

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**

ДИСЕРТАЦИЯ

за присъждане на образователна и научна степен “доктор”

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

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
IIF	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 карпа В
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 растежен 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 смъртност 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 бъдат обяснени 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 имуен отговор с формирането на автоантитела, нарушения във вродения и придобития имунитет, хормонален и цитокинов дисбаланс, абераантно 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 имуен 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 ситемен 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 клиърънса 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 пациентите с ДМ. Тъй като се знае, че естрогенът и естрогеновите рецептори имат способността да модулират генната експресия на множество транскрипционни фактори, изследването на полиморфизми в кодиращите ги гени е от съществено значение за изясняване механизмите на възникване на автоимунния процес.

Освен че биха могли да доведат до изясняването на някои патогенетични механизми, резултатите от провеждането на асоциативни проучвания, 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. Това би допринесло за индивидуализиране на терапията и стои в основата на развитието на съвременната фармакогенетика 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.

ГЛАВА I. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1. АВТОИМУНИТЕТ

Етиологията на автоимунните болести остава неизяснена, въпреки множеството проучвания през последния век. В основата на идеята за автоимунитета лежи концепцията на Р. Ehrlich за “horror autotoxicus”, според която в имунната система съществуват определени механизми, които възпират имунната атака спрямо „своето”. За основополагащо събитие при изследванията на автоимунитета се счита откриването на LE-клетките от Malcolm Hargreaves през 1948 г., което показва наличие на фагоцитоза на собствени структури. През 50-те години на XX век E. Witebsky и N. Rose предоставят допълнителни доказателства за възникването на автоимунния процес като резултат от нарушен имунологичен толеранс. През 1962 г. създателят на клонално-селекционната теория Sir Frank Macfarlane Burnet и неговият сънародник Ian Reay Maskaу издават монография, озаглавена „Автоимунни болести”, с която се слага началото на множество изследвания в една нова област на медицинската наука - автоимунитета. На базата на клонално-селекционната теория, те създават хипотезата за автоимунната болест като “състояние, при което структурните и функционалните увреди са резултат от действието на имунокомпетентни клетки или антитела срещу собствени компоненти на тялото”, водещи до появата на “забранени клонове” от лимфоцити. Още тогава Maskaу отбелязва факта, че “СЛЕ е ключова болест, обхващаща целия спектър от имунопатологични лезии, отнасящи се до забранените клонове, която би могла да спомогне за цялостното разбиране и изясняване на автоимунитета”. С развитието на познанието се оказва, че теорията за “забранените клонове” не дава обяснение за нарушението на хомеостазата в имунната регулация. Предлагат се множество нови хипотези. Сред тях са хипотезата за освобождаване на секвестрирани собствени антигени, избягването на автореактивните клонове, загубата на супресорни клетки, антигенна мимикрия и кръстосана реактивност между екзогенни и променени собствени антигени вследствие на химични фактори и вирусни инфекции, поликлонална стимулация на лимфоцитите. Предложеното през 1986 г. от Mosmann разделение на CD4+ Т клетките на субтипове въз основа на техния цитокинов профил се отразява и на концепцията за автоимунните болести, като се правят опити за категоризирането им като Th1 и Th2 обусловени. С откриването на нови цитокини, тази представа се усложнява, като и до днес принципите за цитокинов дисбаланс при автоимунните болести са предмет на интензивни проучвания. През 1996 г. Matzinger открива значителни недостатъци на теорията за „чуждо” и „своє” и така формулира своя хипотеза,

наречена „danger hypothesis” за ролята на „опасните” сигнали. Според нея имунната реактивност към автоантигените предлага възможност за клетъчна смърт чрез апоптоза или чрез некроза, а автоимунните заболявания са причинени от генни мутации, водещи до нарушения във физиологичната смърт на клетките, при което се задействат процесите на некроза и се изпращат „алармиращи” сигнали. Съществуват и хипотези, които отхвърлят понятието автоимунитет, като отдават наблюдаваните промени на загуба на самокритичност на имунния отговор спрямо повтарящи се антигенни дразнители [1]. Появата на нови теории продължава, но като цяло засега широко е приета идеята за многофакторното естество на автоимунните болести, в чиято патогенеза взимат участие различни екзогенни и ендогенни фактори.

2. СЪВРЕМЕННИ НАПРАВЛЕНИЯ В ИЗСЛЕДВАНИЯТА НА АВТОИМУННИТЕ БОЛЕСТИ – ИМУНОГЕНЕТИКА И ЕПИГЕНЕТИКА

Първоначално имунологичните проучвания при автоимунните болести целят да определят патологичните промени на серологично ниво. Правят се опити за класифицирането им към адаптивния или вродения имунитет. Впоследствие става ясно, че между тези звена на имунната система съществуват множество връзки като цитокините и факторите на системата на комплемента, които наред с Toll-like рецепторите (TLR) играят съществена роля [2]. Реактивната обвързаност на структурите в имунната система предоставя възможности за мониториране на автоимунната болест, но прави трудно определянето на първоизточника на патологичния процес. Генетичният контрол, на който са подложени имунологичните процеси, предполага възможности за определяне на независими маркери, които биха могли да спомогнат за изясняването на патогенезата на автоимунните болести. Опитите за прецизиране на причините за възникване и развитие на автоимунните болести през последното десетилетие водят до провеждането на много генетични, имуногенетични и епигенетични проучвания.

2.1. Имуногенетика - Едно от най-значимите събития в областта на имунологията е откриването на HLA системата и характеризирането на гените на главния комплекс на тъканната съвместимост (МНС) от Jean Dausset, Varuj Benacerraf и George Davis Snell, за което през 1980 г. получават Нобеловата награда за физиология и медицина. Скоро след откриването на МНС излизат множество съобщения за асоциации между различни автоимунни болести и определени HLA антигени [3]. В хода на проучванията върху автоимунитета се установява, че епитопите, които предизвикват мимикрия, често имат сходен аминокиселинен състав с мотиви

от молекулите на МНС [4]. На базата на подобни данни възникват антиген-специфичната теория и тази за артрогенния пептид [5]. Поради важното функционално значение на МНС, системата на човешките левкоцитни антигени е един от първите региони от човешкия геном, които са изцяло секвенирани. Така с навлизането на генетичните методики и охарактеризирането на HLA алелите се разкрива нова перспективна област в имунологията - имуногенетиката, а ролята на генетичните фактори в процесите на автоимунитета се затвърждава.

Към момента основните подходи, които се използват за откриване и определяне на гени и молекулни варианти при полигенните заболявания са: *анализ за скаченост* (Linkage mapping), който се провежда в големи родословия и *асоциативни проучвания* (Linkage disequilibrium mapping) на ниво популация. При фамилените проучвания се проследява ко-сегрегацията между даден фенотип и определен генетичен маркер в поколението, детектират се гени на големи разстояния, като за маркери могат да се използват микросателити. Анализът при асоциативните проучвания се основава най-вече на търсенето и изясняването ролята на единични нуклеотидни полиморфизми (SNPs). Завършването на човешкия геномен проект (The Human Genome Project) и Нар-Мар проекта (The HarMap Project) даде представа за огромния брой SNPs, намиращи се в целия геном. Поради своето изобилие и гъстота, те са идеални полиморфни маркери при асоциативните изследвания на многофакторните заболявания. От получените експериментални данни става ясно, че голяма част от единичните нуклеотидни замени (SNP) могат да повлияват генната експресия [6].

В последните няколко години асоциативните изследвания и анализирането на единични, случайно избрани SNPs се комбинира с анализиране на хаплотипи. Най-голямо предимство на хаплотипните методи е идеята, че често срещаните хаплотипи обхващат повече генетични варианти в един хаплоблок и могат да бъдат тествани като се използват малък брой SNPs, т. нар. „представителни” SNPs (htSNPs - haplotype tag SNPs).

С навлизането на технологиите от следващо поколение стана достъпно едновременното тестване на стотици хиляди SNPs в целия геном и провеждането на широко мащабни геномни асоциативни изследвания. Анализът и интерпретацията на получените данни продължават да бъдат предизвикателство. Поради тази причина се въвеждат нов тип анализи, определящи локуси на количествени белези – англ. quantitative trait loci (QTLs). Използват се вариационни анализи, чрез които се изследва сборният ефект от влиянието на единичните нуклеотидни полиморфизми от различни гени, имащи отношение към даден фенотип, като се отчитат едновременно синергичните (епистатични) и хипостатичните ефекти.

2.2. Епигенетика - Едно съвременно направление в изследването на автоимунните болести е епигенетиката, която представлява своеобразен мост между генетиката и влиянието на екзогенните фактори. Механизмите, по които се осъществяват тези процеси с последващо повлияване на генната експресия, включват CpG-ДНК метилиране, модификация в хистоните и микро-РНК. При СЛЕ е установено хипометилирането на регулаторни области в Т-клетките, при което се наблюдава свръхекспресия на гени като *ITGAL* (CD11a), *CD40LG* (CD40L), *TNFSF7* (CD70), *KIR2DL4* (CD158d) и *PRF1* (перфорин), както и на CD5 в В клетките [7]. Силна асоциация със СЛЕ се наблюдава и при хистоновите модификации с повишено H4 ацетилиране в моноцитите. NcРНК и особено miР-21, miР-148a и miР-126, осъществяват контрол върху други елементи от епигенетичната регулация и главно при транскрипцията на ензима DNMT1 [7]. Метилирането на *RAB22A* (ras-свързан протеин Rab22a), *STX1B2* (синтаксин 1), *LGALS3BP* (галактин 3 свързващ протеин) и *PREX1* (фосфатидил инозитол 3,4,5-трифосфат зависим Rac 1 протеин) корелира с активността на болестта [8]. При ДМ в кожните и мускулните лезии се открива повишена експресия на маркерния за интерфероните ген – *MXA* (миксома устойчив протеин 1), а повишените нива на интерфероните водят до повишена експресия на гени като *CXCL10* (C-X-C мотив хемокин 10), *IFIH1* (интерферон-индуциращ хеликаза С протеин 1), *ISG15/UBE2L6* (убиквитин конюгиран ензим E2 L6), *IRF7* (интерферон регулаторен фактор 7), *IDO1* (индолеамин 2,3-диоксигеназа 1), *MXB* (миксома устойчив протеин 2) и *CHN1* (химерин 1) [9]. Повишена експресия при ДМ показват също така гени, свързани с функциите на Т клетките (*CTLA-4*, *IL2RB*, *TRAC*, *CD3D*), НК-клетките (*NKG7*), макрофагите (*CD68*) и дендритните клетки (*CD83*). Възходяща регулация при идиопатичните миопатии е отчетена и за гените *PLXND1* (плексин D1) и *Akt-3* (RAC-γ серин/треонин протеин киназа), отговорни за съдовото ремоделиране [9]. Проучване върху епигенетичните промени в *Homeobox* гените при ювенилен ДМ, кодиращи транскрипционни фактори, показва хипометилиране на *HOXC11*, *HOXD3* и *HOXD4*, както и на *WT1* (супресор 1 на тумор на Уилмс) [10]. В същото време при други два *Homeobox* гена (*EMX2* и *HOXB*), се наблюдава хиперметилиране на промоторните участъци. Промени от този тип водят до дисбаланс в генната експресия и се считат като възможна предпоставка за възникване на автоимунна болест. Въпреки че съществуват много неизвестни по отношение на епигенетичните фактори, тяхното изучаване има съществен принос за познанието на автоимунитета и в частност за СЛЕ и ДМ.

