие на ANoA беше ограничено до малък брой изследователски лаборатории, тъй като техниките, използвани за тяхното откриване (главно имунопреципитация) са трудоемки и времеотнемащи. Поради тази причина, като се има предвид ниската честота и разпространение на ANoA срещу различните таргетни нуклеоларни автоантигени сред различните етнически групи, е необходимо натрупване на допълнителни данни относно тяхната диагностична и прогностична стойност.

През последното десетилетие беше постигнат огромен напредък в опознаването на структурата на автоантигенните молекули и на имунодоминантните епитопи, срещу които са насочени ANoA. Вследствие на това, рекомбинантните протеини на главните автоантигенни субединици на RNP, PM/Scl, fibrillarin, hUBF/NOR-90, Th/To вече са достъпни за рутинно изследване, което ще допринесе за търсенето на клинични асоциации и за утвърждаване на диагностичната и прогностична значимост на ANoA.

Така получените резултати от нашия екип при проучването на разширен панел от SSc - асоциирани ААт, ни дават основание да смятаме, че рутинното му изследване, като втора стъпка, след АНА Нер-2 ИИФ, в имунодиагностичния подход при пациенти със съмнение за SSc или при пациенти с вече верифицирана диагноза SSc, е разумен и препоръчителен подход, с оглед на:

1. Подпомагане на ранното диагностициране на заболяването и започване на своевременна терапия;
2. Прогнозиране на типа кожно и вътреорганно засягане;
3. Подпомагане оценката на дългосрочната прогноза на пациентите.

В сравнителен план, изследваният имуноблот панел от SSc-асоциирани ААт е по - слабо чувствителен от ИИФ (92.3% спрямо 94.5% чувствителност), което по наше мнение потвърждава необходимостта от провеждането на АНА скрининг като първа стъпка от имунодиагностичния подход при SSc. В същото време панелът от SSc-асоциирани ААт демонстрира по-висока специфичност, в сравнение с АНА скрининговото изследване (63.1% спрямо 52.6% специфичност), което прави двете изследвания взаимно допълващи се в комплексната имунодиагностика на SSc.

5.2. Проучване на нови патогенетични механизми при SSc

5.2.1. Оценка на периферния цитокинов профил в серума на пациенти със SSc в сравнителен план със здрави лица

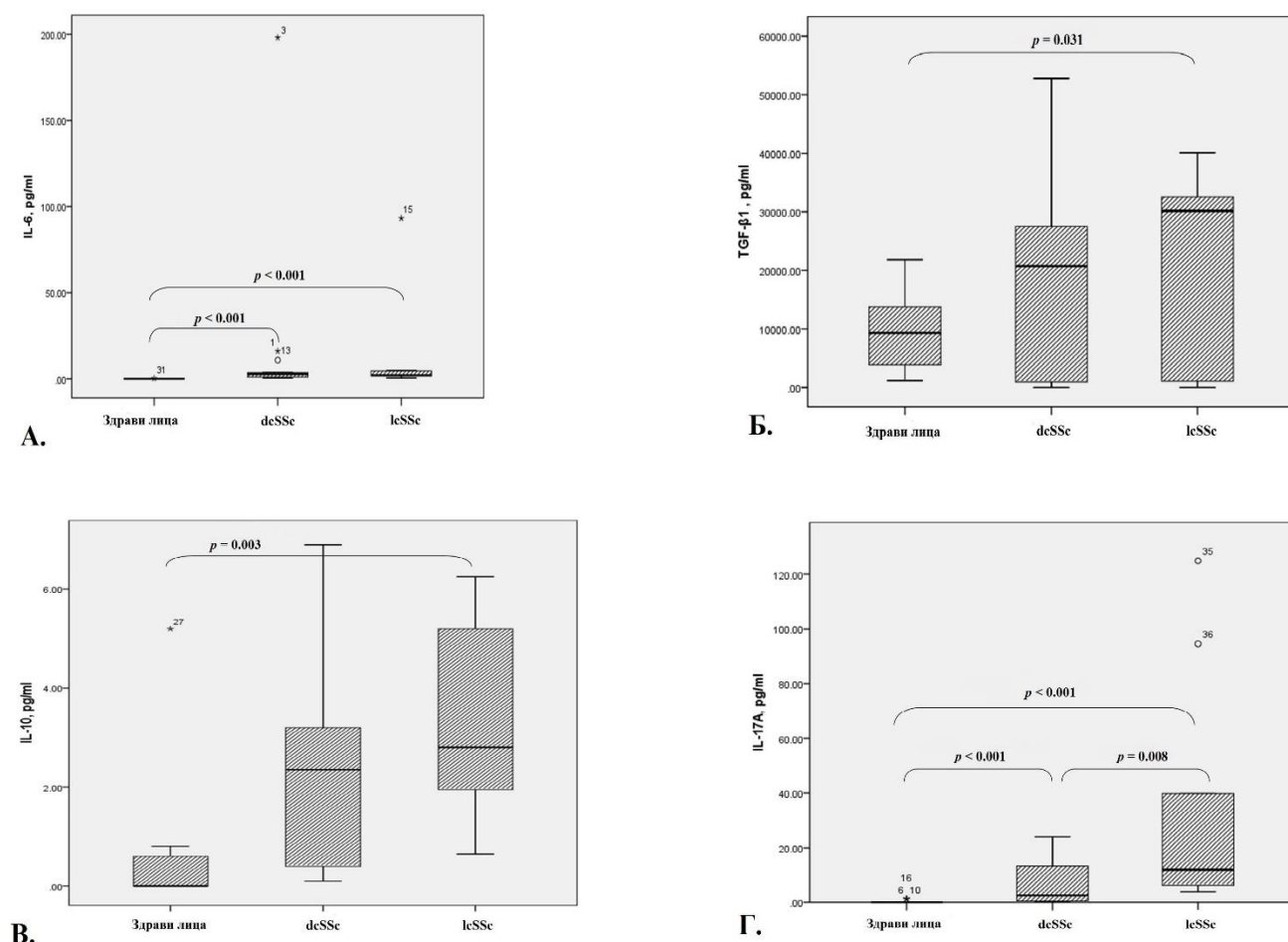
Цитокините и растежните фактори са основни регулатори на процесите на имунна активация, ремоделиране на съдовата стена и ексцесивна продукция на екстрацелуларен матрикс, които са ключови събития в патогенезата на SSc. Цитокините модулират както междуклетъчните взаимоотношения, така и взаимодействието между въввлечените в патогенезата на SSc клетки и екстрацелуларен матрикс, задействайки редица комплексни сигнални пътища, част от които остават недоизяснени. По-голямата част от цитокините, въввлечени в патогенезата на SSc упражняват своя ефект върху и/или биват секретирани от имунни клетки и повлияват както дисрегулацията в компонентите на вродения, така и на адаптивния имуноен отговор. Нашият екип се концентрира върху цитокините IL-6, TGF- β 1, IL-10, IL-17A и IL-23, тясно свързани с недобре проучените в имунопатогенезата на SSc Th17 клетки и Tregs, с идеята да обогатим известните към момента данни за участието на различните Т хелперни субпопулации в патогенетичния процес при SSc.

При изследване на периферния циркулиращ цитокинов профил при пациентите със SSc, в сравнение със здравите лица, намерихме завишени серумни нива на следните цитокини: IL-6 (2.10 [1.05 - 4.60] pg/ml vs 0.00 pg/ml, $p < 0.001$), TGF- β 1 (19.94 ± 3.35 ng/ml vs 10.03 ± 2.25 ng/ml, $p = 0.02$), IL-10 (2.83 ± 0.44 pg/ml vs 0.68 ± 0.51 pg/ml, $p = 0.008$) и IL-17A ($6.30 [2.50 - 15.60]$ pg/ml vs $0 [0.00 - 0.05]$ pg/ml, $p < 0.001$) (табл. 18).

Таблица 18. Циркулиращ цитокинов профил при пациентите със SSc и при здравите лица. Данните са представени като средна $\pm$ SE (Range) и медиана [IQR] (Range)

Цитокин	Пациенти със SSc	Здрави лица	Сигнификантност, p
IL-6, pg/ml	2.10 [1.05 – 4.60] (0.45 – 198.10)	0.00 (0.00 - 0.27)	< 0.001
TGF- β 1, ng/ml	19.94 ± 3.35 (0 – 52.80)	10.03 ± 2.25 (1.16 – 21.80)	0.02
IL-10, pg/ml	2.83 ± 0.44 (0.10 – 6.90)	0.68 ± 0.51 (0.00 – 5.20)	0.008
IL-17A, pg/ml	$6.30 [2.50 – 15.60]$ (0.20 – 124.90)	$0.00 [0.00 - 0.05]$ (0.00 - 1.36)	< 0.001
IL-23, pg/ml	0.00 (0.00 – 0.69)	0.00 (0.00 - 0.27)	Ns.

По отношение на типа кожно засягане, IL-6, TGF- β , IL-10 и IL-17A в серума на пациентите с lcSSc бяха завишени, спрямо здравите контроли, както следва: IL-6 ($2.08 [1.51 - 4.69]$ vs 0.00 pg/ml, $p < 0.001$), TGF- β 1 (22.82 ± 4.99 ng/ml vs 10.03 ± 2.25 ng/ml, $p = 0.031$), IL-10 (3.32 ± 0.59 pg/ml vs 0.68 ± 0.51 pg/ml, $p = 0.003$) и IL-17A ($14.50 [8.55 - 41.65]$ pg/ml vs $0.00 [0.00 - 0.05]$ pg/ml, $p < 0.001$). Нещо повече, открихме значително увеличение на серумния IL-17A при пациенти с lcSSc спрямо dcSSc (31.99 ± 13.29 pg/ml vs 7.14 ± 3.01 pg/ml, $p = 0.008$). При пациентите с dcSSc бяха намерени завишени серумни нива на IL-17A и IL-6, спрямо здравите контроли, както следва: IL-17A ($2.60 [0.45 - 9.80]$ pg/ml vs $0.00 [0.00 - 0.05]$ pg/ml, $p < 0.001$), IL-6 ($2.80 [1.03 - 7.23]$ pg/ml vs 0.00 pg/ml, $p < 0.001$). Данните са представени на Фигура 33.



Фигура 33. Сравнение на серумните нива на циркулиращите цитокини между lcSSc (n = 11) и dcSSc (n = 13), и спрямо здравите лица (n = 16). Боксплотове са представени като средна стойност $\pm$ стандартно отклонение (SD). **А.** Повишен IL-6 при lcSSc спрямо здравите лица, $p < 0.001$. Повишен IL-6 при dcSSc спрямо здравите лица, $p < 0.001$. **Б.** Повишен TGF- β 1 при пациентите с lcSSc спрямо здравите лица, $p = 0.031$. **В.** Увеличен IL-17A, при lcSSc спрямо dcSSc, $p = 0.008$, и спрямо здравите лица, $p < 0.001$; Увеличен IL-17A при dcSSc спрямо здравите лица, $p < 0.001$. **Г.** Увеличен IL-10, при lcSSc спрямо здравите лица, $p = 0.003$

Цитокините TGF- β и IL-10 се произвеждат от Tregs, които от своя страна са задължителни за установяването на имунен толеранс. TGF- β е основен регулатор на фибротичния процес и промените в TGF- β - сигналните пътища са добре описани при SSc (Varga et Abraham 2007). TGF- β подпомага фиброзата чрез стимулиране на синтеза и потискане на разграждането на екстрацелуларния матрикс (Varga et Abraham 2007). В същото време, TGF- β също участва в генерирането на периферни Tregs (Yamagiwa et al. 2001). Друга особеност на TGF- β е, че е въввлечен в генерирането на две функционално противоположни Т-клетъчни субпопулации - Th17 клетките и Tregs, и в зависимост от присъствието в средата на проинфламаторни цитокини, като IL-6 и IL-1, определя съдбата на Т-клетките, изложени на TGF- β (Fenoglio et al.

2011). По този начин, едновременното присъствие на TGF- β и IL-6 в кожни инфилтрати от пациенти със SSc може да благоприятства генерирането на Th17 клетки за сметка на Tregs, което води до пълно изменение на хомеостатичното равновесие. *Dziadzio et al. 2005* не откриват разлика в нивата на TGF- β между lcSSc и dcSSc. Въпреки това, пациентите с dcSSc имат по-ниски нива на активен TGF- β в сравнение с пациентите с lcSSc или здравите контроли. При dcSSc, серумните активни нива на TGF- β корелират отрицателно с mRSS и положително с давността на заболяването (*Dziadzio et al. 2005*). *Dantas et al. 2016* намират значително по-високи серумни нива на TGF- β при пациенти със SSc, отколкото при здрави контроли, което кореспондира и с резултатите, получени от нашия екип. Пациентите с повишени серумни нива на TGF- β по-често страдат от dcSSc, дигитални улцерации и ИББ, като авторите намират асоциация и с положителни ATA и по-висок mRSS (*Dantas et al. 2016*). Ние не открихме сигнификантна разлика в нивата на TGF- β между двете форми на SSc, нито описаните от *Dantas et al. 2016* клинични асоциации, като отчитаме факта, че изследваната от нас кохорта от пациенти със SSc е относително малка и при набиране на по-голяма група от пациенти е възможно да бъдат намерени клинични асоциации.

Нашите резултати по отношение на IL-10 потвърждават получените от други групи, които го намират увеличен в серума на SSc пациенти (*Hasegawa et al. 1997, Gourh et al. 2009*) *Sziks et al. 2015* съобщават, че IL-10 (самостоятелно или в комбинация с IFN- γ) има инхибиторна функция по отношение на фибротичния процес при SSc. В същото време, има данни, че повишените серумни нива на IL-10 и IL-6 корелират положително с ИББ и mRSS на пациентите със SSc (*Sato et al. 2001*), макар нашият екип да не намери такива клинични корелации.

Множество публикации утвърждават IL-6 като ключов фактор в патогенезата на SSc, като част от авторите намират IL-6 повишен в серумите на пациентите, в сравнение със здрави контроли (*Needleman et al. 1992, Sato et al. 2001*). *Feghali et al. 1992* съобщават за 6 до 30 пъти завишени концентрации на IL-6 в супернатанти след култивиране на фибробласти от кожни лезии на пациенти със SSc, в сравнение със стойностите, получени от супернатантите на здрави лица. *Gurram et al. 1994* докладват повишена продукция на IL-6 от PBMC, изолирани от пациенти със SSc, в сравнение със здрави контроли. Намерена е корелация между серумните нива на IL-6 и mRSS на пациенти със SSc (*Sato et al. 2001*). Нашите резултати също демонстрират силно завишени серумни нива на IL-6 при пациентите със SSc, в сравнение със здравите лица и макар да липсва статистически значима разлика между dcSSc и lcSSc, се наблюдава тенденция към по-високи стойности на IL-6 при пациентите с дифузно кожно ангажиране (3-ма от тях са outliers с изключително високи нива на серумен IL-6). При тази

подгрупа пациенти с dcSSc си заслужава да бъде обсъдена възможността за терапевтично повлияване посредством човешко моноклонално антитяло срещу рецептора за IL-6 - анти-IL-6R, tocilizumab.

IL-17 е индуктор на повърхностната експресия на ICAM-1 и VCAM-1 от ендотелните клетки и фибробластите в кожата и индуцира производството на IL-1 и IL-6 (Fossiez *et al.* 1996, Kurasawa *et al.* 2000). IL-17 също така увеличава производството на провъзпалителни цитокини като CCL2, IL-6, IL-8 от кожни и белодробни синовиоцити и фибробласти (Fossiez *et al.* 1996, Yamamoto *et al.* 2001). По отношение на фибротичния процес при SSc, IL-17 инхибира отлагането на колаген от тип I и тип III (Fossiez *et al.* 1996, Kurasawa *et al.* 2000, Brembilla *et al.* 2013) и намалява производството на съединително-тъканен растежен фактор (CTGF) чрез повишена регулация на miR-129-5p в дермалните фибробласти (Nakashima *et al.* 2012). Тези данни кореспондират с получените от нашия екип резултати, относно сигнификантно повишените нива на циркулиращ IL-17, при пациентите с lcSSc спрямо dcSSc. Съществува известно противоречие между данните от животинските модели на SSc, където се демонстрира участието на IL-17 в блеомицин-индуцираната белодробна и кожна фиброза (Wilson *et al.* 2010, Gasse *et al.* 2011) и проучванията при хора, които съобщават за обратна корелация между броя на IL-17⁺ клетките в кожата на пациенти със SSc и степента на кожната склероза (Truchetet *et al.* 2013). Освен това, част от проучванията при хора не намират разлика в нивата на IL-17 спрямо степента на кожно ангажиране при SSc (Radstake *et al.* 2009), докато други автори съобщават за завишени нива на IL-17 при пациенти с dcSSc, ИББ и положителни АТА (Wakhlu *et al.* 2018). В този контекст е необходимо провеждането на допълнителни проучвания при хора, с оглед възможността от приложение на човешко моноклонално антитяло, насочено срещу IL-17 при пациенти със SSc. Такива изследвания са правени *in vitro*, като резултатите показват, че анти-IL17 моноклонално антитяло ефективно блокира ексцесивната колагенова продукция от фибробластите (Yang *et al.* 2014).

