

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

д-р МАРИЯ ХРИСТОВА ХРИСТОВА

**ИМУНОГЕНЕТИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ ПРИ
СИСТЕМЕН ЛУПУС ЕРИТЕМАТОЗУС И
ДЕРМАТОМИОЗИТ**

АВТОРЕФЕРАТ

**на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен
„Доктор”**

Докторска програма „Имунология”

София, 2014

Дисертационният труд е представен на 169 стандартни печатни страници, онагледен с 59 фигури и 65 таблици. В библиографията са включени 369 заглавия, от които 4 на кирилица и 365 на латиница. Във връзка с дисертационния труд са реализирани 3 публикации в списания с импакт фактор и 5 участия в научни форуми.

Дисертационният труд е обсъден на заседание на научния съвет към Катедра клинична лаборатория и клинична имунология, МУ - София (11.03.2014 г.) и е насочен за защита пред научно жури в състав:

1. Проф. Марта Петрова Николова, д.м.н., МУ – София, Катедра по клинична лаборатория и клинична имунология, (вътрешен член и научен ръководител)
2. Проф. д-р Елисавета Йорданова Наумова-Григорова, д.м.н., МУ – София, Катедра по клинична лаборатория и клинична имунология (вътрешен член)
3. Доц. д-р Дора Николаева Попова, д.м., Военномедицинска академия, Отделение по клинична имунология, (външен член)
4. Доц. д-р Стоянка Георгиева Владева, д.м., Тракийски Университет – Стара Загора, Катедра по пропедевтика на вътрешни болести, (външен член)
5. Доц. д-р Ирена Манолова Манолова, д.м., Лаборатория по имунология, Тракийски Университет – Стара Загора, (външен член)

Материалите по защитата са на разположение в деловодството на Катедра по клинична лаборатория и клинична имунология

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 18.06.2014 г. от 14.00ч. в аулата на УСБАЛССЗ „Света Екатерина”, ул. „Пенчо Славейков” 52А

д-р МАРИЯ ХРИСТОВА ХРИСТОВА

**ИМУНОГЕНЕТИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ ПРИ
СИСТЕМЕН ЛУПУС ЕРИТЕМАТОЗУС И
ДЕРМАТОМИОЗИТ**

АВТОРЕФЕРАТ

**на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен
„Доктор”**

в професионално направление 7.1. Медицина от област на висше образование
7. Здравеопазване и спорт

Докторска програма „Имунология”

Научен ръководител:
проф. д-р Марта Петрова Николова, д.м.н.

Официални рецензенти:
доц. д-р Дора Николаева Попова, д.м.
доц. д-р Стоянка Георгиева Владева, д.м.

София, 2014

ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

СЛЕ	Системен лупус еритематозус
ДМ	Дерматомиозит
АНА	Антинуклеарни антитела
АКЛА	Антикардиолипинови антитела
ACR	Американска асоциация по ревматология (American College of Rheumatology)
bp	Базични двойки
CD	Групова детерминанта (cluster of differentiation)
E2	Естрадиол
ER	Естрогенов рецептор
ELISA	Ензимно-свързан имуносорбентен тест- (enzyme-linked immunosorbent assay)
HLA	Човешки левкоцитарни антигени
IFN	Интерферон
IF	Индиректна имуофлуоресценция
IL-1	Интерлевкин 1
IL-6	Интерлевкин 6
IL-10	Интерлевкин 10
LD	Неравновесна връзка (linkage disequilibrium)
MBL	Манозо-свързващ лектин
MHC	Главен комплекс на тъканната съвместимост
NFκB	Нуклеарен фактор kappa B
OR	Отношение на шансовете (Odd Ratio)
PCR	Полимеразна верижна реакция
PCR-RFLP	PCR, последвана от определяне на полиморфизъм по дължина на рестрикционните фрагменти
PCR-SSO	PCR със секвенционно-специфични олигонуклеотиди
rs	Референтен идентификационен номер на SNP (reference SNP)
SNP	Единичен нуклеотиден полиморфизъм
STAT	Сигнален трансдюсер и активатор на транскрипцията
TGF-β	Трансформиращ растежа фактор-β
TLR	Toll-like рецептор
TNF-α	Тумор некротизиращ фактор-α

ВЪВЕДЕНИЕ

Автоимунните заболявания са хетерогенна група органно-специфични или системни болести с хронично-рецидивиращ ход на протичане и най-честа начална изява на болестта в трудоспособна възраст, водещи до инвалидизация. Счита се, че те са един от основните фактори за смъртността при жени в млада и средна възраст. В допълнение към тези факти, определящи ги като социално-значим проблем, трябва да се отбележи, че системният лупус често се свързва и с репродуктивни нарушения, а дерматомиозитът в около 32% от случаите може да бъде проява на паранеопластичен процес, което прави интересът към подлежащите механизми на развитие на тези болести още по-голям. Въпреки значителния технологичен напредък в молекулярната биология и медицината през XX и XXI век, етиологията на автоимунните болести остава неизяснена, а тяхното лечение продължава да бъде предизвикателство в съвременната медицинска практика. Появяват се множество хипотези и теории, чиято цел е да дадат обяснение на нарушенията в хомеостазата на имунната регулация. Като цяло засега е приета идеята за многофакторното естество на автоимунните болести, в чиято патогенеза взимат участие екзогенни и ендогенни фактори. Към последните спадат променен имунен отговор с формирането на автоантитела, нарушения във вродения и придобития имунитет, хормонален и цитокинов дисбаланс, аберантно предаване на сигнала, нарушения в процесите на апоптоза и клетъчно преживяване, генетична предразположеност.

През 1936 г. R. Irwin пръв въвежда термина „имуногенетика“, чрез който се формира едно ново научно направление, имащо за цел да определи генетичния контрол върху имунния отговор, като по този начин се създават условия за комплексно изследване на ендогенните фактори. Само по себе си участието на цитокините във важни процеси като регулация на програмираната клетъчна смърт (апоптоза) и клетъчното преживяване е достатъчна причина за задълбочени проучвания върху тяхната роля в автоимунитета. Установеният цитокинов дисбаланс при много автоимунни болести е допълнителен мотив за изясняване на механизмите, чрез които те способстват за възникването на патологичния процес. Предвид генетичния контрол, на който е подложена тяхната секреция, цитокиновите генни

полиморфизми логично попадат във фокуса на изследване на имуногенетиката. Данните за активно участие на системата на комплемента в процесите на вродената имунна защита и ролята ѝ на свързващо звено с адаптивния имунен отговор, както и наскоро установената модулация върху цитокиновата продукция, я правят също подходящ обект за научни изследвания при автоимунитета. Особено силен аргумент за нейното участие в етиопатогенезата на автоимунните болести са установените генетични нарушения в C1q, C2 и C4 молекулите във връзка с развитието на системен лупус еритематозус (СЛЕ), лупусен нефрит и дерматомиозит (ДМ). Поради структурното сходство на C1q и MBL, генетичните полиморфизми в по-малко изучавания трети път на комплемента (лектинов) представляват обект на засилен изследователски интерес, още повече че MBL има отношение към клирънса на апоптотичен материал. Не на последно място трябва да се отбележи, че хормоналните фактори също играят съществена роля в развитието на някои автоимунни болести. Женският пол е един от значимите рискови фактори за развитие на СЛЕ, като той е преобладаващ и при ДМ. Тъй като се знае, че естрогенът и естрогеновите рецептори имат способността да модулират генната експресия на множество транскрипционни фактори, изследването на полиморфизмите в кодиращите ги гени е от съществено значение за изясняване на механизмите при автоимунитета.

Резултатите от провежданите асоциативни проучвания, освен че биха могли да доведат до изясняването на някои патогенетични механизми, биха могли да спомогнат и за откриването на нови диагностични маркери с прогностична стойност по отношение на очакваната клинична изява и тежест на автоимунната болест. Практическият принос на получените резултати е свързан с приложението на биологичните средства и потенциалната възможност за разграничаване на респондерите от нон-респондерите, което би допринесло за индивидуализиране на терапията и е в основата на развитието на фармакогенетиката и създаването на нови лекарствени стратегии.

Само едновременното изследване на предразполагащите фактори би могло да разкрие причините за полиморфната природа на автоимунните болести, което показва необходимостта от комплексни проучвания.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящото проучване е да се изследва влиянието на някои имунологични и генетични фактори върху предразположението към системен лупус еритематозус и дерматомиозит (citoкини, манозо-свързващ лектин и полиморфизми в кодиращите ги гени, както и полиморфизми в гена за естрогенов рецептор-алфа) и да се оцени ролята им за клиничните прояви при двете заболявания.

За постигане на целта си поставихме следните **задачи**:

1. Да се изследват серумните нива на TNF- α , да се определи влиянието на *TNFA* нуклеотидните полиморфизми върху секрецията на протеина и да се оцени ролята им като предразполагащ фактор за развитие на СЛЕ и ДМ.
2. Да се определи значението на *IL-6* -174G/C полиморфизма като рисков фактор за възникване и изява на СЛЕ и ДМ.
3. Да се изследва честотата на някои проксимални и дистални *IL-10* полиморфизми и да се определи ролята им като предразполагащ фактор за развитие на изследваните заболявания.
4. Да се определят серумните нива на MBL, честотата на „секреторните” SNPs в *MBL2* гена при здрави индивиди сред българската популация и да се определи значението им като фактор за възприемчивост към СЛЕ и ДМ.
5. Да се определи значението на генетични полиморфизми в гена на естрогеновия рецептор - α за възникването и развитието на двете заболявания.
6. Да се определи функционалното значение на хаплотипите и ролята им за развитие на СЛЕ и ДМ.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. МАТЕРИАЛИ

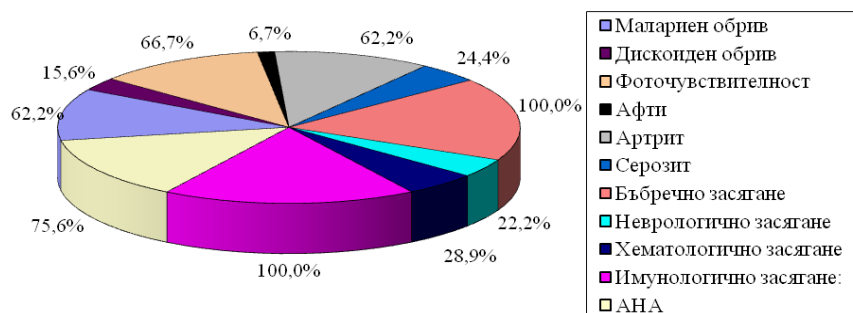
1.1. ИЗСЛЕДВАНИ ЛИЦА

Извършено беше асоциативно проучване от типа случай-контрола, обхващащо общо 157 индивида, разделени в три групи, посочени в таблица 1:

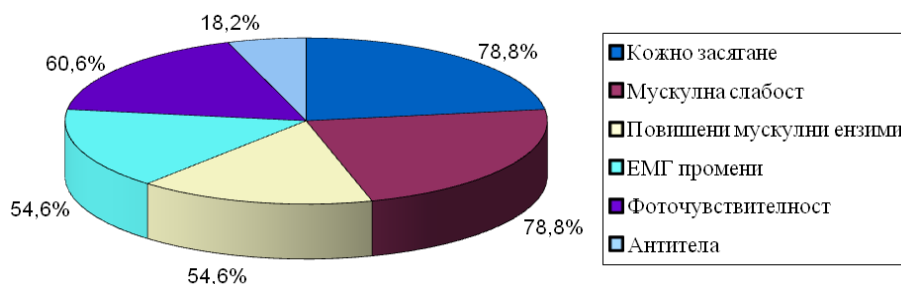
Таблица 1. Характеристика на изследваните групи:

Група	Диагноза	Брой	Мъже	Жени	Възраст				
					Средна	±SD	Медиана	Мин.	Макс.
I гр.	Здрави лица	79	25	54	42.7	14.5	42.0	18	73
II гр.	Пациенти със СЛЕ	45	8	37	41.3	12.4	40.0	18	78
III гр.	Пациенти с ДМ	33	12	21	54.2	14.7	56.5	18	78

- I гр. - 79 здрави неродствени индивиди от биобанка към Молекулярен център по медицина, не проявяващи клинични признаци на аутоимунно заболяване, без анамнестични данни за фамилна обремененост, съответстващи по пол, възраст и етническа принадлежност на изследваните пациенти.
- II гр. - 45 пациента със СЛЕ от IVта Клиника по нефрология на УМБАЛ „Александровска” и Клиника по нефрология към Медицински институт на МВР, подбрани съгласно ревизираните критерии на ACR от 1997 г.
- III гр. - 33 пациента с ДМ от Клиника по кожни и венерически болести на УМБАЛ „Александровска”, подбрани съгласно класификацията на Bohan и Peter.



Фигура 1. Характеристика на клиничните признаци при изследваните пациенти със СЛЕ.



Фигура 2. Характеристика на клиничните признаци при изследваните пациенти със СЛЕ и ДМ.

Всички изследвани лица са подписали писмено информирано съгласие за участие в проучването. Описаното изследване е проведено съгласно етичния кодекс на световната лекарска асоциация (декларацията от Хелзинки), отнасящи се до експерименти с хора. Изследването също така е одобрено от Комисията по етика към Медицински университет – София.

От всички групи бяха изключени пациенти с инфекциозни заболявания и други автоимунни заболявания.

1.2. БИОЛОГИЧЕН МАТЕРИАЛ

1.2.1. Материал за серологично изследване

Изолирането на серума ставаше след венепункция със затворена вакутейнерна система - серумна епруветка с гел на BD от 13ml, посредством центрофугиране 1000g/10 min. Отделеният серум се разпределяше в пластмасови контейнери тип Eppendorf, които се съхраняваха при -20°C до момента на анализа за TNF- α и MBL. При определянето на антитела АНА, анти-ДНК, анти-Sm, антикардиолипинови антитела серумът се изработваше в рамките на 48 часа, поради което пробите бяха съхранявани при $+4^{\circ}\text{C}$.

1.2.2. Материал за генетично изследване и изолиране на ДНК

След подписване на информирано съгласие беше взимана венозната кръв в епруветка с обем 10 ml, съдържаща K_3EDTA (етилен диамин тетраацетат) на BD. ДНК се изолираше чрез машинна магнитна сепарация – Chemagen magnetic separation station чрез кит за изолиране **chemagic DNA Blood10k Kit** на фирма **PerkinElmer**. Получената ДНК се съхраняваше при -20°C в ДНК банка към Молекулярен медицински център МУ-София.

2. МЕТОДИ

2.1. СЕРОЛОГИЧНИ МЕТОДИ

2.1.1. Методи за определяне на серумни антитела*:

- ИФ за АНА при СЛЕ и ДМ
- ELISA за анти-ДНК (скрининг), анти-Sm, анти-кардиолипинови ИгГ/ИгМ при СЛЕ и анти-Jo1 при ДМ

**Забележка: Процедурата беше извършена съгласно СОП в Клиника по клинична имунология на УМБАЛ „Александровска”*

2.1.2. Методи за определяне на серумна концентрация на протеините TNF- α и MBL

Използвани бяха фабрични ELISA китове*:

- TNF- α ELISA кит Diaclone Gen-Probe за in vitro диагностика с каталожен номер 950.090.192, Besançon Cedex, France.
- MBL „захваната” ELISA за научни изследвания Hycult biotech с каталожен номер НК 323 Uden, the Netherlands.

**Забележка: Процедурата беше извършена съгласно указанията на производителя.*

2.2. МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧНИ МЕТОДИ

Молекулярно-биологичното проучване беше извършено в Националната генетична лаборатория и Молекулярния център по медицина към МУ-София. То обхващаше 18 полиморфизма в 5 гена. За генотипизирането им беше използван подход, основаващ се на PCR-RFLP анализ, съгласно данни от предходни проучвания, посочени в таблица 2.

Таблица 2. Представени са гените и изследваните нуклеотидни полиморфизми, rs номенклатура, референция на използваните методи.

Ген	SNP	rs	Референция на методологията
<i>TNFA</i>	-1031 T/C	rs1799964	T. Asghar и сътр. 2004
	-863 C/A	rs1800630	
	-857 C/T	rs1799724	
	-308 G/A	rs1800629	A.G. Wilson и сътр. 1992
	-238 G/A	rs 361525	H.Q. Li и сътр. 2005
	+489 G/A	rs1800610	M. Kūçūkaуcaп и сътр. 2002
<i>IL-6</i>	-174 G/C	rs1800795	M. Libra и сътр. 2006 (модификация на праймери)
<i>IL-10</i>	-3575 T/A	rs1800890	M. O. Moraes и сътр. 2003
	-2849 G/A	rs6703630	W. P. Chong и сътр. 2004
	-2763 C/A	rs6693899	
	-592 C/A	rs1800872	
	<i>MBL2</i>	-550 G/C (H/L)	rs11003125
-221 G/C (Y/X)		rs7096206	R. W. Roelofs и сътр. 2003
223 C/T (A/D)		rs5030737	R. Ramasawmy и сътр. 2008
230 G/A (A/B)		rs1800450	
239 G/A (A/C)		rs1800451	
<i>ESRI</i>	397 C/T PvuII (P/p)	rs2234693	A. Jakimiuk и сътр. 2007
	351 G/A XbaI (X/x)	rs9340799	

Извършена беше полимеразно-верижна реакция, като полученият PCR-продукт беше подложен на рестрикция с посочените в таблица 3 рестриктази. Дължината на рестрикционните фрагменти за алелните варианти се визуализираше на 3% агарозна гел електрофореза посредством оцветяване с етидиев бромид чрез фотодокументационна система.

Таблица 3. Изследвани гени и SNPs в тях, дължина на получения PCR-продукт, използвани рестриктази и дължина на рестрикционните фрагменти за всеки от алелните варианти.

Ген	SNP	PCR- Продукт	Рестриктаза	Рестрикционни фрагменти
<i>TNFA</i>	-1031 T/C	264bp	BbsI	T=251+13; C=180+71+13
	-863 C/A	125bp	HpyCH4IV	C=125; A=101+24
	-857 C/T	128bp	HpyCH4IV	T=128; C=107+21
	-308 G/A	107bp	NcoI	G=87+20; A=107
	-238 G/A	152bp	MspI	G=20+132; A=152
	+489 G/A	551bp	HpyCH4IV	G=111+159+281; A=159+392
<i>IL-6</i>	-174 G/C	198bp	SfaI	G=140+58; C=198
<i>IL-10</i>	-3575 T/A	231bp	Tsp509I	T=121+110; A=231
	-2849 G/A	308bp	AlwI	G=124+184; A=308
	-2763 C/A	308bp	DdeI	C=48+49+97+114; A=48+97+163
	-592 C/A	412bp	RsaI	C=412; A=176+236

<i>MBL2</i>	-550 G/C (H/L)	261bp	XmiI	G=261 C=239+22
	-221 G/C (Y/X)	350bp	BsajI	C=242+108;G=166+76+108
	223 C/T (A/D)	119bp	HhaI	C=91+28; T=119
	230 G/A (A/B)	119bp	BanI	G=84+35; A =119
	239 G/A (A/C)	119bp	MboII	G=119; A =63+56
<i>ESR1</i>	397 C/T (P/p)	1361bp	PvuII	C=1361; T=980 +381
	351 G/A (X/x)	1361bp	XbaI	G=1361; A=935+ 426

2.3. СТАТИСТИЧЕСКИ АНАЛИЗ

За статистическа обработка на получените резултати бяха използвани програми:

➤ **SPSS 16.0 IBM**

Тест на Колмогоров-Смирнов (Shapiro Wilk) за проверка на разпределението:

1. Параметрични методи

- ✓ 1.1. Т-тест за проверка на равенство между две независими извадки
- ✓ 1.2. Еднофакторен дисперсионен анализ (One-way ANOVA)
- ✓ 1.3. Корелационен анализ по Pearson

2. Непараметрични методи

- ✓ 2.1. Тест на Mann-Whitney за сравняване на количествена променлива в две групи (представени са медиани)
- ✓ 2.2. Тест на Kruskal-Wallis за сравняване количествена променлива в повече от две групи (представени са медиани).
- ✓ 2.3. Метод χ -квадрат или точен тест на Фишер при малки извадки за сравняването на две качествени променливи (генетично асоциативно проучване). При множествени сравнения беше извършвана корекция по Bonferroni.
- ✓ 2.4. Определено беше отношение на шансовете (odd ratio=OR) в 95% доверителен интервал за доминантен, рецесивен и кододоминантен модел.
- ✓ 2.5. Корелационен анализ по Spearman.
 - **Haploview 4.2** (неравновесна връзка и хаплотипна реконструкция)
 - **PHASE** (хаплотипна реконструкция)
 - **PLINK** (епистаза SNPxSNP, закон на Hardy-Weinberg)

**Забележка: за статистически достоверни се приеха стойности на $p < 0.05$*

РЕЗУЛТАТИ

1. ПРОУЧВАНЕ ВЪРХУ ЦИТОКИНИ И ПОЛИМОРФИЗМИ В ЦИТОКИНОВИТЕ ГЕНИ

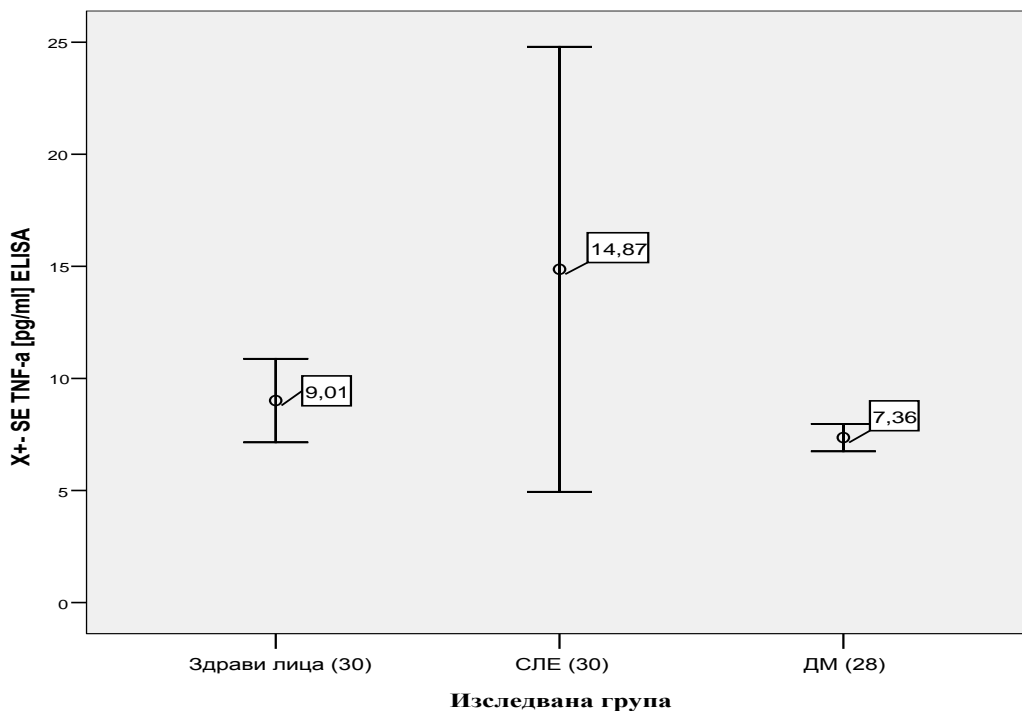
1.1. ТУМОР НЕКРОТИЗИРАЩ ФАКТОР - АЛФА (TNF- α)

За да бъде определено функционалното значение на TNF- α бяха изследвани серумните нива на този цитокин сред болни и здрави индивиди, определено беше влиянието на нуклеотидните полиморфизми върху продукцията на протеина и се проведе асоциативно проучване от типа случай-контрола за единичните нуклеотидни полиморфизми в *TNFA* гена при здрави лица и пациенти със СЛЕ и ДМ.