3. КАНДИДАТ-ГЕНИ ПРИ АВТОИМУННИТЕ БОЛЕСТИ – ОБЩИ (СПОДЕЛЕНИ) И СПЕЦИФИЧНИ ГЕНИ. ГЕНЕТИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ ПРИ СЛЕ и ДМ

Имуногенетиката взаимства прийоми едновременно от генетиката и имунологията, затова изборът на кандидат-гени се основава на изследване на локуси, кодиращи имунологични фактори с важно регулаторно значение, участващи в патогенезата на съответното заболяване, като най-често се използва подходът на асоциативните проучвания. С цел да се определят гените, които участват в развитието на автоимунната болеста и риска, свързан с тях, през последното десетилетие са проведени множество генетични проучвания. Установени са асоциации с повече от 200 генетични локуса. Поради сходството в механизмите на протичане на автоимунните заболявания, често едни и същи кандидат-гени биват изследвани при много от тях. Безспорно едни от традиционните кандидат-гени за автоимунни заболявания се намират в локуси на HLA. В своето проучване В. Rhodes и сътр. [11] представят обобщени данни от голямо асоциативно проучване за степента на участие на различни гени в етиопатогенезата на СЛЕ. Данните показват много силна връзка на СЛЕ с гени от главния комплекс на тъканната съвместимост - MHC $p < 1.7 \times 10^{-52}$. Въпреки по-високата честота, с която някои алели от HLA клас I се срещат сред пациентите със СЛЕ, статистически доказан рисков фактор за всички популации представляват HLA-DR2 (6p21.32DRB1*1501) и HLA-DR3 (6p21.32DRB1*0301) от HLA клас II. Е. Наумова и М. Иванова [12] потвърждават значението на алела DRB1*0301 и за българските пациенти със СЛЕ. Освен това те допълнително установяват асоциации с DRB1*0701, DQB1*02, 0303, 0604, както и протективна роля на алелите DRB1*11 и DRB1*1301 в нашата популация. Хаплотипни асоциации при СЛЕ са наблюдавани във връзка с общия европейски праисторически хаплотип АН 8.1, част от който е и HLA-DR3. Непосредствено до HLA-DR3 се намира HLA клас III локуса, в който е разположен *TNFA* гена заедно с гените *C4a*, *C4b* и *C2*, кодиращи съответно C2 и C4 молекулите от системата на комплемента. Дали тяхната връзка със СЛЕ се дължи на скаченост поради пространствената им близост, или всеки от тях има собствено функционално значение, предстои да бъде изяснявано [11]. Участието на генетични фактори от MHC в развитието на идиопатичните възпалителни миопатии се потвърждава от по-високата честота, с която HLA-B8 и DQA 0501 се срещат при пациенти от бялата раса с ювенилен ДМ, както и от по-честата асоциация на HLA-B14, HLA-DR3 и HLA-Cw7 с класическия ДМ [13]. Участието на системата на комплемента в патогенезата на автоимунните миопатии е причина да бъдат изследвани гените, кодиращи C2 и C4 молекулите.

По този начин се установява, че нулевите алели за *C4* (*C4A*Q0*) и генетичните дефекти в *C2* молекулата също имат отношение към развитието на СЛЕ и ДМ [13].

С развитието на познанията за сигналните биохимични пътища и разкриването на молекулите участващи в тях, се появяват и нови кандидат-гени. Полиморфизмите в гена на протеин-тирозиновата фосфатаза, нерцепторен тип 22 (*PTPN22*), показват силна степен на асоциация както със СЛЕ, така и с идиопатичните миопатии, а тези в гените *ITGAM*, *IRF5*, *BKL*, *STAT4* са свързани с висок риск за развитие на СЛЕ. Според В. Rhodes и сътр. [11] са необходими допълнителни проучвания, за да се определи степента на значимост на полиморфизми в гените *PDCD1*, *TYK2*, *CTLA4/ICOS*, *CRP*, *MBL2* при СЛЕ. При ДМ полиморфизми в гените *BLK*, *CCL21*, *STAT4*, *IL2RA*, *ORMDL3* показват силна степен на асоциация със заболяването [14].

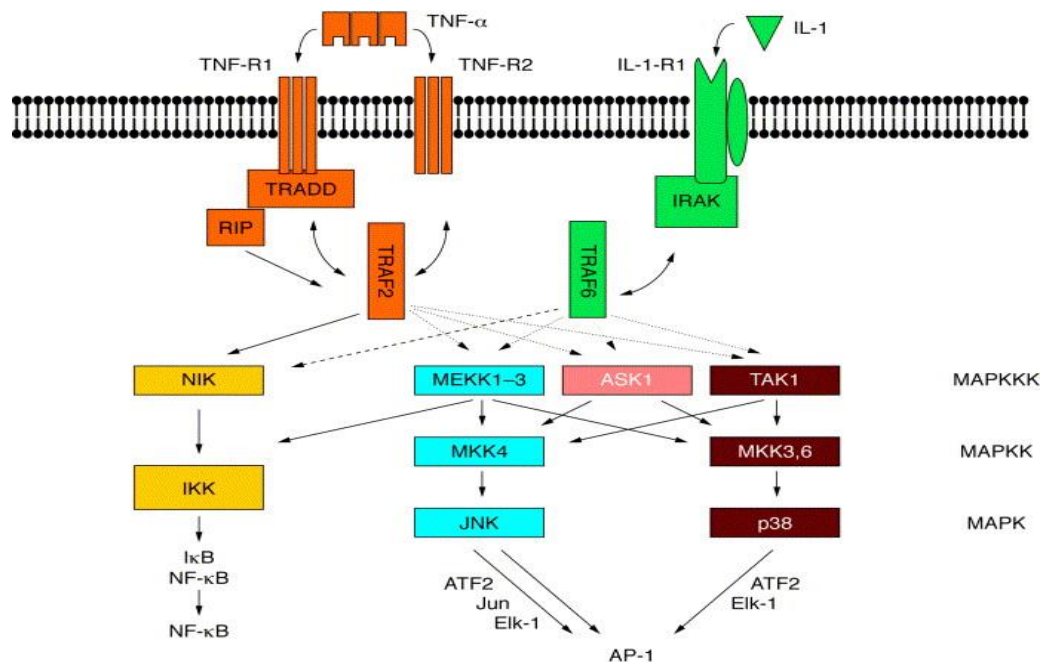
Опитите да бъдат систематизирани множеството проведени проучвания показват, че част от гените могат да доведат до възприемчивост към повече от една аутоимунна болест, поради което са наречени общи, споделени или припокриващи се от англ. „overlap”, а друга част са свързани с възникването на конкретно аутоимунно заболяване – специфични [15]. В този смисъл сравнителният анализ между различните аутоимунни заболявания би могъл в бъдеще да бъде от полза за създаването на диагностични профили на болестта, базирани на генетични маркери. В подкрепа на това са и установените асоциации между някои генетични полиморфизми и наличието на определени аутоантитела [16-17].

В последното десетилетие се оформи концепцията за количествения праг на сигнализация на имунните клетки, която помага да се разбере как множество генетични фактори, които поотделно имат малък ефект се комбинират, така че да доведат до аутоимунна активация. Различни категории гени, които са отговорни за различни функционални пътища, се оказват с потвърден риск за много от аутоимунните болести. Сред тях са: междуклетъчната сигнализация, водеща до активирането на Т и В клетки, сигналната трансдукция на цитокините и цитокиновите рецепторни пътища, благодарение на които се осъществява връзката между отговора към микроорганизми, вродения и адаптивния имунитет [18].

4. РОЛЯ НА ЦИТОКИНИТЕ И ПОЛИМОРФИЗМИ В ЦИТОКИНОВИТЕ ГЕНИ ЗА ВЪЗНИКВАНЕ НА АВТОИМУННИ БОЛЕСТИ

Цитокините са хуморални протеини или гликопротеини, които модулират активността на прицелните клетки, принадлежащи към имунната система. Те имат ключова роля за

осъществяването на вродения имунитет, но потенцират и различни ефекторни нива на адаптивния имунен отговор [19, 20], като така те осъществяват връзка между тези две звена на имунната система. Въпреки плейотропния спектър на действие на цитокините, дидактично се открояват вертикална и хоризонтална ос на тяхното влияние. Първата се осъществява чрез взаимодействието на цитокините със специфични цитокинови рецепторни лиганди, вследствие на което се инициира сигнална трансдукция. В резултат на последвалата каскадна активация настъпват процеси на митотично делене, диференциация или апоптоза [21]. Счита се, че липсата на баланс в осъществяването на тези „downstream” процеси е критичен за възникването на автоимунни и малигнени заболявания [22]. Хоризонталният модел на влияние се изразява в кръстосаното взаимодействие между различни цитокини т.нар. „cross talk”, който се проявява на различни нива. Като пример е посочено кръстосаното взаимодействие между TNF- α и IL-1 (фигура 1). На базата на кръстосаното взаимодействие се осъществяват положителните и отрицателните обратни връзки в цитокиновата мрежа, при което се постига имунологична хомеостаза. Счита се, че при автоимунните болести тя е нарушена, като в потвърждение на тази теза са установените отклонения в цитокиновите профили [23].