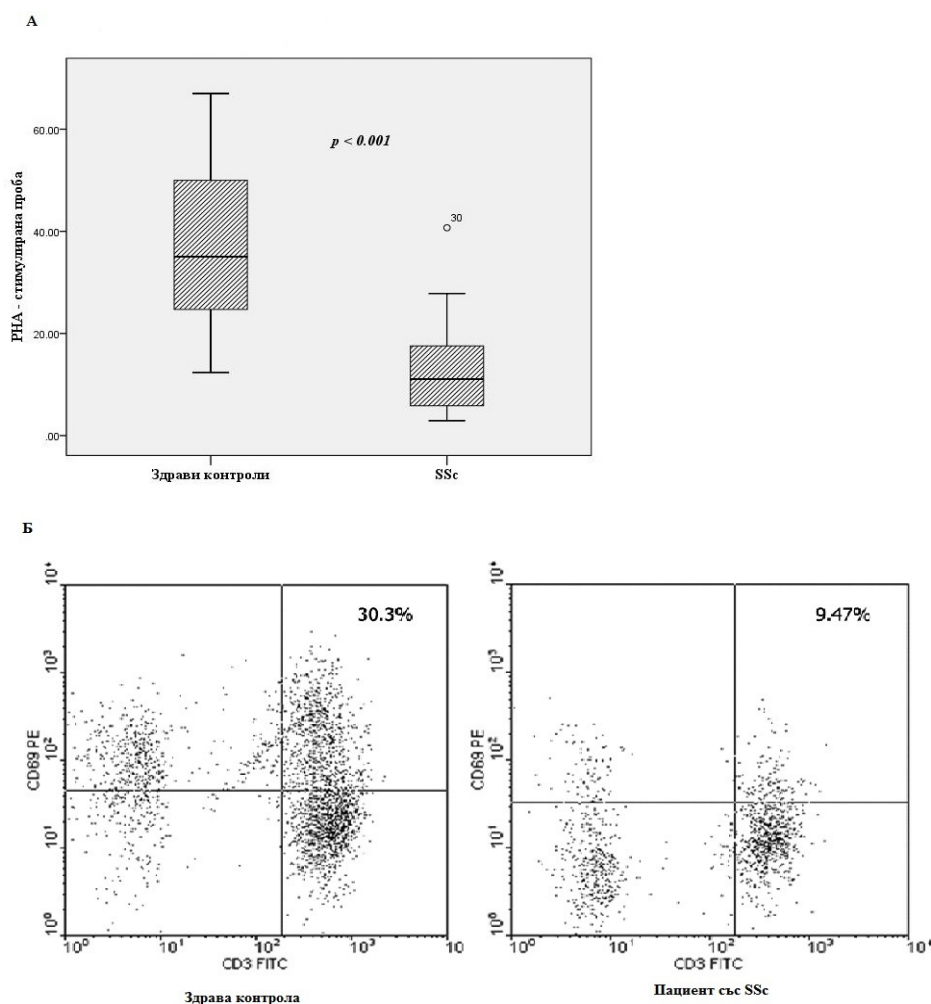
5.2.2. Определяне на способност за активация на Т-лимфоцитите под въздействието на Phytohemagglutinin (PHA) в периферна кръв от пациентите със SSc и при здрави контроли

Екипът ни се насочи към изследване способността за Т клетъчна активация при пациентите със SSc, воден от идеята за повишена Т клетъчна активация в условията на аутоимунитет. С цел да приближим максимално нашето изследване към условията *in vivo*, предпочетохме да използвахме нативни проби от пълна периферна венозна кръв, вместо да изолираме PBMC.

При изследване на „спонтанна” Т-клетъчна активация не открихме значими разлики в процента на ранните активирани Т клетки (CD3⁺CD69⁺) в нестимулирани проби от периферна

кръв между здрави лица и пациенти със SSc, нито с определна форма на SSc. Въпреки това, $CD4^+CD25^+$ лимфоцитите, които се считат за активирани клетки, бяха представени в статистически намален процент при пациентите, в сравнение с контролната група ($p = 0.016$, табл. 19). По отношение на фенотипа на заболяването, пациентите с dcSSc бяха с по-нисък процент на $CD4^+CD25^+$ Т клетки спрямо здравите индивиди ($5.95 \pm 0.89\%$ спрямо $9.36 \pm 1.08\%$, съответно, $p = 0.025$).

Във PHA - стимулираните проби, $CD3^+CD69^+$ Т клетките бяха представени в намален процент при пациентите, в сравнение със здравите контроли ($13.35 \pm 2.90\%$ спрямо $37.0 \pm 2.33\%$, $p < 0.001$) (фиг. 34). Що се отнася до lcSSc и dcSSc, екипът ни не намери разлика между двата фенотипа, нито в сравнение със здравите лица.



Фигура 34. Намален процент на $CD3^+CD69^+$ клетки след PHA-M стимулация в периферна кръв на пациенти със SSc, в сравнение със здрави контроли. **А:** Процент на $CD3^+CD69^+$ клетки във PHA-стимулирани проби от SSc пациенти ($n = 24$) и здрави контроли ($n = 16$), както следва: $13.35 \pm 2.90\%$ срещу $37.03 \pm 2.33\%$, $p < 0.001$. Боксплотите представят средна стойност $\pm$ SD. **Б:** Показана е PHA - стимулирана проба от един представителен субект от всяка група. Изобразен е процентът $CD69^+$ клетки в целия Т клетъчен пул ($CD3^+$ клетки)

Би могло да се допусне, че периферният циркулиращ цитокинов профил при нашите SSc пациенти може да е отговорен за намалената способност на Т клетките да бъдат активирани. Данните на нашия екип показват повишени нива на IL-10, TGF- β и IL-6 в периферната кръв на пациенти със SSc и всички тези цитокини са ангажирани директно или непряко в процеса на потискане на Т клетъчното активиране. IL-10 е плеiotропен цитокин с важни противовъзпалителни и имунорегулаторни функции, който инхибира активността на Th1 клетките (*O'Garra et Vieira 2007, Ng TH et al. 2013*). Заедно с толерогенните дендритни клетки, Tregs, В клетките, NK клетките, неутрофилите и макрофагите могат да бъдат източник на IL-10. Ролята на Th2 клетките, които произвеждат IL-10, също е добре установена (*Chaudhry et al. 2011*). Но скорошни данни парадоксално показват, че Th1 и Th17 клетките са способни също да секретират IL-10. Смята се, че тези "двойнствени по природа" Т клетъчни субпопулации използват секрецията на IL-10, за да потиснат тяхната собствена провъзпалителна активност, директно, или съвместно с толерогенни антиген-представящи клетки (*O'Garra et Vieira 2007*).

По литературни данни, IL-6 инхибира диференциацията на моноцити в дендритни клетки самостоятелно или чрез индуциране на автокринна секреция на IL-10 (*Blanco et al. 2008, Ivanova-Todorova et al. 2009*). По същия начин, както IL-6, така и IL-10, ограничават антиген-представящата функция на дендритните клетки, което в крайна сметка води до образуване на незрели толерогенни миелоидни клетки, секретиращи IL-10, и техният антиген-представящ капацитет води до Т клетъчна анергия (*Kyurkchiev et al. 2014*).

Заедно с IL-10, TGF- β също упражнява инхибиторно въздействие върху Т клетките. TGF- β инхибира активността на IL-2 промотор / енхансер, което води до блокиране на експресията на гена за IL-2 в Т клетките (*Brabletz et al. 1993*). TGF- β инхибиторният ефект върху Т клетките може да бъде медиран чрез усилен експресия на инхибитори на циклин-зависимата киназа p15, p21 и p27 (*Voss et al. 1999*) и намалена експресия на С- тус , циклин D2, както и на циклин E (*Warner et al. 1999*).

Концепцията за потискащата роля на циркулиращия цитокинов профил при SSc, по отношение на Т-клетъчната активация, е в съгласие с докладваните данни за инхибиращото действие на плазма от пациенти със SSc върху активацията на Tregs (*Radstake et al. 2009*).

От друга страна, периферната Т клетъчна анергия след РНА-стимулация при нашите пациенти със SSc може да се дължи на приложената имunosупресивна

терапия. Повечето от пациентите, включени в проучването, са били подложени на лечение с глюкокортикоиди (GCs).

Обикновено, стимулирането на Т-клетките чрез кръстосано свързване на Т-клетъчния рецептор TCR/CD3 и CD28 регулира както ядрения фактор на активираните Т клетки (NFAT), така и активира транскрипционните фактори на протеин 1 (AP-1), което води до усилване транскрипцията на гена за IL-2 и последваща Т клетъчна активация (*Peterson et al. 2012*). Един от важните геномни механизми на GCs действие включва взаимодействието на активирани цитозолни GC рецептори (cGCR) под формата на мономери, с транскрипционни фактори. GC/cGCR комплекс модулира активността на AP-1, NFAT и NF- κ B (ядрен фактор- κ B) (*Buttgereit et al. 2012*). Инхибирането на тяхната ядрена транслокация и функция води до блокиране на експресията на много проинфламаторни цитокини, като IL-2, IL-6, TNF- α (*Buttgereit et al. 2005*). Този геномен механизъм на GCs действие може да обясни намаления процент на периферните CD4⁺CD25⁺ клетки при нашите пациенти със SSc, в сравнение със здрави индивиди, като се има предвид, че CD25 освен маркер за Т клетъчна активация, е също и IL-2-рецепторна α верига. Освен това, нашият екип откри понижени периферни CD4⁺CD25⁺ клетки точно при dcSSc пациентите, всички от които са били подложени на лечение с метилпреднизолон.

Въз основа на получените от нас резултати, ние не сме в състояние да отговорим безусловно на въпроса кой точно е отговорен за намалената способност за активиране на Т-клетките при пациентите със SSc - терапевтичната схема, цитокиновият профил, или и двата фактора оказват влияние, а може би, допълнителни фактори също играят роля.

5.2.3. Изследване на Th17 и Tregs в периферна кръв от пациенти със SSc

Въпреки безспорния принос на натрупаните до момента научни данни относно имунопатогенезата на SSc, все още много въпроси остават без отговор. Сред тях са: кое точно дава началото на автоимунния процес, какви са причините за преобладаването на Th2 имунния отговор, както и да бъдат определени имунологичните различия между дифузната и ограничената форма на SSc. Необходимо е натрупване на допълнителни научни данни и задълбочено изследване на фенотипа на Т-клетките, въввлечени в имунопатогенезата на SSc, както и дали тези субпопулации реално са израз на транзиторни състояния или представляват терминално-диференцирани клетки, особено по отношение на проинфламаторните Th17 клетки и на Tregs, чиято роля при SSc е все още неизяснена. Поради тези причини екипът ни се насочи

към изследване баланса между Th17 и Tregs в периферната кръв на пациенти със SSc и да потърси връзка с типа кожно и органно засягане. На таблица 19 са представени обобщено резултатите за всяка една от изследваните Т хелперни субпопулации, при пациенти със SSc и при здрави лица, които ще бъдат разгледани поотделно по-долу.

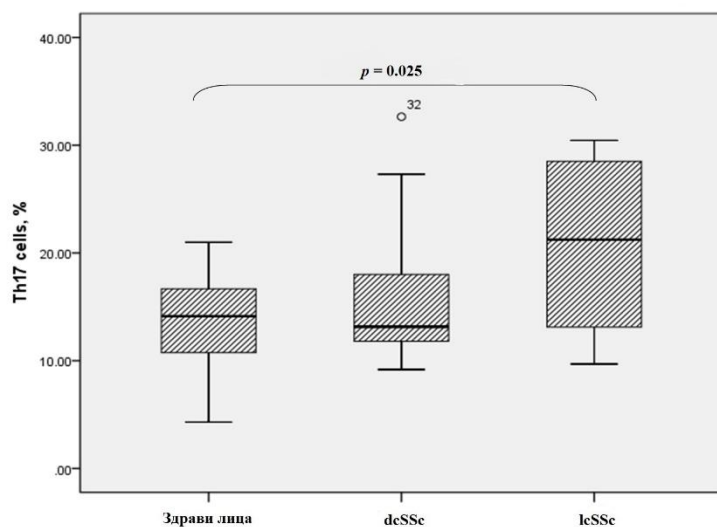
Таблица 19. Т-хелперни субпопулации при пациентите със SSc и при здравите лица. Данните са представени като средна стойност $\pm$ стандартна грешка (SE)

Т клетъчна субпопулация (%)	Пациенти със SSc	Здрави лица	Сигнификантност, <i>p</i>
Th17	18.13 $\pm$ 1.55 (9.18 – 32.64)	13.73 $\pm$ 1.21 (4.30 – 20.99)	0.031
CD4 ⁺ Foxp3 ⁺	14.24 $\pm$ 1.39 (5.68 – 28.73)	11.04 $\pm$ 1.22 (3.55 – 20.84)	Ns.
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	10.22 $\pm$ 1.21 (2.09 – 23.09)	6.88 $\pm$ 0.91 (1.42 – 12.79)	0.052
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	4.02 $\pm$ 0.52 (0.71 – 10.77)	4.16 $\pm$ 0.53 (2.08 – 8.05)	Ns.
CD4 ⁺ CD25 ⁺	6.30 $\pm$ 0.68 (1.40 – 13.36)	9.36 $\pm$ 1.08 (2.84 – 19.60)	0.016

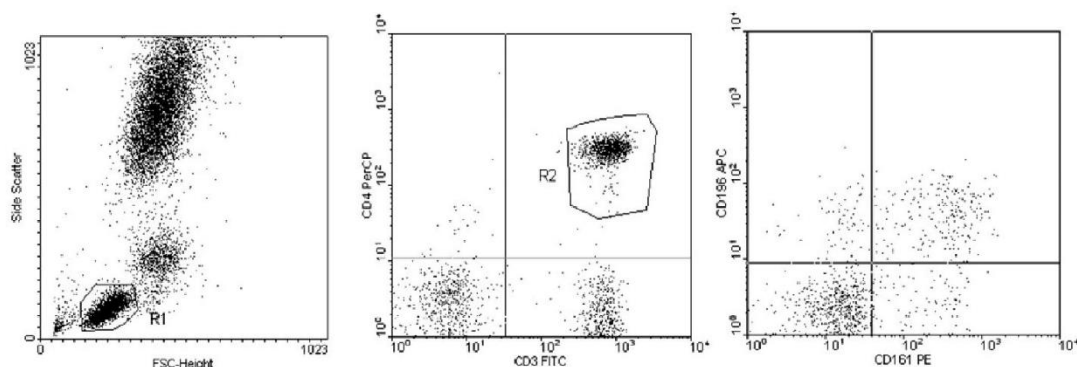
5.2.3.1. Th17 лимфоцити

По отношение на Th17 лимфоцитите открихме увеличен процент Th17 клетки при пациентите със SSc, спрямо здравите контроли ($p = 0.031$, табл. 19). Освен това, Th17 клетките бяха процентно увеличени при пациентите с lcSSc, спрямо контролната група ($20.46 \pm 2.41\%$ спрямо $13.73 \pm 1.21\%$, $p = 0.025$) (фиг. 35). Не намерихме разлика между пациентите, по отношение на двете форми на кожно засягане - lcSSc и dcSSc.