1.1.1. Серумни нива на TNF- α

1.1.1.1. Серумни нива на TNF- α при изследваните болни и здрави лица

Изследвани бяха серумните концентрации на TNF- α при 30 здрави лица, 30 пациенти със СЛЕ и 28 пациента с ДМ. Средната концентрация в групата на контролите е 9.01 pg/ml. Най-висока средна стойност беше установена в групата на пациентите със СЛЕ – 14.87 pg/ml, а най-ниска в тази на пациентите с ДМ -7.36 pg/ml (фигура 3).



Фигура 3. Сравнение на концентрациите TNF- α при здрави контроли, пациенти със СЛЕ и ДМ. Представени са средните стойности за всяка група и стандартната грешка (\pm SE)

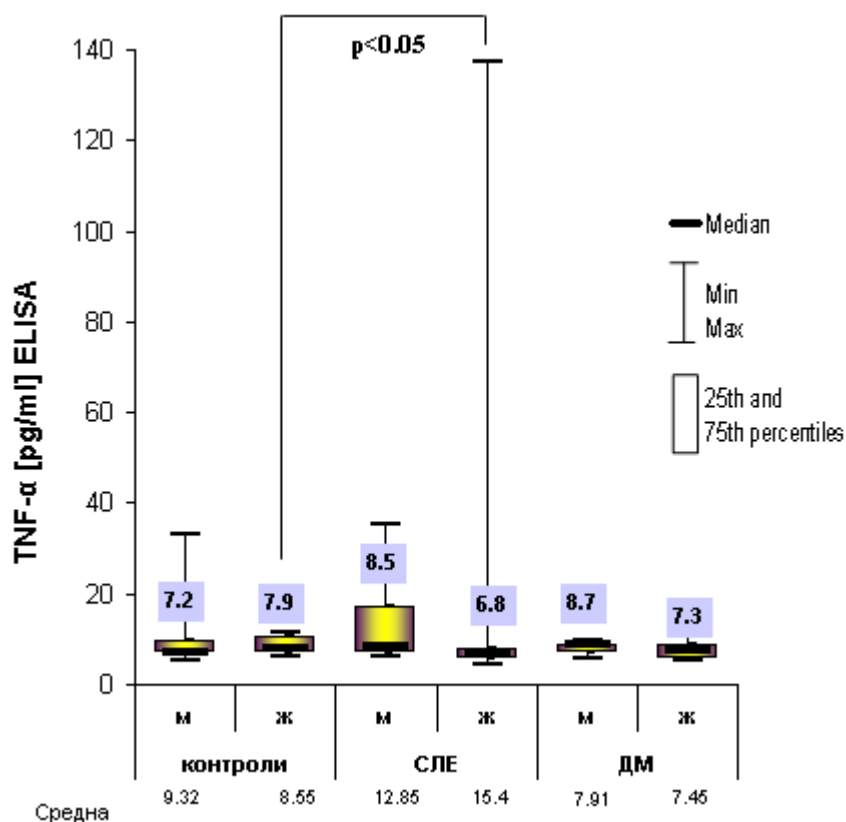
Тестът на Kolmogorov-Smirnov показва, обаче, че разпределението на изследваната променлива (серумна концентрация на TNF- α) е асиметрично, поради което допълнително бяха определени медианите за всяка от изследваните групи - съответно 7.5 pg/ml за контролната група, 7.0 pg/ml за пациентите със СЛЕ и 7.7 pg/ml за пациентите със ДМ (таблица 4). Използван беше U тест на Mann–Whitney за непараметрични вариабилни, който показва, че наблюдаваните разлики между пациентите със СЛЕ и ДМ и здравите лица са статистически незначими ($p=0.26$ за СЛЕ; $p=0.76$ за ДМ). При сравнение на групите 25-ти, 75-ти и 90-ти перцентил също не бяха установени статистически значими различия (таблица 4).

Таблица 4. Концентрация на TNF- α – представени са медианите и съответно 25-ти, 75-ти и 90-ти перцентил в изследваните групи.

Групи	Контроли	СЛЕ		ДМ	
	TNF- α [pg/ml]	TNF- α [pg/ml]	p	TNF- α [pg/ml]	p
25ти	6.5	6.27	0.78	6.5	1.00
50ти (медиана)	7.5	7.0	0.26	7.7	0.76
75ти	10.0	8.2	0.31	8.7	0.45
90ти	12.8	33.2	0.51	9.8	0.17

1.1.1.2. Влияние на пола върху серумните нива на TNF- α

За да се оцени влиянието на пола върху продукцията на TNF- α , всяка от изследваните групи – здрави индивиди, пациенти със СЛЕ и с ДМ, беше разделена на подгрупи - мъже/жени. При сравнение на нивата на протеина между двата пола в рамките на всяка група не се установиха значими различия (фигура 4). В групата на жените със СЛЕ беше установена най-висока средна стойност на TNF- α - 15.4 pg/ml, но и най-ниска медиана – 6.8 pg/ml (фигура 4). Като следваща стъпка бяха сравнени концентрациите на TNF- α между съответните подгрупи здрави и болни индивиди чрез непараметричен тест на Mann-Whitney, с който се доказва статистически значима разлика в нивата на TNF- α между жени със СЛЕ и здрави жени ($p=0.032$), докато при мъже такава разлика не се наблюдаваше (фигура 4). Установената статистически значима разлика е израз на по-високи нива на TNF- α при здрави жени и по-ниска концентрация на протеина при пациентки със СЛЕ.



Фигура 4. Сравнение на концентрациите на TNF- α по пол. 1. при мъже и жени във всяка от изследваните групи – здрави лица, СЛЕ, ДМ и 2. между групите по признак пол. Представена е статистически значима разлика в нивата на TNF- α между здрави жени и пациентки със СЛЕ.

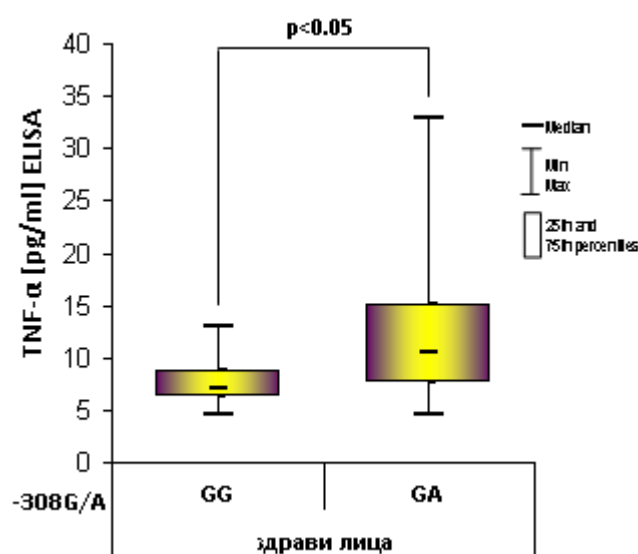
1.1.1.3. Влияние на серумните нива на TNF- α върху клиничните признаци на СЛЕ и ДМ

При определянето на връзката между серумните нива и клиничните признаци на изследваните заболявания не бяха открити статистически значими резултати. Когато беше изследван ефектът на високите нива на TNF- α (над 90-ти перцентил - $>12.8\text{pg/ml}$) спрямо клиничните признаци при СЛЕ, се установи тенденция към асоциация с хематологично засягане ($p=0.06$), изразяващо се главно в анемичен синдром. Трябва да се отбележи също, че всички пациенти със СЛЕ и стойност на TNF- α над 90-ти перцентил бяха с проявена артритна, нефрологична и имунологична форма на заболяването, с положителни АНА.

1.1.2. Влияние на *TNFA* полиморфизмите върху продукцията на TNF- α

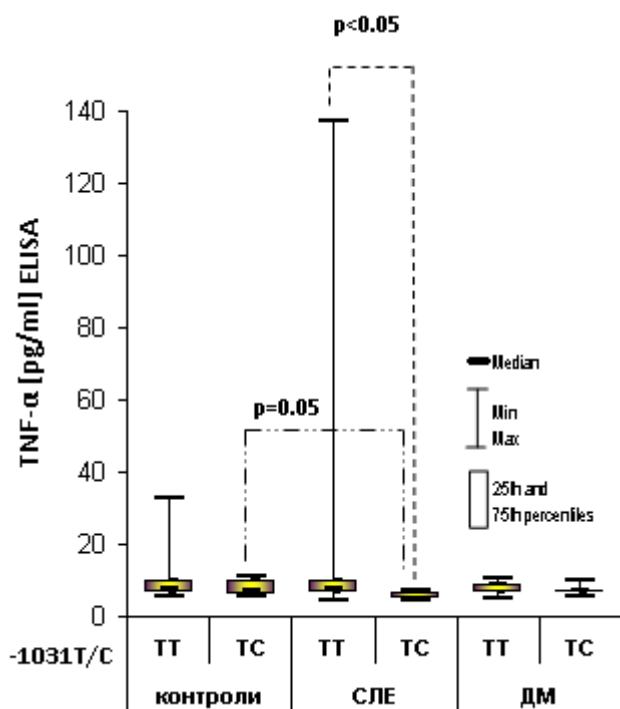
1.1.2.1. Генотипно влияние върху продукцията на TNF- α

При определяне влиянието на генотипите върху продукцията на TNF- α сред здрави лица се установи статистически значима разлика в серумните нива на протеина между носителите на генотипи *TNFA* -308GG и -308GA ($p=0.012$) (фигура 5). Високите нива на TNF- α се свързват с генотипа -308GA, а ниските - с -308GG. Поради ниската честота на генотипи -1031CC, -863AA, -308AA, -238GA и -238AA (<2%), тяхното влияние не можа да се оцени. Генотипните различия в полиморфизмите -857C/T и 489G/A не показаха значими разлики в продукцията на TNF- α .

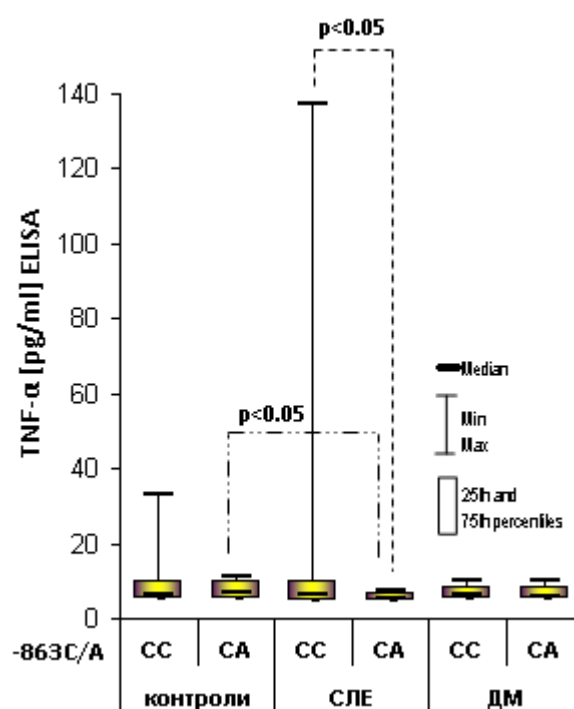


Фигура 5. Генотипно влияние на изследваните *TNFA* -308G/A полиморфизма върху концентрацията на TNF- α при здрави лица. Представена е установената значима разлика в нивата на TNF- α между -308GG и -308GA генотипите. Графиката отразява медианите, 25-ти и 75-ти персентил, както и минималната и максимална стойност.

В условията на патологичен процес беше установена значима разлика в нивата на TNF- α между двойките генотипи -1031TT и -1031TC и -863CC и -863CA при пациенти със СЛЕ (съответно $p=0.015$ и $p=0.017$) (фигура 6) и (фигура 7):



Фигура 6. Влияние на полиморфизма -1031Т/С върху продукцията на TNF- α в зависимост от генотипа и влияние на външни фактори.



Фигура 7. Влияние на полиморфизма -863С/А върху продукцията на TNF- α в зависимост от генотипа и влияние на външни фактори.

Плазмените нива на TNF- α зависят както от носителството на генетични полиморфизми, така и от външни фактори, които повлияват генната експресия. За да се оцени тяхното влияние, в изследваната кохорта бяха сравнени стойностите на TNF- α при един и същи генотип между трите представени групи – здрави лица, СЛЕ, ДМ. Тестът на Mann-Whitney показва наличие на статистически значима разлика в нивата на TNF- α единствено за генотипа -863СА между пациентите със СЛЕ и здравите лица ($p=0.04$) (фигура 7). При болните генотипът -863СА се свързва с по-ниска концентрация на протеина в сравнение с контролната група. Сравнението на концентрациите на TNF- α по генотипи между пациентите с ДМ и контролите не показва значими различия.

1.1.2.2. Влияние на хаплотипните комбинации на изследваните единични нуклеотидни полиморфизми в *TNFA* гена върху серумните нива на TNF- α

Тъй като отделните полиморфизми допринасят в различна степен за нивата на TNF- α , при генотипния анализ не може да се избегне интерференцията с алели на други позиции. Поради това някои автори препоръчват като по-точен анализа, базиран на хаплотипните варианти. Получените данни за разширените

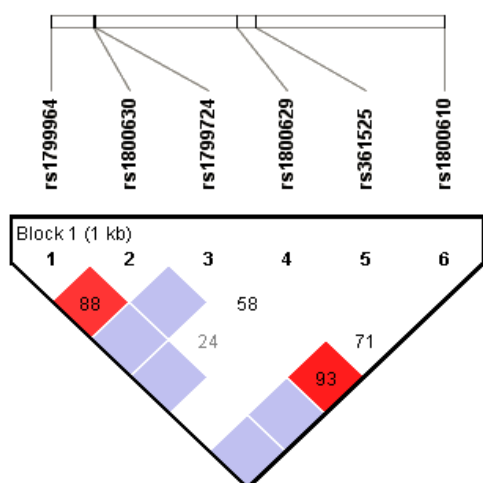
генотипи и влиянието им върху серумното ниво на TNF- α в цялата изследвана популация (n=88) са представени в таблица 8:

Таблица 8. Разширени генотипи за *TNFA* -1031/-863/-857/-308/-238/489 - честотата сред изследваната кохорта и серумни нива TNF- α [pg/ml] - средна стойност, стандартно отклонение, медиана, минимална и максимална стойност.

<i>TNFA</i> -1031/-863/-857/-308/-238/489	Честота	Средна	\pm SD	Медиана	Min	Max
1031 (TT); 863 (CC); 857 (CT); 308 (GG); 238 (GG); 489 (GA)	22.7	9.1	6.3	8.0	5.3	35.4
1031 (TT); 863 (CC); 857 (CC); 308 (GG); 238 (GG); 489 (GG)	21.6	10.6	16.9	6.8	5.3	80.3
1031 (TC); 863 (CA); 857 (CC); 308 (GG); 238 (GG); 489 (GG)	15.9	7.2	1.9	6.8	5.0	11.3
1031 (TT); 863 (CC); 857 (CC); 308 (GA); 238 (GG); 489 (GG)	9.1	11.7	9.3	9.9	4.6	33.0
1031 (TT); 863 (CC); 857 (TT); 308 (GG); 238 (GG); 489 (AA)	7.6	26.8	48.8	7.8	6.3	137.4
1031 (CC); 863 (CA); 857 (CC); 308 (GG); 238 (GG); 489 (GG)	3.4	6.2	1.0	6.7	5.1	6.8
1031 (TT); 863 (CC); 857 (CT); 308 (GA); 238 (GG); 489 (GA)	3.4	8.5	0.4	8.5	8.2	8.9
1031 (TT); 863 (CC); 857 (CC); 308 (GA); 238 (GG); 489 (GA)	2.3	12.5	2.6	12.5	10.6	14.3
1031 (TT); 863 (CA); 857 (CC); 308 (GG); 238 (GG); 489 (GG)	2.3	9.5	3.5	9.5	7.0	11.9
1031 (TC); 863 (CA); 857 (CC); 308 (GA); 238 (GG); 489 (GG)	2.3	6.4	0.3	6.4	6.2	6.6
1031 (TC); 863 (CA); 857 (CT); 308 (GG); 238 (GG); 489 (GA)	2.3	6.6	0.1	6.6	6.5	6.6
1031 (TC); 863 (AA); 857 (CT); 308 (GG); 238 (GG); 489 (GA)	2.3	5.9	1.8	5.9	4.6	7.1
1031 (TT); 863 (CC); 857 (CT); 308 (GA); 238 (GG); 489 (GG)	1.2	10.0	-	10.0	10.0	10.0
1031 (TC); 863 (CC); 857 (CT); 308 (GG); 238 (GG); 489 (GA)	1.2	6.3	-	6.3	6.3	6.3
1031 (TC); 863 (CC); 857 (CT); 308 (GG); 238 (GA); 489 (GA)	1.2	6.6	-	6.6	6.6	6.6
1031 (TT); 863 (CA); 857 (CC); 308 (GA); 238 (GG); 489 (GG)	1.2	7.2	-	7.2	7.2	7.2

*Забележка – в по-тъмно черно са представени комбинациите, при които беше възможно реконструирането на хаплотипните секвенции, както е посочено в текста.

Подходът при реконструирането на *TNFA* хаплотипите включва анализ на разширени генотипи, при които съществува една единствена възможна хаплотипна комбинация или такава, при която комбинациите се базират на установените неравновесни връзки. От изследваните полиморфизми в *TNFA* гена се откриха две такива двойки. Първата е между полиморфизмите *TNFA* -857T/C и *TNFA* 489G/A, при която се наблюдава почти пълна скаченост ($D'=0.93$), а втората е между *TNFA* -1031T/C и *TNFA* -863C/A ($D'=0.88$), установени с χ -квадрат чрез програма Haploview 4.2 (фигура 8):



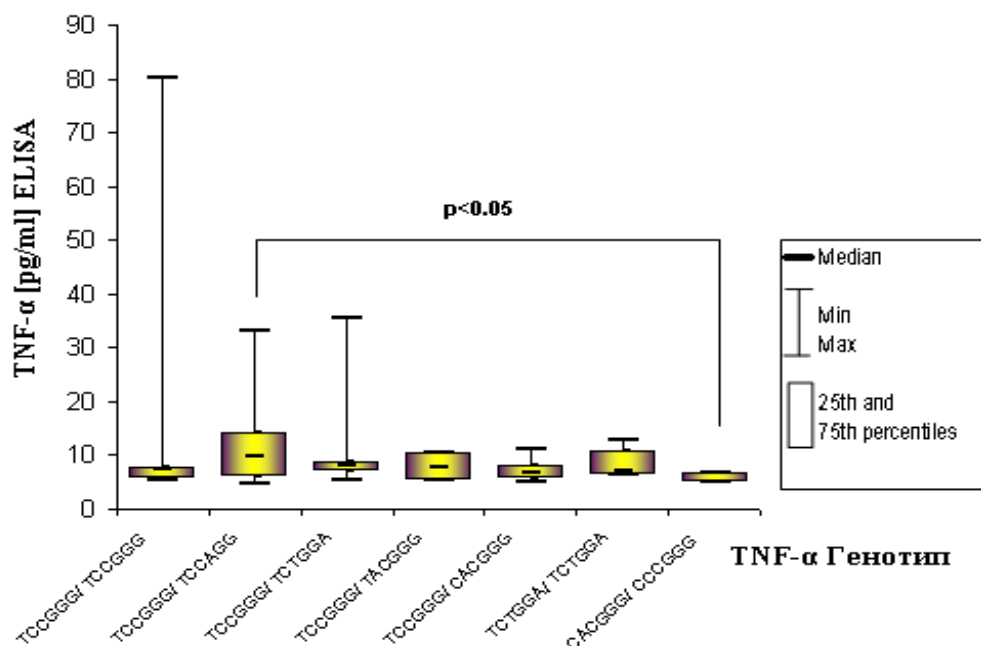
Фигура 8. Неравновесните връзки (LD) при изследваните полиморфизми в *TNFA* гена сред здрави индивиди от българската популация. Всеки квадрат представя силата на LD [D'] между съответната двойка полиморфизми, изразена цифрово. Тъмните квадрати отразяват висока степен на скаченост, [D'] или r^2 по-голямо от 0.8, а останалите цветове съответстват на по-ниски стойности от посочените.