Фигура 1. Схема на кръстосано взаимодействие между цитокините TNF- α и IL-1, осъществяващо се на различни нива в сигналните пътища (по L. Wang и сътр. [24]).

В действителност и двете горепосочени оси се основават на предаването на екстрацелуларни сигнали към клетъчното ядро, при което в зависимост от външния стимул

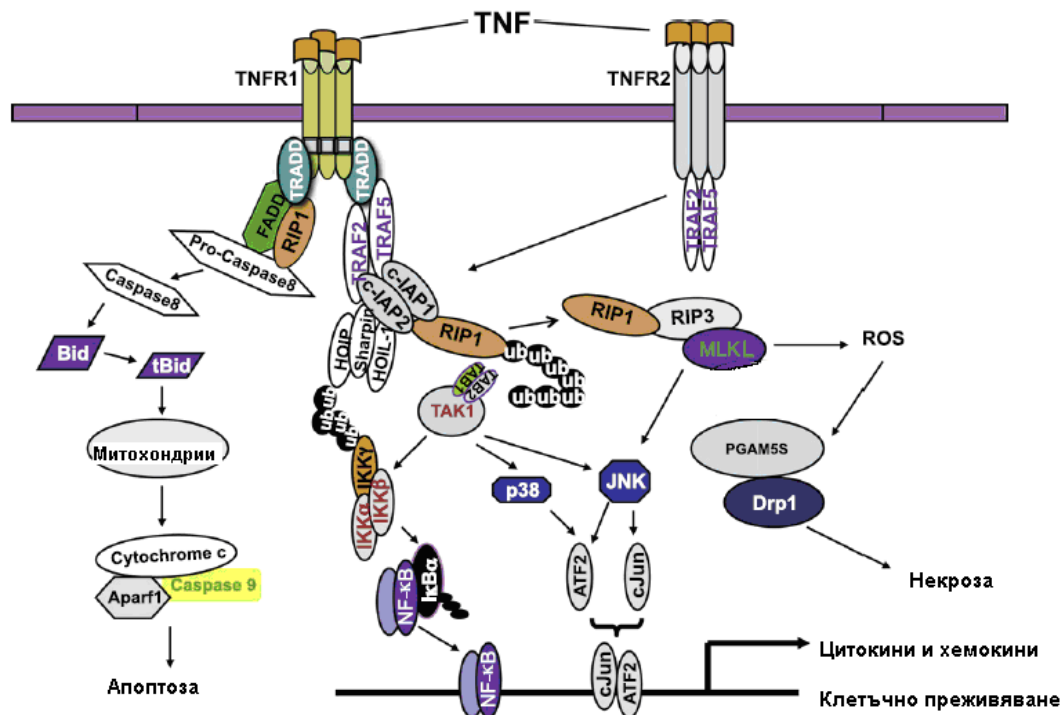
се включват различни транскрипционни фактори, стимулиращи промоторните участъци на целевите гени [24]. От една страна цитокините играят роля на екстрацелуларни сигнали на “входа” на клетката, а от друга те са продукт на генната експресия, способен да преобразува сигнала. Дисбалансът в цитокиновите нива при автоимунните болести предполага нарушения в сигналната трансдукция, а цитокиновите генни полиморфизми логично попадат във фокуса на множество асоциативни проучвания, целящи да установят подлежащите молекулни механизми при тези патологични състояния.

4.1. Тумор некротизиращ фактор алфа (TNF- α)

4.1.1. Биологични характеристики на TNF- α и механизъм на действие - модели на рецепторно взаимодействие

Тумор некротизиращият фактор алфа (TNF- α , кахексин или кахектин) принадлежи към групата на острофазовите белтъци. TNF- α е хомотримерен протеин, като всеки от мономерите има молекулна маса от 17kD. Открива се в две форми – трансмембранна и разтворима. Разтворимата фракция се получава при протеолитично разцепване на трансмембрания протеин от металопроотеиназа TNF- α конвертиращ ензим, наречен ADAM17. Полученият разтворим тримерен протеин има молекулна маса от 51 kDa и за разлика от сравнително стабилната трансмембранна молекула, той е склонен към дисоциация. TNF- α се произвежда от макрофаги и моноцити, стимулирани от липополизахариди (LPS) и други бактериални продукти, както и под действието на IL-1. Като медиатор на възпалението, той оказва паракринно действие върху редица клетки, играе роля на хемоатрактант за неутрофилите, води до експресия на адхезионни молекули, стимулира фагоцитозата, както и секрецията на простагладин E2 (PGE2) [25]. TNF- α притежава и редица имунорегулаторни свойства и участва в регулаторните механизми на вродения имунитет. Някои проучвания показват, че при стимулация с LPS повишаването на нивата му води до инхибиране на TLR-4, а при хронични възпалителни чревни заболявания повишената плазмена концентрация на TNF- α се свързва с повишена експресия на TLR-2 [26]. Отдавна известен факт е, че TNF- α потиска туморогенезата, както и вирусната репликация. С оглед настоящата работа е важно да се отбележи, че TNF- α може да доведе както до клетъчна смърт, така и до клетъчно преживяване [27]. Ключова особеност на този цитокин е способността му да предизвиква както апоптоза, така и некроза [28], тъй като дисбалансът в тези процеси според “danger” теорията стои в основата на подаването на „опасните” сигнали и възникването на автоимунитета.

Въпреки че механизмите, които определят посоката на каскадната трансдукция, не са напълно изяснени, със сигурност се знае, че роля за това играят рецепторите, с които TNF- α се свързва. Познати са два рецептора - TNF-R1 (CD120a; p55/60) и TNF-R2 (CD120b; p75/80). Първият е широко разпространен и се среща в повечето тъкани, докато TNF-R2 е представен основно в лимфоцитите и епителните клетки. Каскадните пътища за клетъчна активация и некроза са сходни за двата рецептора [28]. Благодарение на своята структура TNF-R1 може допълнително да осъществява процес на апоптоза [27, 28]. Моделите на клетъчна активация, некроза и апоптоза са представени на фигура 2.

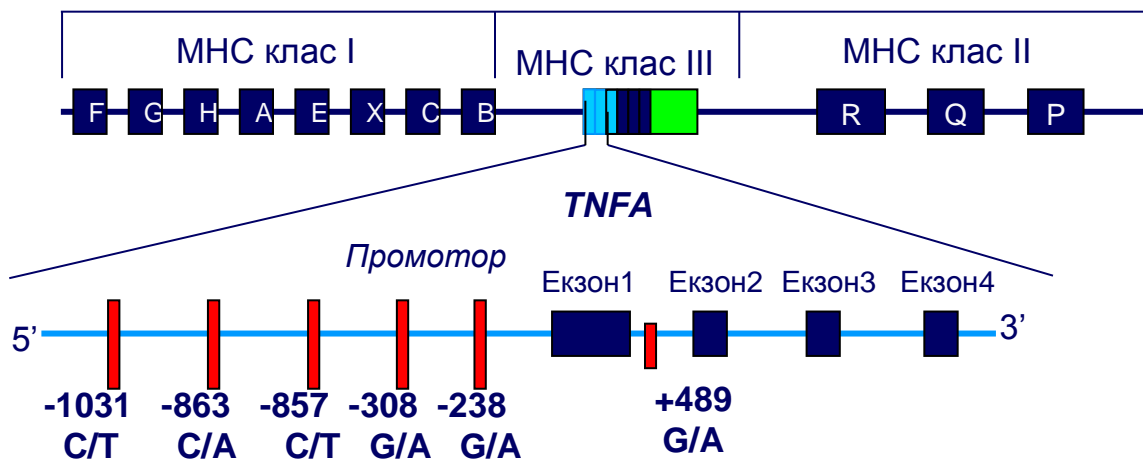


Фигура 2. Модели на рецепторно взаимодействие на TNF- α и функционално значение. (по W. M Chu и сътр. [28]) **А. Модел на клетъчна активация:** При свързването на TNF- α с TNFR1 и TNFR2 се образува TNF рецепторен сигнален комплекс (TNF-RSC). При процес на убиквитинизация (ub) се активира TAK1, която води до фосфорилиране на IKK β - основната киназа, водеща до деградация на I κ B α . При елиминирането на I κ B α NF- κ B свободно се придвижва към ядрото на клетката. TAK1 може алтернативно да активира JNK и p38, което води до димеризация на c-Jun и ATF2 **Б. Модел на некроза:** Несвързаният с убиквитин RIP1 формира RIP1-RIP3 некрозома, която фосфорилира протеин със смесен произход и киназоподобен домейн (MLKL). От една страна MLKL генерира активни кислородни радикали (ROS), а от друга той е ключовият медиатор за връзка с късата изоформа на член 5-ти от семейството на фосфоглицерат мутазата. Тя дефосфорилира динамин-свързания протеин 1 (Drp1), с което се активира процеса на некроза. **В. Модел на апоптоза:** При свързването на TNF- α с TNFR1, TRADD се свързва с Fas-свързан протеин “death” домейн (FADD) и RIP1, които взаимодействат с прокаспаза-8 и довеждат до нейното протеолитично разцепване. Каспаза 8 на свой ред води до активиране на про-апоптичния протеин tBid, който навлиза в митохондриите. Последва намаляване на мембрания потенциал на митохондриите, освобождаване на цитохром C, който заедно с апоптотичния протеазен активационен фактор 1 (Araf1) активира каспаза 3 и 7. В резултат на описаните каскадни пътища настъпва клетъчна апоптоза.

Придвижването на NF-κB към ядрото на клетката води до транскрипцията на повече от 200 NF-κB-зависими гени, включително на такива, отговорни за клетъчното оцеляване, за производството на провъзпалителни цитокини, хемокини, растежни фактори, както и на самия *TNFA* ген. Подобна стимулация на промоторните региони на целеви гени се наблюдава и в резултат на алтернативното активиране на JNK и p38 от TGF-β активирана киназа 1 (TAK1) [29]. Механизмът, по който протича процесът на некроза за двата рецептора, е еднакъв. Важно е да се отбележи, че TNFR2 сигнализацията се активира предимно от мембранносвързаната форма на TNF-α (mTNF-α), докато по-важната при автоимунитета TNFR1 сигнализация, осъществяваща процеса на апоптоза, може да бъде ефективно активирана и от разтворимата му фракция (sTNF-α) [28]. Следователно определянето на серумните нива на TNF-α представлява особен интерес при изследванията на автоимунитета.