А



Б



Фигура 35. А. Увеличен процент Th17 клетки при пациентите с lcSSc, спрямо здравите лица. Боксплотовите са представени като средна стойност $\pm$ стандартно отклонение (SD). Б. На фигурата е представен репрезентативен пациент с lcSSc. Гейтираща стратегия: Първоначално се гейтира върху лимфоцитния облак, определен по физични параметри (вляво). Вторият гейт се поставя върху $CD3^+CD4^+$ клетките (в средата). Th клетките, които двойно експресират на повърхността си CD161 и CD196 (R3, горен десен квадрант), са дефинирани като Th17 лимфоцити

Един от най-значимите резултати, получени от нашия екип, е увеличения процент Th17 лимфоцити и завишените серумни нива на респективния им цитокин, IL-17, при пациентите със SSc. Th17 клетките, описани за първи път през 2005 г, продуцират IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, и IL-26 и осигуряват масивен проинфламаторен отговор (*Korn et al. 2009*). Направените до момента проучвания показват, че Th17 клетките са въввлечени в патогенезата на автоимунни заболявания като астма, ревматоиден артрит, мултипленна склероза, псориазис, graft versus host disease (GVHD) (*Hemdan et al. 2010*). Th17-диференциацията се благоприятства от IL-23, в

кооперация с IL-6 и TGF- β , посредством увеличена продукция на IL-22 (*Manel et al. 2008*). За да определим популацията от Th17 лимфоцити, използвахме описан от няколко екипа подход, включващ повърхностно маркиране на периферната кръв с моноклонални антитела, насочени срещу: CD3; CD4; лектин-подобния рецептор CD161 (IL-17-продуциращите клетки произхождат от наивни CD161⁺CD4⁺ Т лимфоцити); и срещу хемокиновия рецептор CD196 (CCR6), експресиран от всички Th17 клетки (*Annunziato et al. 2007, Cosmi et al. 2008, Singh et al. 2008*). Голяма част от проведените до момента проучвания съобщават за увеличение на Th17 клетките в периферната кръв на пациенти със SSc, спрямо здрави лица (*Radstake et al. 2009, Fenoglio et al. 2011, Rodriguez-Reyna et al. 2011, Truchetet et al. 2011*), което отговаря на получените от нашия екип резултати. *Kurasawa et al. 2000* описват свръхпродукция на IL-17 в периферната кръв, кожен биоптат и бронхоалвеоларен лаваж на пациенти със SSc, което предполага централната роля на IL-17 в патогенезата на SSc. Смята се, че IL-17 е ключов цитокин особено в ранните стадии на заболяването, когато усилва фибробластната пролиферация, продукцията на IL-1 и експресията на адхезионни молекули върху ендотелните клетки. Нашият екип не установи значими разлики в серумните нива на IL-17 през различните стадии на SSc, но съобщаваме за първи път в литературата за значима разлика в серумните нива на IL-17, в зависимост от типа кожно ангажиране, намирайки IL-17 сигнификантно завишен в периферната кръв на пациенти с lcSSc спрямо dcSSc.

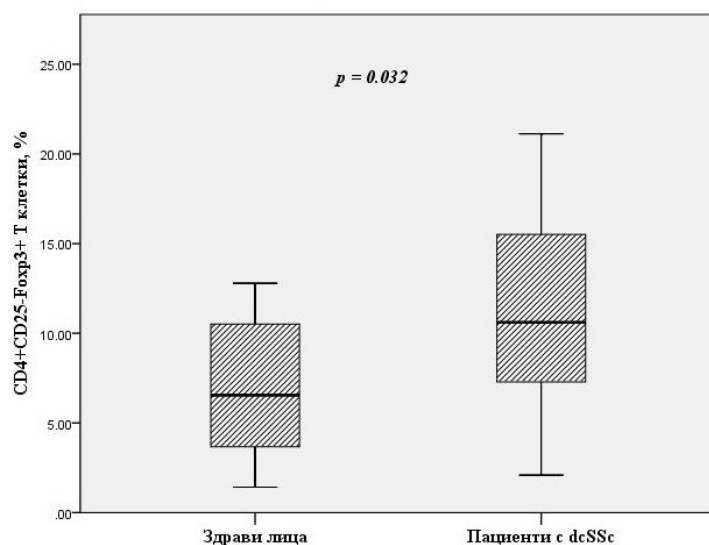
Въпреки че IL-17 усилва фибробластната пролиферация, този цитокин не индуцира производството на колаген от кожните фибробласти, дори по-скоро намалява способността на TGF- β да ги активира. Нещо повече, *Truchetet et al. 2013* съобщават за обратно пропорционална зависимост между броя на IL-17 - положителните клетки в кожните лезии на пациенти със SSc и степента на кожното уплътнение. Следователно, би могло да се предположи, че в определени случаи IL-17 би могъл да играе ролята на “антифибротичен” медиатор на възпалението. Има данни, че използваните към настоящия момент простаноиди за лечение на васкулопатията при SSc, включително простагландин I₂, увеличава *in vivo* броя на Th17 лимфоцитите (*Truchetet et al. 2012*).

Дали Th17 cells и IL-17 могат да упражняват индиректен профибротичен ефект, чрез взаимодействието между ендотелни и епителни клетки или посредством увеличаване продукцията на про-ангиогенни фактори, като IL-8 и CCL-2, предстои да бъде изяснено. Обект на бъдещи изследвания е и ролята на Th17 клетките в образуването на автоантитела при SSc. При животински модели е установено, че IL-17 спомага за образуването на автоантитела при

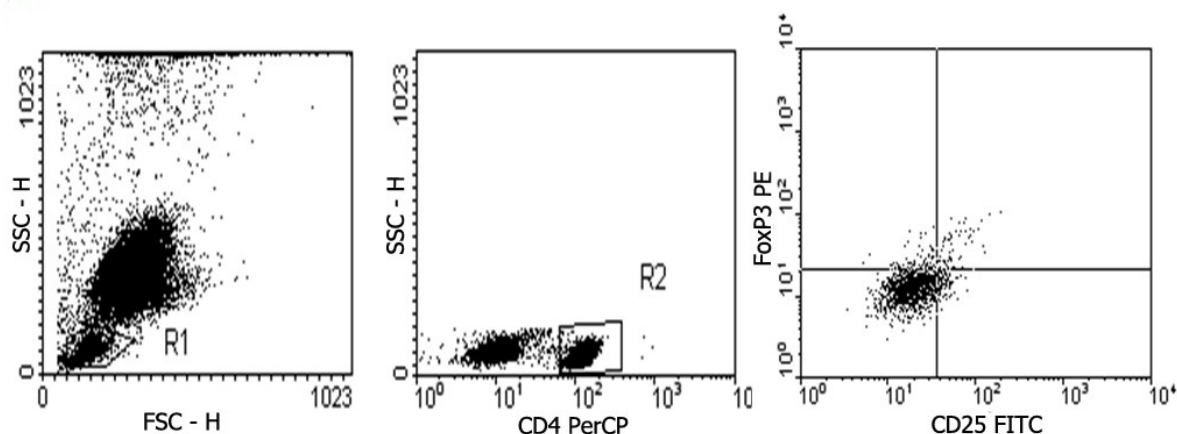
BXD2-миши модел, чрез организиране на спонтанното формиране на автореактивни герминативни центрове (Hsu et al. 2008).

5.2.3.2. Treg лимфоцити

А



Б



Фигура 36. А. Увеличен процент CD4+CD25-Foxp3+ Т клетки при пациентите с dcSSc ($n = 13$), спрямо здравите лица ($n = 16$), съответно, $10.94 \pm 1.65\%$ vs $6.88 \pm 0.91\%$, $p = 0.032$. Боксплотовете са представени като средни стойности $\pm$ SD. Б. Фенотипно определяне на CD4⁺CD25⁺-FoxP3⁺ Т лимфоцити. На фигурата е представен репрезентативен пациент с dcSSc. Първоначално се гейтира върху лимфоцитния облак, определен по физични параметри (вляво). Вторият гейт се поставя върху CD4⁺ клетките (в средата). Десният плот е гейтиран по логичен гейт, направен чрез комбинация между гейт едно и гейт две. Наблюдават се (вдясно) две субпопулации CD4⁺FoxP3⁺ клетки, като се счита, че класическите Tregs са с висока експресия на CD25 (CD25 high, горен десен квадрант)

Екипът ни не откри сигнификантна разлика по отношение на общата популация $CD4^+Foxp3^+$ клетки между пациенти и здравите лица. Бе отчетена известна тенденция към покачване процента на тези клетки при пациентите с dcSSc спрямо контролната група ($14.73 \pm 1.71\%$ vs $11.04 \pm 1.22\%$, $p = 0.083$). Не намерихме разлика и по отношение на „класическите“ Tregs $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Т клетки, нито при сравнение на пациентите със здравите лица, нито между lcSSc и dcSSc (табл. 19). Установихме гранично увеличен процент $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Т клетки при пациентите със SSc, спрямо контролите ($p = 0.052$, табл. 19), а сигнификантно процентно повишение на $CD25^-$ Tregs бе отчетено при пациентите с dcSSc, в сравнение с контролната група (фиг. 36) ($10.94 \pm 1.65\%$ vs 6.88 ± 0.91 , $p = 0.032$), но не и спрямо пациентите с lcSSc.

Освен Th17 лимфоцитите, Tregs вероятно също играят ключова роля в патогенезата на SSc, имайки предвид, че Tregs имат критично значение за установяването на имунологичен толеранс и предотвратяване развитието на автоимунни състояния (*Sakaguchi et al. 2008*). Понижаване броя на тези клетки не само създава условия за възникване на автоимунитет, но и усилва отговора към чужди антигени. Промени в броя и функцията на Tregs се съобщават при РА и СЛЕ (*Lin et al. 2007*). Нашите резултати показаха несигнификантно увеличение на процента $CD4^+Foxp3^+$ Tregs в периферната кръв на пациенти със SSc, спрямо здрави лица, но не установихме сигнификантна разлика в процента на $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Tregs. Литературните данни, касаещи количествените и функционалните промени в Tregs при SSc, са противоречиви. *Slobodin et al. 2010* съобщават за значителна експанзия на Tregs (достигаща до 34% от пула на Т хелперните клетки) в периферна кръв от пациенти със SSc, която корелира положително както с индекса на активност на SSc (Valentini Disease Activity Index), така и с тежестта на клиничната изява (измерена според Medsger Disease Severity Scale). Авторите обаче не откриват функционални промени в изследваните Tregs, въпреки повишения им абсолютен брой и процент в циркулацията. *Radstake et al. 2009* също съобщават за увеличен брой Tregs в периферна кръв на пациенти със SSc, но за разлика от *Slobodin et al. 2010*, откриват компрометирана функционална активност на Tregs, свързано с понижена експресия на CD69 и TGF- β .

Първоначално за определяне на популацията от Tregs е използван повърхностният маркер CD25 (IL-2 receptor alpha) - $CD4^+CD25^+$ Tregs. CD25 се експресира конститутивно от Tregs, но основният му недостатък е, че може да бъде експресиран и от активирани Т клетки (*Corthay et al. 2009*). Нов, специфичен маркер за определяне на Tregs е транскрипционният фактор forkhead box P3 protein (Foxp3), който действа като основен медиатор за установяването на имунологичен толеранс (*Rudensky et al. 2011*). Експресията на Foxp3 е строго специфична за

Tregs и, независимо от експресията на CD25, корелира със супресорната активност на Tregs (Gonçalves-Sousa *et al.* 2010). Tregs могат да бъдат разделени на две категории: естествени (nTregs) и индуцирани (iTregs) (Schmitt *et al.* 2009). Индуцираните Tregs се диференцират от наивни Т клетки, след антигенна стимулация, при наличие на специфични условия в периферията. IL-2 е от основно значение за формирането на iTregs, индуцирайки TGF- β -медираната експресия на Foxp3 при наивни CD4⁺ Т клетки (Schmitt *et al.* 2009).

Стимулиране на Т-клетъчния рецептор в присъствието на TGF- β индуцира експресията на Foxp3 у наивни Т клетки и води до превръщането им в Foxp3⁺ Tregs (Chen *et al.* 2010). В същото време, TGF- β е отговорен за индуцирането на транскрипционния фактор ROR γ t, необходим за диференцирането на Th17 клетките (Manel *et al.* 2008) като по този начин TGF- β се явява свързващо звено между процесите на диференциация на Th17 и Tregs.

IL-6, като проинфламаторен цитокин, е основен “диригент” на диференциацията на CD4⁺ Т клетки (Dienz *et al.* 2009). В отсъствието на IL-6, Foxp3 насочва диференциацията на Т клетките в посока Tregs. Обратното, при наличието на IL-6 като втори сигнал, TGF- β промотира Th17 поларизацията (Dienz *et al.* 2009). Нашият екип установи сигнификантно повишение на серумния IL-6 при болните. Вземайки предвид този резултат, в комбинация със завишените серумни нива на TGF- β , бихме могли да предположим, че именно завишените нива на IL-6 и TGF- β водят до увеличаване процента на Th17 клетките в периферната циркулация на пациенти със SSc.

Друг цитокин, въввлечен в индукцията на Tregs е IL-10, като в същото време nTregs и iTregs самите секретират IL-10. Нашите резултати показват завишени серумни нива на IL-10, въпреки че не намерихме сигнификантна експанзия на „класически” Tregs в периферната кръв на пациентите със SSc. Разбира се, добре известно е, че много други клетъчни популации могат да бъдат източник на IL-10.

Нашият екип установи увеличен процент на CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Т клетки при пациентите с dcSSc спрямо здравите лица. Скорошно проучване съобщава за увеличен процент CD25 негативни CD4⁺Foxp3⁺ Т клетки в периферна кръв на пациенти със СЛЕ (Lin *et al.* 2007, Zhang *et al.* 2008, Suen *et al.* 2009). Описано е, че както CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs, така и CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs при пациенти със СЛЕ, демонстрират сходен профил по отношение на експресията на CD62L, CD95, GITR, CD127, и CTLA-4 - типични маркери за фенотипа на Tregs (Yan *et al.* 2009). Според Yan *et al.* 2009 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Т клетките притежават значителна супресорна активност, сравнима с тази на класическите Tregs (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Т клетки). Съществува и друга хипотеза по отношение на тази клетъчна популация - CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Т

клетките биха могли да представляват периферен резервоар за Tregs (Yan *et al.* 2009). В случай на автоимунна реактивация, както при пациентите със СЛЕ, CD25 негативните Foxp3⁺ Т клетки, могат да си възвърнат експресията на CD25, в опит да компенсират хомеостатичния дисбаланс, изместен в посока агресивна експанзия на автореактивни Т и В клетки. Трето проучване намира CD4⁺CD25-Foxp3⁺ Т клетките за функционално некомпетентни при СЛЕ (Walker *et al.* 2009).

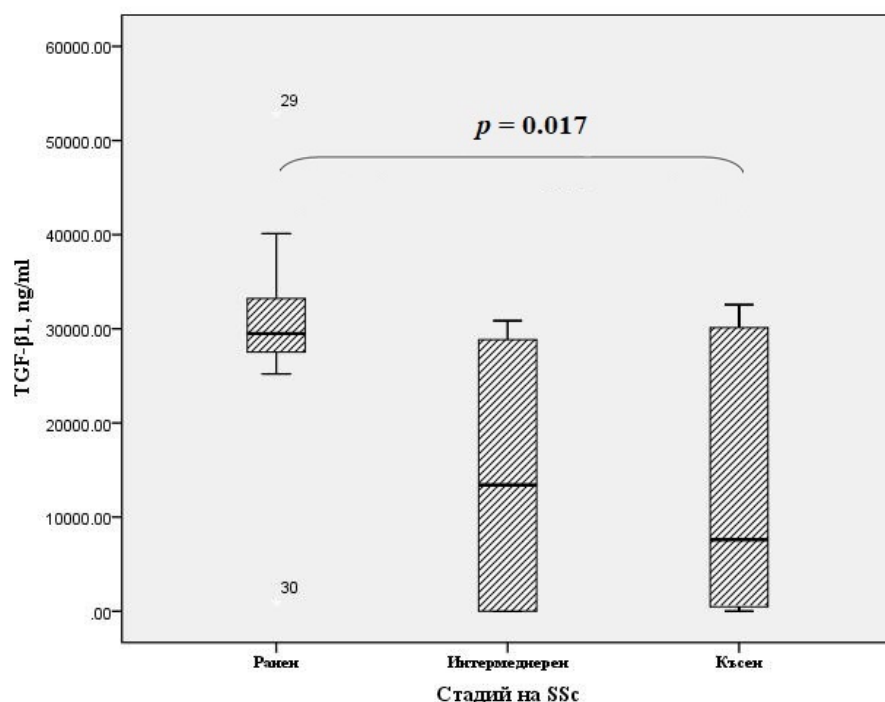
При пациентите с dcSSc, пулс-терапията с глюкокортикостероиди би могла също да обясни увеличението на процент CD4⁺CD25-Foxp3⁺ Т клетки в периферната циркулация. При пациенти с РА, лекувани с ГКС, е докладвано увеличение на CD4⁺CD25-Foxp3⁺ Т клетките, като е установена обратнопропорционална зависимост с клиничните параметри (de Paz *et al.* 2012). Пациентите с РА, носители на вискоекспресиращ генотип за IL-10 демонстрират завишени CD4⁺CD25-Foxp3⁺ Т клетки, което кореспондира и с установените от нашия екип резултати при пациентите със SSc (de Paz *et al.* 2012).