От анализа бяха изключени хаплотипни комбинации, при които има повече вероятни комбинации или такива, които се срещат с честота под 2%. По този начин се определи средната и медианата на TNF- α за следните хаплотипни двойки (таблица 9):

Таблица 9. Хаплотипни двойки и съответстващите им медиана и средна стойност на TNF- α [pg/ml]

Хаплотипи <i>TNFA</i> -1031/-863/-857/-308/-238/489	Медиана	Min	Max	Средна \pm SD
TCCGGG/TCCAGG	9.9	4.6	33.0	11.7 \pm 9.3
TCCGGG/TACGGG	9.5	7.0	11.9	9.5 \pm 3.5
TCCGGG/TCTGGA	8.0	5.3	35.4	9.1 \pm 6.3
TCCGGG/TCCGGG	6.8	5.3	80.3	10.6 \pm 16.9
TCCGGG/CACGGG	6.7	5.1	6.8	7.2 \pm 1.9

Тъй като TCCGGG е общ за всички хаплотипни двойки, беше възможно да се сравни влиянието на хаплотипите TCCAGG, TACGGG, TCTGGA, TCCGGG и CACGGG за продукцията на TNF- α (таблица 9). Статистическият анализ не показва значими различия между тях ($p > 0.05$). Значима разлика беше установена между хаплотипните двойки TCCGGG/TCCAGG и CACGGG/CACGGG ($p = 0.03$), при които бяха установени съответно медиани 9.5 pg/ml и 6.7 pg/ml (фигура 9):



Фигура 9. Сравнение на серумните нива на TNF- α при получените хаплотипни двойки - *TNFA* -1031/-863/-857/-308/-238/489. Представена е установената статистическа значимост в концентрацията на TNF- α между хаплотипните двойки TCCGGG/TCCAGG и CACGGG/CCCGGG ($p=0.03$).

За да бъде определена взаимовръзката между факторите на болестта и хаплотипната секреция на TNF- α , бяха сравнени стойностите на TNF- α за най-честите хаплотипни комбинации между здрави и болни (таблица 10). Във всички изследвани групи стойностите на TNF- α при индивидите с хаплотипна комбинация TCCGGG/TCCAGG бяха най-високи. Комбинацията TCCGGG/CACGGG при пациенти със СЛЕ показва тенденция към асоциация с ниски нива на TNF- α в сравнение с контролната група ($p=0.06$) (таблица 10):

Таблица 10. Честота на хаплотипните комбинации, медиана на TNF- α при пациенти със СЛЕ, ДМ и здрави лица

Изследвани групи Хаплотипи <i>TNFA</i> -1031/-863/-857/-308/-238/489	Здрави лица		СЛЕ			ДМ		
	Честота [%]	Медиана TNF- α [pg/ml]	Честота [%]	Медиана TNF- α [pg/ml]	p	Честота [%]	Медиана TNF- α [pg/ml]	p
TCCGGG/TCCGGG	10%	6.4	23.3%	7.5	0.12	32.1%	7.6	0.22
TCCGGG/TCCAGG	10%	11.1	6.7%	7.8	0.19	10.7%	8.7	0.67
TCCGGG/TCTGGA	30.3%	7.2	13.3%	7.6	0.52	21.4%	8.7	0.11
TCCGGG/CACGGG	16.7%	7.5	16.7%	6.2	0.06	14.3%	6.9	0.46

1.1.3. Генетичен анализ на изследваните *TNFA* полиморфизми

1.1.3.1. Асоциативно проучване на изследваните *TNFA* полиморфизми при СЛЕ и ДМ

В хода на настоящото проучване бе проведен анализ от вида случай - контрола за връзката на шест единични нуклеотидни полиморфизма (SNPs) в *TNFA* гена (-1031C/T, -863C/A, -857C/T, -308G/A, -238G/A и 489G/A) с ДМ и СЛЕ. Всички изследвани SNPs бяха в съответствие със закона на Hardy-Weinberg.

Получените резултати относно генотипните и алелни честоти на всички изследвани единични нуклеотидни полиморфизми в гена *TNFA* при пациенти със СЛЕ и ДМ са обобщени в таблици 11 и 12. От всички изследвани полиморфизми единствено *TNFA* -1031T/C показва асоциация със СЛЕ за -1031CC генотипа ($p=0.046$). Изчислено беше, че рискът от развитие на болестта свързан с -1031C алела, е около два пъти по-висок (OR-1.78; 95%CI 0.86-3.66). При пациенти с ДМ генотопът -1031CC също показва по-висока честота (6.1%) спрямо контролите (0%), но разликата не достигна статистическа значимост ($p=0.085$).

Сред пациентите със СЛЕ беше установена по-висока честота на носителство на генотипите *TNFA* -857CC и 489GG в сравнение с контролите, без обаче да се достига статическа значимост (-857CC OR=1.46, 95%CI 0.7-3.1; 489GG OR=1.33, 95%CI 0.64-2.8).

Честотата на *TNFA* -308A алела е ниска и във всички изследвани групи. Сравнителният анализ за генотипното разпределение в полиморфизма -308G/A не показва статистическа значимост нито сред пациенти със СЛЕ, нито при тези с ДМ в сравнение с контролите.

Честотата на *TNFA* -238GA генотипа сред пациентите със СЛЕ беше 6.6%. В групата на пациентите с ДМ и сред здравите лица -238A-алелът не беше установен.

Таблица 11. Алелни и генотипни честоти на изследваните полиморфизми в *TNFA* гена при пациентите със СЛЕ и здрави лица.

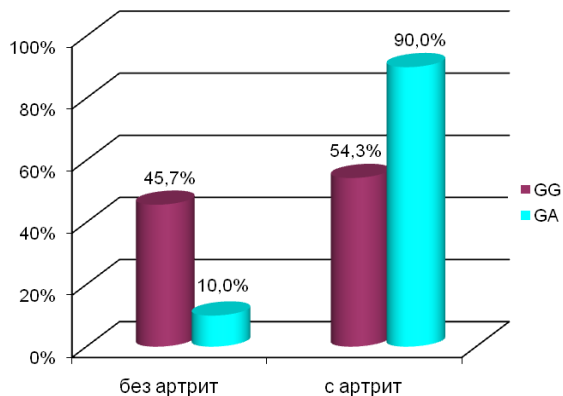
Ген <i>TNFA</i> / полиморфизъм	Генотипи и алели		Група, брой (%)		OR	95% CI	p-стойност (точен тест на Фишер)
			Пациенти СЛЕ (45)	Контроли (79)			
<i>rs179964</i> <i>-1031T/C</i>	Генотипи	TT	33 (73.3)	59 (74.7)	1.07	0.47 – 2.47	1.0000
		TC	9 (20.0)	20 (25.3)	0.73	0.30 – 1.79	0.5023
		CC	3 (6.7)	0 (0.0)	NaN	0-NaN	0.0458
	Алели	T	83.3	87.3	0.38	0.15 – 1.09	0.1227
		C	16.7	12.7	1.78	0.86 – 3.66	
<i>rs1800630</i> <i>-863C/A</i>	Генотипи	CC	33 (73.3)	58 (73.4)	1.00	0.44 – 2.30	1.0000
		CA	11 (24.5)	21 (26.6)	0.89	0.38 – 2.07	0.8343
		AA	1 (2.2)	0 (0.0)	NaN	0-NaN	0.3629
	Алели	C	85.6	86.7	0.90	0.43 – 1.91	0.8486
		A	14.4	13.3	1.10	0.52 – 2.32	
<i>rs1799724</i> <i>-857C/T</i>	Генотипи	CC	27 (60.0)	40 (50.6)	1.46	0.69 – 3.07	0.3524
		CT	14 (31.1)	33 (41.8)	0.62	0.29 – 1.36	0.2554
		TT	4 (8.9)	6 (7.6)	1.10	0.46 – 2.65	1.0000
	Алели	C	75.6	71.5	1.23	0.68 – 2.22	0.5531
		T	24.4	28.5	0.81	0.44 – 1.46	
<i>rs1800629</i> <i>-308G/A</i>	Генотипи	GG	35 (77.8)	60 (75.9)	1.10	0.46 – 2.65	1.0000
		GA	10 (22.2)	18 (22.8)	0.96	0.40 – 2.32	1.0000
		AA	0 (0.0)	1 (1.3)	NaN	0-NaN	1.0000
	Алели	G	88.9	87.3	1.15	0.51 – 2.59	0.8404
		A	11.1	12.7	0.88	0.38 – 1.93	
<i>rs361525</i> <i>-238G/A</i>	Генотипи	GG	42 (93.3)	79 (100.0)	NaN	0-NaN	0.0791
		GA	3 (6.7)	0 (0.0)	NaN	0-NaN	0.0791
		AA	0 (0.0)	0 (0.0)	NaN	0-NaN	1.0000
	Алели	G	96.7	100.0	NaN	0-NaN	0.2462
		A	3.3	0.0	NaN	0-NaN	
<i>rs1800610</i> <i>489G/A</i>	Генотипи	GG	26 (57.8)	40 (50.6)	1.33	0.63 – 2.79	0.4608
		GA	15 (33.3)	33 (41.8)	0.69	0.32 – 1.49	0.4437
		AA	4 (8.9)	6 (7.6)	1.18	0.31 – 4.45	1.000
	Алели	G	74.4	71.5	1.16	0.64 – 2.08	0.6592
		A	25.6	28.5	0.86	0.47 – 1.54	

Таблица 12. Алелни и генотипни честоти на изследваните *TNFA* полиморфизми пациенти с ДМ и здрави лица.

Ген <i>TNFA</i> / полиморфизъм	Генотипи и алели		Група, брой (%)		OR	95% CI	p-стойност (точен тест на Фишер)
			Пациенти ДМ (33)	Контроли (79)			
<i>rs179964</i> <i>-1031T/C</i>	Генотипи	TT	23 (69.7)	59 (74.7)	0.77	0.31 – 1.91	0.6424
		TC	8 (24.2)	20 (25.3)	0.94	0.36 – 2.42	1.0000
		CC	2 (6.1)	0 (0.0)	NaN	0-NaN	0.0849
	Алели	T	81.8	87.3	0.61	0.28 – 1.35	0.2889
		C	18.2	12.7	1.62	0.74 – 3.55	
<i>rs1800630</i> <i>-863C/A</i>	Генотипи	CC	21 (63.7)	58 (73.4)	0.63	0.26 – 1.50	0.3644
		CA	11 (33.3)	21 (26.6)	1.38	0.57 – 3.32	0.4972
		AA	1 (3.0)	0 (0.0)	NaN	0-NaN	0.2946
	Алели	C	80.3	86.7	0.62	0.29 – 1.33	0.3067
		A	19.7	13.3	1.60	0.74 – 3.42	
<i>rs1799724</i> <i>-857C/T</i>	Генотипи	CC	22 (66.0)	40 (50.6)	1.95	0.83 – 4.55	0.1465
		CT	10 (30.3)	33 (41.8)	0.61	0.25 – 1.44	0.2922
		TT	1 (3.0)	6 (7.6)	0.38	0.04 – 3.20	0.4452
	Алели	C	88.1	71.5	1.79	0.87 – 3.66	0.1303
		T	18.2	28.5	0.55	0.27 – 1.14	
<i>rs1800629</i> <i>-308G/A</i>	Генотипи	GG	28 (84.9)	60 (75.9)	1.77	0.60 – 5.23	0.3276
		GA	4 (12.1)	18 (22.8)	0.46	0.14 – 1.50	0.2966
		AA	1 (3.0)	1 (1.3)	2.43	0.14 – 40.17	1.0000
	Алели	G	90.9	87.3	1.44	0.55 – 3.79	0.5024
		A	9.1	12.7	0.69	0.26 – 1.80	
<i>rs361525</i> <i>-238G/A</i>	Генотипи	GG	33 (100.0)	79 (100.0)	NaN	0-NaN	1.0000
		GA	0 (0.0)	0 (0.0)	NaN	0-NaN	1.0000
		AA	0 (0.0)	0 (0.0)	NaN	0-NaN	1.0000
	Алели	G	100.0	100.0	NaN	0-NaN	1.0000
		A	0.0	0.0	NaN	0-NaN	
<i>rs1800610</i> <i>489G/A</i>	Генотипи	GG	22 (66.7)	40 (50.6)	1.95	0.83 – 4.55	0.1465
		GA	10 (30.3)	33 (41.8)	0.61	0.25 – 1.44	0.2922
		AA	1 (3.0)	6 (7.6)	0.38	0.04 – 3.20	0.4452
	Алели	G	81.8	71.5	1.79	0.87 – 3.66	0.1303
		A	18.2	28.5	0.55	0.27 – 1.14	

1.1.3.2. Алелно и генотипно влияние на *TNFA* полиморфизмите върху клиничната изява при СЛЕ и ДМ

При проучването на връзката между изследваните SNPs и клиничните признаци при СЛЕ, беше установена единствено асоциация на високопродукцията -308GA генотип с наличието на артрит (OR 7.6 95%CI 0.9-66.4; $p=0.04$, фигура 10):

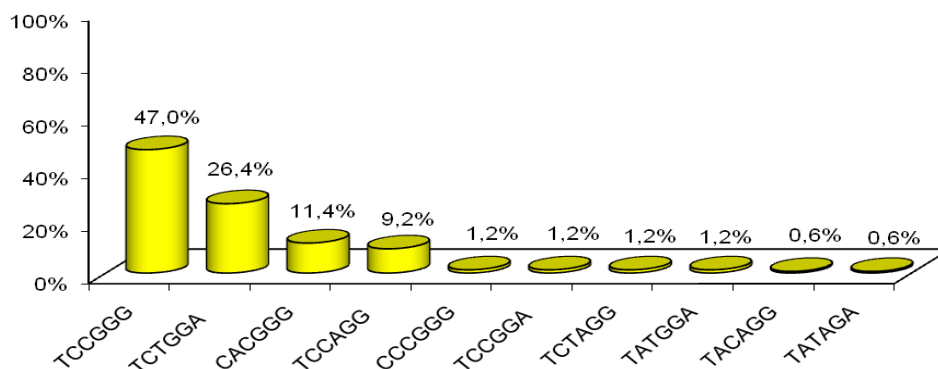


Фигура 10. Процентно разпределение на *TNFA* -308GG и -308GA генотипите сред пациенти със СЛЕ без артрит и с артритна проява.

При проучването на връзката между изследваните единични нуклеотидни полиморфизми и клиничните белези при ДМ не бяха установени асоциации.

1.1.3.3. Хаплотипно разпределение на *TNFA* -1031/-863/-857/-308/-238/489 при изследваните здрави и болни лица със СЛЕ и ДМ.

На базата на данните от генотипния анализ на изследваните 6 SNPs в гена *TNFA* бяха реконструирани 10 хаплотипа с помощта на софтуерна програма PHASE (фигура 11):



Фигура 11. Честотно разпределение на хаплотипи *TNFA* -1031/-863/-857/-308/-238/489 сред здрави индивиди.

Сравнението на хаплотипите между здравите индивиди и пациентите със СЛЕ и ДМ чрез програма Haploview показва пет общи хаплотипа във всички изследвани групи – *TNFA* -1031/-863/-857/-308/-238/489 TCCGGG, TCTGGA, CACGGG, TCCAGG, CCCGGG. Между пациентите със СЛЕ и контролната група допълнително беше установен хаплотип TCCGGA, а между пациентите с ДМ и здрави хаплотип TACGGG. При сравняване на честота между изследваните групи пациенти и здрави индивиди не се установиха статистически значими различия. Когато отделните групи бяха анализирани по пол, при жени хаплотипът *TNFA* -1031C/-863C/-857C/-308G/-238G/489G (CCCGGG) показва по-висока честота в групите на жените със СЛЕ (3,9%) и с ДМ (7,1%) в сравнение с контролната група здрави жени (0%), а направеният статистически анализ потвърди наличието на асоциация както със СЛЕ ($p=0.038$) (фигура 12), така и с ДМ ($p=0.007$) (фигура 13):

Haplotype	Freq.	Case, Control Ratios	Chi Square	p value
Haplotype Associations				
Block 1				
TCCGGG	0.469	0.469, 0.469	0.0	0.9977
TCTGGA	0.206	0.184, 0.222	0.392	0.5314
CACGGG	0.147	0.145, 0.148	0.004	0.9499
TCCAGG	0.112	0.109, 0.114	0.009	0.9225
CCCGGG	0.016	0.039, 0.000	4.303	0.038
TCCGGA	0.015	0.018, 0.012	0.082	0.7745

Фигура 12. *TNFA* -1031/-863/-857/-308/-238/489 хаплотипи при пациентки със СЛЕ и здрави жени. Представени са общите хаплотипи между пациентките със СЛЕ и здравите жени, общата честота за двете групи, честотата при пациентките, честотата при здравите жени, χ -стойността и p -стойността.

Haplotype	Freq.	Case, Control Ratios	Chi Square	p value
Haplotype Associations				
Block 1				
TCCGGG	0.484	0.524, 0.469	0.37	0.5428
TCTGGA	0.200	0.143, 0.222	1.186	0.276
CACGGG	0.119	0.071, 0.138	1.272	0.2594
TCCAGG	0.109	0.095, 0.114	0.106	0.7444
TACGGG	0.027	0.071, 0.010	4.248	0.1393
CCCGGG	0.021	0.072, 0.000	7.332	0.0068

Фигура 13. *TNFA* -1031/-863/-857/-308/-238/489 хаплотипи при пациентки с ДМ и здрави жени. Представени са общите хаплотипи между пациентките с ДМ и здравите жени, общата честота за двете групи, честотата при пациентките с ДМ, честотата при здравите жени, χ -стойността и p -стойността.

1.2. ИНТЕРЛЕВКИН 6 (IL-6)

1.2.1. Асоциативно проучване на *IL-6 -174G/C* полиморфизма при СЛЕ и ДМ

Честотата на *IL-6 -174 G/C* полиморфизма бе проучена в група от 52 болни със СЛЕ и 35 пациента с ДМ и беше сравнена с тази на 80 здрави, неродствени индивиди. Полиморфизмът показва съответствие със закона на Hardy-Weinberg. Наблюдаваните алелни и генотипни честоти при изследваните пациенти със СЛЕ и здрави лица са представени в таблица 13. Установено беше, че честотата на -174GG генотипа сред пациентите със СЛЕ е по-висока (55.8%) в сравнение с контролите (40.0%), което се свързва с повишен риск от развитие на болестта с 1.9 пъти (OR 1.89; 95% CI 0.9-3.81; $p=0.11$). Алелът -174G самостоятелно също води до два пъти по-висок риск за развитие на СЛЕ и показва статистически значима асоциация със заболяването (OR 1.89, 95% CI 1.13-3.18; $p=0.01$, таблица 13):

Таблица 13. Генотипни и алелни честоти на *IL-6 -174G/C* полиморфизма при пациенти със СЛЕ и здрави лица.

Ген <i>IL-6/</i> полиморфизъм	Генотипи и алели		Група, брой (%)		OR	95% CI	P-стойност (точен тест на Фишер)
			СЛЕ (52)	Здрави(80)			
<i>rs1800795</i> <i>-174G/C</i>	Генотипи	GG	29 (55.8)	32 (40.0)	1.89	0.93 – 3.83	0.1074
		GC	13 (25.0)	21 (26.3)	0.93	0.42 – 2.08	1.000
		CC	10 (19.2)	27 (33.7)	0.46	0.20 – 1.08	0.0775
	Алели	G	68.3%	53.1%	1.89	1.13 – 3.18	0.0153
		C	34.6%	46.9%	0.52	0.31 – 0.88	

Анализът на резултатите по пол показва, че при жени със СЛЕ генотипът -174GG е позитивно асоцииран със заболяването ($p=0.012$). Генотипът -174GG и алелът -174G водят до три пъти по-висок риск от развитие на болестта (OR 2.90, 95% CI 1.28-6.57; $p=0.01$) и (OR 2.96, 95% CI 1.63-5.38; $p=0.003$), а -174CC генотипът се свързва с протективен ефект (OR=0.27; 95% CI 0.12-0.84; $p=0.008$). Самостоятелно -174G алелът при жени със СЛЕ показва още по-силна асоциация ($p=0.003$) (таблица 14), която се запази и след корекция по Bonferroni ($p=0.01$).