4.1.2. Генетична организация на *TNFA* гена и генна експресия

Генът *TNFA*, е локализиран в силно полиморфния регион на HLA клас III, намиращ се върху хромозома бp21.3 [30]. Състои се от 3 kb и съдържа 4 екзона. Схематично е представен на фигура 3. До момента в промоторния регион, екзоните и 3'-непреведения район на *TNFA* гена са идентифицирани голям брой SNPs.



Фигура 3. Ген за *TNFA* (модифицирана по М. А. Stone и R. D. Inman [31])

При здрави доброволци M6zes и сътр. [32] потвърждават наличието на значителни индивидуални различия в нивата на TNF-α като предполагат, че тези разлики са генетично детерминирани от полиморфизми, свързани с различните нива на генна експресия. Данните от

независими изследователски екипи показват, че промоторните полиморфизми -1031T/C -863C/A (rs645836), -857C/T (rs1799724), -308G/A (rs1800629), -238G/A (rs361525) и полиморфизмът 489G/A вероятно притежават функционално значение, което се свързва с повишена или понижена генна експресия. Тъй като не липсват и проучвания за тяхната неутралност по отношение на генната експресия, мненията относно значението им не са категорични. Теоретичните основи за ролята им се основават на предположенията, че някои алелни варианти могат да бъдат свързани с по-висока скорост на транскрипция, поради повишената свързваща активност на специфичните транскрипционни фактори в областта на промоторните полиморфизми [33, 34]. Така например за *TNFA* -857T/C полиморфизма се доказва, че присъединяването на октамер свързващия транскрипционен фактор OCT1 (POU2F1) е алел-зависим процес [35]. Свързването се осъществява при наличие на *TNFA* -857T алела, но не и при *TNFA* -857C, което предопределя разлика в генната експресия. Повечето проучвания относно функционалното значение на *TNFA* -308G/A полиморфизма показват значителни транскрипционни различия, които потвърждават по-висока генна експресия, свързана с *TNFA* -308A алела (TNF2) [36-38]. Някои автори не намират подобна асоциация, поради което се оформят противоположни становища и това е една от причините да се води дискусия относно функционалната роля на този полиморфизъм [39, 40]. Skoog и сътр. [41] установяват с около 30% по-ниска транскрипционна активност за *TNFA* -863A алела при хепатопластни транскрипти *in vitro* и значително по-ниски серумни нива при индивидите, носители на този алел. Sharma и сътр. [42] също потвърждават тези данни. При изследването на подлежащите молекулярни механизми, отговорни за наблюдаваната алел-специфична регулация върху генната експресия, се установява, че при стимулацията с LPS, наличието на *TNFA* -863A алела води до увеличаване на свърхчувствителността на ДНАза I, като свързването на транскрипционния фактор NFκB се определя от алел-специфично ремоделиране на хроматиновата структура [43]. Не липсват обаче проучвания, които установяват по-високи серумни нива за -863AA генотипа [44]. Съществуват *in vitro* данни, които показват, че -238A алелът води до значително по-ниска промоторна активност в сравнение с транскрипти на дивия тип [45], но Cui и сътр. [46] не потвърждават тези резултати *in vivo*. Противоречиви са и данните относно влиянието и на *TNFA* -1031T/C полиморфизма върху серумните нива на TNF-α [47]. В едно проучване, обхващащо голяма кохорта неродствени индивиди, се установява, че -1031TT генотипът е свързан с по-високи нива на циркулиращ TNF-α [46]. В съответствие с тези резултати са данните на Sharma и сътр. [42], които откриват асоциация на -1031C алела с по-ниски нива на TNF-α. Полиморфизмът *TNFA* 489G/A е описан за пръв път

през 1996 г. от D'Alfonso и сътр. [48]. За разлика от останалите полиморфизми той се намира в интрон 1 на *TNFA* гена, но се счита, че има отношение към стартовата позиция при транскрипция [49].

4.1.3. Роля на *TNFA* хаплотипите

Поради локализацията на *TNFA* гена в HLA клас III локуса определянето на функционалното значение на хаплотипите първоначално се разглежда в контекста на разширените HLA хаплотипи. С нарастващия брой SNPs в *TNFA* гена, за които се установява влияние върху генната експресия, хаплотипните анализи се фокусират върху функционално важни *TNFA* хаплотипи [50].

Тъй като отделните полиморфизми допринасят в различна степен за нивата на TNF- α , генотипният анализ не може да избегне интерференцията от влиянието на отделните генотипи. Вариациите в серумните нива, свързани с определени SNPs, са причина да се търсят обяснения за посочените различия, както и по-информативни подходи за оценката на кумулативния ефект от цитокиновите полиморфизми върху концентрацията на TNF- α . Поради това се счита, че анализът на комбинацията от алели на полиморфни позиции, формиращи хаплотипи, може да бъде по-надежден подход за оценка на генната регулация *in vivo* [50]. Тяхната роля тепърва се проучва, като първоначалните данни за функционалното им значение са противоречиви. В едно от малкото проведени проучвания сред здрави индиви не се установява разлика между концентрацията на TNF- α между *TNFA* -857/-308/-238 > GCC/GCC и GGC/GGC генотипите. От друга страна, съществуват проучвания, които показват асоциация на определени хаплотипи с патологични състояния включително СЛЕ [51]. Описани са случаи, в които хаплотипите, а не отделните полиморфни варианти, показват прогностичен характер, като напоследък все повече се появяват примери за необходимостта от няколко хаплотипа (цис-действащи сайтове), за да се получи определен фенотип или да се повлияе синтеза на даден генен продукт [52].

4.1.4. Популационни проучвания върху *TNFA* полиморфизмите

Честотното разпределение на *TNFA* полиморфизмите е определяно при различни асоциативни и антропологични проучвания. При изследване на 22 SNPs в гена *TNFA* сред английската популация Simmonds и сътр. установяват, че само 8 от тях -238G/A, -308G/A, -857C/T, -863C/A, -1031T/C, 489G/A, 851A/G, 1304A/G се срещат с честота над 5%. Първото подобно проучване сред българската популация е проведено от П. Николова [53]. То обхваща 5 полиморфизма -1031T/C, -863C/A, -857C/T, -308G/A, 489G/A. Анализирани са 55 здрави

индивида. Използван е методът PCR-SSP, като е проведена валидация чрез PCR-SBT. Трябва да се отбележи, че честотата на единичните нуклеотидни полиморфизми в отделните популации е силно вариабилна. Така поради значителния брой и различната честота на полиморфизмите в *TNFA* гена, установена на популационно ниво, се счита, че те могат да бъдат използвани и като маркери на родословието [54]. Допуска се, че разнообразието в алелните честоти може да бъде следствие от позитивна селекция на определени полиморфизми на популационно ниво. В подкрепа на селективната теория са установените неравновесни връзки между различните полиморфизми и различията в хаплотипното разпределение между популациите. Резултатите от многобройни проучвания, проведени напоследък показват, че в рамките на една популация също нередко съществуват значителни различия. Така например честотата на *TNFA* -238GG генотипа в тайванската популация е в диапазон от 76% до 96%, а сред кавказката популация честотата на *TNFA* -238AA генотипа варира от 0% при испанци от Гранада до 6 % сред португалци. Не е изключено част от различията да се дължат и на различните методики за детекция на полиморфизмите.

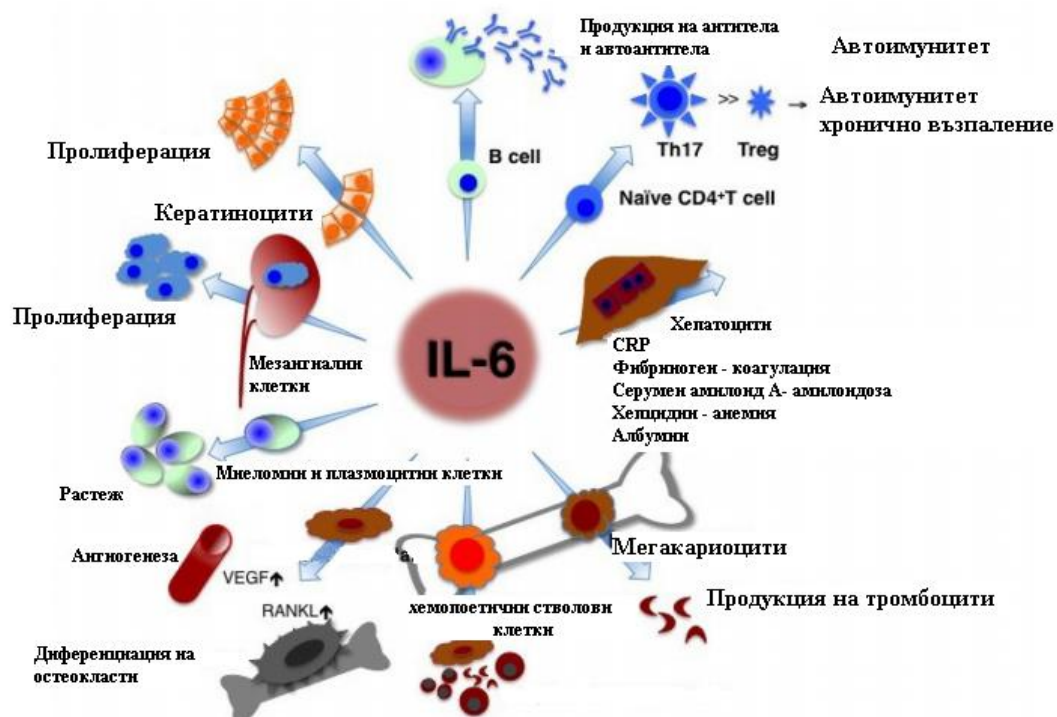
4.1.5. Проучвания върху серумните нива на TNF- α и полиморфизми в *TNFA* гена при автоимунни заболявания

Проучванията, целящи да определят ролята на TNF- α при патологични състояния на базата на изследване на плазмените му концентрации, показват разнопосочни резултати. Високи нива на TNF- α са описани при редица автоимунни заболявания като псориазис, пемфигус, болест на Бехчет, болест на Crohn, ревматоиден артрит, ювенилен ревматоиден артрит, анкилозиращ спондилоартит, системен лупус [55, 56]. Изследванията показват, че при плакнатия псориазис съществува обратна връзка, т.к. ефективната терапия води до понижаване на серумните концентрации [57]. Неслучайно много от автоимунните заболявания са показани за лечение с TNF- α блокери, въпреки че не във всички случаи то е ефективно. Наличието на респондери и нон-респондери също поставя въпроса за вероятни индивидуални генетични различия. Всички тези данни налагат по-детайлно проучване на механизмите на регулация на генната експресия. При много автоимунни заболявания се откриват асоциации с единични нуклеотидни полиморфизми в *TNFA* гена. Така например в своя мета-анализ Zhuang и сътр. [58] установяват връзка между -238G/A полиморфизма и псориазис. В някои популации се доказва асоциация на *TNFA* -308G/A полиморфизма с ревматоиден артрит [59], СЛЕ [60] и болест на Бехчет [61]. Дори данните от проведените мета-анализи не са категорични и показват наличието на значителни популационни различия.