5.2.4. Връзка между болестната активност, стадия на SSc, наличието на висцерално засягане и изследваните имунологични показатели

Според болестната активност, пациентите бяха разделени на две групи – активна и стабилна/неактивна SSc. С активна SSc бяха 16 болни, а при останалите 8 пациента липсваха признаци на болестна активност към момента на изследването (табл. 11). Не открихме сигнификантна разлика между двете групи по отношение на процента Tregs и Th17 клетки, повърхностната експресия на PD-1 и PD-L1 върху Т-хелперни лимфоцити, нито в серумните нива на изследваните цитокини.

Спрямо стадия на болестта, пациентите бяха разпределени както следва: ранна SSc $n = 10$; интермедиерна SSc, $n = 5$ и късна SSc, $n = 9$ (табл. 11). Получените резултати показаха, че стадия на заболяването не оказва влияние върху процента Tregs и Th17, нито върху повърхностната експресия на PD-1 и PD-L1 от Т-хелперните клетки. По отношение на цитокиновия профил, намерихме завишени серумни нива на TGF- β 1 при пациентите с ранна SSc, спрямо късния стадий, независимо от клиничната форма на заболяването (30.03 ± 4.59 ng/ml vs 13.08 ± 4.50 ng/ml, $p = 0.017$) (фиг. 37).

Висцерално засягане имаше при 12 от пациентите, както следва: ПАХ, $n = 1$; ИББ, $n = 7$; езофагеален дисмотилитет (esophageal dysmotility, ED), $n = 5$; SRC, $n = 1$ (табл. 11). Не бяха намерени разлики при изследваните имунологични показатели между пациентите с и без висцерално засягане.



Фигура 37. Сравнение на серумните нива на TGF-β1 между трите стадия от развитието на SSc. Боксплотовите са представени като средна стойност ± стандартно отклонение (SD). Наблюдават се завишени серумни нива на TGF-β1 при пациентите с ранен стадий на SSc, спрямо късния стадий, независимо от клиничната форма на заболяването, $p = 0.017$

В заключение, нашите резултати демонстрират подчертан Th17 циркулаторен профил в периферната кръв на пациенти със SSc, като за първи път в литературата, нашият екип съобщава за увеличен IL-17A при lcSSc спрямо dcSSc.

За първи път също, екипът ни докладва увеличен процент на $CD4^+CD25^-FoxP3^+$ Т клетки при SSc.

По отношение на серумните нива на цитокините IL-10, IL-23 и TGF-β1, получените от екипа ни резултати потвърждават описаните до момента в научната литература.

6. ИЗВОДИ:

6.1. Изводи по отношение на имунодиагностичната част от дисертационния труд:

1. Изследването на АНА чрез HEp-2 ИИФ (с определяне на титър и вид имунофлуоресцентен образ) е добър скринингов метод за откриване на АНА като първа стъпка от алгоритъма за ранна диагностика на SSc; или при пациенти с вече верифицирана диагноза SSc, като маркер за проследяване на имунологичната активност на SSc.
2. Разширеният панел от SSc - асоциирани ААт е препоръчително да бъде изследван рутинно, като втора стъпка, след провеждането на АНА скрининг, в имунодиагностичния подход при пациенти със съмнение за SSc.
3. При пациенти с вече верифицирана диагноза SSc, е разумен и препоръчителен подход, с оглед на прогнозиране на типа кожно и вътреорганно засягане и подпомагане оценката на дългосрочната прогноза на пациентите.

6.2. Изводи относно имунопатогенетичната част от дисертационния труд:

1. Получените от екипа резултати, относно увеличения процент Th17 и $CD4^+CD25^-FoxP3^+$ Т клетки в периферната циркулация на пациенти със SSc, дават основание да се предположи, че двете Т клетъчни популации играят ключова роля в патогенезата на SSc.
2. Повишените серумни нива на IL-17A при пациентите с lcSSc, спрямо тези с dcSSc хвърлят светлина върху бъдещи възможности за терапия на lcSSc, посредством използването на анти-IL17A човешко моноклонално антитяло.
3. Циркулиращия цитокинов профил вероятно повлиява Т клетъчните популации при пациенти със SSc, както и баланса между Th17/Tregs.
4. Цитокиновото обкръжение, както и употребата на глюкокортикостероиди биха могли да бъдат фактор, повлияващ Т клетъчната активация при пациенти със SSc.

7. Приноси

7.1. Научно-теоретични:

- За първи път екипът ни съобщава за промени в $CD4^+CD25^-FoxP3^+$ Т клетките при SSc;
- За първи път екипът ни съобщава за повишени серумни нива на IL-17A при пациенти с lcSSc, спрямо тези с dcSSc;

7.2. Методични:

- Валидиран е имуноблот метод за изследване на 13 SSc-асоциирани ААт.

7.3. Научно-приложни:

- Намерена е асоциация между анти-Th/To ААт и ГИТ засягане, неописана до момента;
- Анти-Th/To ААт се срещат по-често сред българските пациенти със SSc, в сравнение с описаната им честота при останалите европейски популации.

8. Публикации и участия в научни прояви във връзка с дисертационния труд:

➤ Публикации, реализирани във връзка с дисертационния труд:

1. **Е. Красиминова**, Д. Калинова, Ц. Великова, К. Тумангелова-Юзеир, Е. Иванова-Тодорова, В. Решкова, А. Копчев, Р. Рашков и Д. Кюркчиев. Разширен имунологичен панел в диагностиката на прогресивна системна склероза. Ревматология 2016; Год.XXIV(2):35-51
2. **Ekaterina Krasimirova**, Dobroslav Kyurkchiev. T helper cells in the immunopathogenesis of Systemic Sclerosis – current trends. Acta Medica Bulgarica 2017, Volume 44, Issue 1, Pages 57–63, ISSN (Online) 0324-1750, doi: <https://doi.org/10.1515/amb-2017-0010>
3. **Ekaterina Krasimirova**, Tsvetelina Velikova, Ekaterina Ivanova-Todorova, Kalina Tumangelova-Yuzeir, Desislava Kalinova, Vladimira Boyadzhieva, Nikolay Stoilov, Tsvetelina Yoneva, Rasho Rashkov and Dobroslav Kyurkchiev. Treg/Th17 cell balance and Phytohaemagglutinin activation of T lymphocytes in peripheral blood of systemic sclerosis patients. World Journal of Experimental Medicine. World J Exp Med. 2017 Aug 20; 7(3): 84–96. doi: <https://doi.org/10.5493/wjem.v7.i3.84>
4. **Е. Красиминова**, К. Тумангелова-Юзеир, Е. Иванова-Тодорова, Г. Василев, Ц. Великова, Д. Калинова, Вл. Бояджиева, Н. Стоилов, Р. Стоилов, Р. Рашков, Д. Кюркчиев. Склеродерма-специфични автоантитела при пациенти с прогресивна системна склероза и атипичен ход на протичане на болестта – клинични случаи. Ревматология 2017; Год.XXV(2-3):31-40
5. Vasilev, G., Ivanova, M., Ivanova-Todorova, E., Tumangelova-Yuzeir, K., **Krasimirova E.**, Stoilov R., Kyurkchiev D. Secretory factors produced by adipose mesenchymal stem cells downregulate Th17 and increase Treg cells in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. Rheumatol Int (2019) 39: 819. <https://doi.org/10.1007/s00296-019-04296-7>, IF 2.200;
6. **Е. Krasimirova**, V. Boyadzhieva, R. Stoilov. Systemic sclerosis with anti-topoisomerase I autoantibodies in a mother and daughter with SSc susceptible HLA - haplotype: case-report and comprehensive review of the literature. Under review;

• Монографии, учебници, ръководства

1. Имунофлуоресцентно определяне на антинуклеарни антитела. Атлас, първо издание, ISBN 978-954-9318-91-3, Централна медицинска библиотека, МУ - София, 2018 г. Под редакцията на д-р Екатерина Иванова-Тодорова. Международния консенсус за АНА светения – International consensus on antinuclear antibody pattern (ICAP). **Е. Красиминова Куртева**, Е. Иванова-Тодорова. - глава от книга;

➤ **Участия в научни форуми във връзка с дисертационния труд:**

1. **E. Krasimirova**, D. Kalinova, Ts. Velikova, K. Tumangelova-Yuzeir, E. Ivanova-Todorova, V. Reshkova, A. Kopchev, R. Rashkov, D. Kyurkchiev. New approaches for immunological testing of patients with Systemic sclerosis. V II-ма Работна среща "Експериментални модели и методи в биомедицинските изследвания", проведена в Института по експериментална морфология, патология и антропология с музей - БАН, 16-18 май 2016 г.
2. Е. Иванова-Тодорова, Ц. Великова, К. Тумангелова-Юзеир, **Е. Красимирова**, Д. Кюркчиев. Международен консенсус относно антинуклеарните антитела: нови подходи в тълкуването на цитоплазмения и митотичния тип светене. Юбилейна научна конференция "10 години Българска асоциация по клинична имунология" 28-29.10.2016, София, Шератон Хотел Балкан.
3. **E. Krasimirova**, D. Kalinova, Ts. Velikova, K. Tumangelova-Yuzeir, E. Ivanova-Todorova, V. Reshkova, A. Kopchev, R. Rashkov, D. Kyurkchiev. An extended autoantibody profile in the diagnostics of systemic sclerosis. Oral and poster presentation at 8yh EFIS-EJI South East European Immunology School *SEEIS 2016), 14-17.10. 2016, Durres, Albania.
4. **Е. Красимирова**, Д. Калинова, Ц. Великова, К. Тумангелова-Юзеир, Е. Иванова-Тодорова, В. Решкова, Р. Рашков, Д. Кюркчиев. Разширен панел от автоантитела подобрява имунодиагностиката и клиничното проследяване при пациенти със системна склероза. Юбилейна научна конференция "10 години Българска асоциация по клинична имунология" 28-29.10.2016, София, Шератон Хотел Балкан.
5. **Ekaterina Krasimirova**, Tsvetelina Velikova, Ekaterina Ivanova-Todorova, Kalina Tumangelova-Yuzeir, Desislava Kalinova, Vladimira Boyadzhieva, Nikolay Stoilov, Tsvetelina Yoneva, Rasho Rashkov and Dobroslav Kyurkchiev. Alterations of Tregs and Th17 cell populations and serum levels of their respective cytokines in peripheral blood of Systemic sclerosis patients – poster and e-poster presentation. 4th International Congress on Controversies in Rheumatology & Autoimmunity, CORA 2017, Bologna, Italy, 9-11 March, 2017.
6. Ekaterina Ivanova-Todorova, Kalina Tumangelova-Yuzeir, Tsvetelina Velikova, **Ekaterina Krasimirova**, Dobroslav Kyurkchiev. International consensus on anti-nuclear antibodies patterns: standartization of nuclear, cytoplasmic and mitotic patterns on hep-2 cells. National conference of Rheumatology 11-14 may 2017 Aheloy, Bulgaria. Rheumatology Vol.XXV, №1/2017: 10-11.
7. **Ekaterina Krasimirova**, Tsvetelina Velikova, Ekaterina Ivanova-Todorova, Kalina Tumangelova-Yuzeir, D. kalinova, V. Boyadzhieva, N. Stoilov, Ts Yoneva, R. Rashkov, Dobroslav Kyurkchiev. Up-regulated peripheral cd4+cd25-foxp3+ cells along with pronounced Th17 circulating

profile in patients with ssc. National Conference of Rheumatology 11-14 may 2017 Aheloy, Bulgaria. Rheumatology Vol.XXV, №1/2017: 12-13. oral presentation.

8. **E. K. Kurteva**, G. Vassilev, M. Ivanova, E. Ivanova-Todorova, K. Tumangelova-Yuzeir, V. Boyadzhieva, N. Stoilov, R. Stoilov, D. Kyurkchiev. Adipose-derived mesenchymal stem cells alter the Th17/Tregs axis in patients with Rheumatoid arthritis yet not in patients with Systemic sclerosis - preliminary data, Poster presentation. European Congress of Immunology ECI, Amsterdam, 2-5 September 2018.

9. **Ekaterina Kurteva**, Ekaterina Ivanova-Todorova, Kalina Tumangelova–Yuzeir, Georgi Vasilev, Vladimira Boyadzhieva, Nikolay Stoilov, Rumen Stoilov, Dobroslav Kyurkchiev; Effects exerted by human adipose-derived mesenchymal stem cells on th17 and treg cell subsets in patients with systemic sclerosis. V-ти Национален конгрес по имунология 25-28 октомври 2018, гр. Пловдив.

10. **Ekaterina Kurteva**, Ts Velikova, Ekaterina Ivanova-Todorova, Kalina Tumangelova–Yuzeir, D Kalinova, Vladimira Boyadzhieva, Nikolay Stoilov, Ts Yoneva, R Rashkov, Dobroslav Kyurkchiev. Alterations of Th17 and Treg cell populations and serum levels of their respective cytokines in peripheral blood of SSc patients. 5th international CORA, Florence, Italy, 2019.

➤ **Участия в научни проекти по темата на дисертационния труд:**

1. **Участник** в Конкурс „ГРАНТ - 2015” на МУ-София ДОГОВОР №59/2015 г., ПРОЕКТ с вх. № 242/14.01.2015г. на тема: **“Оптимизиране имунологичната диагностика при различните форми на прогресивна системна склероза чрез изследване на широк набор от автоантитела”**. Отчетен с оценка „много добра“.
2. **Водещ изследовател** в Конкурс „Млад изследовател - 2017“ на МУ-София, ДОГОВОР № Д-140/02.05.2017 г., ПРОЕКТ с вх. № 8480/09.12.2016 г. на тема: **“Изследване на фенотип и цитокинова секреция на Т-хелперните субпопулации Th17 и Tregs при пациенти със системна склероза**. Отчетен с оценка „много добра“.