Таблица 14. Генотипни и алелни честоти на *IL-6 -174G/C* полиморфизма при пациентки със СЛЕ и здрави жени.

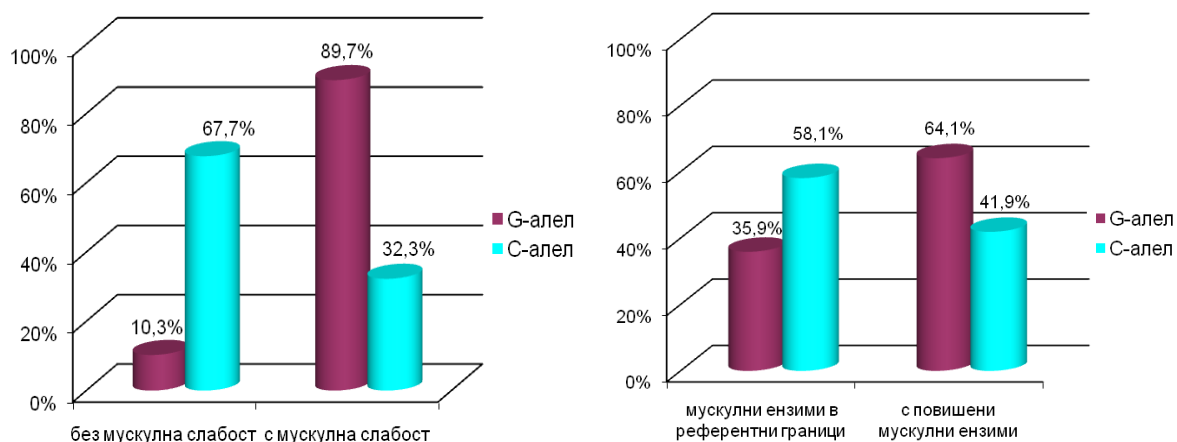
Ген <i>IL-6/</i> полиморфизъм	Генотипи и алели		Група, брой (%)		OR	95% CI	p-стойност (точен тест на Фишер)
			СЛЕ жени (43)	Здрави жени (58)			
<i>rs1800795</i> <i>-174G/C</i>	Генотипи	GG	26 (60.5)	20 (34.5)	2.90	1.28 – 6.57	0.012
		GC	10 (23.2)	14 (24.1)	0.95	0.37 – 2.41	1.0000
		CC	7 (16.3)	24 (41.4)	0.27	0.12 – 0.84	0.008
	Алели	G	72.1%	46.6%	2.96	1.63 – 5.38	0.003
		C	27.9%	53.4%	0.33	0.18– 0.61	

Полиморфизмът *IL-6 -174G/C* не показва връзка с наличието на ДМ.

1.2.2. Алелно и генотипно влияние на *IL-6 -174G/C* полиморфизма върху клиничните признаци при СЛЕ и ДМ

Между *IL-6 -174G/C* полиморфизма и клиничните признаци на СЛЕ не бяха установени асоциации.

При болните с ДМ *-174G* алелът показва асоциация с наличието на мускулна слабост ($p=0.023$, OR 4.2, 95%CI 1.2-15) и тенденция към асоциация с повишените нива на мускулните ензими ($p=0.054$, OR 2.5, 95%CI 0.9-6.5) (фигура 14):

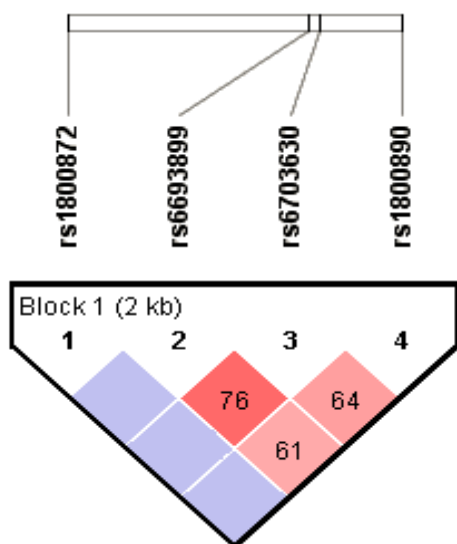


Фигура 14. Алелно разпределение на *IL-6 -174G/C* полиморфизма според А. наличие и отсъствие на мускулна слабост Б. наличие или отсъствие на повишени мускулни ензими.

1.3. ИНТЕРЛЕВКИН 10 (IL-10)

1.3.1. Асоциативно проучване на изследваните *IL-10* полиморфизми при СЛЕ и ДМ

В хода на настоящото проучване бе проведен анализ от вида случай - контрола за връзката на четири полиморфизма в *IL-10* гена (-3575T/A, -2763C/A, -2849G/A и -592C/T) с предположението за появата на СЛЕ и ДМ и клиничните им признаци. Всички изследвани SNPs в гена на *IL-10* бяха в съответствие със закона на Hardy-Weinberg. Между *IL-10* -2763C/A и *IL-10* -2849 G/A полиморфизма беше установена неравновесна връзка ($D'=0.76$) (фигура 15). Останалите двойки сред дисталните полиморфизми също показаха скаченост, но с по-ниска степен (фигура 15):



Фигура 15. Представена е неравновесната връзка на изследваните полиморфизми в *IL-10* гена в здрави индивиди от българската популация.

Всеки квадрат представя силата на неравновесната връзка между съответната двойка полиморфизми, изразена цифрово. Тъмните квадрати демонстрират скаченост между дисталните промоторни полиморфизми.

Наблюдаваните алелни и генотипни честоти на изследваните IL-10 полиморфизми сред пациентите със СЛЕ са представени в таблица 15. Никой от изследваните полиморфизми не показва асоциация със заболяването. Установено беше, че алелите -3575T и -2849G се свързват с по-висок риск за възприемчивост към СЛЕ съответно (OR 1.44, 95%CI 0.78-2.65) и (OR 1.82, 95%CI 0.75-4.44). Генотипът -2849AA пък показва по-висока честота сред здравите индивиди (6%) в сравнение с пациентите със СЛЕ, сред които той не беше наблюдаван. Алелът-2849A също преобладаваше сред здравите индивиди в сравнение с пациентите със СЛЕ (16.9% към 7.8% таблица 15).

Таблица 15. Алелни и генотипни честоти на изследваните полиморфизми в *IL-10* гена при пациенти със СЛЕ и здрави лица.

Ген <i>IL-10</i> / полиморфизъм	Генотипи и алели		Група, брой (%)		OR	95% CI	p-стойност (точен тест на Фишер)
			Пациенти СЛЕ (45)	Контроли (77)			
<i>rs1800890</i> <i>-3575T/A</i>	Генотипи	TT	25 (55.6)	38 (49.3)	1.28	0.61 – 2.68	0.5751
		TA	18 (40.0)	32 (41.6)	0.93	0.44 – 1.98	1.0000
		AA	2 (4.4)	7 (9.1)	0.46	0.09 – 2.34	0.4827
	Алели	T	75.6%	70.1%	1.44	0.78 – 2.65	0.2935
		A	24.4%	29.9%	0.69	0.37 – 1.26	
<i>rs6703630</i> <i>-2849G/A</i>	Генотипи	GG	38 (84.4)	56 (72.7)	2.03	0.78 – 5.26	0.1816
		GA	7 (15.6)	16 (20.8)	0.70	0.26 – 1.86	0.6323
		AA	0 (0.0)	5 (6.5)	NaN	0-NaN	0.1565
	Алели	G	92.2%	83.1%	1.82	0.75 – 4.44	0.2239
		A	7.8%	16.9%	0.54	0.22 – 1.32	
<i>rs6693899</i> <i>-2763C/A</i>	Генотипи	CC	26 (57.8)	43 (55.8)	1.08	0.51 – 2.27	0.8523
		CA	18 (40.0)	25 (32.5)	1.38	0.64 – 2.97	0.4361
		AA	1 (2.2)	9 (11.7)	0.17	0.02 – 1.40	0.0898
	Алели	C	77.8%	72.1%	1.35	0.73 – 2.49	0.3651
		A	22.2%	27.9%	0.73	0.40 – 1.35	
<i>rs1800872</i> <i>-592C/A</i>	Генотипи	CC	23 (51.1)	49 (63.6)	0.59	0.28 – 1.26	0.1873
		CA	19 (42.2)	21 (27.3)	1.94	0.89 – 4.23	0.1108
		AA	3 (6.7)	7 (9.1)	0.71	0.17 – 2.91	0.7436
	Алели	C	72.2%	77.3%	0.77	0.42 – 1.41	0.4428
		A	27.8%	22.7%	1.28	0.70 – 2.33	

От направения статистически анализ се откри асоциация на *IL-10 -3575TT* генотипа ($p=0.019$, OR 2.74, 95%CI 1.13-6.64) и T-алела ($p=0.028$, OR 2.13, 95%CI 1.0-4.44) с дерматомиозит (таблица 16):

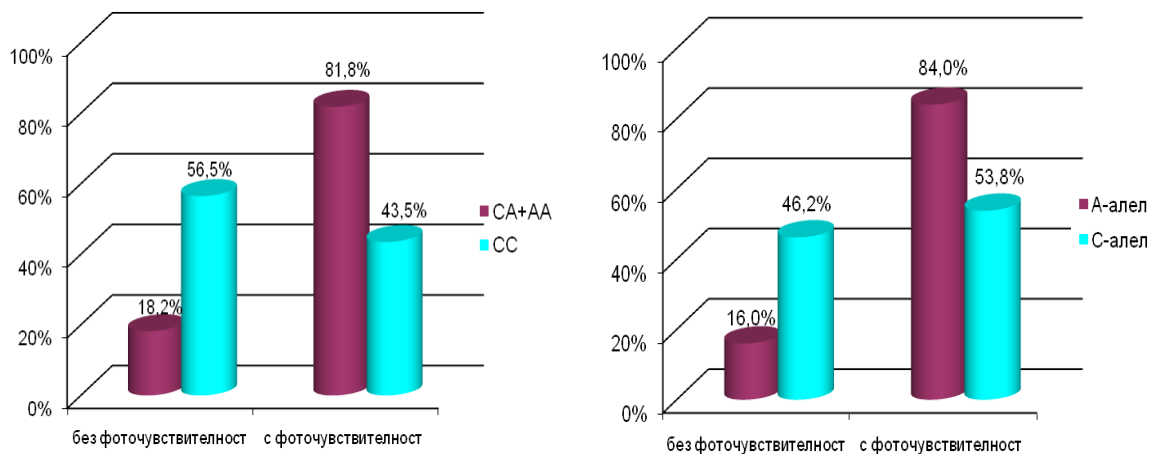
Таблица 16. Алелни и генотипни честоти на изследваните полиморфизми в *IL-10* гена при пациенти с ДМ и здрави лица.

Ген <i>IL-10</i> / полиморфизъм	Генотипи и алели		Група, брой (%)		OR	95% CI	p-стойност (точен тест на Фишер)
			Пациенти ДМ (33)	Контроли (77)			
<i>rs1800890</i> <i>-3575T/A</i>	Генотипи	TT	24 (72.7)	38 (49.3)	2.73	1.12 – 6.64	0.0351
		TA	7 (21.2)	32 (41.6)	0.37	0.14 – 0.97	0.0509
		AA	2 (6.1)	7 (9.1)	0.64	0.12 – 3.28	0.7214
	Алели	T	83.3%	70.1%	2.12	1.02 – 4.43	0.0446
		A	16.7%	29.9%	0.46	0.22 – 0.97	
<i>rs6703630</i> <i>-2849G/A</i>	Генотипи	GG	24 (72.7)	56 (72.7)	1.00	0.40 – 2.49	1.0000
		GA	8 (24.3)	16 (20.8)	1.22	0.46 – 3.21	0.8016
		AA	1 (3.0)	5 (6.5)	0.38	0.04 – 3.45	0.6605
	Алели	G	84.8%	83.1%	1.23	0.55 – 2.73	0.6955
		A	15.2%	16.9%	0.75	0.36 – 1.79	
<i>rs6693899</i> <i>-2763C/A</i>	Генотипи	CC	20 (60.6)	43 (55.8)	1.21	0.53 – 2.79	0.6792
		CA	13 (39.4)	25 (32.5)	1.35	0.58 – 3.14	0.5167
		AA	0 (0.0)	9 (11.7)	NaN	0-NaN	0.0551
	Алели	C	80.3%	72.1%	1.57	0.78 – 3.18	0.2384
		A	19.7%	27.9%	0.63	0.31 – 1.27	
<i>rs1800872</i> <i>-592C/A</i>	Генотипи	CC	19 (57.6)	49 (63.6)	0.77	0.33 – 1.78	0.6689
		CA	13 (39.4)	21 (27.3)	1.73	0.73 – 4.09	0.2610
		AA	1 (3.0)	7 (9.1)	0.31	0.03 – 2.64	0.4313
	Алели	C	77.3%	77.3%	1.00	0.50 – 1.98	1.000
		A	22.7%	22.7%	1.00	0.50 – 1.98	

1.3.2. Алелно и генотипно влияние на изследваните *IL-10* полиморфизми върху клиничните признаци при СЛЕ

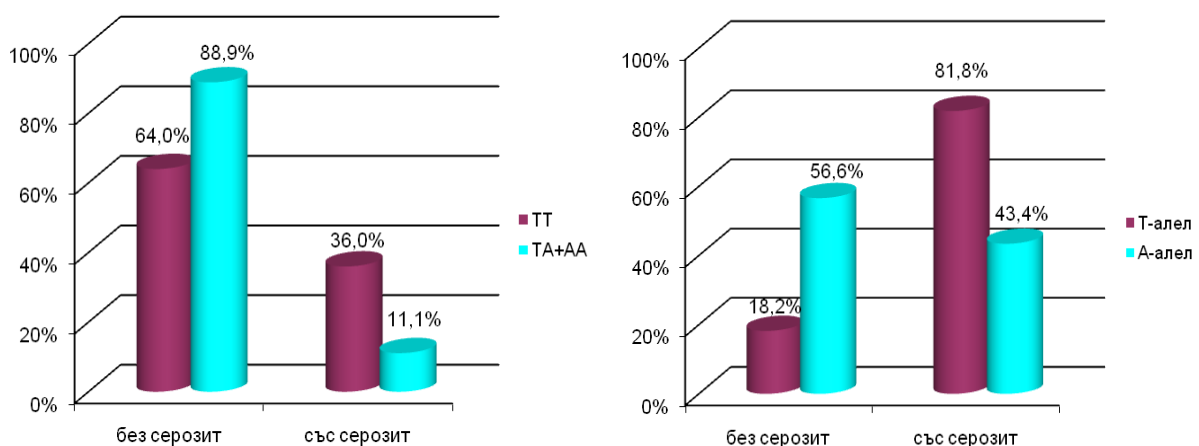
Между *IL-10* полиморфизмите и клиничните прояви при СЛЕ съгласно критериите на Американския колеж по ревматология се установиха асоциации, както за изследвания проксимален промоторен полиморфизъм, така за дисталните полиморфизми.

Присъствието на *IL-10* -592A алела в генотипите CA и AA, както и самостоятелно показва асоциация с наличието на фоточувствителност (CA+AA/CC OR 5.85, 95% CI 1.5-22.8, p=0.009) и (-592A алел - OR 4.5, 95% CI 1.4-14.6, p=0.007). Процентното разпределение на получените асоциации е представено на фигура 16:

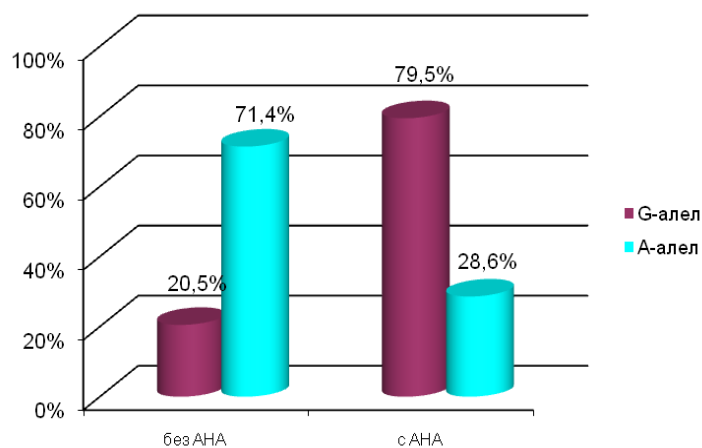


Фигура 16. Процентно разпределение на *IL-10* -592C/A полиморфизма според наличието и отсъствието на фоточувствителност при А. доминантен модел CA+AA/CC Б. за алелите -592C и -592A.

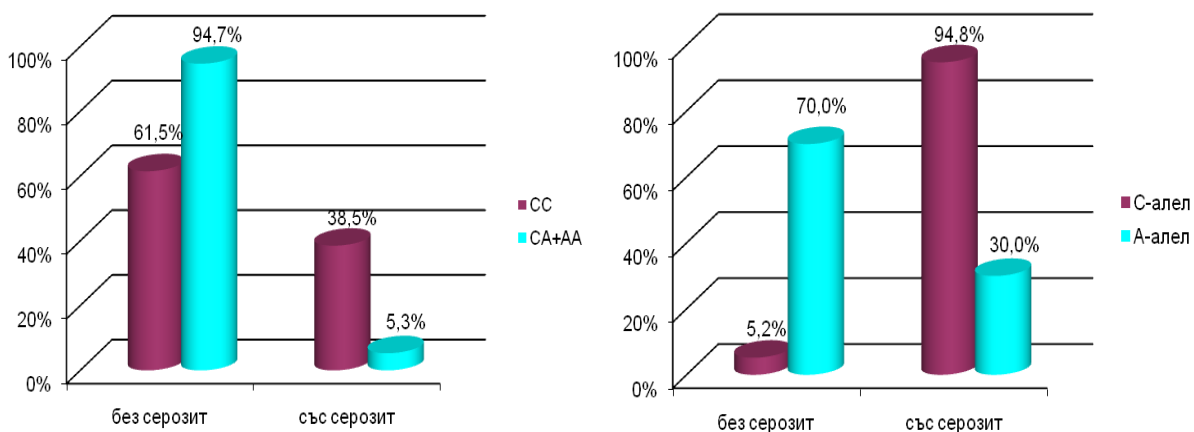
Между -3575TT генотипа и съответно -3575T алела беше намерена статистически значима асоциация със серозит (за TT генотипа, OR 5, 95%CI 0.95-27 p=0.045; за T алела OR 4.2, 95%CI 0.9-19.5, p=0.044) (фигура 17). Между -2849GG генотипа (p=0.006; OR 13.3, 95%CI 2.1-85.4) и G алела (p=0.009, OR 9.7, 95%CI 1.7-54.4) бе установена асоциация с наличието на АНА (фигура 18). За генотипа -2763CC и C алела също се установи асоциация с наличието на серозит (CC генотип p=0.01, OR 11.3, 95%CI 1.3-98; C алел p=0.016, OR 8.1, 95%CI 1-64.8, фигура 19).



Фигура 17. Процентно разпределение на *IL-10* -3575T/A полиморфизма според наличието и отсъствието на серозит при А. рецесивен модел TT/TA+AA Б. за алелите -3575T и -3575A.



Фигура 18. Процентно разпределение на G и A алела от полиморфизма *IL-10* -2849G/A сред пациенти със СЛЕ при наличие или отсъствие на АНА.



Фигура 19. Процентно разпределение на *IL-10* -2763C/A полиморфизма според наличието и отсъствието на серозит при А. рецесивен модел CC/CA+AA Б. за алелите -2763C и -2763A.

1.3.3. Алелно и генотипно влияние *IL-10* полиморфизмите върху клиничните изява при ДМ

Между *IL-10* полиморфизмите и клиничните параметри при ДМ не бяха установени асоциации.

1.3.4. Разпределение на *IL-10* -3575/-2849/-2763/-592 хаплотипите при СЛЕ и ДМ

Хаплотипният анализ на всички изследвани полиморфизми не показва асоциация със СЛЕ. Хаплотипът -3575/-2849/-2763/-592 > TGCC показва слаба тенденция за асоциация с ДМ ($p=0.0647$), а хаплотипът *IL-10* -3575T/-2763C показва асоциация с ДМ ($p=0.0479$) (фигура 20), докато за СЛЕ не се установиха специфични хаплотипни комбинации.

Haplotype	Freq.	Case, Control Ratios	Chi Square	p value
Haplotype Associations				
Block 1				
TC	0.673	0.769, 0.632	3.914	0.0479
AA	0.187	0.132, 0.210	1.839	0.1751
AC	0.072	0.034, 0.089	2.03	0.1542
TA	0.068	0.065, 0.069	0.015	0.9033

Фигура 20. *IL-10 -3575/-2763/* хаплотип при болни с ДМ и здрави индивиди. Представени са общите хаплотипи между пациентите с ДМ и здравите индивиди, общата честота за двете групи, честота при пациентите, честота при контролите, χ -стойността и p-стойността. Демонстрирана е асоциация на -3575T/-2763C с болестта ($p < 0.05$).

Анализът при отделните полове също не доведе до значими резултати.