4.2. Интерлевкин-6 (IL-6)

4.2.1. Биологични характеристики на интерлевкин-6 (IL-6) и механизъм на действие

IL-6 е цитокин с плейотропно действие, участващ в имунния отговор, хемопоезата, костния метаболизъм и възпалителните процеси. Притежава едновременно про- и антивъзпалителни свойства. Основните му функции са обобщени на фигура 4.



Фигура 4. Плейотропна роля на IL-6 - имунологични и неимунологични функции (по Т. Такаки и сътр. [62])

От една страна TNF- α и IL-1 водят до стимулиране на продукцията на IL-6, с който показват синергично действие в острофазовия отговор. От друга страна обаче, IL-6 осъществява и антивъзпалителен ефект чрез контрол върху продукцията на IL-1 α и TNFp55, които се явяват антагонисти на горепосочените цитокини. Първоначално имунологичната роля на IL-6 се свързва със стимулиране на В клетъчната диференциация, водеща до поява на антитяло-продуциращи плазматични клетки. По-късно се установяват и други имунологични функции, свързани с активацията и диференциацията на Т-клетките и макрофагите. Доказано е, че IL-6 стимулира диференциацията на Th17 посредством активиране на транскрипционните фактори Stat 3 и ROR γ t [63]. Счита се, че нарушената регулация на този процес и би могла да играе роля в развитието на аутоимунитета.

Интерес представляват и някои неимунологични функции на IL-6. Към тях спадат ролята му на миокин, отделящ се от мускулните клетки в отговор на мускулно съкращение,

способността му за активация на остеокластите, обясняваща терапевтичния ефект на инхибиторите на IL-6 при сенилната остеопороза, значението му на невропротектор, поради способността му да преминава кръвномозъчната бариера. В своето проучване Ruef и сътр. [64] доказват, че IL-6 играе ролята на автокринен фактор за мезангиалноклетъчна пролиферация. Нарушенията в продукцията му се свързват с появата на мезангиопролиферативен гломерулонефрит [65], а приложението на рекомбинантен IL-6 при мишки води до ускорена изява на лупус-нефрит [66]. Резултатите от *in vitro* проучвания показват, че IL-6 води и до кератиноцитна пролиферация в клетъчни култури [67]. Това свойство предполага, че повишената продукция на IL-6 може да стимулира клетъчната пролиферация и левкоцитната инфилтрация в кожата и да доведе до появата на хиперкератотични плаки. Установена е повишена секреция на IL-6 *in vivo* сред пациенти с възпалителни автоимунни кожни заболявания като псориазис [67, 68] и лихен планус [69]. От друга страна проведените опити с интрадермално приложение на цитокина при мишки не водят до появата на кожни лезии [70]. Посочените данни показват, че неимунологичните ефекти на цитокините също могат да повлияят клиничните прояви на автоимунната болест и да променят нейния ход. Изясняването на молекулярните механизми, на които се подчинява секрецията на IL-6, биха могли да спомогнат за уточняването на част от съществуващите противоречия, както по отношение на имунологичните, така и на неимунологичните му свойства.

IL-6 осъществява своето действие посредством два типа рецептори - трансмембранен и растворим. Повърхностният цитокинов рецепторен комплекс се състои от IL-6R α (CD126) и gp 130 (CD130). Разпространението му обхваща множество тъкани, за разлика от CD126. В отговор на иницииран от IL-6 сигнал, gp 130 димеризира и активира Janus кинази (JAKs). Ангажират се хомоложните домейни на фосфатаза Src, съдържащи тирозин фосфатаза 2 (SHP-2), като по този начин се активира *ras/raf*-митоген протеин киназен път - MAPK. Чрез фосфорилиране на сигналните трансдюсери и активатори на транскрипцията (STATs) се задействат прицелните гени и се стимулира тяхната експресия [71]. Разтворимата форма на рецептора за IL-6 участва във феномен наречен транс-сигнално предаване. Той се състои във възможността комплексът, състоящ се от IL-6 и растворимия рецептор (sIL-6R), да се свързва с gp 130 в тъкани, където нормално липсва CD126, с което спектърът на действие на IL-6 значително се увеличава. Счита се, че възпалителните свойства на IL-6 се дължат предимно на транс-сигналното предаване, а антиинфламаторното действие се опосредства от класическата сигнална трансдукция [72]. Нови проучвания показват, че именно sIL-6R е медиатор на функциите на паратхормона върху хемопоезата и костния метаболизъм [73].

4.2.2. Серумни нива на IL-6, структурна организация на IL-6 гена и генна експресия. Проучвания върху полиморфизми в IL-6 гена при автоимунни болести.

Повишени нива на циркулиращ IL-6 се установяват както при физиологични условия, свързани с повишена физическа активност [74], така и при патологични състояния като инфекции, възпалителни процеси, автоимунни и малигнени заболявания. Съобщава се за наличие на високи плазмени нива на IL-6 при пациенти със системен ювенилен артрит, болест на Crohn [75], псориазис, ревматоиден артрит, системен лупус еритематозус. През 1998 г. Fishman и сътр. правят предположение, че продукцията на IL-6 е генетично предопределена и за пръв път описват функционалната роля на -174G/C полиморфизма за модулацията на генната експресия *in vitro* и *in vivo* [76]. Резултатите от тяхното проучване показват, че -174C алелът се свързва с по-ниски нива на експресия на IL-6, а G-алелът - съответно с по-високи. Нещо повече, те установяват, че алелът -174G е рисков фактор за развитието на ювенилен ревматоиден артрит. Така те поставят въпроса за ролята на този полиморфизъм като предразполагащ фактор за развитието на автоимунен процес. Пет години по-късно Sawczenko и сътр. потвърждават значението на -174GG генотипа за някои от клиничните прояви на болестта на Crohn и връзката му с наличието на по-високи нива на CRP [75]. До момента проучванията, касаещи ролята на полиморфизмите в IL-6 гена за развитието и клиничната картина на автоимунните болести са малко на брой, а необходимостта от тяхното провеждане все повече нараства, тъй като те биха могли да спомогнат за изясняването на механизмите на действие и отговора на лечение с рецепторния антагонист на IL-6 – tocilizumab. Установено е, че когато нивата на sIL-6R силно превалят над IL-6, те могат да блокират класическата сигнална трансдукция, тъй като IL-6 се свързва изцяло в комплекс с рецептора и бива неутрализиран от разтворимия gp130Fc [72].

Генът, който кодира IL-6, е локализиран върху хромозома 7p15.3, с дължина около 5 kb, и се състои от 5 екзона. Най-често изследваните единични нуклеотидни полиморфизми в промоторния участък, за които има данни, че повлияват генната експресия са -597G/A, -572G/C и -174G/C. Научният интерес към последния е особено голям поради отчетливия ефект на -174G алела, свързан с повишената синтеза на IL-6. Проучванията показват, че -174G/C полиморфизмът е силно полиморфен сред кавказката популация и почти мономорфен сред азиатци, африканци и латино-американци [77]. Данните за честотното разпределение сред българската популация показват сходство с кавказката популация и дават основание за провеждане на асоциативни проучвания [78].

4.3. Интерлевкин-10 (IL-10)

4.3.1. Биологични характеристики на IL-10 и механизъм на действие

Първоначално IL-10 е наречен инхибитор на цитокиновата синтеза (CSIF), поради способността му да инхибира Th1 цитокиновата продукция. Секретира се от множество клетъчни типове: макрофаги, дендритни клетки, В клетки, Th1, Th2, Th17, регулаторните Т (Tregs) и NK клетките [79]. Една от основните му функции е да антагонизира действието на IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α и особено на IL-12 [80, 81]. Биологичните ефекти на IL-10 са насочени към антиген-представящите клетки (APC). Той инхибира активацията и узряването на макрофагите и дендритните клетки, като по този начин индиректно влияе върху Т-клетъчната диференциация [82]. IL-10 потиска както експресията на МНС клас II, така и костимулиращия сигнал от B7.1/B7.2 (CD80/CD86). Напоследък се доказва, че имунологичните му функции са свързани и с диференциацията и узряването на В клетките, гранулоцитите, мастоцитите, кератиноцитите, както и активацията на NK-клетките и CD8+ [79, 81, 83-85]. IL-10 способства за преживяването и на автореактивните В-клетки [79, 86]. Обект на проучване са IL-10 продуциращите регулаторни В клетки, наречени B10, за които се счита, че също играят важна роля за развитието на автоимунните болести [87]. При диференциацията си те продуцират антитела, които значително обогатяват разнообразието на серумните IgM и IgG. Поради ниския им афинитет се приема, че те допринасят за потискане на автоимунитета *in vivo* [88]. Съществуват данни, че C1q и MBL стимулират сигналите, свързани с потискане на предизвикания от LPS възпалителен отговор на IL-1 α и IL-1 β чрез повишаване на секрецията на IL-10, IL-1 рецепторния антагонист и IL-6 [89]. Въпреки явната връзка между IL-10 и предразположението към някои автоимунни болести, познанията за клетъчните субтипове, отговарящи за конкретните клинични прояви са ограничени. Една от причините за това е, че регулацията на IL-10 се осъществява чрез разнообразни сигнални системи.