➤ **Други:**

Успешно положен изпит след проведен официален сертифициращ курс на Европейската лига за борба с ревматизма (EULAR) за Системна склероза: **EULAR On-line course on Systemic Sclerosis** (27.06.2018);

9. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Abraham D, Krieg T, Distler J, Distler O. Overview of pathogenesis of systemic sclerosis. *Rheumatology*. 2006;48(suppl_3):iii3-iii7.
2. Afzali B, Lombardi G, Lechler R, Lord G. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clinical & Experimental Immunology*. 2007;148(1):32-46.
3. Agarwal S, Reveille J. The genetics of scleroderma (systemic sclerosis). *Current Opinion in Rheumatology*. 2010;22(2):133-138.
4. Aggarwal R, Lucas M, Fertig N, Oddis C, Medsger T. Anti-U3 RNP autoantibodies in systemic sclerosis. *Arthritis & Rheumatism*. 2009;60(4):1112-1118.
5. Ahmed S, Tan F, Arnett F, Jin L, Geng Y. Induction of apoptosis and fibrillin 1 expression in human dermal endothelial cells by scleroderma sera containing anti-endothelial cell antibodies. *Arthritis & Rheumatism*. 2006;54(7):2250-2262.
6. Aksu G, Gulez N, Azarsız E, Karaca N, Kutukçuler N. Determination of cut-off titers and agreement between immunofluorescence and immunoblotting methods for detecting antinuclear antibodies in children. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2010;24(4):230-236.
7. Alamanos Y, Tsifetaki N, Voulgari P, Siozos C, Tsamanduraki K, Alexiou G et al. Epidemiology of systemic sclerosis in northwest Greece 1981 to 2002. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2005;34(5):714-720.
8. Andrade L, Klotz W, Herold M, Conrad K, Rönnelid J, Fritzler M et al. International consensus on antinuclear antibody patterns: definition of the AC-29 pattern associated with antibodies to DNA topoisomerase I. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2018;56(10):1783-1788.
9. Antiga E, Quaglini P, Bellandi S, Volpi W, Del Bianco E, Comessatti A et al. Regulatory T cells in the skin lesions and blood of patients with systemic sclerosis and morphoea. *British Journal of Dermatology*. 2010;162(5):1056-1063.
10. Arnett F, Cho M, Chatterjee S, Aguilar M, Reveille J, Mayes M. Familial occurrence frequencies and relative risks for systemic sclerosis (scleroderma) in three United States cohorts. *Arthritis & Rheumatism*. 2001;44(6):1359-1362.
11. Arora-Singh R, Assassi S, del Junco D, Arnett F, Perry M, Irfan U et al. Autoimmune diseases and autoantibodies in the first degree relatives of patients with systemic sclerosis. *Journal of Autoimmunity*. 2010;35(1):52-57.
12. Asano Y, Jinnin M, Kawaguchi Y, Kuwana M, Goto D, Sato S et al. Diagnostic criteria, severity classification and guidelines of systemic sclerosis. *The Journal of Dermatology*. 2018;45(6):633-691.
13. Aversa G. An interleukin 4 (IL-4) mutant protein inhibits both IL-4 or IL-13- induced human immunoglobulin G4 (IgG4) and IgE synthesis and B cell proliferation: support for a common component shared by IL-4 and IL-13 receptors. *Journal of Experimental Medicine*. 1993;178(6):2213-2218.
14. Avouac J, Fransen J, Walker U, Riccieri V, Smith V, Muller C et al. Preliminary criteria for the very early diagnosis of systemic sclerosis: results of a Delphi Consensus Study from EULAR Scleroderma Trials and Research Group. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2010;70(3):476-481.
15. Avouac J, Fühnrohr B, Tomcik M, Palumbo K, Zerr P, Horn A et al. Inactivation of the transcription factor STAT-4 prevents inflammation-driven fibrosis in animal models of systemic sclerosis. *Arthritis & Rheumatism*. 2011;63(3):800-809.
16. Baraut J, Farge D, Jean-Louis F, Kesmandt H, Durant C, Verrecchia F et al. Les cytokines dans la sclérodémie systémique. *Pathologie Biologie*. 2012;60(2):127-139.

17. Barnes J, Mayes M. Epidemiology of systemic sclerosis. *Current Opinion in Rheumatology*. 2012;24(2):165-170.
18. Baroni S, Santillo M, Bevilacqua F, Luchetti M, Spadoni T, Matteo Mancini B. Stimulatory Autoantibodies to the PDGF Receptor in Scleroderma. *New England Journal of Medicine*. 2006;355(12):1278-1280.
19. Beck J. The behaviour of certain nuclear antigens in mitosis. *Experimental Cell Research*. 1962;28(2):406-418.
20. Bellisai F, Morozzi G, Scaccia F, Chellini F, Simpatico A, Pecetti G et al. Evaluation of the Effect of Bosentan Treatment on Proinflammatory Cytokine Serum Levels in Patients Affected by Systemic Sclerosis. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 2011;24(1):261-264.
21. Bernstein R, Mordi Y, Steigerwald J, Tan E. Antinuclear Antibodies in Progressive Systemic Sclerosis: Association of Renal Disease with a Speckled Nucleolar Pattern. *Clinical Science*. 1981;61(3):29P.3-29P.
22. Betteridge Z, Woodhead F, Lu H, Shaddick G, Bunn C, Denton C et al. Brief Report: Anti-Eukaryotic Initiation Factor 2B Autoantibodies Are Associated With Interstitial Lung Disease in Patients With Systemic Sclerosis. *Arthritis & Rheumatology*. 2016;68(11):2778-2783.
23. Blanco P, Palucka A, Pascual V, Banchereau J. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2008;19(1):41-52.
24. Bohelay G, Blaise S, Levy P, Claeys A, Baudot N, Cuny J et al. Lower-limb Ulcers in Systemic Sclerosis: A Multicentre Retrospective Case-control Study. *Acta Dermato Venereologica*. 2018;98(7):677-682.
25. Bolster M, Silver R. Clinical features of systemic sclerosis. In: Hochberg M, Silman A, Smolen J, Weinblatt M, Weisman M, ed. by. *Rheumatology*. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Mosby; 2015. p. 1165 - 1176.
26. Brabletz T, Pfeuffer I, Schorr E, Siebelt F, Wirth T, Serfling E. Transforming growth factor beta and cyclosporin A inhibit the inducible activity of the interleukin-2 gene in T cells through a noncanonical octamer-binding site. *Molecular and Cellular Biology*. 1993;13(2):1155-1162.
27. Brembilla N, Montanari E, Truchetet M, Raschi E, Meroni P, Chizzolini C. Th17 cells favor inflammatory responses while inhibiting type I collagen deposition by dermal fibroblasts: differential effects in healthy and systemic sclerosis fibroblasts. *Arthritis Research & Therapy*. 2013;15(5):R151.
28. Brinckmann J, Hunzelmann N, El-Hallous E, Krieg T, Sakai L, Krenzel S et al. Absence of autoantibodies against correctly folded recombinant fibrillin-1 protein in systemic sclerosis patients. *Arthritis Research & Therapy*. 2005;7(6):R1221.
29. Brouwer R, Pruijn G, van Venrooij W. *Arthritis Research*. 2001;3(2):102.
30. Brouwer R, Vree Egberts W, Hengstman G, Raijmakers R, van Engelen B, Peter Seelig H et al. *Arthritis Research*. 2002;4(2):134.
31. Buckley C, Rainger G, Nash G, Raza K. Endothelial cells, fibroblasts and vasculitis. *Rheumatology*. 2005;44(7):860-863.
32. Burt R, Shah S, Dill K, Grant T, Gheorghide M, Schroeder J et al. Autologous non-myeloablative haemopoietic stem-cell transplantation compared with pulse cyclophosphamide once per month for systemic sclerosis (ASSIST): an open-label, randomised phase 2 trial. *The Lancet*. 2011;378(9790):498-506.
33. Buttgerit F, Saag K, Cutolo M, da Silva J, Bijlsma J. The molecular basis for the effectiveness, toxicity, and resistance to glucocorticoids: focus on the treatment of rheumatoid arthritis. *Scandinavian Journal of Rheumatology*. 2005;34(1):14-21.
34. Campbell P, LeRoy E. Pathogenesis of systemic sclerosis: A vascular hypothesis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 1975;4(4):351-368.

35. Campbell P, LeRoy E. Pathogenesis of systemic sclerosis: A vascular hypothesis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 1975;4(4):351-368.
36. Cappelli S, Bellando Randone S, Camiciottoli G, De Paulis A, Guiducci S, Matucci-Cerinic M. Interstitial lung disease in systemic sclerosis: where do we stand?. *European Respiratory Review*. 2015;24(137):411-419.
37. Cavazzana I, Ceribelli A, Quinzanini M, Scarsi M, Airò P, Cattaneo R et al. Prevalence and clinical associations of anti-Ku antibodies in systemic autoimmune diseases. *Lupus*. 2008;17(8):727-732.
38. Cepeda E, Reveille J. Autoantibodies in systemic sclerosis and fibrosing syndromes: clinical indications and relevance. *Current Opinion in Rheumatology*. 2004;16(6):723-732.
39. Ceuppens J, Baroja M, Lorre K, Van Damme J, bILLIAU A. Human T cell activation with phytohemagglutinin. The function of IL-6 as an accessory signal. *J Immunol*. 1988;141(11):3868-3874.
40. Chan E, Damoiseaux J, Carballo O, Conrad K, de Melo Cruvinel W, Francescantonio P et al. Report of the First International Consensus on Standardized Nomenclature of Antinuclear Antibody HEp-2 Cell Patterns 2014–2015. *Frontiers in Immunology*. 2015;6.
41. Chan E, Damoiseaux J, de Melo Cruvinel W, Carballo O, Conrad K, Francescantonio P et al. Report on the second International Consensus on ANA Pattern (ICAP) workshop in Dresden 2015. *Lupus*. 2016;25(8):797-804.
42. Chan E, Fritzler M, Wiik A, Andrade L, Reeves W, Tincani A et al. AutoAbSC.Org — Autoantibody Standardization Committee in 2006. *Autoimmunity Reviews*. 2007;6(8):577-580.
43. Chan H, Lee Y, Hong H, Kuo T. Anticentromere antibodies (ACA): clinical distribution and disease specificity. *Clinical and Experimental Dermatology*. 1994;19(4):298-302.
44. Chaudhry A, Samstein R, Treuting P, Liang Y, Pils M, Heinrich J et al. Interleukin-10 Signaling in Regulatory T Cells Is Required for Suppression of Th17 Cell-Mediated Inflammation. *Immunity*. 2011;34(4):566-578.
45. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei K, Li L, Marinos N et al. Conversion of Peripheral CD4+CD25–Naive T Cells to CD4+CD25+Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3. *The Journal of Experimental Medicine*. 2003;198(12):1875-1886.
46. Chiffot H, Fautrel B, Sordet C, Chatelus E, Sibilia J. Incidence and Prevalence of Systemic Sclerosis: A Systematic Literature Review. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2008;37(4):223-235.
47. Chizzolini C, Brembilla N, Montanari E, Truchetet M. Fibrosis and immune dysregulation in systemic sclerosis. *Autoimmunity Reviews*. 2011;10(5):276-281.
48. Chizzolini C, Raschi E, Rezzonico R, Testoni C, Mallone R, Gabrielli A et al. Autoantibodies to fibroblasts induce a proadhesive and proinflammatory fibroblast phenotype in patients with systemic sclerosis. *Arthritis & Rheumatism*. 2002;46(6):1602-1613.
49. Chung Y, Chang S, Martinez G, Yang X, Nurieva R, Kang H et al. Critical Regulation of Early Th17 Cell Differentiation by Interleukin-1 Signaling. *Immunity*. 2009;30(4):576-587.
50. Ciccia F, Guggino G, Ferrante A, Cipriani P, Giacomelli R, Triolo G. Interleukin-9 and T helper type 9 cells in rheumatic diseases. *Clinical & Experimental Immunology*. 2016;185(2):125-132.
51. Colaris M, de Boer M, van der Hulst R, Cohen Tervaert J. Two hundreds cases of ASIA syndrome following silicone implants: a comparative study of 30 years and a review of current literature. *Immunologic Research*. 2016;65(1):120-128.
52. Coulter C, Baron M, Pope J. A Delphi exercise and cluster analysis to aid in the development of potential classification criteria for systemic sclerosis using SSc experts and databases. *Clin Exp Rheumatol*. 2013;2 Suppl(76):24-30.

53. Curotto de Lafaille M, Lafaille J. CD4⁺ regulatory T cells in autoimmunity and allergy. *Current Opinion in Immunology*. 2002;14(6):771-778.
54. Dagher J, Scheer U, Voit R, Grummt I, LONZETTI L, RAYMOND Y et al. Autoantibodies to NOR 90/hUBF: longterm clinical and serological followup in a patient with limited systemic sclerosis suggests an antigen driven immune response. *J Rheumatol*. 2002;29(7):1543-1547.
55. Damoiseaux J, Andrade L, Carballo O, Conrad K, Francescantonio P, Fritzler M et al. Clinical relevance of HEp-2 indirect immunofluorescent patterns: the International Consensus on ANA patterns (ICAP) perspective. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2019;78(7):879-889.
56. D'Angelo W, Fries J, Masi. A, Shulman L. Pathologic observations in systemic sclerosis (scleroderma). *The American Journal of Medicine*. 1969;46(3):428-440.
57. Dantas A, Gonçalves S, Almeida A, Gonçalves R, Sampaio M, Vilar K et al. Reassessing the Role of the Active TGF- β 1 as a Biomarker in Systemic Sclerosis: Association of Serum Levels with Clinical Manifestations. 2019.
58. D'Aoust J, Hudson M, Tatibouet S, Wick J, Mahler M, Baron M et al. Clinical and Serologic Correlates of Anti-PM/Scl Antibodies in Systemic Sclerosis: A Multicenter Study of 763 Patients. *Arthritis & Rheumatology*. 2014;66(6):1608-1615.
59. de Almeida Brito F, Maria Elói Santos S, Aparecida Ferreira G, Pedrosa W, Gradiisse J, Cristina Costa L et al. Diagnostic Evaluation of ELISA and Chemiluminescent Assays as Alternative Screening Tests to Indirect Immunofluorescence for the Detection of Antibodies to Cellular Antigens. *American Journal of Clinical Pathology*. 2016;145(3):323-331.
60. De Palma R, Del Galdo F, Lupoli S, Altucci P, Abbate G, Valentini G. Peripheral T lymphocytes from patients with early systemic sclerosis co-cultured with autologous fibroblasts undergo an oligoclonal expansion similar to that occurring in the skin. *Clinical and Experimental Immunology*. 2006;144(1):169-176.
61. de Paz B, Prado C, Alperi-López M, Ballina-García F, Rodriguez-Carrio J, López P et al. Effects of glucocorticoid treatment on CD25-FOXP3⁺ population and cytokine-producing cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2012;51(7):1198-1207.
62. Denton C. I32 Scleroderma Renal Crisis. *Rheumatology*. 2016;55(Issue suppl_1):Page i6.
63. Denton C, Black C, Abraham D. Mechanisms and consequences of fibrosis in systemic sclerosis. *Nature Clinical Practice Rheumatology*. 2006;2(3):134-144.
64. Denton C, Khanna D. Systemic sclerosis. *The Lancet*. 2017;390(10103):1685-1699.
65. Denton C, Lapadula G, Mouthon L, Müller-Ladner U. Renal complications and scleroderma renal crisis. *Rheumatology*. 2009;48(suppl_3):iii32-iii35.
66. Denton C, Steen V. Scleroderma Renal Crisis. *Scleroderma*. 2011;;361-371.
67. Derk C, Artlett C, Jimenez S. Morbidity and mortality of patients diagnosed with systemic sclerosis after the age of 75: a nested case-control study. *Clinical Rheumatology*. 2006;25(6):831-834.
68. Domsic R, Rodriguez-Reyna T, Lucas M, Fertig N, Medsger T. Skin thickness progression rate: a predictor of mortality and early internal organ involvement in diffuse scleroderma. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2010;70(1):104-109.
69. Douvas A, Achten M, Tan E. Identification of a nuclear protein (Scl-70) as a unique target of human antinuclear antibodies in scleroderma. *J Biol Chem*. 1979;254(20):10514-10522.
70. Dubois M, Boisvert F. The Nucleolus: Structure and Function. *The Functional Nucleus*. 2016;;29-49.
71. Duhon T, Geiger R, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nature Immunology*. 2009;10(8):857-863.
72. Duncan M, Berman B. Stimulation of Collagen and Glycosaminoglycan Production in Cultured Human Adult Dermal Fibroblasts by Recombinant Human Interleukin 6. *Journal of Investigative Dermatology*. 1991;97(4):686-692.