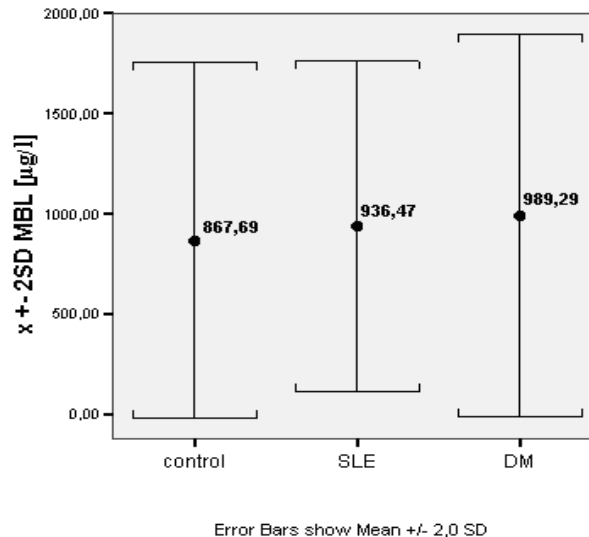
При СЛЕ хаплотипът -3575/-2849/-2763/-592 > TGCC показва връзка с клинични прояви като серозит ($p=0.03$), хематологично засягане ($p=0.0076$), фоточувствителност ($p=0.012$)

2. ПРОУЧВАНЕ ВЪРХУ МАНОЗО-СВЪРЗВАЩИЯ ЛЕКТИН (MBL) И ПОЛИМОРФИЗМИ В *MBL2* ГЕНА

2.1. Серумни нива на MBL

2.1.1. Серумни нива на MBL при изследваните болни и здрави лица

Получените стойности за нивата на MBL както в групите на пациентите, така и сред контролите бяха силно вариабилни, като интервалът, в който попадаха, варираше от 0 до 1730 $\mu\text{g/L}$. Въпреки това проверката показва, че разпределението на променливата (концентрация на MBL) във всяка от изследваните групи е нормално. Проведен беше вариационен анализ One-Way ANOVA, който показва, че разликите в концентрациите в сравняваните групи не са значими $dF(2;88) = 0,285$; $p=0.753$. Резултатите от изследваните серумни нива на MBL са представени на фигура 21:



Фигура 21. Сравнение на концентрациите на MBL при здрави лица, пациенти със СЛЕ и ДМ. Представени са средните стойности за всяка група и стандартното отклонение ($\pm 2SD$)

2.1.2. Влияние на серумните нива на MBL върху клиничните признаци при СЛЕ и ДМ

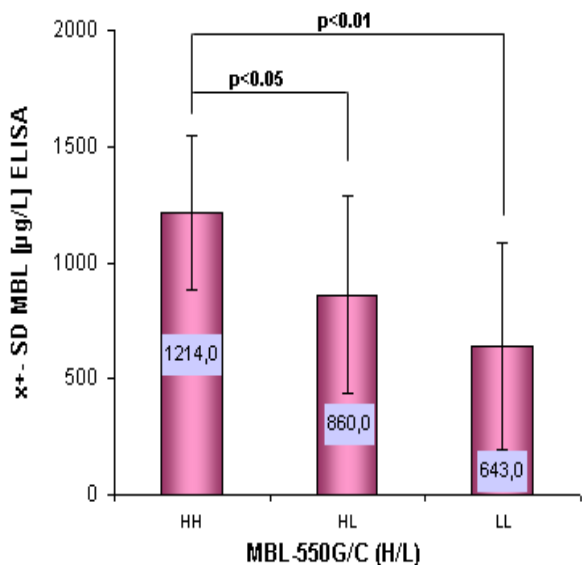
При изследването на връзката между серумните нива на MBL и клиничните признаци на изследваните заболявания, не бяха открити статистически значими резултати.

2.2. Влияние на MBL2 полиморфизмите върху продукцията на MBL

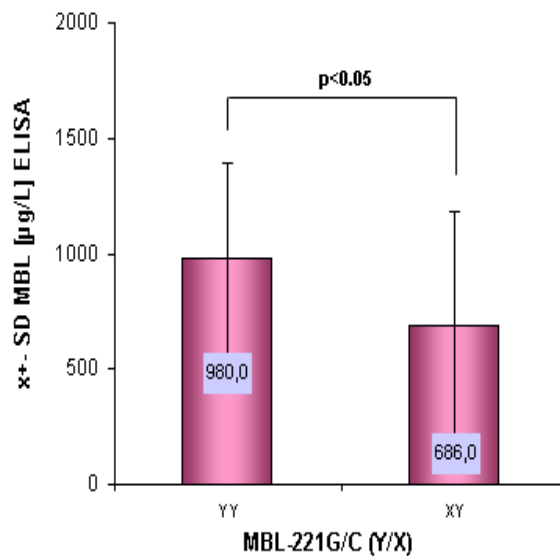
2.2.1. Генотипно влияние върху серумните нива на MBL

Когато изследвахме влиянието на нуклеотидните полиморфизми върху продукцията на MBL, статистически значими разлики се откриха и при двата промоторни полиморфизма. Индивидите, носители на -221XY генотипа показаха с 30% по-ниски нива в сравнение с -221YY генотипа ($p=0.048$) (фигура 22). Статистически значими различия в серумните нива на MBL бяха установени между носителите на генотипите -550HH и -550HL ($p=0.037$) и съответно между -550HH и -550LL ($p=0.009$) (фигура 23). Въпреки установените по-ниски стойности в сравнение с дивия тип, при хетерозиготите с генотипи 52AD и 54AB не се установи сигнификантно понижаване на серумните нива (фигури 24 и 25). Носителите на генотип 54BB бяха само двама мъже, при които беше отчетена концентрация 0, но поради ниската честота на този генотип той беше изключен от статистическия анализ. Поради своята

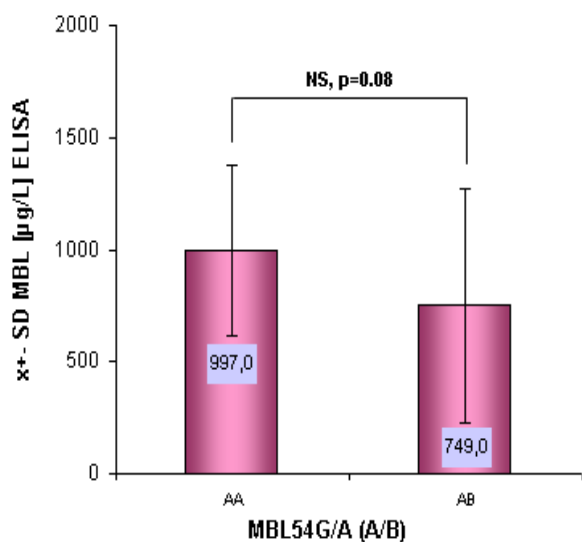
мономорфност, 57A/C полиморфизмът не позволи оценка на значението му за серумните нива на MBL.



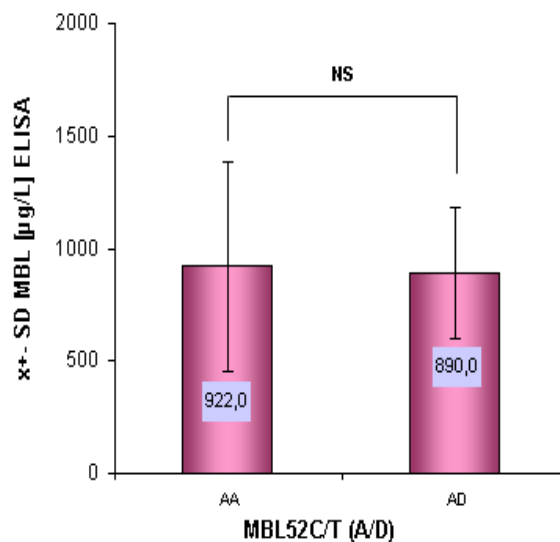
Фигура 22. Влияние на полиморфизма -550G/C върху продукцията на MBL в зависимост от генотипа



Фигура 23. Влияние на полиморфизма -221G/C върху продукцията на MBL в зависимост от генотипа



Фигура 24. Влияние на полиморфизма A/B в кодон 54 върху продукцията на MBL в зависимост от генотипа



Фигура 25. Влияние на полиморфизма A/D в кодон 52 върху продукцията на MBL в зависимост от генотипа

За да се оцени влиянието на външните фактори върху продукцията на MBL, изследваната кохорта беше разделена на базата на генотипите, като се сравниха стойностите на MBL при един и същи генотип между трите изследвани групи - здрави лица, СЛЕ, ДМ, но не бяха открити статистически значими различия при нито един от изследваните полиморфизми.

2.2.2. Хаплотипно влияние на *MBL2* -550/-221/223/230/239 върху секрецията на MBL

Комбинациите от промоторните и структурните полиморфизми води до формирането на т.нар. „секреторни хаплотипи”, които се свързват с различни нива на продукция на MBL и честотата им варира сред различните полулации. Данните от настоящото проучване за разширените генотипи са представени в таблица 17:

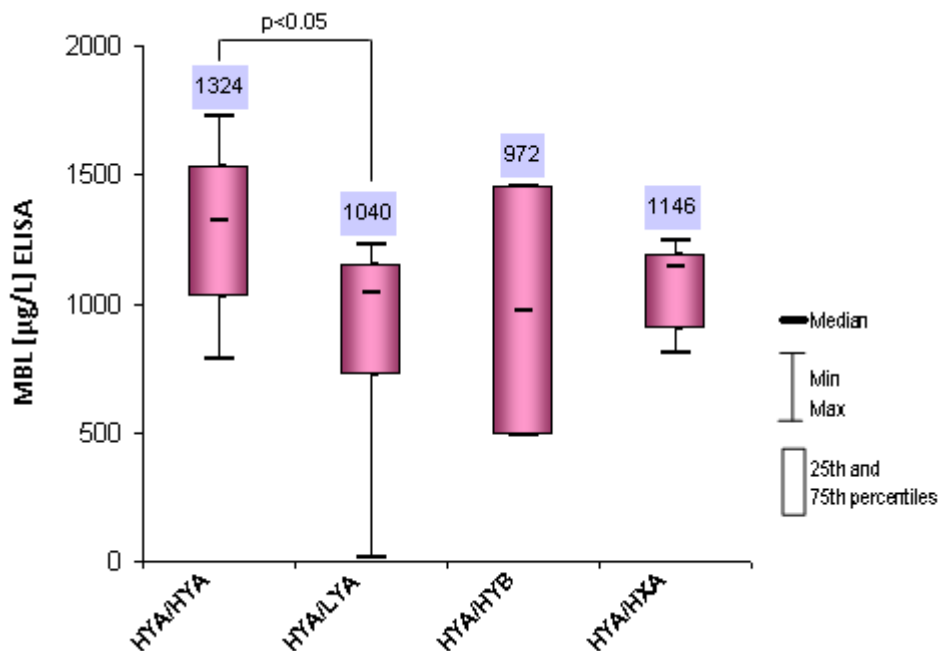
Таблица 17. *MBL2* разширени генотипи, честота, концентрация на MBL [$\mu\text{g/L}$] –средна, стандартно отклонение, медиана, минимална и максимална стойност.

<i>MBL2</i> -550/-221/ 223/230/239	Честота	Средна	$\pm\text{SD}$	Медиана	Min	Max
550 (HL); 221 (YX); 52 (AA); 54 (AA); 57 (AA)	20.1%	899.6	457.9	920.0	0.0	1672.0
550 (HH); 221 (YY); 52 (AA); 54 (AA); 57 (AA)	17.1%	1274.0	294.7	1324.0	784.6	1730.1
550 (HL); 221 (YY); 52 (AA); 54 (AA); 57 (AA)	17.1%	1080.0	147.1	1040.0	16.0	1227.0
550 (HL); 221 (YY); 52 (AA); 54 (AB); 57 (AA)	12.6%	858.0	579.9	696.0	392.1	1648.3
550 (HL); 221 (YY); 52 (AD); 54 (AA); 57 (AA)	9.1%	937.6	310.4	968.0	456.2	1248.5
550 (LL); 221 (YX); 52 (AA); 54 (AB); 57 (AA)	6.8%	72.0	36.0	86.0	16.1	136.6
550 (HH); 221 (YY); 52 (AA); 54 (AB); 57 (AA)	3.4%	972.0	684.5	972.0	488.0	1456.0
550 (HH); 221 (YX); 52 (AA); 54 (AA); 57 (AA)	3.4%	900.4	393.7	1146.0	806.7	1246.4
550 (HL); 221 (YX); 52 (AA); 54 (AB); 57 (AA)	3.4%	196.7	17.0	213.6	156.0	236.0
550 (LL); 221 (YY); 52 (AA); 54 (BB); 57 (AA)	2.2%	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
550 (HL); 221 (YX); 52 (AD); 54 (AA); 57 (AA)	1.2%	1160.0	-	1160.0	1160.0	1160.0
550 (HH); 221 (YY); 52 (AD); 54 (AA); 57 (AA)	1.2%	968.0	-	968.0	968.0	968.0
550 (LL); 221 (YY); 52 (AA); 54 (AA); 57 (AA)	1.2%	848.0	-	848.0	848.0	848.0
550 (LL); 221 (YX); 52 (AA); 54 (AA); 57 (AA)	1.2%	752.0	-	752.0	752.0	752.0

*Забележка – в по-тъмно черно са представени комбинации, за които могат да бъдат определени хаплотипните секвенции, както е посочено в текста.

Подходът при определяне на хаплотипното влияние върху секрецията на MBL включва анализ на хаплотипи, при които съществува една единствена възможна хаплотипна комбинация. От анализа бяха изключени хаплотипни комбинации, при които има повече варианти или такива, които се срещат с ниска честота <2%. Поради малкия брой на получените хаплотипни комбинации беше използван тест на Mann Whiney, при което се установи

значима разлика между хаплотипните двойки НУА/НУА и НУА/ЛУА (фигура 26):



Фигура 26. Сравнение на серумните концентрации на MBL по хаплотипни двойки за цялата кохорта MBL -550/-221/223/230/239. Представена е установената статистическа значимост в концентрацията на MBL между хаплотипните двойки НУА/НУА и НУА/ЛУА ($p < 0.05$)

За да се определи взаимовръзката между хаплотипната секреция и влиянието на патологичния процес, бяха сравнени концентрациите на MBL между здравите и болните лица при най-честите хаплотипи, но не беше установена сигнификантна разлика.

2.3. Генетичен анализ на изследваните *MBL2* полиморфизми

2.3.1. Асоциативно проучване на *MBL2* полиморфизми при СЛЕ и ДМ

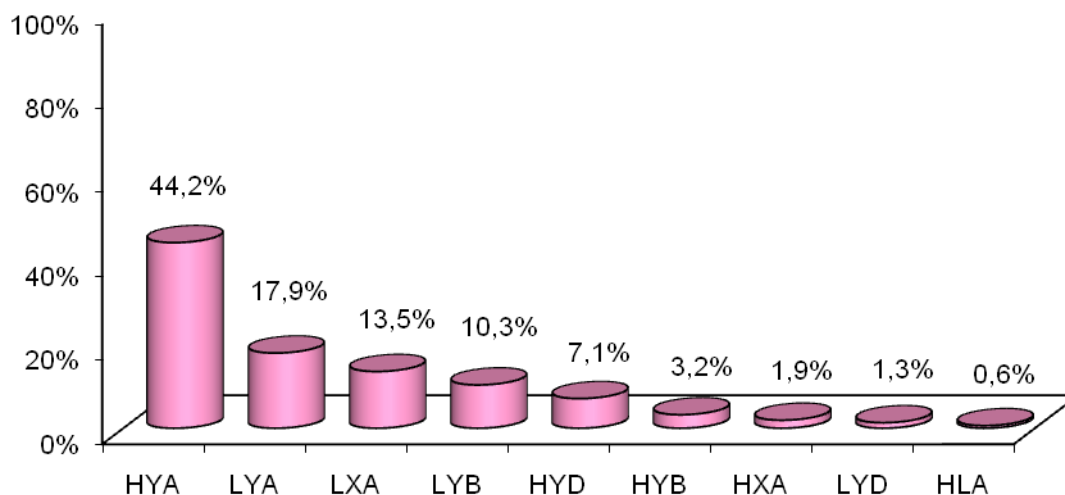
В хода на настоящото проучване беше проведен асоциативен анализ на връзката на пет единични нуклеотидни полиморфизма в *MBL2* гена -550 G/C (H/L), -221 G/C (Y/X), -223C/T (A/D) Arg52Cys, -230G/A (A/B) Gly54Asp, -239C/T (A/C) Gly57Glu) със СЛЕ и ДМ. Наблюдаваните алелни и генотипни честоти на *MBL2* полиморфизмите в изследваните групи са обобщени в таблица 18. Полиморфизмът *MBL2* 57A/C показва мономорфност. Останалите изследвани SNPs бяха в съответствие със закона на Hardy-Weinberg. Никой от изследваните полиморфизми не показва асоциация с изучаваните заболявания, но честотата на генотип -221YX сред пациентите със СЛЕ беше по-висока (OR 1.74, 95%CI 0.81-3.75).

Таблица 18. Генотипни и алелни честоти на изследваните полиморфизми в *MBL2* гена при пациенти със СЛЕ и здрави лица.

Ген <i>MBL2</i> / полиморфизъм	Генотипи и алели		Група, брой (%)		
			СЛЕ (45)	ДМ (33)	Здрави лица (78)
<i>rs11003125</i> <i>-550G/C (H/L)</i>	Генотипи	HH	13 (28.9)	14 (42.4)	26 (33.3)
		HL	26 (57.8)	16 (48.5)	37 (47.5)
		LL	6 (13.3)	3 (9.1)	15 (19.2)
	Алели	H	57.8%	66.7%	57.1%
		L	42.2%	33.3%	43.9%
<i>rs17096206</i> <i>-221G/C (Y/X)</i>	Генотипи	YY	26 (57.8)	22 (66.7)	54 (69.2)
		YX	19 (42.2)	11 (33.3)	23 (29.5)
		XX	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.3)
	Алели	Y	78.9%	83.3%	84.0%
		X	21.1%	16.7%	16.0%
<i>rs5030737</i> <i>223C/T (A/D)</i>	Генотипи	AA	36 (80.0)	31 (96.6)	66 (84.6)
		AD	9 (20.0)	2 (3.4)	10 (12.8)
		DD	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (2.6)
	Алели	A	90.0%	93.9%	91.0%
		D	10.0%	6.1%	9.0%
<i>rs1800450</i> <i>230G/A (A/B)</i>	Генотипи	AA	34 (75.6)	22 (66.7)	57 (73.1)
		AB	11 (24.4)	10 (30.3)	20 (25.6)
		BB	0 (0.0)	1 (3.0)	1 (1.3)
	Алели	A	87.8%	81.8%	85.9%
		B	12.2%	18.2%	14.1%
<i>rs1800451</i> <i>239 G/A (A/C)</i>	Генотипи	AA	45 (100.0)	33 (100.0%)	78 (100.0)
		AC	0 (100.0)	0 (0.0)	0 (100.0)
		CC	0(0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	Алели	A	100.0%	100.0%	100.0%
		C	0.0%	0.0%	0.0%

2.3.2. Хаплотипно разпределение на *MBL2* -550/-221/223/230/239 при изследваните здрави лица и при пациенти със СЛЕ и ДМ

Чрез програма PHASE бяха реконструирани хаплотипите. Сред изследваните здрави българи преобладаваха хаплотипите HYA, LYA, LXA и LYB (фигура 28):



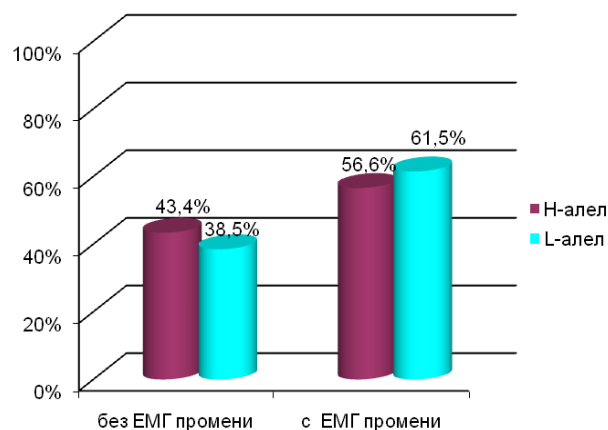
Фигура 28. Хаплотипно разпределение на *MBL2*-550/-221/223/230/239 полиморфизмите сред здрави българи.

Никой от изследваните хаплотипи не показва асоциация с изследваните автоимунни болести.

2.3.3. *MBL2* полиморфизми и клинична изява при СЛЕ и ДМ

2.3.3.1. Промоторни полиморфизми и клинична изява при СЛЕ и ДМ

По отношение на клиничните симптоми и лабораторните показатели при изследваните заболявания за промоторните полиморфизми се установи асоциация на -550L алела с ЕМГ находката при пациенти с ДМ ($p=0.03$, OR 3.2, 95%CI 1.1-9.7, фигура 29). Този алел е по-чест и сред пациентите с ДМ и кожните прояви на болестта (OR 3.75, 95%CI 0.76-18.5), мускулната слабост (OR 3.75, 95%CI 0.76-18.5), повишените нива на мускулните ензими (OR 2.35, 95%CI 0.8-6.9). Генотипният анализ показва тенденция към асоциация на генотипа -221XY с наличието на АНА при пациенти със СЛЕ ($p=0.06$, OR 4.5, 95%CI 0.8-24).



Фигура 29. Процентно разпределение на -550H и -550L алела сред пациенти с ДМ според наличието или липсата на ЕМГ промени.