Доказано е, че при макрофагите транскрипционните фактори Sp1 и Sp3 играят основна роля в контрола на транскрипцията на *IL-10* гена [90]. В проксималния край на промотора на *IL-10* гена се намират няколко последователности богати на GC, към които транскрипционните фактори от семейството на Sp проявяват афинитет. В съответствие с тези данни са проучванията, които доказват, че индуцираните от LPS Sp1 и Sp3 се свързват с последователности в проксималната част на промотора на *IL-10* [91-93]. По-късно се установява, че свързването на Sp факторите има и регулаторна роля по отношение на промоторната активност на *IL-10* гена при LPS стимулирани клетъчни линии. За Sp1 фактора се знае, че може

да доведе до активиране както на p38, така и на ERK MAPK сигналните пътища [92, 94, 95]. По рецепторен път се достига да особено важна молекула в IL-10 трансдукцията - Stat3, която осъществява своята регулаторна функция през няколко различни сигнални пътища - IFN- α [96], LPS [97] и този на глюкокортикостероидите [98]. Стимулацията на секреция на IL-10 от NK-клетки чрез IL-2 [99] и IL-12 пък се дължи на IL-12 зависимата STAT 4 сигнална трансдукция [100]. Не по-малко важни са и факторите от семейството на NF- κ B - p50 [101] и p65/ RelA [102], които са свързани със стимулираната от LPS IL-10 експресия в APCs. По този начин се създават условия за интерференция с други цитокинови пътища и с тези на комплемента. Продукцията на IL-10 се регулира както на транскрипционно, така и на посттранскрипционно ниво [103, 104], но закономерностите, на които се подчинява предаването на сигнала, остават ненапълно изяснени.

4.3.2. Структурна организация на *IL-10* гена и генна експресия.

Една от насоките, в които се работи в последното десетилетие, е изясняването на молекулярните основи на генната експресия. Съществуват данни, че наличието на SNPs в промоторния участък може да повлияе афинитета на свързване на транскрипционните фактори, с последващо включване на алтернативни сигнални пътища и промяна в експресията. Участието на генетични фактори в продукцията на IL-10 се подкрепя и от установената конкордантност при монозиготни близнаци по отношение на нивата на IL-10. Счита се че, 70% от продукцията на IL-10 е генетично предопределена [105], а междуиндивидуалните различия в нивата на IL-10 се отдават на определени SNPs в промоторния участък на гена *IL-10* [106, 107].

IL-10 се кодира от *IL-10* гена, който е локализиран върху дългото рамо на хромозома 1 (1q31-32). Състои се от 5 екзона. Неговият промотор е силно полиморфен, като за част от промоторните полиморфизми е установено, че имат отношение към генната експресия и съответно към серумната концентрация на IL-10. Условно те се разделят на полиморфизми в проксималния и дисталния промоторен участък. Тяхната честота и значение в различните популации варира значително.

4.3.2.1. Проксимални промоторни полиморфизми в *IL-10* гена

Повечето от асоциативните проучвания са насочени към изучаването на проксималните промоторни полиморфизми, като три от тях -1082G/A (rs1800896), -819C/T (rs1800871) и -592C/A (rs1800871) представляват особен интерес [108].

Най-често изследваният полиморфизъм е -1082G/A. Функционалният анализ показва, че в -1082 региона се намира свързващо място за транскрипционните фактори от семейството на ETS(E26), които имат влияние върху процеси като клетъчна диференциация, клетъчна

пролиферация, контрол на клетъчния цикъл и апоптоза. Индивиди, хомозиготни по G алела, имат по-високи нива на циркулиращ IL-10, по-висока експресия на IL-10 mRNA и повишена продукция на IL-10 след *in vitro* стимулация. Практически за -1082GG генотипа е характерен подобър отговор към лечение с глюкокортикоиди и особено с prednisone [109]. Поради изброените особености полиморфизмът -1082G/A е обект на няколко големи проучвания в българската популация.

Полиморфизмът -592C/A е разположен в участък с негативно регулаторно влияние [110]. В него се локализират места за свързване с няколко транскрипционни фактора. Два независими екипа [111, 112] доказват, че *IL-10* -592A алелът предопределя по-нисък IL-10 секреторен капацитет. В зависимост от алелното състояние на -592C/A полиморфизма с него се свързва ядрен транскрипционен фактор – поли–аденозин дифосфат–рибоза полимераза 1 (PARP-1) [113]. Той играе ролята на репресор и предопределя различия в нивата на IL-10 транскрипцията. Полиморфизмът -592C/A се среща с най-висока честота сред азиатската популация, като честотата на A-алела достига до 67.2% при японци и около 21% сред европейци [112]. За българската популация се доказва пълната скаченост на полиморфизмите -592C/A и -819 C/T [114], но неговата роля като фактор на възприемчивост за СЛЕ и ДМ остава недоизяснена.

4.3.2.2. Дистални промоторни полиморфизми в *IL-10* гена

Gibson и сътр. [105] откриват 7 нови SNPs в дисталната част на промоторния участък на гена за IL-10 между - 3.1 и - 4 kb. Три от тях (-3575T/A, -2849G/A и -2763C/A) се срещат с по-висока честота и могат да повлияят върху секрецията на IL-10 подобно на някои от проксималните промоторни полиморфизми.

Установено е, че -3575T/A полиморфизмът съдържа регион за транскрипционен фактор - Pit-1. Алелните различия определят свързването на различните изоформи на Pit-1, което води до разлики в експресията на *IL-10* [105]. Тя е значително по-висока за -3575T алела. Трябва да се отбележи, че частична регулация върху изоформите оказват и естрогените, което се доказва при полиморфонуклеари от периферна кръв на пациенти със СЛЕ [115].

При изучаването на полиморфизмите и връзката им с продукцията на IL-10, Gibson и сътр. [105] установяват, че G и A алелите на позиция -2849 са равномерно разпределени сред индивиди с високи и ниски нива на интерлевкина, докато A алелът на позиция -3575 и -2763 преобладава при индивидите с ниски нива на IL-10. При хаплотипния анализ, се установява, че AAA комбинацията се асоциира с ниска продукция на IL-10, а TGC хаплотипът - с висока. Gibson и сътр. [105] считат, че тези полиморфизми могат да обяснят голяма част от разликите в

плазмените нива, които не могат да бъдат свързани с проксималните полиморфизми и наличието на микросателитите, като препоръчват при изследване на *IL-10* полиморфизмите да се прави хаплотипно разпределение от проксимално-дистален тип, за което данните до момента са малко.

4.3.3. Проучвания върху полиморфизми в *IL-10* гена при автоимунни болести.

Все още не е напълно изяснено клиничното значение на *IL-10* и ролята му в патогенезата на автоимунитета [116]. *IL-10* е цитокин, който при автоимунитета е проучван заради способността му да потиска Th1 хелперния тип отговор и секрецията на IFN- γ . По-съществена роля за автоимунните процеси, обаче, имат неговите имуностимулиращи свойства върху В клетките и активираните CD8+ Т клетки. Съществуващите данни за повишена цитокинова секреция при автоимунните заболявания като СЛЕ [117], болест на Съогрен [118], системна склероза [119] са причина за повишен интерес към изследване на връзката между различни автоимунни заболявания и генетичните полиморфизми. Проведените през последната година няколко мета-анализи за ролята на *IL-10* полиморфизмите при различни автоимунни заболявания обобщават голяма част от проведените изследвания върху проксималните промоторни полиморфизми [120-122]. Данните от тях показват, че предразположението към развитие на улцерозен колит е асоциирано с полиморфизмите *IL-10* -819C/T и -592C/A, но не и с -1082G/A. *IL-10* -1082G алелът играе ролята на фактор на възприемчивост за развитие на синдром на Съогрен, докато генотипът "АТА/АТА" има протективен ефект. Въпреки установената асоциация на полиморфизмите *IL-10* -1082G/A и -592C/A със СЛЕ, авторите посочват необходимостта от провеждане на допълнителни проучвания за потвърждаването на получените резултати поради установени популационни различия. В българската популация *IL-10* -1082G/A полиморфизмът не показва асоциация със СЛЕ [123] и с множествена склероза [114], но честотата на генотипите -819CC и -592CC е значително по-висока сред пациенти с МС. Ролята на -592C/A при български пациенти със СЛЕ не е проучвана. В стремежа да се изясни участието на проксималните полиморфизми се пропуска фактът, че дисталните промоторни полиморфизми също могат да влияят върху автоимунния процес.

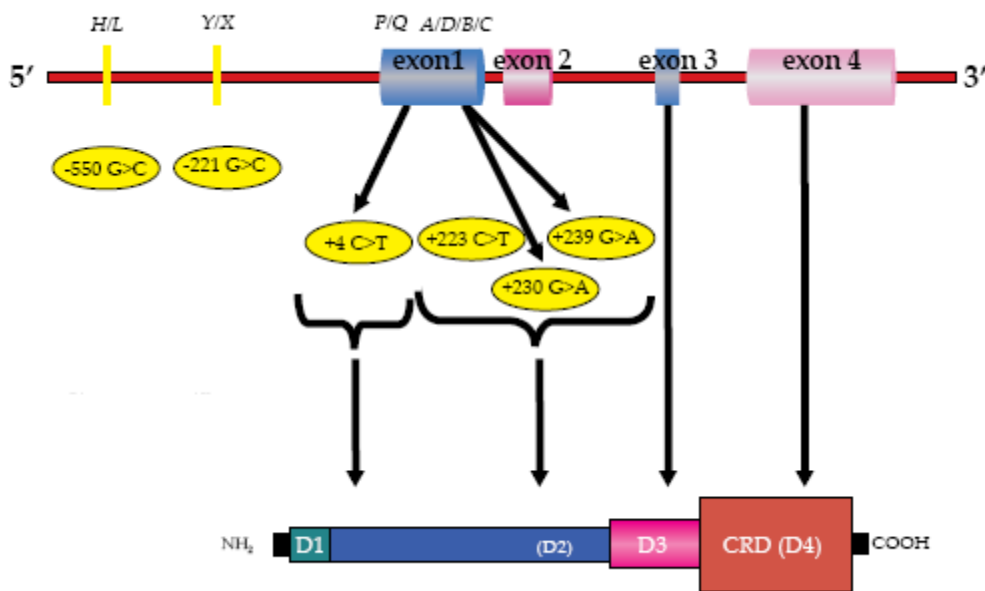
5. МАНОЗО-СВЪРЗВАЩ ЛЕКТИН

5.1. Биологични характеристики на MBL и механизъм на действие.