73. Dziadzio M, Smith R, Abraham D, Black C, Denton C. Circulating levels of active transforming growth factor β 1 are reduced in diffuse cutaneous systemic sclerosis and correlate inversely with the modified Rodnan skin score. *Rheumatology*. 2005;44(12):1518-1524.
74. Eissfeller P, Sticherling M, Scholz D, Hennig K, Lüttich T, Motz M et al. Comparison of Different Test Systems for Simultaneous Autoantibody Detection in Connective Tissue Diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005;1050(1):327-339.
75. Elhai M, Avouac J, Kahan A, Allanore Y. Systemic sclerosis at the crossroad of polyautoimmunity. *Autoimmunity Reviews*. 2013;12(11):1052-1057.
76. Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F, Pallotta S et al. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *Journal of Clinical Investigation*. 2009.
77. Fallon P, Richardson E, McKenzie G, McKenzie A. Schistosome Infection of Transgenic Mice Defines Distinct and Contrasting Pathogenic Roles for IL-4 and IL-13: IL-13 Is a Profibrotic Agent. *The Journal of Immunology*. 2000;164(5):2585-2591.
78. Farge D, Arruda L, Brigant F, Clave E, Douay C, Marjanovic Z et al. Long-term immune reconstitution and T cell repertoire analysis after autologous hematopoietic stem cell transplantation in systemic sclerosis patients. *Journal of Hematology & Oncology*. 2017;10(1).
79. Farmer R, Clifford Jr. R, Hines E. Prognostic significance of Raynaud's phenomenon and other clinical characteristics of systemic scleroderma. *Circulation*. 1960;21:1088.
80. Fattal I, Shental N, Molad Y, Gabrielli A, Pokroy-Shapira E, Oren S et al. Epstein-Barr virus antibodies mark systemic lupus erythematosus and scleroderma patients negative for anti-DNA. *Immunology*. 2014;141(2):276-285.
81. Feghali C, Bost K, Boulware D, Levy L. Mechanisms of pathogenesis in scleroderma. I. Overproduction of interleukin 6 by fibroblasts cultured from affected skin sites of patients with scleroderma. *J Rheumatol*. 1992;19(8):1207-1211.
82. Feghali-Bostwick C, Medsger T, Wright T. Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies. *Arthritis & Rheumatism*. 2003;48(7):1956-1963.
83. Fenoglio D, Battaglia F, Parodi A, Stringara S, Negrini S, Panico N et al. Alteration of Th17 and Treg cell subpopulations co-exist in patients affected with systemic sclerosis. *Clinical Immunology*. 2011;139(3):249-257.
84. Fertig N, Domsic R, Rodriguez-Reyna T, Kuwana M, Lucas M, Medsger T et al. Anti-U11/U12 RNP antibodies in systemic sclerosis: A new serologic marker associated with pulmonary fibrosis. *Arthritis & Rheumatism*. 2009;61(7):958-965.
85. Feuerstein N, Spiegel S, Mond J. The nuclear matrix protein, numatrin (B23), is associated with growth factor-induced mitogenesis in Swiss 3T3 fibroblasts and with T lymphocyte proliferation stimulated by lectins and anti-T cell antigen receptor antibody. *The Journal of Cell Biology*. 1988;107(5):1629-1642.
86. Fineschi S, Cozzi F, Burger D, Dayer J, Meroni P, Chizzolini C. Anti-fibroblast antibodies detected by cell-based ELISA in systemic sclerosis enhance the collagenolytic activity and matrix metalloproteinase-1 production in dermal fibroblasts. *Rheumatology*. 2007;46(12):1779-1785.
87. Fleischmajer R. The Pathophysiology Of Scleroderma. *International Journal of Dermatology*. 1977;16(5):310-318.
88. Fossiez F. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *Journal of Experimental Medicine*. 1996;183(6):2593-2603.
89. Frech T, De Domenico I, Murtaugh M, Revelo M, Li D, Sawitzke A et al. Autophagy is a key feature in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Rheumatology International*. 2013;34(3):435-439.

90. Fritzler M. 77. Autoantibody Assays: Performance, Interpretation and Standardization. In: Rose N, Mackay I, ed. by. The autoimmune diseases [Internet]. 5th ed. St. Louis: Academic Press; 2013 [cited 5 August 2019]. p. 1161-1170.
91. Fujii H, Hasegawa M, Takehara K, Mukaida N, Sato S. Abnormal expression of intracellular cytokines and chemokine receptors in peripheral blood T lymphocytes from patients with systemic sclerosis. *Clinical and Experimental Immunology*. 2002;130(3):548-556.
92. Gabrielli A, Svegliati S, Moroncini G, Avvedimento E. Pathogenic autoantibodies in systemic sclerosis. *Current Opinion in Immunology*. 2007;19(6):640-645.
93. Gasse P, Riteau N, Vacher R, Michel M, Fautrel A, di Padova F et al. IL-1 and IL-23 Mediate Early IL-17A Production in Pulmonary Inflammation Leading to Late Fibrosis. *PLoS ONE*. 2011;6(8):e23185.
94. Gelber A, Pillemer S, Baum B, Wigley F, Hummers L, Morris S et al. Distinct recognition of antibodies to centromere proteins in primary Sjogren's syndrome compared with limited scleroderma. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2006;65(8):1028-1032.
95. Ghrénassia E, Avouac J, Khanna D, Derk C, Distler O, Suliman Y et al. Prevalence, Correlates and Outcomes of Gastric Antral Vascular Ectasia in Systemic Sclerosis: A EUSTAR Case-control Study. *The Journal of Rheumatology*. 2013;41(1):99-105.
96. Giovannetti A, Rosato E, Renzi C, Maselli A, Gambardella L, Giammarioli A et al. Analyses of T cell phenotype and function reveal an altered T cell homeostasis in systemic sclerosis. *Clinical Immunology*. 2010;137(1):122-133.
97. Goetz R. The pathology of progressive systemic sclerosis (generalized scleroderma), with special reference to changes in the viscera. *Clin Proc*. 1945;4:337-392.
98. González C, Martin T, Arroyo T, García-Isidoro M, Navajo J, González-Buitrago J. Comparison and variation of different methodologies for the detection of autoantibodies to nuclear antigens (ANA). *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 1997;11(6):388-392.
99. Goren I, Segal G, Shoenfeld Y. Autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvant (ASIA) evolution after silicone implants. Who is at risk? *Clinical Rheumatology*. 2015;34(10):1661-1666.
100. Goswami R. Th9 Cells: New Member of T Helper Cell Family. *Methods in Molecular Biology*. 2017;;1-19.
101. Gourh P, Arnett F, Assassi S, Tan F, Huang M, Diekman L et al. Plasma cytokine profiles in systemic sclerosis: associations with autoantibody subsets and clinical manifestations. *Arthritis Research & Therapy*. 2009;11(5):R147.
102. Guggino G, Lo Pizzo M, Di Liberto D, Rizzo A, Cipriani P, Ruscitti P et al. Interleukin-9 over-expression and T helper 9 polarization in systemic sclerosis patients. *Clinical & Experimental Immunology*. 2017;190(2):208-216.
103. Gunawardena H. The Clinical Features of Myositis-Associated Autoantibodies: a Review. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. 2015;52(1):45-57.
104. Gurram M, Pahwa S, Frieri M. Augmented interleukin-6 secretion in collagen-stimulated peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic sclerosis. *Ann Allergy*. 2019;73(6):493-496.
105. Hamaguchi Y. Autoantibody profiles in systemic sclerosis: Predictive value for clinical evaluation and prognosis. *The Journal of Dermatology*. 2010;37(1):42-53.
106. Hamaguchi Y, Kodera M, Matsushita T, Hasegawa M, Inaba Y, Usuda T et al. Clinical and Immunologic Predictors of Scleroderma Renal Crisis in Japanese Systemic Sclerosis Patients With Anti-RNA Polymerase III Autoantibodies. *Arthritis & Rheumatology*. 2015;67(4):1045-1052.
107. Hasegawa M. Enhanced production of interleukin-6 (IL-6), oncostatin M and soluble IL-6 receptor by cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic sclerosis. *Rheumatology*. 1999;38(7):612-617.

- 108.Hasegawa M. Biomarkers in systemic sclerosis: Their potential to predict clinical courses. *The Journal of Dermatology*. 2016;43(1):29-38.
- 109.Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K. Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 1997;24(2):328-333.
- 110.Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Sato S. Pathogenesis of systemic sclerosis: Altered B cell function is the key linking systemic autoimmunity and tissue fibrosis. *Journal of Dermatological Science*. 2005;39(1):1-7.
- 111.Heijnen I, Foocharoen C, Bannert B, Carrieri P, Caporali R, Smith V et al. Clinical significance of coexisting antitopoisomerase I and anticentromere antibodies in patients with systemic sclerosis: a EUSTAR group-based study. *Clin Exp Rheumatol*. 2013;31(2 Suppl 76):96-102.
- 112.Hemdan N, Birkenmeier G, Wichmann G, Abu El-Saad A, Krieger T, Conrad K et al. Interleukin-17-producing T helper cells in autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*. 2010;9(11):785-792.
- 113.Herold M, Klotz W, Andrade L, Conrad K, de Melo Cruvinel W, Damoiseaux J et al. International Consensus on Antinuclear Antibody Patterns: defining negative results and reporting unidentified patterns. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2018;56(10):1799-1802.
- 114.Herold M, Klotz W, Andrade L, Conrad K, de Melo Cruvinel W, Damoiseaux J et al. International Consensus on Antinuclear Antibody Patterns: defining negative results and reporting unidentified patterns. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2018;56(10):1799-1802.
- 115.Herold M, Klotz W, Sack U, Conrad K. ICAP – ein Versuch zur einheitlichen Beschreibung der Fluoreszenzmuster von antizellulären Antikörpern auf HEp-2-Zellen. *LaboratoriumsMedizin*. 2017;41(4).
- 116.Herrick A, Ennis H, Bhushan M, Silman A, Baidam E. Incidence of childhood linear scleroderma and systemic sclerosis in the UK and Ireland. *Arthritis Care & Research*. 2010;62(2):213-218.
- 117.Higashi-Kuwata N, Makino T, Inoue Y, Takeya M, Ihn H. Alternatively activated macrophages (M2 macrophages) in the skin of patient with localized scleroderma. *Experimental Dermatology*. 2009;18(8):727-729.
- 118.Ho K, Reveille J. The clinical relevance of autoantibodies in scleroderma. *Arthritis Research & Therapy*. 2003;5(2):80-93.
- 119.Hoa S, Hudson M, Troyanov Y, Proudman S, Walker J, Stevens W et al. Single-specificity anti-Ku antibodies in an international cohort of 2140 systemic sclerosis subjects. *Medicine*. 2016;95(35):e4713.
- 120.Hoffmann K, Mccarty T, Segal D, Chiaramonte M, Hesse M, Davis E et al. Disease fingerprinting with cDNA microarrays reveals distinct gene expression profiles in lethal type 1 and type 2 cytokine-mediated inflammatory reactions. *The FASEB Journal*. 2001;15(13):2545-2547.
- 121.Horimoto A, da Costa I. Overlap between systemic sclerosis and rheumatoid arthritis: a distinct clinical entity?. *Revista Brasileira de Reumatologia (English Edition)*. 2016;56(4):287-298.
- 122.Hornbeck P. Double-Immunodiffusion Assay for Detecting Specific Antibodies. *Current Protocols in Immunology*. 1991;00(1):2.3.1-2.3.4.
- 123.Hsu H, Yang P, Wang J, Wu Q, Myers R, Chen J et al. Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice. *Nature Immunology*. 2007;9(2):166-175.

124. Huaux F, Liu T, McGarry B, Ullenbruch M, Xing Z, Phan S. Eosinophils and T Lymphocytes Possess Distinct Roles in Bleomycin-Induced Lung Injury and Fibrosis. *The Journal of Immunology*. 2003;171(10):5470-5481.
125. Imai H, Fritzler M, Neri R, Bombardieri S, Tan E, Chan E. Immunocytochemical characterization of human NOR-90 (upstream binding factor) and associated antigens reactive with autoimmune sera. *Molecular Biology Reports*. 1994;19(2):115-124.
126. Iudici M, Fasano S, Iacono D, Russo B, Cuomo G, Valentini G. Prevalence and factors associated with glucocorticoids (GC) use in systemic sclerosis (SSc): a systematic review and meta-analysis of cohort studies and registries. *Clinical Rheumatology*. 2013;33(2):153-164.
127. Ivanova-Todorova E, Bochev I, Mourdjeva M, Dimitrov R, Bukarev D, Kyurkchiev S et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Immunology Letters*. 2009;126(1-2):37-42.
128. Jaeschke R, Guyatt G, Sackett D. Users' guides to the medical literature. III. How to use an article about a diagnostic test. A. Are the results of the study valid? Evidence-Based Medicine Working Group. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 1994;271(5):389-391.
129. Jarzabek-Chorzelska M, Blaszczyk M, Jablonska S, Chorzelski T, Kumar V, Beutner E. Scl 70 antibody—a specific marker of systemic sclerosis. *British Journal of Dermatology*. 1986;115(4):393-401.
130. Jiménez-García L, Rothblum L, Busch H, Ochs R. Nucleologenesis: use of non-isotopic in situ hybridization and immunocytochemistry to compare the localization of rDNA and nucleolar proteins during mitosis. *Biology of the Cell*. 1989;65(3):239-246.
131. Johnson S, Soowamber M, Fransen J, Khanna D, Van Den Hoogen F, Baron M et al. There is a need for new systemic sclerosis subset criteria. A content analytic approach. *Scandinavian Journal of Rheumatology*. 2017;47(1):62-70.
132. Joseph C, Darrah E, Shah A, Skora A, Casciola-Rosen L, Wigley F et al. Association of the Autoimmune Disease Scleroderma with an Immunologic Response to Cancer. *Science*. 2013;343(6167):152-157.
133. Kahaleh M. Vascular Involvement in Systemic Sclerosis (SSc). *Clin Exp Rheumatol*. 2004;22(Suppl. 33):S19-S23.
134. Kähäri V, Sandberg M, Kalimo H, Vuorio T, Vuorio E. Identification of Fibroblasts Responsible for Increased Collagen Production in Localized Scleroderma by In Situ Hybridization. *Journal of Investigative Dermatology*. 1988;90(5):664-670.
135. Kaji K, Fertig N, Medsger T, Satoh T, Hoshino K, Hamaguchi Y et al. Autoantibodies to RuvBL1 and RuvBL2: A Novel Systemic Sclerosis-Related Antibody Associated With Diffuse Cutaneous and Skeletal Muscle Involvement. *Arthritis Care & Research*. 2014;66(4):575-584.
136. Kalogerou A. Early T cell activation in the skin from patients with systemic sclerosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2005;64(8):1233-1235.
137. Kantor T, Friberg D, Medsger T, Buckingham R, Whiteside T. Cytokine production and serum levels in systemic sclerosis. *Clinical Immunology and Immunopathology*. 1992;65(3):278-285.
138. Kayser C, Fritzler M. Autoantibodies in Systemic Sclerosis: Unanswered Questions. *Frontiers in Immunology*. 2015;6.
139. Khanna D, Furst D, Clements P, Allanore Y, Baron M, Czirjak L et al. Standardization of the Modified Rodnan Skin Score for Use in Clinical Trials of Systemic Sclerosis. *Journal of Scleroderma and Related Disorders*. 2017;2(1):11-18.
140. Kill A, Tabeling C, Undeutsch R, Kühl A, Günther J, Radic M et al. Autoantibodies to angiotensin and endothelin receptors in systemic sclerosis induce cellular and systemic events associated with disease pathogenesis. *Arthritis Research & Therapy*. 2014;16(1):R29.

141. Klein S, Kretz C, Ruland V, Stumpf C, Haust M, Hartschuh W et al. Reduction of regulatory T cells in skin lesions but not in peripheral blood of patients with systemic sclerosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2010;70(8):1475-1481.
142. Knobler R, Moinzadeh P, Hunzelmann N, Kreuter A, Cozzio A, Mouthon L et al. European Dermatology Forum S1-guideline on the diagnosis and treatment of sclerosing diseases of the skin, Part 1: localized scleroderma, systemic sclerosis and overlap syndromes. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2017;31(9):1401-1424.
143. Knudsen G, Harbo H, Smestad C, Celius E, Åkesson E, Oturai A et al. X chromosome inactivation in females with multiple sclerosis. *European Journal of Neurology*. 2007;14(12):1392-1396.
144. Kopf M, Gros G, Bachmann M, Lamers M, Bluethmann H, Köhler G. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature*. 1993;362(6417):245-248.
145. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo V. IL-17 and Th17 Cells. *Annual Review of Immunology*. 2009;27(1):485-517.
146. Koumakis E, Giraud M, Dieudé P, Cuomo G, Airo P, Chiocchia G et al. SAT0013 Candidate gene study in systemic sclerosis identifies a rare and functional variant of TNFAIP3 locus as a risk factor for individual polyautoimmunity. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2013;71(Suppl 3):475.1-475.
147. Krzyszczyk M, Li Y, Ross S, Ceribelli A, Chan E, Bubb M et al. Gender and ethnicity differences in the prevalence of scleroderma-related autoantibodies. *Clinical Rheumatology*. 2011;30(10):1333-1339.
148. Kurasawa K, Hirose K, Sano H, Endo H, Shinkai H, Nawata Y et al. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis & Rheumatism*. 2000;43(11):2455-2463.
149. Kuwana M. Circulating Anti-Nuclear Antibodies in Systemic Sclerosis: Utility in Diagnosis and Disease Subsetting. *Journal of Nippon Medical School*. 2017;84(2):56-63.
150. Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, Kawakami Y, Tojo T. Longitudinal analysis of autoantibody response to topoisomerase I in systemic sclerosis. *Arthritis & Rheumatism*. 2000;43(5):1074.
151. Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, Tojo T, Homma M. Autoantibody reactive with three classes of RNA polymerases in sera from patients with systemic sclerosis. *Journal of Clinical Investigation*. 1993;91(4):1399-1404.
152. Kyurkchiev D. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World Journal of Stem Cells*. 2014;6(5):552.
153. Lafyatis R, York M. Innate immunity and inflammation in systemic sclerosis. *Current Opinion in Rheumatology*. 2009;21(6):617-622.
154. Lazzaroni M, Cavazzana I, Colombo E, Dobrota R, Hernandez J, Hesselstrand R et al. Malignancies in Patients with Anti-RNA Polymerase III Antibodies and Systemic Sclerosis: Analysis of the EULAR Scleroderma Trials and Research Cohort and Possible Recommendations for Screening. *The Journal of Rheumatology*. 2017;44(5):639-647.
155. Liaskos C, Marou E, Simopoulou T, Barmakoudi M, Efthymiou G, Scheper T et al. Disease-related autoantibody profile in patients with systemic sclerosis. *Autoimmunity*. 2017;50(7):414-421.
156. Lin S, Chen K, Lin C, Kuo C, Ling Q, Chan C. The quantitative analysis of peripheral blood FOXP3-expressing T cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients. *European Journal of Clinical Investigation*. 2007;37(12):987-996.
157. Lleo A, Marzorati S, Anaya J, Gershwin M. Primary biliary cholangitis: a comprehensive overview. *Hepatology International*. 2017;11(6):485-499.
158. Luo Y, Wang Y, Wang Q, Xiao R, Lu Q. Systemic sclerosis: Genetics and epigenetics. *Journal of Autoimmunity*. 2013;41:161-167.