2.3.3.2. Структурни полиморфизми и клинична изява при СЛЕ и ДМ

Изучаването на връзката между полиморфизмите и клиничните прояви на двете болести показва, че структурните полиморфизми нямат отношение към клиничната изява при ДМ. При СЛЕ се установи асоциация между 54AB генотипа и кожните прояви, свързани с малариен обрив ($p=0.035$, OR 8.9, 95% CI 1-77.3), както и обратна зависимост спрямо наличието на АНА ($p=0.014$, OR 7, 95% CI 1.5-31.8). Полиморфизмът *MBL2* 52A/D не показва асоциация с клиничните признаци на СЛЕ.

3. ПРОУЧВАНЕ ВЪРХУ ГЕНА ЗА ЕСТРОГЕНОВ РЕЦЕПТОР- α (*ESR1*)

3.1. Асоциативно проучване на изследваните *ESR1* полиморфизма при СЛЕ и ДМ

Изследваните SNPs в гена за естрогенов рецептор – α бяха в съответствие със закона на Hardy-Weinberg. Наблюдаваните алелни и генотипни честоти на *ESR1* XbaI x/X и PvuII p/P полиморфизмите сред пациентите със СЛЕ, ДМ и здрави лица са представени в таблица 19.

Установено беше, че *ESR1* XbaI x/X и PvuII p/P полиморфизмите са в неравновесна връзка ($D'=0.84$). Въпреки по-високата честота на генотипа XX сред пациентите в сравнение с тази на контролите (съответно 20.6% за ДМ и 22.5% за СЛЕ към 14.5 за контролите) статистическият анализ не показва значими разлики. Анализът по пол също не доведе до статистически значим резултат.

Таблица 19. Генотипни и алелни честоти на *ESR1* PvuII p/P и XbaI x/X полиморфизмите сред пациенти с ДМ, СЛЕ и здрави лица.

<i>Генотип/алел</i>	<i>СЛЕ</i>	<i>ДМ</i>	<i>Здрави лица</i>
Брой изследвани лица	n=49	n=34	n=69
PvuII p/P (T/C)			
pp (TT)	10 (20.4%)	10 (29.4%)	17 (24.6%)
Pp (TC)	26 (53.1%)	18 (52.9%)	37 (53.6%)
PP (CC)	13 (26.5%)	6 (17.7%)	15 (21.7%)
p (T)	46.9%	55.9%	51.4%
P (C)	53.1%	44.1%	45.6%
XbaI x/X (A/G)			
xx (AA)	15 (30.6%)	11 (32.4%)	17 (24.6%)
Xx (AG)	23 (46.9%)	16 (47.0%)	42 (60.9%)
XX (GG)	11 (22.5%)	7 (20.6%)	10 (14.5%)
x (A)	54.1%	55.9%	55.1%
X (G)	45.9%	44.1%	44.9%

Преобладаващият генотип във всички изследвани групи е PpXx, последван от ххрр и ХХР, без да се наблюдават статистически различия в разпределението между пациенти и здрави индивиди. Честотата на разширените генотипи е представена на таблица 20:

Таблица 20. Честотата на разширените генотипи сред изследваните групи

<i>Генотип</i>	<i>СЛЕ</i>	<i>ДМ</i>	<i>Контроли</i>
Брой изследвани лица	n=49	n=34	n=69
PvuII XbaI			
Ppxx	10 (20.4%)	9 (26.5%)	12 (17.4)
PpXx	5 (10.2%)	2 (5.9%)	5 (7.2%)
ppXx	0 (0.0%)	1 (2.9%)	5 (7.2%)
PpXx	21 (42.9%)	14 (41.2%)	30 (43.5%)
PPXx	2 (4.1%)	1 (2.9%)	7 (10.2%)
PpXX	0 (0.0%)	2 (5.9%)	2 (2.9%)
PPXX	11 (22.4%)	5 (14.7%)	8 (11.6%)

3.2. Алелно и генотипно влияние на *ESR1* полиморфизмите върху клиничната изява при СЛЕ и ДМ

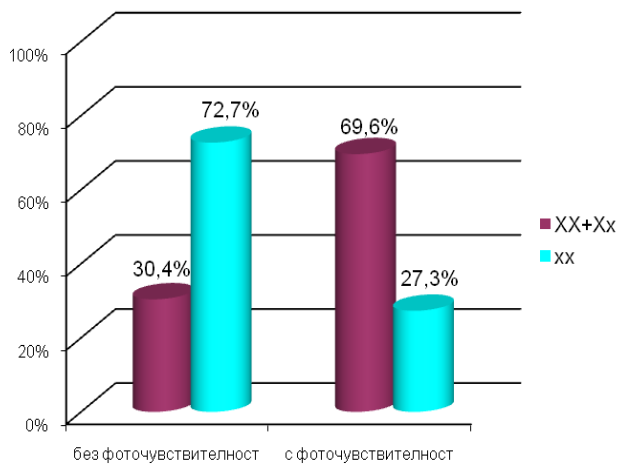
При проучване на влиянието на генотипите върху клиничните признаци върху изследваните заболявания се откри асоциация между X алела и XX+Xx генотипите с фоточувствителността при пациенти с ДМ (доминантен модел (XX+Xx) $p=0.025$, OR 6.1, 95% CI 1.2-30.1 фигура 30 и X алел $p=0.03$, OR 2.9 95% CI 1.1-7.9 фигура 31). Съответно P алелът ($p=0.09$, OR 2.2, 95% CI 0.83-6) и PP+Pp генотипи ($p=0.056$, OR 4.7, 95% CI 0.4-23) също преобладаваха сред фоточувствителните пациенти с ДМ. Комбинациите от генотипи, съдържащи

високопродуциращи алели (PPXX, PpXx, PpXX), показаха връзка с фоточувствителността сред пациенти с ДМ ($p=0.025$, OR 1.3, 95% CI 0.36-4.9). Въпреки че липсва статистическа значимост, PPXX генотипът се среща с по-висока честота и сред фоточувствителните пациенти със СЛЕ (OR 1.3, 95% CI 0.36-4.9).

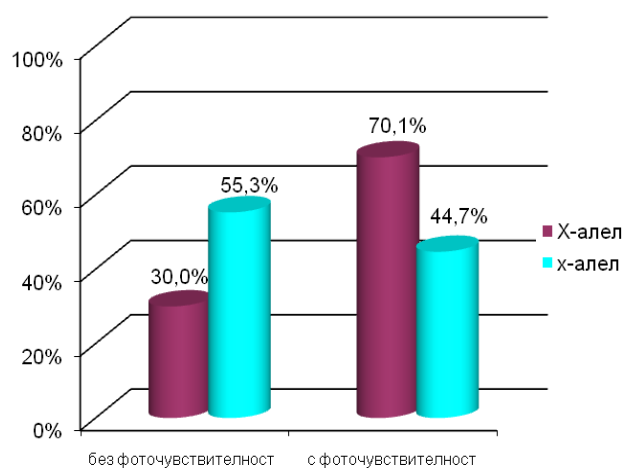
Установено беше, че генотипът XbaI XX е по-чест сред пациенти с ДМ и неврологични нарушения ($p=0.085$, OR 6.5, 95% CI 0.68-61.2), а pp генотипът доминира при пациенти с ДМ и повишени мускулни ензими ($p=0.07$, OR 4.7, 95% CI 0.82-27.1).

За XbaI X алела се установи тенденция към асоциация с малариен обрив при пациенти със СЛЕ ($p=0.07$, OR 2.4, 95% CI 1-5.7).

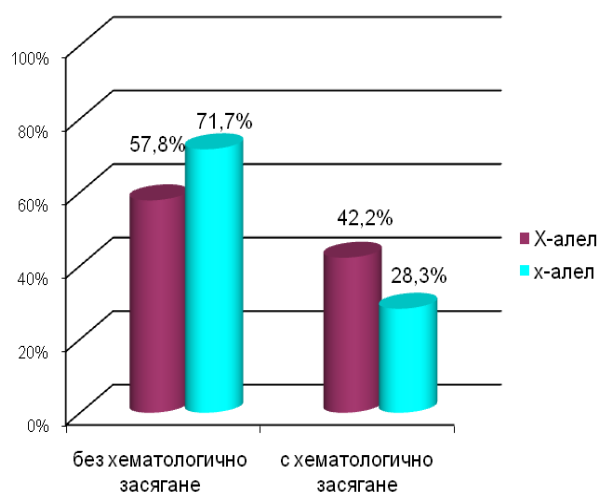
Между генотипите XX+Xx ($p=0.035$) и PP+Pp ($p=0.008$) и пациентите със СЛЕ с хематологично засягане се откри силна асоциация, която беше изразена и на алелно ниво – за X алела (OR 1.9, 95% CI 1.07-3.49; $p=0.038$) (фигура 32) и за P алела (OR 3.8, 95% CI 1.53-9.44; $p=0.005$) (фигура 33):



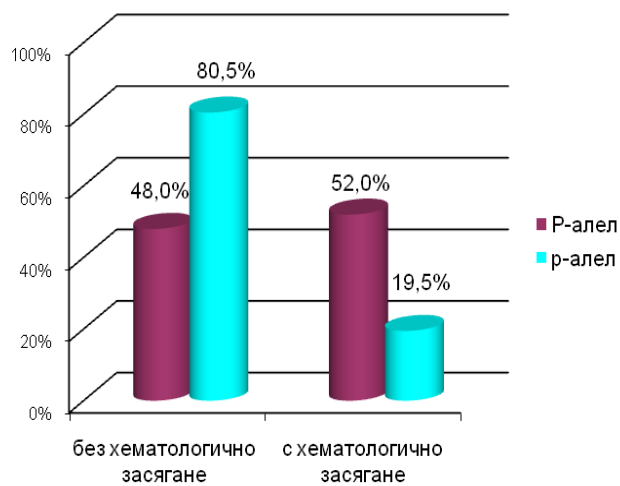
Фигура 30. Процентно разпределение на доминантен модел XX+Xx/xx по признак фоточувствителност при ДМ



Фигура 31. Процентно разпределение на алелите X и x по признак фоточувствителност при ДМ



Фигура 32. Процентно разпределение на алелите X и x по признак хематологично засягане при СЛЕ



Фигура 33. Процентно разпределение на алелите P и p по признак хематологично засягане при СЛЕ

ОБСЪЖДАНЕ

1. ЦИТОКИНИ И ПОЛИМОРФИЗМИ В ЦИТОКИНОВИТЕ ГЕНИ – РОЛЯ ПРИ СЛЕ И ДМ

Ролята на цитокините като медиатори на имунния процес ги превръща във фокус на интензивни проучвания от страна на съвременната имунология и имуногенетика. Понастоящем подходът при генетичните изследвания включва едновременното изследване на про- и антивъзпалителни цитокини, поради комплексния характер на цитокиновата мрежа и автоимунните болести. Въпреки множеството проведени проучвания, данните относно участието на единичните нуклеотидни полиморфизми в патогенезата на автоимунните болести остават противоречиви. Търсят се нови подходи за тяхната оценка, които включват анализ на хаплотипи, локуси на количествени белези, епистатични и хипостатичните ефекти в генната експресия. Въпреки това се установяват значителни популационни вариации, а изясняването на механизмите на влияние на единичните нуклеотидни полиморфизми върху автоимунния процес продължават да бъдат предизвикателство за съвременната наука.

Настоящата работа е насочена към изясняване на ролята на цитокиновите генни полиморфизми в патогенезата на автоимунните болести, като се прави оценка на протеиновата продукция в зависимост от генетичните полиморфизми, анализират се непроучвани до момента за българската популация полиморфизми и се изследва ролята на хаплотипите.

1.1. ТУМОР НЕКРОТИЗИРАЩ ФАКТОР - АЛФА (TNF- α) – РОЛЯ ПРИ ЗДРАВИ И БОЛНИ ЛИЦА

Изследването на серумните нива на TNF- α цели да се уточнят участието на протеина в патогенезата на болестта, възможността да се използва като маркер за активност на автоимунната болест и прогностичен маркер, мониториране на ефекта от лечение с анти-TNF- α инхибитори. Проучванията в тази насока са предмет на широка дискусия, а резултатите често са противоречиви. Поради това настоящата работа имаше за задача да оцени влиянието на серумните нива на TNF- α за развитието на СЛЕ и ДМ и клиничните им прояви, да уточни влиянието на единичните нуклеотидни

полиморфизми върху продукцията на TNF- α , с което да се създаде основа за комплексна оценка на ролята им в автоимунния процес.

1.1.1. Роля на TNF- α за развитието и клиничните прояви на СЛЕ и ДМ

Въпреки наблюдаваните разлики в серумните нива на TNF- α между трите изследвани групи, анализът на резултатите не показва наличие на статистическа значимост, което е в съответствие с данни от предходни изследвания, неоткриващи връзка между нивата на TNF- α и СЛЕ и ДМ. Възможно е получените резултати да се дължат на факта, че към момента на изследването голяма част от пациентите провеждат активно лечение и са в клинично-лабораторна ремисия. По същата причина е възможно да не се открива асоциация между серумните нива на TNF- α и клиничните признаци на двете заболявания. Въпреки това трябва да се отбележи, че в групата на СЛЕ 100% от пациентите със стойности над 90-ти перцентил (cut-off 12.8pg/ml) имат проявена артритна, хематологична и имунологична форма на заболяването, както и положителни АНА. Повишените нива на TNF- α над 90-ти перцентил (cut-off 12.8pg/ml) показват тенденция към асоциация с хематологично засягане при пациенти със СЛЕ ($p=0.06$), което е наблюдавано и от други автори. В настоящото проучване не бяха установени разлики в серумните нива на TNF- α между пациентите с ДМ и контролната група, поради което резултати ни не могат да подкрепят заключението на A.M. Reed и сътр., че TNF- α е чувствителен биомаркер по отношение активността на заболяването, независимо от провеждането на лечение с имуномодулиращи средства. Получените от нас резултати са в пълно съответствие с тези на S. Gabay и сътр. и подкрепят тяхното становище, че серумните нива на TNF- α не са ключов фактор за развитието на болестта.

Съвременното схващане, че не само високите, но също така и ниските нива на TNF- α водят до развитието на СЛЕ, се потвърждава и от настоящото проучване. От една страна най-високи средни стойности са отчетени в групата на пациенти със СЛЕ, но от друга страна медианата в тази група е по-ниска в сравнение с медианата в контролната група. Причина за тези различия са големите индивидуални отклонения в нивата на TNF- α в групата на пациентите със СЛЕ, които биха могли да се дължат на нарушения в генната експресия. Непараметричният тест на Mann-Whitney показва, че при жени със СЛЕ, въпреки високите средни стойности на TNF- α , статистическа значимост имат ниските нива. Тези резултати са очаквани предвид

инхибиращия ефект на естрогените спрямо TNF- α и NF κ B сигнализацията. В други проучвания, използващи непараметрични тестове, също се установява значимост на ниските нива сред пациенти със СЛЕ. Като възможна причина за влиянието на ниските нива на TNF- α върху автоимунния процес може да се изтъкне намалената апоптоза, тъй като именно разтворимата фракция на цитокина е лиганд за проапоптотичния рецептор 1 (TNF- α R1).

1.1.2. Значение на *TNFA* полиморфизмите върху продукцията на TNF- α

1.1.2.1. Алелно и генотипно влияние върху продукцията на TNF- α

Получените резултати подкрепят наличието на генотипни различия в продукцията на TNF- α . Бяха установени значително по-ниски нива на протеина сред здравите индивиди с -308GG генотип в сравнение с носителите на -308GA генотипа, което е в съответствие с данни от предходни проучвания. По този начин настоящата работа подкрепя становището за функционалната роля на -308G/A полиморфизма. Въпреки че не се установиха генотипни различия в серумните нива на TNF- α в контролната група по отношение на останалите полиморфизми, данните показват, че те имат значение в условията на патологичен процес. В групата на СЛЕ бяха установени асоциации на -1031TT и -863CC генотипите с високи нива на TNF- α , а на -1031TC и -863CA генотипите - с ниски нива. Тези резултати са в пълно съответствие с данните на Sharma и сътр., които съобщават за наличието на значимо по-ниски нива на TNF- α у носителите на -1031C и -863A алелите. Skoog и сътр. също наблюдават по-ниски нива при носителите на -863A алела. Подобно на предходни проучвания в настоящата работа също беше установена силна скаченост между -863A и -1031C алелите. Така получените от нас резултати подкрепят хипотезата, че -863C/A полиморфизмът би могъл да влияе върху свързването на транскрипционния фактор NF κ B и да доведе до промени в генната експресия. Не може да се изключи, обаче, водеща роля и на полиморфизма -1031T/C.

За разлика от проучванията на D. A. van Heel и сътр., които наблюдават алел-зависима експресия на *TNFA* гена по отношение на -857C/T полиморфизма във връзка с присъединяване на транскрипционния фактор OCT1(POU1F2), в настоящата работа не се откриват различия в серумните нива на TNF- α , нито сред контролната група, нито сред изследваните пациенти. Възможно обяснение за наблюдаваните разлики е, че в настоящата

работа не е провеждана *ex vivo* стимулация с липополизахариди. Така това на пръв поглед несъответствие всъщност е възможно да се дължи на факта, че за разлика от “housekeeping” гените, генната експресия на *TNFA* не е постоянна. Тя зависи в голяма степен от външни фактори, а единичните нуклеотидни полиморфизми предоставят само потенциал за ниска или висока експресия на протеина във връзка с транскрипционните фактори, които могат да се присъединят в съответните домейни на промоторния участък. Подобно на предишни данни в настоящото проучване не се установиха различия в генната експресия на *TNFA* по отношение на 489G/A полиморфизма, с което по-скоро се отхвърля неговото функционално значение.

Освен от генетичните полиморфизми, свързането на транскрипционните фактори зависи и от редица външни фактори, които също са обект на интензивни проучвания. Установените от нас разлики при сравнението на серумните нива на TNF- α между идентични генотипи (-1031TC и -863CA) при болни и здрави лица свидетелстват за подобни механизми. Тези външни фактори биха могли директно да повлияват генната експресия или да влияят на посттранскрипционно ниво. Във всички случаи данните от настоящото проучване показват целесъобразността от извършването на епигенетични проучвания при автоимунните заболявания.

1.1.2.2. Роля на хаплотипите за продукцията на TNF- α

В настоящото изследване за пръв път се проучва функционалната роля на хаплотипни комбинации от 6 SNPs. Ролята на хаплотипните комбинации се потвърждава от установената статистически значима разлика между генотипите TCCGGG/TCCAGG и CACGGG/CCCGGG. Тези резултати съвпадат с данните на S. Sharma, които установяват, че индивидите с хаплотип -1031/-863/-857/-308 > TCCG имат значимо по-високи нива на TNF- α спрямо тези с хаплотип CACG. Частично обяснение на получените резултати дават изследванията на D. A. van Heel и сътр. Според тях хаплотипната комбинация -863C/-857C е предпоставка за свързване на NF κ B, но не и за OCT1, при което се избягва инхибиращият ефект на OCT1 върху NF κ B транскрипционната активност. Така този хаплотип създава предпоставка за високи нива на TNF- α . В друго проучване A. Mekinian и сътр. изследват функционалната роля на -857/-308/-238 хаплотипите сред здрави индивиди, за които не откриват статистически значими различия. Те, обаче, не отчитат влиянието на полиморфизмите -1031T/C и -863C/A, които очевидно играят

ключова роля според получените в настоящата работа резултати. Освен това подходът им да сравняват средната стойност на един хаплотип с тази на всички останали, намалява разграничителната способност на изследването.

Трябва да се отбележи, че в настоящото проучване между хаплотипите TCCAGG, TACGGG, TCTGGA, TCCGGG и CACGGG не беше установена статистически значима разлика в нивата на TNF- α , но това може да се дължи на маскиращия ефект, който TCCGGG хаплотипът оказва в рамките на общия генотип.

1.1.3. *TNFA* полиморфизми и генетична предразположеност към СЛЕ и ДМ

Получените резултати относно значението на *TNFA* полиморфизми за възприемчивостта към СЛЕ и ДМ са противоречиви и варират в отделните популации.

От всички SNPs в *TNFA* гена най-голяма дискусия предизвиква -308G/A полиморфизмът. Както беше посочено, при проведените асоциативни проучвания, касаещи участието на този полиморфизъм в патогенезата на автоимунните заболявания, изследвателските екипи се разделят в мненията си. Голяма част от проучванията откриват асоциация между този полиморфизъм и СЛЕ и ДМ в европейската популация, докато в азиатската популация подобна връзка не се наблюдава. В настоящото изследване също не беше установена асоциация между -308G/A полиморфизма и развитието на ДМ и СЛЕ, но най-вероятно причина за това е по-ниската честота, с която този полиморфизъм беше наблюдаван сред изследваните индивиди, което е в съответствие с данните от предходни проучвания за българската популация. В подкрепа на неговото значение е наблюдавана асоциация на -308GA генотипа с артритните прояви при пациенти със СЛЕ. Получените резултати са в съответствие и с проучвания, които отчитат ролята на *TNFA* -308G/A полиморфизма по отношение тежестта на протичане на ревматоидния артрит. Установените по-високи серумни нива сред носителите на -308GA генотипа биха могли да обяснят наблюдаваната асоциация и говорят в полза на функционалното значение на изследвания полиморфизъм. Като логично продължение на получените от нас резултати са данните от наскоро проведен мета-анализ при пациенти с ревматоиден артрит, в който се съобщава за ролята на -308G алела като позитивен предиктор на отговора на лечение с TNF- α инхибитори.