Манозо-свързващият лектин (MBL) е острофазов плазмен протеин, представител на фамилията на колектините, чиято функция е свързана с вродената имунна защита и активирането на третия път на системата на комплемента. В еволюционно отношение лектиниовият път е възникнал след алтернативния и преди класическия. Осъществява Ca^{2+} -зависимо разпознаване на манозни и N-ацетил глюкозамин остатъци, произвеждани от голям брой микроорганизми, както и остатъци от собствен отпадъчен материал под формата на манан-асоциирани молекулни последователности (MAMPs). При свързването си с тях MBL активира лектиновия път на системата на комплемента, в резултат на което се стига до протеолитично разцепване на C4 молекулата. Този процес много наподобява на активирането на системата на комплемента по класическия път. Ролята на C1s и C1r се изпълнява от манозо-свързани серин-протеази (MASPs), с които MBL формира комплекси. Досега са идентифицирани четири MASPs – MASP1, MASP2, MASP3, MASP19. В резултат на включилата се каскада се стига до комплемент-медирана смърт и/или фагоцитоза. Известно е, че поради ролята си на опсонин, MBL участва в клиърънса на апоптотични клетки. Предполага се, че именно тази негова функция има значение за възникването на автоимунен процес в случаите на дефицит на MBL, при които се наблюдава дефект в ефективното „очистване“ с последващо антигеннообразуване [124]. Установено е, че MBL циркулира в плазмата като смес от различни по големина олигомери - обикновено от тримери до хексамери. Физиологичните нива на MBL могат да варират в широки граници от 100 до 1000 $\mu\text{g/L}$, а според някои автори и до 5000 $\mu\text{g/L}$ [125, 126, 127, 128, 129]. Неговото количество зависи от общото състояние на организма [130], възрастта [129], пола [129], наличието или отсъствието на инфекции. MBL има способността да се свързва директно към незрелите моноцит-произлизащи дендритни клетки (MDCs), като по този начин отслабва предизвиканата от LPS активация на NF κ B в тези клетки [131]. Във високи концентрации MBL потиска производството на провъзпалителни цитокини като TNF- α и IL-12 и инхибира способността на MDCs да активират алогенни Т-лимфоцити. Тези данни заедно с наскоро установената роля на MBL като ко-рецептор за TLR [132] предполагат и други възможни механизми, чрез които MBL би могъл да повлиява развитието на автоимунните болести.

5.2. Генетична организация на *MBL2* гена. Структурни и промоторни полиморфизми.

След като се установяват три случая на деца с нарушена фагоцитоза, за които се открива, че причината е наличието на дефицит на MBL, проучванията се насочват към изясняването на молекулните механизми за възникването му. Структурната организация на *MBL2* гена е обект на изследване още от 1989г. Открити са два гена *MBL1* и *MBL2*, които са разположени на близко разстояние върху хромозома 10 (10q11.2-q21). Манозо-свързващият лектин се кодира от *MBL2* гена, а *MBL1* е псевдоген. Характерно за *MBL2* е, че той е силно полиморфен, а популационните вариации са големи. Състои се от четири екзона, които кодират различни части на манозо-свързващия лектин, подробно разгледани на фигура 6.



Фигура 5. Генетична структура на *MBL2* гена и роля на екзони в кодиране на частите на протеина (по V. Pradhan и сътр. [133]) Екзон 1 и 2 са отговорни за кодирането на тройната колагенова спирала, наречена още хеликс. При по-детайлен анализ се вижда, че екзон 1 кодира сигналния пептид - регион богат на цистеин и 7 глицин-Хаа-Уаа повтора [134]. Отделени от тях чрез глицин-глутаминов дуплекс следват още 12 глицин-Хаа-Уаа повтора, които се кодират от екзон 2. Екзон 3 е отговорен за формирането на шийната област на белтъка, а екзон 4 кодира домейна, в който се свързват въглехидратите [134]. Един интересен факт, който често се пропуска във връзка със структурната организация на *MBL2* гена, е наличието и на алтернативен екзон – екзон 0, намиращ се на разстояние около 1kb в посока upstream от екзон 1. Неговата функция не е известна, но засега се свързва с алтернативна транскрипция вместо екзон 1, без това да води до структурни промени в протеина [135, 136].

5.2.1. Структурни полиморфизми в *MBL2* гена, генна експресия и влияние върху серумната концентрация. Популационни различия.

В екзон 1 са познати три структурни полиморфизма, 223 C/T, 230G/A и 239 G/A, чиито полиморфни алели се означават още като D, B и C. Първоначално те се определят като

синонимни (missense) замени в полипептидната верига съответно на позиция 52 замяна на Arg от Cys (D), на 54 Gly от Asp (B) и на 57 Gly от Glu (C). Впоследствие се оказва, че те могат да доведат до промените в първичната аминокиселинна последователност с нарушена тримеризация на полипептида [137]. Такива мутантни тримери са по-нестабилни и показват по-ниска степен на полимеризация. Те подлежат на ензимно разграждане и обуславят дефицит на MBL [137], който може да бъде абсолютен или функционален. Изброените три полиморфизма често се означават с общ символ "O" – нулеви алели [135]. С буквата "A" се означава дивият тип, който се свързва с обичайни нива на MBL. Установено е, че унаследаването на B, C и D алелите става по автозомно-доминантен път.

Знае се, че B алелът се среща сравнително често сред европейската раса, докато в източноафриканската популация е с много ниска честота. Първоначално се е считало, че този алел води до ниски серумни концентрации поради неправилно съчетаване на тройната спираловидна структура в молекулата на MBL. По-късно обаче присъствието му се установява и при здрави индивиди от европейската раса с изненадващо висока честота (0.13). Тези противоречиви данни водят до серия от нови проучвания. Lee и сътр. [129] сочат B алела като основен фактор за понижаване на серумните концентрации на MBL сред корейци. C-алелът е представен главно сред индивиди от Западна Африка. Той показва много ниска честота сред индивиди от бялата раса и напълно липсва в азиатската популация [135]. D-алелът се среща с еднаква честота (около 0.05-0.08) както в европейската, така и в източноафриканската популация [138]. Неговата честота намалява в Западна Африка и липсва напълно в азиатската раса [139, 140].

5.2.2. Организация на промоторния участък на *MBL2* гена - регулаторни SNPs, генна експресия и влияние върху серумната концентрация. Популационни различия.

Характерно за промоторния регион на *MBL2* гена е, че в него се съдържат елементи типични за гените, кодиращи острофазови белтъци. В неговата проксимална част се намират два полиморфизма -550 G/C (rs11003125) и -221 G /C (rs7096206) познати още като H/L и Y/X, а в 5' непреведения регион на промотора се открива и трети SNP обозначен като P/Q. Въпреки че промоторните SNPs не водят до структурни промени, те имат регулаторна функция по отношение на генната експресия. От всички промоторни полиморфизми полиморфизмът *MBL2* -221G/C (Y/X) има най-силно изразен низходящ регулаторен ефект, а X-алелът предполага ниски серумни нива на MBL, подобни на тези при структурните варианти на B, C и D [141, 142].

MBL -221G/C (Y/X) полиморфизмът се открива с най-висока честота сред индивиди с европейски и южноазиатски произход - около 24% [143, 144]. При източно-азиатци и американци честотата му е по-ниска [143]. Полиморфизмът *MBL* -550G/C (H/L) е най-чест сред американци и европейци, а най-рядък сред африканци. При почти всички етнически групи с изключение на африканците честотата на *MBL* -550G/C (H/L) полиморфизма преобладава в сравнение с тази на *MBL* -221G/C (Y/X) [143], макар функционално му значение да не е така изразено.

По-голям интерес при изучаването на промоторните полиморфизми представляват хаплотипните им комбинации. Установено е, че хаплотипите HY, LY, LX добре корелират съответно с високи, умерени и ниски серумни нива на MBL [144]. При тях също се наблюдават значителни междуетнически вариации. Хаплотипът HY се среща с висока честота сред ескимоси - 0.83, с умерена честота сред кавказките народи - 0.33, а най-рядко сред африканци - 0.08. Обратно, LY хаплотипът е най-чест сред африканци - 0.23 и най-рядък сред ескимоси - 0.04 [144]. Според Madsen и сътр. [144] ефектът от промоторните варианти може да обясни голяма част от различията в плазмените нива на MBL, които не могат да бъдат обяснени с наличието на структурните полиморфизми.

5.3. Определяне на „секреторни хаплотипи” – генетично детерминиране на серумните нива на MBL.

Описаните 3 промоторни полиморфизма H/L, Y/X и P/Q, заедно с посочените структурни полиморфизми A, B, C и D формират разширени хаплотипи. Поради това, че тези SNPs са разположени в регион на силна неравновесна връзка, въпреки че теорично съществуват по-голям брой комбинации, на практика най-често се срещат седем от тях - HYPA, HYPD, LXPA, LYPA, LYPB, LYQA и LYQC. По този начин се формират т.н. „секреторни хаплотипи”, за които се счита че в голяма степен определят серумната концентрация на MBL. Разграничават се хаплотипи свързани с висока секреция - HYPA и LYQA, с умерена секреция - LYPA, с ниска – LXPA и такива с дефект в секрецията – LYPB, LYQC, HYPD [135, 144]. Въпреки това при индивиди с еднакъв генотип биха могли да се открият разлики в нивата на MBL до 10 пъти [145, 146].

Честотата на гореспоменатите седем хаплотипа в популациите отговаря на около 85% от изследваните индивиди, но в отделните популации тя е изключително вариабилна. Българският принос за изследваното на „секреторните хаплотипи” е на М. Ivanova и сътр. [147], които благодарение на разработения от тях метод, определят честотата на секреторните хаплотипи в

четири различни популации – японска, европейска, латиноамериканска и афроамериканска. Представените от тях данни потвърждават наличието на големи междурасови и междуетнически различия. Досега няма данни за честотата и значението на *MBL2* полиморфизмите в българската популация. Според Verdu и сътр. [143] честотата на ниско секретиралите хаплотипи в световен мащаб е около 13%. Високопродуциращите хаплотипи са около 49%, а тези с интермедиерна секреция - 15%. Хаплотипите, свързани с дефицит, се срещат с висока честота в различните географски региони, като общо те заемат до 22%.