159. Ma W, Chang C, Gershwin M, Lian Z. Development of autoantibodies precedes clinical manifestations of autoimmune diseases: A comprehensive review. *Journal of Autoimmunity*. 2017;83:95-112.
160. Maddison P. Mixed connective tissue disease: overlap syndromes. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*. 2000;14(1):111-124.
161. Mahler M, Fritzler M. Antinucleolar Antibodies as Diagnostic Markers in Systemic Autoimmune Diseases. *Autoantibodies*. 2014;:145-150.
162. Mahler M, Hanly J, Fritzler M. Importance of the dense fine speckled pattern on HEp-2 cells and anti-DFS70 antibodies for the diagnosis of systemic autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*. 2012;11(9):642-645.
163. Manel N, Unutmaz D, Littman D. The differentiation of human TH-17 cells requires transforming growth factor- β and induction of the nuclear receptor ROR γ t. *Nature Immunology*. 2008;9(6):641-649.
164. Marie I, Gehanno J, Bubenheim M, Duval-Modeste A, Joly P, Dominique S et al. Systemic sclerosis and exposure to heavy metals: A case control study of 100 patients and 300 controls. *Autoimmunity Reviews*. 2017;16(3):223-230.
165. Mariz H, Sato E, Barbosa S, Rodrigues S, Dellavance A, Andrade L. Pattern on the antinuclear antibody-HEp-2 test is a critical parameter for discriminating antinuclear antibody-positive healthy individuals and patients with autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis & Rheumatism*. 2010;63(1):191-200.
166. Masi A. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis & Rheumatism*. 1980;23(5):581-590.
167. Mathian A, Parizot C, Dorgham K, Trad S, Arnaud L, Larsen M et al. Activated and resting regulatory T cell exhaustion concurs with high levels of interleukin-22 expression in systemic sclerosis lesions. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2012;71(7):1227-1234.
168. Matsui S. Ueber die Pathologie und Pathogenese der Scleroderma. *Mitt ad med Fakult dk Univ zu Tokyo*. 1924;31:55.
169. Matsushita T, Hasegawa M, Yanaba K, Kodera M, Takehara K, Sato S. Elevated serum BAFF levels in patients with systemic sclerosis: Enhanced BAFF signaling in systemic sclerosis B lymphocytes. *Arthritis & Rheumatism*. 2005;54(1):192-201.
170. Mavalia C, Scaletti C, Romagnani P, Carossino A, Pignone A, Emmi L et al. Type 2 helper T-cell predominance and high CD30 expression in systemic sclerosis. *Am J Pathol*. 1997;151(6):1751-1758.
171. Mehra S, Walker J, Patterson K, Fritzler M. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Autoimmunity Reviews*. 2013;12(3):340-354.
172. Mierau R, Moinzadeh P, Riemekasten G, Melchers I, Meurer M, Reichenberger F et al. Frequency of disease-associated and other nuclear autoantibodies in patients of the German network for systemic scleroderma: correlation with characteristic clinical features. *Arthritis Research & Therapy*. 2011;13(5):R172.
173. Miller F, Alfredsson L, Costenbader K, Kamen D, Nelson L, Norris J et al. Epidemiology of environmental exposures and human autoimmune diseases: Findings from a National Institute of Environmental Health Sciences Expert Panel Workshop. *Journal of Autoimmunity*. 2012;39(4):259-271.
174. Mimori T. Clinical Significance of Anti-Ku Autoantibodies -A Serologic Marker of Overlap Syndrome?. *Internal Medicine*. 2002;41(12):1096-1098.
175. Mitri G, Lucas M, Fertig N, Steen V, Medsger T. A comparison between anti-Th/To- and anticentromere antibody-positive systemic sclerosis patients with limited cutaneous involvement. *Arthritis & Rheumatism*. 2003;48(1):203-209.
176. Mora G. Systemic Sclerosis: Environmental Factors. *The Journal of Rheumatology*. 2009;36(11):2383-2396.

177. Mosmann T, Coffman R. Two types of mouse helper T-cell clone. *Immunology Today*. 1987;8(7-8):223-227.
178. Muratori P, Muratori L, Cassani F, Terlizzi P, Lenzi M, Rodrigo L et al. Anti-multiple nuclear dots (anti-MND) and anti-SP100 antibodies in hepatic and rheumatological disorders. *Clinical & Experimental Immunology*. 2002;127(1):172-175.
179. Murdjeva M, Rymasheva N, Draganov M, Paunov L. A comparative study of immunological methods for determination of serum antinuclear antibodies. *Folia Medica*. 2011;53(4):21-27.
180. Nakashima T, Jinnin M, Yamane K, Honda N, Kajihara I, Makino T et al. Impaired IL-17 Signaling Pathway Contributes to the Increased Collagen Expression in Scleroderma Fibroblasts. *The Journal of Immunology*. 2012;188(8):3573-3583.
181. Needleman B, Wigley F, Stair R. Interleukin-1, Interleukin-2, Interleukin-4, Interleukin-6, Tumor Necrosis Factor α , and Interferon- γ Levels in Sera from Patients With Scleroderma. *Arthritis & Rheumatism*. 1992;35(1):67-72.
182. Ng T, Britton G, Hill E, Verhagen J, Burton B, Wraith D. Regulation of Adaptive Immunity; The Role of Interleukin-10. *Frontiers in Immunology*. 2013;4.
183. Nihtyanova S, Denton C. Autoantibodies as predictive tools in systemic sclerosis. *Nature Reviews Rheumatology*. 2010;6(2):112-116.
184. Nishimagi E, Tochimoto A, Kawaguchi Y, Satoh T, Kuwana M, Takagi K et al. Characteristics of patients with early systemic sclerosis and severe gastrointestinal tract involvement. *J Rheumatol* 2007 Oct;34(10):2050-5. 2007;34(10):2050-2055.
185. Nistala K, Wedderburn L. Th17 and regulatory T cells: rebalancing pro- and anti-inflammatory forces in autoimmune arthritis. *Rheumatology*. 2009;48(6):602-606.
186. O'Sullivan J, Pai D, Cridge A, Engelke D, Ganley A. The nucleolus: a raft adrift in the nuclear sea or the keystone in nuclear structure?. *BioMolecular Concepts*. 2013;4(3).
187. Ochs R, Lischwe M, Spohn W, Busch H. Fibrillarin: a new protein of the nucleolus identified by autoimmune sera. *Biology of the Cell*. 1985;54(2):123-133.
188. O'Donovan M, Johns S, Wilcox P. The effect of PHA stimulation on lymphocyte subpopulations in whole-blood cultures. *Mutagenesis*. 1995;10(4):371-374.
189. O'Garra A. CD4⁺ T-cell subsets in autoimmunity. *Current Opinion in Immunology*. 1997;9(6):872-883.
190. Okamoto Y, Hasegawa M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Huu D, Iwakura Y et al. Potential roles of interleukin-17A in the development of skin fibrosis in mice. *Arthritis & Rheumatism*. 2012;64(11):3726-3735.
191. Okano Y. Autoantibody Reactive with RNA Polymerase III in Systemic Sclerosis. *Annals of Internal Medicine*. 1993;119(10):1005.
192. Okano Y, Medsger T. Autoantibody to th ribonucleoprotein (nucleolar 7-2 rna protein particle) in patients with systemic sclerosis. *Arthritis & Rheumatism*. 1990;33(12):1822-1828.
193. Ong V, Evans L, Shiwen X, Fisher I, Rajkumar V, Abraham D et al. Monocyte chemoattractant protein 3 as a mediator of fibrosis: Overexpression in systemic sclerosis and the type 1 tight-skin mouse. *Arthritis & Rheumatism*. 2003;48(7):1979-1991.
194. Onishi A, Sugiyama D, Kumagai S, Morinobu A. Cancer Incidence in Systemic Sclerosis: Meta-Analysis of Population-Based Cohort Studies. *Arthritis & Rheumatism*. 2013;65(7):1913-1921.
195. Op De Beeck K, Vermeersch P, Verschueren P, Westhovens R, Mariën G, Blockmans D et al. Detection of antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence and by solid phase assay. *Autoimmunity Reviews*. 2011;10(12):801-808.
196. O'Reilly S, Huggle T, van Laar J. T cells in systemic sclerosis: a reappraisal. *Rheumatology*. 2012;51(9):1540-1549.
197. Osler W. The principles and practice of medicine. New York: D. Appleton; 1893.

198. Papp G, Horvath I, Barath S, Gyimesi E, Sipka S, Szodoray P et al. Altered T-cell and regulatory cell repertoire in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Scandinavian Journal of Rheumatology*. 2011;40(3):205-210.
199. Papp G, Horvath I, Barath S, Gyimesi E, Sipka S, Szodoray P et al. Altered T-cell and regulatory cell repertoire in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Scandinavian Journal of Rheumatology*. 2011;40(3):205-210.
200. Patterson K, Roberts-Thomson P, Lester S, Tan J, Hakendorf P, Rischmueller M et al. Interpretation of an Extended Autoantibody Profile in a Well-Characterized Australian Systemic Sclerosis (Scleroderma) Cohort Using Principal Components Analysis. *Arthritis & Rheumatology*. 2015;67(12):3234-3244.
201. Pauling J, Salazar G, Lu H, Betteridge Z, Assassi S, Mayes M et al. Presence of anti-eukaryotic initiation factor-2B, anti-RuvBL1/2 and anti-synthetase antibodies in patients with anti-nuclear antibody negative systemic sclerosis. *Rheumatology*. 2017;57(4):712-717.
202. Pavitt G. eIF2B, a mediator of general and gene-specific translational control. *Biochemical Society Transactions*. 2005;33(6):1487.
203. Peterson L, Jaskowski T, Mayes M, Tebo A. Detection of anti-U3-RNP/fibrillarin IgG antibodies by line immunoblot assay has comparable clinical significance to immunoprecipitation testing in systemic sclerosis. *Immunologic Research*. 2015;64(2):483-488.
204. Phelps R, Daian C, Shibata S, Fleischmajer R, Bona C. Induction of Skin Fibrosis and Autoantibodies by Infusion of Immunocompetent Cells from Tight Skin Mice into C57BL/6 Pa/Pa Mice. *Journal of Autoimmunity*. 1993;6(6):701-718.
205. Poormoghim H, Moghadam A, Moradi-Lakeh M, Jafarzadeh M, Asadifar B, Ghelman M et al. Systemic sclerosis: demographic, clinical and serological features in 100 Iranian patients. *Rheumatology International*. 2013;33(8):1943-1950.
206. Postlethwaite A, Holness M, Katai H, Raghoebar R. Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix proteins in response to interleukin 4. *Journal of Clinical Investigation*. 1992;90(4):1479-1485.
207. Prescott R, Freemont A, Jones C, Hoyland J, Fielding P. Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. *The Journal of Pathology*. 1992;166(3):255-263.
208. Radić M, Kaliterna D, Fabijanić D, Radić J. Prevalence of systemic sclerosis in Split–Dalmatia county in Southern Croatia. *Clinical Rheumatology*. 2010;29(4):419-421.
209. Radić M, Martinović K, Ljutić D. The level of anti-topoisomerase I antibodies highly correlates with metacarpophalangeal and proximal interphalangeal joints flexion contractures in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol*. 2006;24(4):407-412.
210. Radstake T, van Bon L, Broen J, Hussiani A, Hesselstrand R, Wuttge D et al. The Pronounced Th17 Profile in Systemic Sclerosis (SSc) Together with Intracellular Expression of TGFβ and IFNγ Distinguishes SSc Phenotypes. *PLoS ONE*. 2009;4(6):e5903.
211. Radstake T, van Bon L, Broen J, Wenink M, Santegoets K, Deng Y et al. Increased Frequency and Compromised Function of T Regulatory Cells in Systemic Sclerosis (SSc) Is Related to a Diminished CD69 and TGFβ Expression. *PLoS ONE*. 2009;4(6):e5981.
212. Raja J, Denton C. Cytokines in the immunopathology of systemic sclerosis. *Seminars in Immunopathology*. 2015;37(5):543-557.
213. Randone S, Guiducci S, Cerinic M. Systemic sclerosis and infections. *Autoimmunity Reviews*. 2008;8(1):36-40.
214. Rankin A, Mumm J, Murphy E, Turner S, Yu N, McClanahan T et al. IL-33 Induces IL-13–Dependent Cutaneous Fibrosis. *The Journal of Immunology*. 2009;184(3):1526-1535.
215. Ranque B, Mouthon L. Geoepidemiology of systemic sclerosis. *Autoimmunity Reviews*. 2010;9(5):A311-A318.

- 216.Ranque B, Mouthon L. Geoepidemiology of systemic sclerosis. *Autoimmunity Reviews*. 2010;9(5):A311-A318.
- 217.Rengarajan J, Szabo S, Glimcher L. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunology Today*. 2000;21(10):479-483.
- 218.Reveille J, Solomon D. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: Anticentromere, Scl-70, and nucleolar antibodies. *Arthritis & Rheumatism*. 2003;49(3):399-412.
- 219.Riemekasten G, Philippe A, Nather M, Slowinski T, Muller D, Heidecke H et al. Involvement of functional autoantibodies against vascular receptors in systemic sclerosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2010;70(3):530-536.
- 220.Rodnan G. An Historical Account of the Study of Progressive Systemic Sclerosis (Diffuse Scleroderma). *Annals of Internal Medicine*. 1962;57(2_Part_1):305.
- 221.Rodnan G. The Nature of Joint Involvement in Progressive Systemic Sclerosis (Diffuse Scleroderma). *Annals of Internal Medicine*. 1962;56(3):422.
- 222.Rodnan G, Fennell Jr R. Progressive Systemic Sclerosis Sine Scleroderma. *JAMA*. 1962;180(8):665.
- 223.Rodríguez-Reyna T, Furuzawa-Carballeda J, Cabiedes J, Fajardo-Hermosillo L, Martínez-Reyes C, Díaz-Zamudio M et al. Th17 peripheral cells are increased in diffuse cutaneous systemic sclerosis compared with limited illness: a cross-sectional study. *Rheumatology International*. 2011;32(9):2653-2660.
- 224.Rozman B, Cucnik S, Sodin-Semrl S, Czirjak L, Varju C, Distler O et al. Prevalence and clinical associations of anti-Ku antibodies in patients with systemic sclerosis: a European EUSTAR-initiated multi-centre case-control study. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2007;67(9):1282-1286.
- 225.Rudnicka L, Czuwara J, Barusińska A, Nowicka U, Makiela B, Jablonska S. Implications for the Use of Topoisomerase I Inhibitors in Treatment of Patients with Systemic Sclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1996;803(1 The Camptoth):318-320.
- 226.Russo P, Lester S, Roberts-Thomson P. Systemic sclerosis, birth order and parity. *International Journal of Rheumatic Diseases*. 2013;;n/a-n/a.
- 227.Saito A, Muro Y, Sugiura K, Akiyama M. Low prevalence of autoantibodies to CENP-H, -I, -K, -L, -M, -N, -T and -U in a Japanese cohort of anti-centromere positive samples. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 2012;35(1):57-63.
- 228.Salazar G, Assassi S, Wigley F, Hummers L, Varga J, Hinchcliff M et al. Antinuclear antibody-negative systemic sclerosis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2015;44(6):680-686.
- 229.Salmon-Ehr V. Expression of interleukin-4 in scleroderma skin specimens and scleroderma fibroblast cultures. Potential role in fibrosis. *Archives of Dermatology*. 1996;132(7):802-806.
- 230.Sato S, Hanakawa H, Hasegawa M, Nagaoka T, Hamaguchi Y, Nishigima C. Levels of interleukin 12, a cytokine of type 1 helper T cells, are elevated in sera from patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2000;27(12):2838-2842.
- 231.Sato S, Hasegawa M, Takehara K. Serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 correlate with total skin thickness score in patients with systemic sclerosis. *Journal of Dermatological Science*. 2001;27(2):140-146.
- 232.Satoh M, Ajmani A, Ogasawara T, Langdon J, Hirakata M, Wang J et al. Autoantibodies to RNA polymerase II are common in systemic lupus erythematosus and overlap syndrome. Specific recognition of the phosphorylated (IIO) form by a subset of human sera. *Journal of Clinical Investigation*. 1994;94(5):1981-1989.
- 233.Satoh M, Chan E, Ho L, Rose K, Parks C, Cohn R et al. Prevalence and sociodemographic correlates of antinuclear antibodies in the United States. *Arthritis & Rheumatism*. 2012;64(7):2319-2327.