При анализ на литературните данни се установяват различия в мненията, както относно функционалното значение на -1031T/C полиморфизма, така и по отношение на ролята му на фактор за възприемчивост при автоимунните болести. Според едно проучване *in vitro*, при стимулация на периферни нуклеарни клетки с конканавалин-А, се наблюдават по-високи нива на TNF- α и по-висока промоторна транскрипционна активност у носителите на -857T или -1031C алелите, отколкото у носителите на -857C или -1031T алелите. Резултатите от настоящото изследване, обаче, са в съответствие с други две проучвания, доказващи по-ниска транскрипционна активност за -1031C и -863A алелите. Най-вероятно подобни различия съществуват и на популационно ниво и биха могли да обяснят защо установената в английската популация роля на -1031TT генотипа за развитие на ДМ, не се потвърждава сред български пациенти със същото заболяване. В настоящата работа за пръв път се установява ролята на -1031CC генотипа като рисков фактор за развитие на СЛЕ сред българи. Значението на -1031T/C полиморфизма в нашата популация се подчертава и от проучване, в което се наблюдава наличие на тенденция към позитивна асоциация на субституцията 1031T>C с меланома малигнум. Тези данни, наред с установената понижена продукция на TNF- α у носителите на -1031C алела, предполагат нарушена генна експресия, която би могла да доведе до намаляването на проапоптотичните му свойства с потискане на антитуморния му ефект и създаване предпоставки за антилялообразуване. Описаната роля на *TNFA* -1031C алела вероятно се дължи на популационни особености, тъй като той се оказва фактор на възприемчивост за автоимунни заболявания и сред други популации, близки до нашата. Описаната от нас асоциация доказва ролята му на рисков фактор сред българските пациенти и затвърждава значението му на споделен локус за автоимунитет.

Получените резултати за влиянието на -863C/A полиморфизма върху протеиновата продукция предполагат функционалното му участие. Установено е, че нископродуциращият генотип -863AA се асоциира със СЛЕ в тайванската популация. Въпреки наблюдаваната неравновесна връзка между -1031C и -863A алелите, -863C/A полиморфизмът не показва статистическа значима асоциация със СЛЕ сред българи. Като най-вероятна причина може да се посочи наблюдаваната от нас по-ниска честота на -863AA генотипа, която се отчита и в предходни проучвания, касаещи българската популация. В представената работа, обаче, се установи по-

висока честота на -863А алела в хомо- и хетерозиготно състояние сред пациентите със СЛЕ и имунологично засягане, както и по-висока честота на този алел сред пациентите с ДМ и ЕМГ промени. Тези данни подкрепят ролята му в патогенезата на автоимунния процес.

Въпреки че не беше наблюдавана асоциация между -857С/Т полиморфизма и изследваните заболявания, беше установена по-висока честота на -857СС генотипа сред двете групи изследвани пациенти, особено сред жени със СЛЕ. Възможно обяснение за наличието на полови различия е описаното взаимодействие на NFκВ р65 протеина и транскрипционния фактор OCT1 в присъствието на -857С алела, което допълнително подлежи на естрогенова модулация. Тези особености на *TNFA* -857С/Т полиморфизма са причина той да бъде изучаван и във връзка с оценка на ефективността от лечение с TNF-α инхибитори при ревматоиден артрит, но получените данни са твърде противоречиви, за да бъде направено категорично заключение.

Анализът от настоящите резултати показва, че полиморфизмът *TNFA* 489G/A е в силна неравновесна връзка с -857С/Т, което е в пълно съответствие с данните, получени за гръцката популация. Нашите наблюдения са в унисон и с предходни проучвания, доказващи голямото генетично сходство на българската и гръцката популация. Установената по-висока честота на *TNFA* 489GG генотипа сред жените със СЛЕ, най-вероятно е следствие от скачеността на двата изследвани полиморфизма. Вероятно това е и причината, поради която резултатите ни не потвърдиха установената сред други популации асоциация на 489А алела със СЛЕ, при които липсва подобна неравновесна връзка. Представените резултати демонстрират популационната обусловеност на неравновесните връзки, с което се подкрепя тезата на Ваена и сътр., че единичните нуклеотидни полиморфизми в промоторния регион на *TNFA* гена отразяват родословната еволюция.

В настоящото проучване за пръв път се изследва честотата на -238G/A полиморфизма сред българи. Получените резултати показаха ниска честота на -238А алела във всички изследвани групи, което ни дава основание да приемем, че този полиморфизъм не играе съществена роля за възприемчивостта към СЛЕ и ДМ сред българи. Подобно честотно разпределение е установено и сред други европейски проучвания. По литературни данни алелната честотата на -238АА генотипа сред кавказката популация варира от 0 до 6%, като най-висока е сред португалци. Ниската честота, с която този полиморфизъм се среща, вероятно е причина ролята му

по отношение на автоимунните болести да остане ненапълно изяснена. Според Kaijzel и сътр. *TNFA* -238A алелът е асоцииран с по-тежко протичане на ревматоидния артрит, докато Мамурова и сътр. установяват, че -238GA генотипът оказва протективен ефект по отношения на ювенилния ДМ. В съответствие с резултатите на Мамурова и сътр., Kaluza и сътр. откриват, че у пациенти с псориазис, носители на -238A алела, се наблюдава по-ниска транскрипционна активност на *TNFA* гена. Ниската честота на -238A алела сред българи, не позволи да определим функционалната роля на този полиморфизъм.

Хаплотипният анализ не показва статистически значим резултат при изследване на отделните групи, но при разделяне на пациентите по пол, нископродуциращия хаплотип -1031C/-863C/-857C/-308G/-238G/489G показва асоциация с развитието на ДМ и СЛЕ у жени. Причина за това вероятно е описаното кръстосано взаимодействие между транскрипционните фактори и естрогените, които модулират генната експресия.

1.2. ПОЛИМОРФИЗЪМ *IL-6* -174G/C - РОЛЯ ПРИ СЛЕ И ДМ

От всички полиморфизми в *IL-6* гена, най-голямо значение за развитието на автоимунните заболявания се отдава на полиморфизма -174G/C. Въпреки това данните за неговото влияние продължават да бъдат противоречиви. Асоциация между -174GG генотипа и СЛЕ се установява в египетската и малайзийската популации, докато при германци, португалци и китайци не се откриват различия в алелното и генотипното разпределение между болни и здрави индивиди. Настоящата работа подкрепя ролята на високосекретиращия -174G алел като рисков фактор за развитието на СЛЕ, особено при жени. Получените резултати са в съответствие с данните от наскоро проведен мета-анализ, който доказва, че -174G алелът е асоцииран със СЛЕ основно сред Европейската популация, докато значението му при азиатци не е така отчетливо.

Представените резултати потвърждават наличието на популационни различия и подкрепят хипотезата на Vorinskaya и сътр. за адаптивното значение на -174G/C полиморфизма сред различните популационни групи. В настоящата работа за първи път се проучва ролята на -174G/C полиморфизма в патогенезата на ДМ, но не беше установена асоциация с болестта. Освен за изясняване на патогенетичните механизми на участие на *IL-6* при СЛЕ и ДМ,

резултатите от настоящото проучване биха могли да имат практическо приложение при употребата на инхибитора на IL-6 рецептора – tocilizumab, който е в етап на клинични проучвания и при двете изследвани заболявания. До този момент е установено, че носителите на нискосекретиращия -174CC генотип по-трудно отговарят на лечение с rituximab и TNF- α блокери. Възможно е тези резултати да са израз на нарушен механизъм на обратна връзка от страна на IL-6, при който има намален регулаторен контрол върху нивата на TNF- α при ниска експресия на този цитокин. Тези данни са важни, тъй като предполагат, че съществуващите кръстосани взаимодействия в цитокиновата мрежа са подложени на генетичен контрол. В този смисъл липсата на директна асоциация между -174G/C полиморфизма и ДМ в настоящата работа, не изключва неговия модулиращ ефект, но дава основание да се предположи, че самостоятелно той не е предразполагащ фактор за възприемчивост към болестта. От друга страна в литературата липсват данни за предикативното значение на генетичните полиморфизми в IL-6 гена при употребата на tocilizumab. Установената от нас асоциация между високопродуциращия -174G алел и СЛЕ би могла да обясни по-отчетливия ефект от приложението на този биологичен препарат при голяма част от пациенти със СЛЕ, както и наличието на единични съобщения за благоприятен ефект при автоимунните миопатии.

В много от проведените проучвания се установява ролята на -174G-алела и GG-генотипа в клиничните изяви на автоимунните болести. Schotte и сътр. съобщават за асоциация между -174G алела и дискоидните кожни лезии и антихистоновите антитела при СЛЕ. Други автори посочват връзка на -174G алела и наличието на антинуклеарни антитела, малариен обрив и хематурия при мъже. В настоящото проучване се установи асоциация на -174G/C полиморфизма със СЛЕ, но тъй като всички изследвани пациенти имат бъбречно засягане, може също да се приеме, че съществуващата връзка отразява патологичната роля, която повишените нива на IL-6 оказват върху гломерулните структури. От друга страна Huang и сътр. не установяват асоциации между -174G/C полиморфизма и клиничните и лабораторни прояви при СЛЕ, което корелира с останалата част от резултатите в настоящата работа. Не е изключено наблюдаваните различия между отделните изследователски групи да се дължат на популационни особености. Въпреки че не се отчита статистическа значимост, трябва да се отбележи, че -174GG генотипът и G алелът се срещат с по-висока честота сред

фоточувствителните пациенти с ДМ, което вероятно се дължи на установеното влияние на IL-6 върху кератиноцитната пролиферация. При ДМ алелът -174G в хомо- и хетерозиготно състояние се асоциира с мускулна слабост и показва тенденция към асоциация с повишените нива на мускулните ензими. Тъй като не се открива връзка с болестта, най-вероятно това се дължи на ролята на IL-6 като миокин.

В заключение нашите резултати показват, че полиморфизмът IL-6 - 174G/C участва в патогенезата на СЛЕ и лупус нефрита, особено при жени, докато при ДМ неговата роля е по-скоро модулираща и има отношение към някои клинични прояви на болестта.

1.3. IL-10 ПОЛИМОРФИЗМИ – РОЛЯ ПРИ СЛЕ И ДМ

Повечето проучвания, свързани с развитието на СЛЕ, са насочени към изясняване значението на проксималните промоторни полиморфизми в IL-10 гена, а ролята на тези, намиращи се в дисталния участък, е слабо проучена. До момента честотата на дисталните полиморфизми в българската популация не е изследвана. Необходимостта от тяхното проучване се обуславя от данни, показващи значителното им влияние върху продукцията на IL-10. С изключение на една единствена публикация, касаеща ролята на -1082G/A полиморфизма при автоимунните миопатии, значението на IL-10 полиморфизмите в патогенезата на ДМ също не е изследвано.

1.3.1. Честотно разпределение на дисталните IL-10 полиморфизми сред здрави българи

Всички изследвани полиморфизми в IL-10 гена показаха честота над 5% сред здрави българи, което е в съответствие с резултатите на A. Gibson и сътр. Установената от нас алелна честота от 70.1% за T алела спрямо 29.9% за A алела в -3575T/A полиморфизма напълно съвпада с данните, получени за здрави индивиди от кавказки произход. За разлика от мономорфната изява на полиморфизма -2849G/A сред китайци от Хонг Конг, резултатите от настоящото проучване показват, че сред българи той е полиморфен и е в неравновесна връзка с полиморфизма -2763C/A. Генотипната честота на полиморфизма -592C/A не се различава от тази в македонската и северната гръцка популации.

В своето проучване A. Gibson и сътр. установяват висока честота на хаплотипите -3757/-2849/-2763 > TGC, AAA, AGA и ниска на TAA, AAC, AGC сред здрави доброволци от кавказки произход. Полученото честотно разпределение на тези хаплотипи сред българи е идентично и предполага, че при провеждане на асоциативни проучвания в рамките на кавказката популация могат да се очакват сходни резултати.

1.3.2. Роля на *IL-10* полиморфизмите и генетична предразположеност към СЛЕ и ДМ

Полиморфизмът -3575T/A се намира в мястото на свързване на транскрипционен фактор *Pit-1*, а експресията на изоформите на *Pit-1* се регулират частично от естрогените. Тъй като при СЛЕ и ДМ се наблюдават високи нива на *IL-10*, а в литературата съществуват данни, че *IL-10* -3575T алелът се свързва с повишена експресия на *IL-10*, в настоящата работа бе изследвана ролята на -3575T/A полиморфизма за възприемчивостта към двете заболявания и клиничната им проява. Въпреки че не се наблюдаваха статистически значими разлики в алелните и генотипните честоти между здравите индивиди и пациентите със СЛЕ, бе намерена асоциация между -3575TT генотипа и T алела и наличието на серозит. Така получените резултати се различават от тези на Gibson и сътр., които намират асоциация на *IL-10* -3575T алела със СЛЕ сред афроамериканци, но не подкрепят напълно данните на W. Chong и сътр., отхвърлящи ролята му в патогенезата на СЛЕ сред китайската популация. Причината за наблюдаваните различия вероятно се дължи на наличието на популационни особености. Настоящото проучване е първото, което изследва ролята на -3575T/A сред европейци със СЛЕ и поради това не беше възможно да се направи сравнителен анализ с други популационни групи, близки до българската. Значението на -3575T/A полиморфизма и необходимостта от неговото изследване се подчертава още повече от получените от нас резултати относно ДМ. В представената работа за първ път беше изследвана и установена асоциация между -3575TT генотипа и -3575T алела и развитието на ДМ. Тези данни, потвърждават ролята на дисталните полиморфизми като споделен локус на автоимунитет и подкрепят становището на Gibson и сътр., които препоръчват при изучаването на *IL-10* полиморфизмите да се провежда комплексен анализ от проксимално-дистален тип.

Генотипът -2849AA се свързва с по-ниски нива на IL-10, поради което той би могъл да оказва протективна роля за развитието на СЛЕ и ДМ. Въпреки че резултатите от нашето проучване не показаха асоциация на този полиморфизъм със самото заболяване, наблюдаваната по-висока честота на AA генотипа сред контролите е в полза на изказаното предположение. Анализът на получените данни показва, че полиморфизмът -2849G/A не играе роля за развитието на ДМ и клиничното протичане на болестта сред българи.

IL-10 -2763C алелът се свързва с по-висока секреция на IL-10 в сравнение с А алела и допринася за развитието на СЛЕ сред афроамериканци. Вероятно поради популационни особености подобна връзка не беше потвърдена за българските пациенти със СЛЕ. Въпреки това -2763CC генотипът и -2763C алелът показаха асоциация с наличието на серозит, което е в съответствие с предходни проучвания, доказващи ролята на високите нива на IL-10 като причина за по-честа проява на серозит. Получените резултати в настоящата работа показват, че -2763C/A полиморфизмът няма отношение към развитието на ДМ, нито към клиничното протичане на болестта сред българи.

Полиморфизмът -592C/A е разположен в регион на негативно регулаторно влияние. Ролята на полиморфизма IL-10 -592C/A в етиологията на автоимунните болести в отделните популации все още не е напълно изяснена. В едно проучване се съобщава за асоциация на генотипа -592CC със СЛЕ у китайски пациенти, докато в друго, че А алелът се свързва с развитието на лупусен нефрит. В допълнение към тези противоречиви становища се прибавят данни, според които този полиморфизъм няма отношение към развитието на СЛЕ. Получените в настоящото проучване резултати за ролята на -592C/A полиморфизма при автоимунните болести също не са категорични. Те показват, че комбинацията от генотипи -592AA+CA са свързани с повишен риск за развитие на лупусен нефрит, серозит и наличието на фоточувствителност, докато -592CC генотипът е по-чест сред пациентите с ДМ с кожно засягане и мускулна слабост. Едно възможно обяснение на описаните данни дава работата на Е. Y. Chung и сътр., които посочват, че в присъствието на -592A алела в промоторния регион може да се присъедини както активната, така и неактивната форма на транскрипционния фактор PARP-1. Този процес от своя страна зависи от степента на апоптоза и некроза. Според авторите при силно изразена

апоптоза се включва активната форма на PARP-1, която осъществява негативен ефект по отношение на транскрипцията на *IL-10*.

Определянето на приноса на отделните полиморфизми за концентрацията на *IL-10* и етиологията на заболяванията е трудно поради тяхното интерфериране в рамките на хаплотипите. При изучаване на връзката между нивата на *IL-10* и проксималните промоторни хаплотипи Se Temple и сътр. установяват, че след стимулация със *S. pneumoniae*, периферните мононуклеарни клетки, носещи хаплотип -1082/-819/-592 > АТА имат значително по-високи нива на мРНК, отколкото тези с хаплотипи GСС и АСС. Други автори посочват, че транскрипционната активност на GСС хаплотипа е с около 20% по-висока в сравнение с тази на АТА и АСС. Възможно е тези несъответствия да се дължат на роля на дисталните хаплотипи, която и в двата случая не е уточнена. Според А. Gibson и сътр. дисталните хаплотипи 3575/-2849/-2763 > ААА или АГА се асоциират с ниски нива на *IL-10*, а TGC - с високи. В присъствието на дисталния промоторен хаплотип - TGC независимо дали е в комбинация с някой от следните проксимални хаплотипи -1082/-819/-592 > АСС, АТА, GСС, не се наблюдават различия в серумните нива на *IL-10*, което според авторите доказва водещата роля на дисталните полиморфизми в секрецията на *IL-10*. Установената в настоящото проучване тенденция към асоциация между -3575Т/-2849/-2763/-592 > TGСС хаплотипа и ДМ е в съответствие с тяхното предположение.

Резултатите от настоящето проучване обогатяват съществуващите данни за честотата на цитокиновите полиморфизми в българската популация. Това е първото проучване в литературата, което изследва ролята на *IL-10* полиморфизмите в патогенезата на ДМ. Получените данни за неравновесна връзка и сходство в честотите на хаплотипите сред европейската популация, показват че подобно на класическите проксимални промоторни полиморфизми, дисталните също са част от консервативен регион, което подкрепя хипотезата за еволюционно обусловения адаптивен отговор.

2. МАНОЗО-СВЪРЗВАЩ ЛЕКТИН И ПОЛИМОРФИЗМИ В *MBL2* ГЕНА – РОЛЯ ПРИ СЛЕ И ДМ

2.1. Роля на серумните нива на MBL за развитието и клиничните прояви на СЛЕ и ДМ

Въпреки наличието на индивидуални вариации в серумните нива на MBL, резултатите в настоящото проучване не показаха значими разлики в трите изследвани групи. Между серумните нива и клиничните прояви при СЛЕ и ДМ също не се установи асоциация, което е в съответствие с данните на Takahashi и сътр. Липсата на асоциация между ниските нива на MBL и СЛЕ може да се дължи на факта, че 100% от изследваните пациенти са с лупус нефрит, а някои автори съобщават за наличието на по-високи нива на протеина при пациенти със СЛЕ и бъбречно засягане. За разлика от Werth и сътр. резултатите от настоящото проучване не потвърждават значението на ниските нива на MBL при ДМ. Едно възможно обяснение на получените резултати е хипотезата на Bouwman и сътр., според които високите и ниските нива на MBL отразяват различни фази на автоимунната болест. В съответствие с това предположение са резултатите от наскоро проведено проучване, което показва, че благоприятният отговор при анти-TNF- α терапията се свързва с понижаване на нивата на MBL. Интересно е да се отбележи, че при болните с лупус нефрит се открива реципрочност между нивата на MBL и наличието на антитела, което се потвърждава и в настоящата работа. Този феномен е още по-силно изразен сред болните с ДМ.

2.2. Значение на *MBL2* нуклеотидните полиморфизми за серумните нива на MBL

Получените от нас резултати подкрепят наличието на генотипни различия в продукцията на MBL. Установени бяха статистически значими разлики и за двата изследвани промоторни полиморфизма подобно на проучвания сред датчани и австралийци. В съответствие с резултатите от тези проучвания, сред българи се установи водеща роля на -221X алела в

сравнение с -550L алела, тъй като при сравнение на двата алела в хетерозиготно състояние X-алелът понижава в по-силна степен нивата на MBL. В настоящото проучване генотипите -550HH, -550HL и -550LL корелират добре с високи, междинни и ниски нива на белтъка в съответствие с данните на Lee и сътр.

Мутантните полиморфизми D, B и C (52A/D, 54A/B and 57A/C) често се обозначават с общия символ „O” и се разглеждат заедно. Настоящото изследване показва, че тези полиморфизми се срещат с различна честота сред българи и имат различно отношение към секрецията на MBL. Представените резултати потвърждават предишни наблюдения, че за разлика от генотипът 54BB, водещи до почти липсващи нива на циркулиращ MBL, полиморфизмът 52A/D не води до драстично понижаване в серумните нива на MBL. Поради различната тежест и принос на структурните полиморфизми върху нивата на MBL, настоящото проучване показва необходимостта те да бъдат разглеждани поотделно.

Подобно на други изследвания се доказва, че хаплотипите NYA и LYA са високопродуциращи, LXA и LYD – нископродуциращи, а LYB – дефектен, свързан с ниски до липсващи нива на MBL.

2.3. Секреторни полиморфизми в *MBL2* гена и генетична предразположеност към СЛЕ и ДМ

Честотата на полиморфизмите в *MBL2* гена за нашата популация не е проучвана. От проведените в настоящото проучване генетични изследвания сред българи, установихме мономорфност единствено по отношение на A/C замяната в кодон 57, което е в унисон с резултати от други популационни проучвания.

Макар и несигнификантно, в настоящото проучване се наблюдава по-висока честота на генотипа -221XY сред пациентите със СЛЕ. Тези резултати са в съответствие с данните от наскоро проведен мета-анализ, който доказва, че -221X алелът е рисков фактор за развитието на СЛЕ във всички популации. Предходни проучвания доказват връзката на -221X алела с някои клинични признаци на СЛЕ - по-ранна изява на болестта, кожно засягане, серозит. Sandrin-García и сътр. установяват връзка между -221X алела и наличието на антифосфолипидни антитела. В съответствие с тези данни в настоящата работа се наблюдава асоциация на -221XY генотипа с наличието на фоточувствителност и слаба тенденция за асоциация с наличието на АНА

при изследваните пациенти със СЛЕ. Наред с установеното влияние на -221X алела върху секрецията на MBL посочените данни подкрепят хипотезата, че ниските нива и нарушенията във функцията на протеина водят до занижена скорост на очистване от апоптотичен материал, създавайки условия за антиядлообразуване. Честотата на -221XY генотипа е по-висока сред пациентите с ДМ и фоточувствителност. Възможно обяснение на връзката между нискосекретиращите полиморфизми в *MBL2* гена и фоточувствителността при ДМ дава проучването на Lokitz и сътр., които доказват, че при облъчване на кожата с UV лъчи, MBL има способността да се свързва с апоптотичните кератиноцити. Много вероятно е при дефицит на MBL този механизъм да бъде нарушен, а функцията на макрофагите - възпрепятствана, с последващо стимулиране на автоимунната фоточувствителност от наличните апоптотични клетки и остатъчния материал.

Генотипът -550LL и алелът L не показаха асоциация с нито едно от изследваните заболявания, но се установи връзка между генотипа -550LL и L-алела и ЕМГ находката при пациенти с ДМ. Тези данни показват, че пониската продукция на MBL, свързана с L-алела, оказва влияние и върху стуркутите на нервната система, най-вероятно по неспецифичен път.

Мутантните полиморфизми D, B и C (52A/D, 54A/B и 57A/C) често се обозначават с общия символ „O” и се разглеждат заедно, но както стана ясно, тези полиморфизми се срещат с различна честота сред българи и имат различно отношение към секрецията на MBL. Данните, касаещи асоциацията на тези три полиморфизма със СЛЕ, не са еднопосочни. Част от авторите намират асоциация със СЛЕ, докато други - не. Подобно на последните в представената работа не се наблюдава статистически значима асоциация на ДМ или СЛЕ с нито един от трите полиморфизма. Мета-анализ, проведен наскоро показва, че степента на взаимовръзка на полиморфизма в кодон 54 със СЛЕ е различна в отделните етнически групи. В настоящото проучване генотипът 54AB показва завишена честота сред пациентите със СЛЕ и малариен обрив. Има данни, че пациенти със СЛЕ, които носят нискосекретиращи генотипи имат по-висока честота на анти-ДНК, анти-Ro/SS-A и анти-La/SS-B, които често са свързани с кожни прояви. Така от представените до момента данни може да се обобщи, че полиморфизмите в *MBL2* гена имат значение не толкова за възникването на двете болести, колкото за тяхната фенотипна проява.

Нито един от изследваните хаплотипи не показва асоциация с развитието на ДМ и СЛЕ. Липсата на асоциация с изследваните заболявания корелира с данните от други проучвания и показва, че *MBL2* генът играе по-скоро модулираща роля, но не е предразполагащ фактор за развитието на СЛЕ и ДМ. Получените резултати от проведените имуноензимните изследвания също са в съответствие с анализа от генетичните проучвания.

3. ПОЛИМОРФИЗМИ В ГЕНА ЗА ЕСТРОГЕНОВ РЕЦЕПТОР-АЛФА (*ESR1*) – РОЛЯ ПРИ СЛЕ И ДМ

Биологичните действия на естрогените се осъществяват от естрогеновите рецептори, които функционират като лиганд-свързани транскрипционни фактори и провеждат сигнала до специфични участъци в промоторите на естроген-зависими гени. Генът за ER- α *ESR1* е силно полиморфен, но два от всички полиморфизми предизвикват особен интерес - RvuII p/P и XbaI x/X. Установено е, че доминантните варианти RvuII P (C) и XbaI X (G) са свързани с повишена активност на ER- α . До момента, обаче, значението на тези два полиморфизма за развитието на СЛЕ остава неясна. В настоящата работа за първи път се изследва и ролята им при ДМ.

Няколко проучвания в азиатската популация установяват връзката на RvuII p/P и XbaI x/X полиморфизмите със СЛЕ. Подобно на предходни проучвания в европейската популация, в настоящата работа не се доказва ролята му на предразполагащ фактор за развитие на заболяването. Установени бяха единствено асоциации с клинични признаци на болестта като хематологично засягане и малриен обрив.

Известно е, че алелите RvuII P и XbaI X се свързват с повишена продукция на естроген, а високите му концентрации оказват ефект върху диференциацията на стволовите клетки и могат да доведат до панцитопения. Подобни процеси биха могли да обяснят установената от нас връзка между ХХРР генотипа и хематологичните промени при пациенти със СЛЕ.

X-алелът и генотипите ХХ+Хх показаха асоциация с малариен обрив при пациенти със СЛЕ, а РРХХ генотипът се оказа преобладаващ сред фоточувствителните пациенти. Получените резултати съответстват напълно на данните от проучването на Johansson и сътр. и са в потвърждение на познатата роля на естрогените като тригери на фоточувствителността.

Механизмът, по който това се осъществява, не е изяснен, но едно възможно обяснение за наблюдаваните промени е потискането на анти-възпалителните цитокини в кератиноцитите от 17β -естрадиола, което е резултат от свързването на хомодимера с различни транскрипционни фактори като NF- κ B, AP-1/c-Jun, c-Fos, ATF-2, Sp1 и Sp3.

Резултатите от проучванията при ДМ показват наличие на асоциация единствено между Р и Х алелите и фоточувствителността. Трябва да се отбележи, че ХХ генотипът преобладава сред пациентите с ЕМГ промени, а рр генотипът - сред тези с повишени мускулни ензими. Резултатите от проучванията при животински модели показват, че естрогенът значимо ограничава повишаването на нивата на креатинин киназата след физически натоварвания. Предполага се, че естрогените оказват мембранно-стабилизиращ ефект върху сакролемата и така може да се намали степента на разкъсването ѝ. Може да се предположи, че понижената рецепторна активност, свързана с рр генотипа, би могла да има обратен ефект, свързан с мускулна увреда, което би могло да обясни наблюдавания от нас резултат.

Практическата стойност на тези проучвания, подобно на другите изследвани от нас полиморфизми, е свързана с оценка на възможностите за индивидуализиране на терапията в бъдеще. В едно изследване, проведено наскоро, е установено, че пациентки с ревматоиден артрит, които носят генотипите ХХ и РР отговарят по-слабо на лечение с leflunomide, отколкото пациентките с генотипи хх и рр. От друга страна двата полиморфизма не показват отношение към лечението с метотрексат на пациенти с ревматоиден артрит. Тепърва предстои да се изясни тяхната роля и предикативна стойност спрямо отговора на лечението с естрогени при СЛЕ и ДМ, за чиито ефекти има противоречиви съобщения.

ОБОБЩЕНИЕ

В настоящата работа за пръв път в България беше проучено генетичното влияние на локуси, кодиращи фактори от три основни системи, за които се счита, че участват в патогенезата на автоимунните болести – цитокини, хормони и система на комплемента. За целта бяха изследвани 18 единични нуклеотидни полиморфизма. Част от получените резултати имат фундаментален характер. За пръв път в световен мащаб беше определена ролята на полиморфизми в цитокиновите гени *IL-6*, *IL-10* и в гена за ER- α за предразположеността към развитие на ДМ, както и значението на полиморфизми в гените *TNFA*, *IL-6* и *MBL2* сред български пациенти със СЛЕ.

Участието на цитокините за развитието на автоимунните болести е безспорно и се потвърждава и от настоящото проучване. Установено беше, че алелите *TNFA* -1031C и *IL-6* -174G са рискови за развитието на СЛЕ (лупус нефрит), а *IL-10* 3575T алелът е предразполагащ фактор при ДМ. Подобни резултати показват, че при автоимунните болести терапевтична мишена са различни цитокини. От друга страна установените клинични асоциации между високо продуциращия генотип -308GA и артритни прояви при СЛЕ поставят въпроса за индивидуално-ориентирана терапия на базата на генетичния профил на изследвания индивид.

Предвид значителните популационни различия в разпределението на „секреторните хаплотипи” в *MBL2* гена и липсата на данни за българската популация, настоящото проучване допринася за обогатяване на популационните база данни. При изследване на влиянието на нуклеотидните полиморфизми върху продукцията на MBL сред българи се установи значима роля на промоторни полиморфизми. Генотипите -550HH, -550HL, 550LL корелират добре с високи, средни и ниски нива на белтъка, а -221YY и -221YX съответно с високи и ниски нива. За структурните полиморфизми се отчете по-слаб ефект на въздействие, като сред тях най-силен ефект показва 54B алелът. Установено беше, че поради различния принос на структурните полиморфизми за секрецията на MBL, те не трябва да бъдат разглеждани като общ показател “O”, а всеки от тях да бъде анализиран поотделно. Изследванията до момента дават основание да се приеме, че полиморфизмите

в *MBL2* гена имат значение не толкова за възникването на автоимунната болест, колкото за нейната клинична изява. Алелът -550L показва асоциация с ЕМГ находката при ДМ, а 54АВ генотипът - с кожните прояви при СЛЕ.

Безспорно женският пол е един от значимите фактори за развитие на СЛЕ и ДМ. В повечето от проучванията, които имат за цел изясняване ролята на естрогена и естрогеновия рецептор в патогенезата на СЛЕ, са използвани животински модели. Настоящото изследване допринася за обогатяване данните за ролята на RvuII p/P и XbaI x/X полиморфизмите при СЛЕ и поставя началото на проучванията върху локуса на естрогенов рецептор алфа при ДМ. Въпреки че не беше установена асоциация между посочените полиморфизми и изследваните заболявания, X и P алелите показаха модулиращи ефекти по отношение на фоточувствителността и хематологичните показатели. Тъй като генът за ER- α (*ESR1*) е силно полиморфен, а е слабо проучен, той продължава да бъде фокус на внимание, както и всички останали гени, кодиращи протеини от сигналната каскада на естрогеновия път.

ИЗВОДИ

Въз основа на данните от настоящето проучване могат да бъдат направени следните изводи:

- А.** Полиморфизмът *TNFA* -308G/A има функционално значение, тъй като сред здрави индивиди хетерозиготният генотип -308GA се свързва със значимо повишена продукция на TNF- α , а при пациенти със СЛЕ този генотип е рисков фактор за артритна проява на болестта.

Б. Променените нива на TNF- α са свързани с развитието на СЛЕ, което предполага нарушена генна експресия на *TNFA* гена в резултат на външни фактори и промяна в апоптотичните сигнали.

В. Сред българи *TNFA* -1031CC генотипът е позитивно асоцииран със СЛЕ и играе ролята на рисков фактор за развитие на болестта.

Г. Серумните нива на TNF- α и *TNFA* полиморфизмите имат второстепенно значение за възникването на ДМ.
- Полиморфизмът *IL-6* -174G/C се асоциира със СЛЕ особено при жени и участва в патогенезата на лупус нефрита, докато неговата роля при ДМ се свързва с модулация на клиничните прояви най-вероятно поради ролята му на миокин.
- Алелът Т на полиморфизма *IL-10* -3575T/A в хомозиготно и хетерозиготно състояние е предразполагащ фактор за развитието на ДМ. Той играе ролята на рисков фактор и за развитието на серозит при СЛЕ, което показва, че изследваният полиморфизъм е споделен локус на автоимунитет.
- А.** Секрецията на MBL е генетично детерминирана и зависи от *MBL2* полиморфизмите, като сред българи значение оказват L, X и B алелите.

Б. Секрецията на MBL при СЛЕ и ДМ не е болестно променена, а *MBL2* полиморфизмите не се асоциират с нито едно от изследваните заболявания, следователно *MBL2* генът не е предразполагащ локус за развитието им, а има само модулираща функция по отношение на някои от клиничните им прояви.
- Полиморфизмите XbaI x/X и PvuII p/P в *ESR1* гена са възможни модулиращи фактори за развитието на СЛЕ и ДМ, свързани предимно с клиничните прояви на двете автоимунни болести, но не са предразполагащ фактор за тяхната възприемчивост.

6. Установените статистически значими разлики в продукцията на TNF- α между хаплотипните комбинации TCCGGG/TCCAGG и CACGGG/CCCGGG и в тази на MBL за хаплотипите HYA, LYA, HYB подкрепят функционалното им значение и са основание за изучаването им при асоциативни проучвания.

СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ

I. ТЕОРЕТИЧНИ (НАУЧНО-ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ) ПРИНОСИ

1. За първи път сред българи е определена честотата на *MBL2* „секреторни” полиморфизми и дистални промоторни полиморфизми в *IL-10* гена, което допринася за обогатяване на популационните база данни.
2. За първи път в световен мащаб са проучени полиморфизми в гените *IL-6*, *IL-10* и *ESR1* при дерматомиозит, като се установи значима за заболяването асоциация с дисталнен полиморфизъм -3575T/A от *IL-10* гена.
3. Проведено е за първи път асоциативно проучване на полиморфизми в гените *TNFA*, *IL-6*, *MBL2* сред български пациенти със СЛЕ.
4. За пръв път е направена функционална оценка на *TNFA* хаплотипни комбинации, обхващащи 6 SNPs
5. За първи път в Европа е проведен хаплотипен анализ на 6 SNPs в *TNFA* гена при пациенти със СЛЕ и ДМ.

II. ПРИЛОЖНИ (НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИ) ПРИНОСИ

1. Създадена е ДНК-банка за системен лупус еритематозус и дерматомиозит към Молекулярен център по медицина.
2. Въведен и оптимизиран е PCR-RFLP метод за анализ на полиморфизми в цитокиновите гени *TNFA*, *IL-6*, *IL-10* и *MBL2* гена, които биха могли да се използват в рутинната практика при изследване и на други автоимунни и малигнени заболявания.
3. Разработен е модел за хаплотипна реконструкция и функционална оценка на хаплотипи.

ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Hristova M**, Dourmishev L, Kamenarska Z, Nikolova S, Kaneva R, Vinkov A, Baleva M, Monova D, Mitev V. *Role of the promoter polymorphism IL-6 –174G/C in dermatomyositis and systemic lupus erythematosus*. Biomed Res Int 2013, 315365. (IF 2012=2.88)

2. **Hristova M**, Dourmishev L, Kamenarska Z, Miteva L, Vinkov A, Kaneva R, Mitev V, Savov A. *MBL2 polymorphisms - manifestations in Bulgarian patients with adult dermatomyositis and systemic lupus erythematosus*. Int J Immunogenet 2013, DOI: 10.1111/iji.12093. (IF2012=1.355)

3. Dourmishev L, Kamenarska Z, **Hristova M**, Dodova R, Kaneva R, Mitev V. *Association of TNF- α polymorphisms with adult dermatomyositis and systemic lupus erythematosus in Bulgarian patients*. Int J Dermatol 2012, 51, 1467-1473. (IF 2012=1.342)

ЦИТИРАНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Zhou Q**, Hou S, Liang L, Li X, Tan X, Wei L, Lei B, Kijlstra A, Yang P. *MicroRNA-146a and Ets-1 gene polymorphisms in ocular Behcet's disease and Vogt-Koyanagi-Harada syndrome*. Ann Rheum Dis (The EULAR Journal) 2014 Jan;73(1):170-6. (IF 2013=9.111)

2. **Li X**, Chai W, Ni M, Xu M, Lian Z, Shi L et al. *The effects of gene polymorphisms in Interleukin-4 and Interleukin-6 on the susceptibility of rheumatoid arthritis in a Chinese population*. BioMed Research International Volume 2014, Article ID 265435 (IF 2012=2.88)

НАУЧНИ ДОКЛАДИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

European Academy of Dermatology and Venereology, 20-24.10.2011, Lisbon, Portugal.
Dourmishev L, Kamenarska Z, **Hristova M**, Kaneva R. **Abstract PO265** *TNF- α and IL-10 single-nucleotide polymorphisms in Bulgarian patients with dermatomyositis*

Excellence in Rheumatology (EiR) 25-28.01.2012, Madrid, Spain.

Hristova M, Kamenarska Z, Dourmishev L, Baleva M, Kaneva R, Savov A. *TNF- α and Mannose-binding lectin single nucleotide polymorphisms in systemic lupus erythematosus patients*. Rheumatology Volume 51 suppl 1 February

9th EADV Spring Symposium, 6-10.06.2012, Verona, Italy.

Dourmishev L, Kamenarska Z, **Hristova M** et al.

Estrogen Receptor α Gene (ESR1) single nucleotide polymorphisms are associated with photosensitivity in Bulgarian patients with dermatomyositis. (Book of abstracts).

Шести национален конгрес по нефрология, 5-7.10.2012, Пловдив, България

Христова М, Илиев А, Каменарска З, Пенева Е, Дурмишев Л, Балева М, Саввов А, Богов Б. *Имуногенетично участие на TNF- α в патогенезата на системния лупус при пациенти с бъбречно засягане*

22nd EAVD Congress, 2-6.10.2013, Istanbul, Turkey.

Hristova M, Kamenarska Z, Nikolova S, Kaneva R, Dourmishev L

Abstract P866 *IL-6 promoter polymorphism -174G/C in patients with dermatomyositis*. (Book of abstract)

СЪДЪРЖАНИЕ:

ВЪВЕДЕНИЕ	3
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	5
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	6
1. МАТЕРИАЛИ.....	6
1.1. ИЗСЛЕДВАНИ ЛИЦА	6
1.2. БИОЛОГИЧЕН МАТЕРИАЛ.....	7
2. МЕТОДИ.....	8
2.1. СЕРОЛОГИЧНИ МЕТОДИ	8
2.2. МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧНИ МЕТОДИ.....	8
2.3. СТАТИСТИЧЕСКИ АНАЛИЗ.....	10
РЕЗУЛТАТИ	11
1. ЦИТОКИНИ И ПОЛИМОРФИЗМИ В ЦИТОКИНОВИТЕ ГЕНИ.....	11
1.1. ТУМОР НЕКРОТИЗИРАЩ ФАКТОР - АЛФА (<i>TNFA</i>).....	11
1.2. ИНТЕРЛЕВКИН 6 (<i>IL-6</i>).....	24
1.3. ИНТЕРЛЕВКИН 10 (<i>IL-10</i>).....	26
2. МАНОЗО-СВЪРЗВАЩ ЛЕКТИН (<i>MBL</i>) И ПОЛИМОРФИЗМИ В <i>MBL2</i> ГЕНА	31
3. ПОЛИМОРФИЗМИ В ГЕНА ЗА ЕСТРОГЕНОВ РЕЦЕПТОР – АЛФА (<i>ESR1</i>)	38
ОБСЪЖДАНЕ	42
1. РОЛЯ НА ЦИТОКИНИТЕ И ПОЛИМОРФИЗМИ В ЦИТОКИНОВИТЕ ГЕНИ.....	42
1.1. ТУМОР НЕКРОТИЗИРАЩ ФАКТОР - АЛФА (<i>TNFA</i>).....	42
1.2. ИНТЕРЛЕВКИН 6 (<i>IL-6</i>).....	49
1.3. ИНТЕРЛЕВКИН 10 (<i>IL-10</i>)	51
2. РОЛЯ НА <i>MBL</i> И ПОЛИМОРФИЗМИ В <i>MBL2</i> ГЕНА	55
3. РОЛЯ НА ПОЛИМОРФИЗМИ В <i>ESR1</i> ГЕНА	58
ОБОБЩЕНИЕ	60
ИЗВОДИ	62
СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ	64
СПРАВКА ЗА ПУБЛИКАЦИИ, ЦИТИРАНИЯ И ДОКЛАДИ	65
СЪДЪРЖАНИЕ	66

БЛАГОДАРНОСТИ:

Изказвам специални благодарности на:

Проф. д-р Марта Николова и целия екип на Клиниката по клинична имунология към УМБАЛ „Александровска” с ръководител проф. д-р Елисавета Наумова

Д-р Зорница Каменарска, Доц. Радка Кънева, д-р Атанаска Миткова от Молекулярния център по медицина към МУ-София

Доц. Алексей Савов и Силвия Андонова от Националната генетична лаборатория към СБАЛ „Майчин дом”

Проф. д-р Даниела Монова и д-р Евгения Пенева от ВМИ на МВР за помощта при подбора на пациенти със СЛЕ

Проф. д-р Б. Богов, проф. д-р Б. Киперова и целия екип на IV-та Клиника по нефрология към УМБАЛ „Александровска” за помощта при подбора на пациенти със СЛЕ и за колегиалността, която проявиха в рутинната работа

Доц. д-р Любомир Дурмишев от ККВБ към УМБАЛ „Александровска” за подбора на пациенти с ДМ