234. Scala E, Pallotta S, Frezzolini A, Abeni D, Barbieri C, Sampogna F et al. Cytokine and chemokine levels in systemic sclerosis: relationship with cutaneous and internal organ involvement. *Clinical and Experimental Immunology*. 2004;138(3):540-546.
235. Scharffetter K, Lankat-Buttgereit B, Krieg T. Localization of collagen mRNA in normal and scleroderma skin by in-situ hybridization. *European Journal of Clinical Investigation*. 1988;18(1):9-17.
236. Shah A, Hummers L, Casciola-Rosen L, Visvanathan K, Rosen A, Wigley F. Examination of Autoantibody Status and Clinical Features Associated With Cancer Risk and Cancer-Associated Scleroderma. *Arthritis & Rheumatology*. 2015;67(4):1053-1061.
237. Shah A, Rosen A, Hummers L, Wigley F, Casciola-Rosen L. Close temporal relationship between onset of cancer and scleroderma in patients with RNA polymerase I/III antibodies. *Arthritis & Rheumatism*. 2010;62(9):2787-2795.
238. Shanmugam V, Swistowski D, Saddic N, Wang H, Steen V. Comparison of indirect immunofluorescence and multiplex antinuclear antibody screening in systemic sclerosis. *Clinical Rheumatology*. 2011;30(10):1363-1368.
239. Sharma S, MacLean J, Pinto C, Kradin R. The effect of an anti-CD3 monoclonal antibody on bleomycin-induced lymphokine production and lung injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1996;154(1):193-200.
240. Shouval R, Furie N, Raanani P, Nagler A, Gafter-Gvili A. Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Systemic Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2018;24(5):937-944.
241. Silman A. Epidemiology of scleroderma. *Current Opinion in Rheumatology*. 1991;3(6):967-972.
242. Silman A, Hochberg M, Cooper C. *Epidemiology of the rheumatic diseases*. Oxford: Oxford University Press; 2009.
243. Sirlin J. The Nucleolus. *Progress in Biophysics and Biophysical Chemistry*. 1962;12:25-66.
244. Slobodin G, Ahmad M, Rosner I, Peri R, Rozenbaum M, Kessel A et al. Regulatory T cells (CD4+CD25brightFoxP3+) expansion in systemic sclerosis correlates with disease activity and severity. *Cellular Immunology*. 2010;261(2):77-80.
245. Sollberg S, Peltonen J, Uitto J, Jimenez S. Elevated expression of $\beta 1$ and $\beta 2$ integrins, intercellular adhesion molecule 1, and endothelial leukocyte adhesion molecule 1 in the skin of patients with systemic sclerosis of recent onset. *Arthritis & Rheumatism*. 1992;35(3):290-298.
- Spencer-Green G. Outcomes in Primary Raynaud Phenomenon. *Archives of Internal Medicine*. 1998;158(6):595-600.
246. Spencer-Green G, Alter D, Welch H. Test Performance in Systemic Sclerosis. *The American Journal of Medicine*. 1997;103(3):242-248.
247. Srivastava N, Hudson M, Tatibouet S, Wang M, Baron M, Fritzler M. Thinking outside the box—The associations with cutaneous involvement and autoantibody status in systemic sclerosis are not always what we expect. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2015;45(2):184-189.
248. Steen V. Predictors of end stage lung disease in systemic sclerosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2003;62(2):97-99.
249. Steen V. Autoantibodies in Systemic Sclerosis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2005;35(1):35-42.
250. Steen V, Oddis C, Conte C, Janoski J, Casterline G, Medsger T. Incidence of systemic sclerosis in allegheny county, Pennsylvania. A twenty-year study of hospital-diagnosed cases, 1963–1982. *Arthritis & Rheumatism*. 1997;40(3):441-445.
251. Steen V, Powell D, Medsger T. Clinical correlations and prognosis based on serum autoantibodies in patients with systemic sclerosis. *Arthritis & Rheumatism*. 1988;31(2):196-203.

252. Suen J, Li H, Jong Y, Chiang B, Yen J. Altered homeostasis of CD4⁺ FoxP3⁺ regulatory T-cell subpopulations in systemic lupus erythematosus. *Immunology*. 2009;127(2):196-205.
253. Sujau I, Ng C, Sthaneshwar P, Sockalingam S, Cheah T, Yahya F et al. Clinical and autoantibody profile in systemic sclerosis: baseline characteristics from a West Malaysian cohort. *International Journal of Rheumatic Diseases*. 2014;18(4):459-465.
254. Sundaresan M, Yu Z, Ferrans V, Irani K, Finkel T. Requirement for Generation of H₂O₂ for Platelet-Derived Growth Factor Signal Transduction. *Science*. 1995;270(5234):296-299.
255. Svegliati S, Cancelli R, Sambo P, Luchetti M, Paroncini P, Orlandini G et al. Platelet-derived Growth Factor and Reactive Oxygen Species (ROS) Regulate Ras Protein Levels in Primary Human Fibroblasts via ERK1/2. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(43):36474-36482.
256. Svegliati S, Cancelli R, Sambo P, Luchetti M, Paroncini P, Orlandini G et al. Platelet-derived Growth Factor and Reactive Oxygen Species (ROS) Regulate Ras Protein Levels in Primary Human Fibroblasts via ERK1/2. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(43):36474-36482.
257. Sziksz E, Pap D, Lippai R, Béres N, Fekete A, Szabó A et al. Fibrosis Related Inflammatory Mediators: Role of the IL-10 Cytokine Family. *Mediators of Inflammation*. 2015;2015:1-15.
258. Tarn W, Steitz J. Highly Diverged U4 and U6 Small Nuclear RNAs Required for Splicing Rare AT-AC Introns. *Science*. 1996;273(5283):1824-1832.
259. Tiev K, Abriol J, Burland M, Antonelli D, Klatzmann D, Cabane J et al. T cell repertoire in patients with stable scleroderma. *Clinical and Experimental Immunology*. 2005;139(2):348-354.
260. Tormey V, Bunn C, Denton C, Black C. Anti-fibrillarin antibodies in systemic sclerosis. *Rheumatology*. 2001;40(10):1157-1162.
261. Truchetet M, Brembilla N, Montanari E, Allanore Y, Chizzolini C. Increased frequency of circulating Th22 in addition to Th17 and Th2 lymphocytes in systemic sclerosis: association with interstitial lung disease. *Arthritis Research & Therapy*. 2011;13(5):R166.
262. Truchetet M, Brembilla N, Montanari E, Lonati P, Raschi E, Zeni S et al. Interleukin-17A⁺ Cell Counts Are Increased in Systemic Sclerosis Skin and Their Number Is Inversely Correlated With the Extent of Skin Involvement. *Arthritis & Rheumatism*. 2013;65(5):1347-1356.
263. Tseng C, Yen J, Tsai W, Ou T, Wu C, Sung W et al. Increased incidence of Sjogren's syndrome in systemic sclerosis: A nationwide population study. *Autoimmunity*. 2015;48(7):438-444.
264. Tuffanelli D, Winkelmann R. Systemic Scleroderma. *Archives of Dermatology*. 1961;84(3):359-371.
265. Ulanet D, Torbenson M, Dang C, Casciola-Rosen L, Rosen A. Unique conformation of cancer autoantigen B23 in hepatoma: A mechanism for specificity in the autoimmune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(21):12361-12366.
266. Ulanet D, Wigley F, Gelber A, Rosen A. Autoantibodies against B23, a nucleolar phosphoprotein, occur in scleroderma and are associated with pulmonary hypertension. *Arthritis & Rheumatism*. 2003;49(1):85-92.
267. Valencia X. TNF downmodulates the function of human CD4⁺CD25^{hi} T-regulatory cells. *Blood*. 2006;108(1):253-261.
268. Valentini G, Baroni A, Esposito K, Naclerio C, Buommino E, Farzati A et al. Peripheral blood T lymphocytes from systemic sclerosis patients show both Th1 and Th2 activation. *J Clin Immunol*. 2001;21(3):210-217.
269. Valentini G, Iudici M, Walker U, Jaeger V, Baron M, Carreira P et al. The European Scleroderma Trials and Research group (EUSTAR) task force for the development of revised activity criteria for systemic sclerosis: derivation and validation of a preliminarily revised EUSTAR activity index. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2016;76(1):270-276.

270. van Bon L, Cossu M, Radstake T. An update on an immune system that goes awry in systemic sclerosis. *Current Opinion in Rheumatology*. 2011;23(6):505-510.
271. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson S, Baron M, Tyndall A et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2013;72(11):1747-1755.
272. Van Eenennaam H, Vogelzangs J, Bisschops L, Te Boome L, Seelig H, Renz M et al. Autoantibodies against small nucleolar ribonucleoprotein complexes and their clinical associations. *Clinical and Experimental Immunology*. 2002;130(3):532-540.
273. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *Journal of Clinical Investigation*. 2007;117(3):557-567.
274. Varga J, Bashey R. Regulation of Connective Tissue Synthesis in Systemic Sclerosis. *International Reviews of Immunology*. 1995;12(2-4):187-199.
275. Varga J, Lafyatis R. Etiology and pathogenesis of systemic sclerosis. In: Hochberg M, Silman A, Smolen J, Weinblatt M, Weisman M, ed. by. *Rheumatology*. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Mosby; 2015. p. 1165 - 1176.
276. Villalta D, Imbustaro T, Di Giovanni S, Lauriti C, Gabini M, Turi M et al. Diagnostic accuracy and predictive value of extended autoantibody profile in systemic sclerosis. *Autoimmunity Reviews*. 2012;12(2):114-120.
277. Vonk M, Marjanovic Z, van den Hoogen F, Zohar S, Schattenberg A, Fibbe W et al. Long-term follow-up results after autologous haematopoietic stem cell transplantation for severe systemic sclerosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2008;67(1):98-104.
278. Voss M, Wolff B, Savitskaia N, Ungefroren H, Deppert W, Schmiegeler W et al. TGFbeta-induced growth inhibition involves cell cycle inhibitor p21 and pRb independent from p15 expression. *International Journal of Oncology*. 1999;.
279. Waite J, Skokos D. Th17 Response and Inflammatory Autoimmune Diseases. *International Journal of Inflammation*. 2012;2012:1-10.
280. Wakhlu A, Sahoo R, Parida J, Rai M, Misra D, Agrawal V et al. Serum Interleukin-6, Interleukin-17A, and transforming growth factor beta are raised in systemic sclerosis with interstitial lung disease. *Indian Journal of Rheumatology*. 2018;13(2):107.
281. Walecka I. Systemic sclerosis and the gastrointestinal tract. *Gastroenterology Review*. 2017;3:163-168.
282. Walker J, Fritzler M. Update on autoantibodies in systemic sclerosis. *Current Opinion in Rheumatology*. 2007;19(6):580-591.
283. Walker L. Regulatory T cells overturned: the effectors fight back. *Immunology*. 2009;126(4):466-474.
284. Warner B, Blain S, Seoane J, Massagué J. Myc Downregulation by Transforming Growth Factor β Required for Activation of the p15Ink4bG1Arrest Pathway. *Molecular and Cellular Biology*. 1999;19(9):5913-5922.
285. Watad A, Quaresma M, Bragazzi N, Cervera R, Tervaert J, Amital H et al. The autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA)/Shoenfeld's syndrome: descriptive analysis of 300 patients from the international ASIA syndrome registry. *Clinical Rheumatology*. 2017;37(2):483-493.
286. Wei L, Laurence A, Elias K, O'Shea J. IL-21 Is Produced by Th17 Cells and Drives IL-17 Production in a STAT3-dependent Manner. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(48):34605-34610.
287. White B. Immunologic aspects of scleroderma. *Current Opinion in Rheumatology*. 1994;6(6):612-615.

288. Wilson M, Madala S, Ramalingam T, Gochuico B, Rosas I, Cheever A et al. Bleomycin and IL-1 β -mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. *The Journal of Experimental Medicine*. 2010;207(3):535-552.
289. Wirz E, Jaeger V, Allanore Y, Riemekasten G, Hachulla E, Distler O et al. Incidence and predictors of cutaneous manifestations during the early course of systemic sclerosis: a 10-year longitudinal study from the EUSTAR database. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2015;75(7):1285-1292.
290. Wynn T. Fibrotic disease and the TH1/TH2 paradigm. *Nature Reviews Immunology*. 2004;4(8):583-594.
291. Yamagiwa S, Gray J, Hashimoto S, Horwitz D. A Role for TGF- β in the Generation and Expansion of CD4+CD25+ Regulatory T Cells from Human Peripheral Blood. *The Journal of Immunology*. 2001;166(12):7282-7289.
292. Yamamoto T, Eckes B, Hartmann K, Krieg T. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in the lesional skin of systemic sclerosis. *Journal of Dermatological Science*. 2001;26(2):133-139.
293. Yan B, Liu Y. The Nature of Increased Circulating CD4+CD25-Foxp3+ T Cells in Patients with Systemic Lupus Erythematosus: A Novel Hypothesis. *The Open Rheumatology Journal*. 2009;3(1):22-24.
294. Yanaba K, Yoshizaki A, Muroi E, Hara T, Ogawa F, Usui A et al. Elevated Circulating TWEAK Levels in Systemic Sclerosis: Association with Lower Frequency of Pulmonary Fibrosis. *The Journal of Rheumatology*. 2009;36(8):1657-1662.
295. Yang X, Yang J, Xing X, Wan L, Li M. Increased frequency of Th17 cells in systemic sclerosis is related to disease activity and collagen overproduction. *Arthritis Research & Therapy*. 2014;16(1):R4.
296. Yurovsky V. The Repertoire of T-Cell Receptors in Systemic Sclerosis. *Critical Reviews™ in Immunology*. 1995;15(2):155-165.
297. Zaarur N, Xu X, Lestienne P, Meriin A, McComb M, Costello C et al. RuvbL1 and RuvbL2 enhance aggresome formation and disaggregate amyloid fibrils. *The EMBO Journal*. 2015;34(18):2363-2382.
298. Zhang B, Zhang X, Tang F, Zhu L, Liu Y, Lipsky P. Clinical significance of increased CD4+CD25-Foxp3+ T cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2008;67(7):1037-1040.
299. Zheng Y, Rudensky A. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nature Immunology*. 2007;8(5):457-462.
300. Zulian F, Martini G. Childhood systemic sclerosis. *Current Opinion in Rheumatology*. 2007;19(6):592-597.
301. Иванова - Тодорова Е. Имунофлуоресцентно определяне на антинуклеарни антитела. Атлас. 1st ed. София: Централна медицинска библиотека, МУ - София; 2018.
302. Иванова И, И. Манолова и Р. Стоилов. Феномен на Raynaud и антицентромерни антитела: преглед на литературата и описание на два случая. *Ревматология XIII*, 2005, бр.2:27-31.
303. Р. Шумналиева и Зл. Коларов. Генетика в ревматологията - *Ревматология*, 20, 2012, № 1, с. 17-26.