Появата на „секреторни хаплотипи” е обект на дискусии и причина за създаването на две теории - селективна и неутрална. Някои автори считат, че нискосекретиралите полиморфизми, съответно ниските серумни нива на MBL, са предимство по отношение на вътреклетъчни инфекции като туберкулоза и лайшмания, което е причина за тяхната селекция. Също толкова вероятна е и хипотезата за появата на *MBL2* полиморфизмите в резултат на естествения еволюционен ход [143]. Проведените лонгитудинални проучвания не показват по-висока смъртност от инфекции при възрастни с дефицит на MBL [148, 149], но протективната роля на MBL във вродената защита и по-голямата предразположеност към инфекции в случаите на дефицит, насърчават провеждането на асоциативни проучвания, особено в областта на автоимунните болести.

5.4. Проучвания върху секреторните полиморфизми в *MBL2* гена при автоимунни болести.

Клиничното значение на *MBL2* полиморфизмите и ролята им в патогенезата на автоимунитета не е напълно изяснена [150]. От една страна е възможно *MBL2* полиморфизмите да са индиректно свързани с автоимунните болести поради това, че ниските серумни нива водят по-често до инфекции, които на свой ред са отключващи фактори на автоимунния процес. От друга страна ролята на MBL в ефективното „очистване” на апоптотични клетки и участието му в сигналната трансдукция предполагат директно влияние [151]. В подкрепа на тази хипотеза има няколко проучвания. Seelen и сътр. [124] доказват, че при пациенти с ниски плазмени нива на MBL, поради присъствието на алели В, С и D, се наблюдава по-голяма честота на антикардиолипинови и анти-С1q антитела. По нови данни свидетелстват за влияние на MBL върху продукцията на цитокини [146]. Опити с мишки доказват инхибиращия ефект, който MBL осъществява спрямо секрецията на TNF- α от макрофагите, което е резултат от TLR сигнал, водещ до активиране на активационен протеин 1 (AP-1) [132]. Участието му в регулацията на цитокиновата мрежа се потвърждава и от наскоро публикувани данни на Wang и

сътр. [131], които показват, че високите концентрации на MBL *in vitro* потискат производството на TNF- α и IL-12 в дентритни клетки [146]. Съществуват данни, че MBL и C1q стимулират сигналите, водещи до потискане на предизвикания от LPS проинфламаторен отговор на IL-1 α и IL-1 β и повишават секрецията на IL-10, IL-1 рецепторния антагонист и IL-6 в полиморфонуклеарните клетки. Тези данни предполагат възможност за модулиране на цитокиновия отговор и имунния процес от MBL. В литературата са описани асоциации между ниски серумни нива на MBL и автоимунни болести като СЛЕ и ревматоиден артрит [152], хронични възпалителни чревни заболявания [153], болест на Бехчет [154]. Има и други становища [155].

Данните относно генетичните полиморфизми и ролята им в автоимунитета показват, че нулевите алели „O” се свързват с повишен риск за развитие на СЛЕ [156] и автоимунен тиреоидит [157] сред бразилски пациенти, а Gergely и сътр. [158] намират асоциация между нискосекретиращите структурни полиморфизми 52 и 57 и ювенилния идиопатичен артрит сред унгарски пациенти. Sivaram и сътр. [153] установят, че *MBL2* 54В алелът играе ролята на фактор на възприемчивост за хронични възпалителни чревни заболявания сред индийци. Същият алел е асоцииран и с псориазис сред турски пациенти [159]. От друга страна влиянието на *MBL2* полиморфизмите при пациенти със СЛЕ и РА в японската популация не се потвърждава [160]. Hoffmann и сътр. [155] също не намират асоциация между *MBL2* полиморфизмите с хронични възпалителни чревни заболявания сред германци. Im и сътр. [161] съобщават за липсата на асоциация между структурните и промоторните полиморфизми в *MBL2* гена сред корейски пациенти с анкилозиращ спондилит. Три наскоро проведени метаанализа обобщават голяма част от данните относно значението на *MBL2* полиморфизмите като фактор за развитие на РА и СЛЕ. Xie и сътр. [162] не доказват значението на кодон 54 за развитието на артрит, а екипът на Lee и сътр. [163] потвърждават значението му само за някои етнически групи. За разлика от Lee и сътр., Xu и сътр. [164] не установяват връзка между структурните полиморфизми в *MBL2* гена и СЛЕ в европейската популация. Така до момента се потвърждава мнението, че са необходими допълнителни проучвания за изясняване на ролята им.

6. ЕСТРОГЕНИ И ПОЛИМОРФИЗМИ В ГЕНА ЗА ЕСТРОГЕНОВ РЕЦЕПТОР- α

6.1. Биологични характеристики на естрогените

През 1929 г. Adolf Butenandt и Edward Adelbert Doisy независимо един от друг изолират и определят структурата на множество полови хормони, включително и тази на естрогените. По-късно поради нарастващото значение на тази научна сфера те получават Нобелова награда за откритията си. Наред с другите си свойства, естрогените оказват влияние и върху имунната система като благоприятстват имунния отговор от CD4⁺Th2 тип [165]. Във физиологични дози естрогените стимулират CD4⁺CD25⁺Tregs, с което позволяват да се поддържа толеранса към собствени антигени [166]. Доказано е, че естрогените действат върху CD4⁺CD25⁻ Т клетките чрез естрогеновите рецептори ER(s) [166]. Сред свойствата на естрогените е способността им да регулират процесите на апоптоза [167], клетъчния растеж, диференциацията и пролиферацията на лимфоидни клетки, да модулират производството на цитокини и други фактори на имунната система. В ниски концентрации естрогените стимулират TNF- α , IFN- γ , IL-1 β и активността на НК-клетките [168]. По време на бременност естрогените потискат проинфламаторните пътища – и продукцията на TNF- α , IL-1 β , IL-6, като в същото време активират производството на IL-4, IL-10 и TGF- β [168].

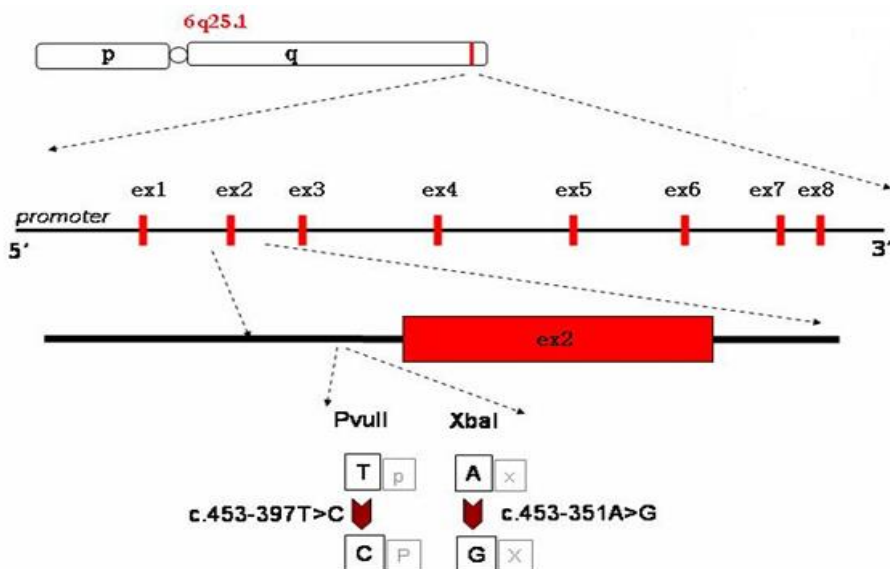
6.2. Естрогенови рецептори - роля в сигналната трансдукция

Осъществяването на функциите на естрогените се опосредства от естрогеновите рецептори (ER) - α и β , които принадлежат към суперсемейството на нуклеарните рецептори за стероидни и тиреоидни хормони. Лиганд-зависимата активация на естрогеновите рецептори включва транслокация в ядрото, където се осъществява директно свързване на хомодимера с естроген отговорните елементи (ERE) или свързване с други транскрипционни фактори като AP-1/c-Jun, c-Fos, ATF-2, Sp1 и Sp3, които водят до провеждане на независим от ERE сигнал [169]. В някои клетъчни субтипове е установено взаимно потискане между естрогеновия рецептор и NF κ B. Естрогеновите рецептори водят до намаляване на активността на NF- κ B при свързването му с ДНК и инхибират NF κ B-опосредстваната транскрипция от IL-6 промотора, като изместват определени корегулатори в него [170]. В други случаи те могат да действат и синергично с ядрения фактор. Опити в миши модели на лупус показват, че липсата на ген за ER α води до значително по-слаба изява на болестта и подобрява преживяемостта. От друга страна, в животински модели на артрит, ER α агонистите оказват благоприятен ефект, което според

Cunningham и сътр. [171] показва, че действието на ER α е подложено на регулация от външни фактори. Счита се, че някои често срещани полиморфизми в гена *ESR1* водят до промени в рецепторната експресия и функция, с което биха могли да се обяснят наблюдаваните различия в действието на ER α [172]. За ER β е установено, че няма отношение към аутоимунитета.

6.3. Структурна организация на гена за естрогенов рецептор – алфа. Полиморфизми PvuII и XbaI - роля при аутоимунните болести

ER са открити през 1958 година от Elwood V. Jensen. Двата рецептора ER α и ER β се кодират от различни гени, означавани съответно като *ESR1* и *ESR2*, разположени на различни хромозоми. *ESR1*, който представлява научен интерес от имунологична гледна точка, е локализиран върху шеста хромозома в областта 6q25.1 (фигура 7). Той се състои от 8 екзона (140kb). В интрон 1 на разстояние от 46bp се намират две познати рестрикционни места – 1.rs2234693 PvuII 397T>C (P/p) и 2.rs9340799 XbaI 351A>G (X/x).



Фигура 6. Генетична структура на *ESR1* гена и локализация на P/p и X/x полиморфизмите (адаптирана от S. Andonova и сътр.[173])

Съществуват данни, че доминантните варианти на PvuII P (C) и XbaI X (G) са свързани с повишена активност на ER α [174, 175]. Освен при изследванията върху рака на млечната жлеза [176], ендометриозата [177] и сенилната остеопороза [178], през последните години се проучва тяхното значение в патогенезата на аутоимунитета, особено при заболяванията, засягащи по-често женския пол. Резултатите от проведените проучвания са обобщени в таблица 1.

Таблица 1. Проучвания за ролята на PvuII P/p и XbaI X/x полиморфизмите при автоимунните болести.

Автор	Заболяване	Популация	PvuII полиморфизъм	XbaI полиморфизъм
Танев Д, 2011 [173]	Системен лупус	българска	-	-
Kisiel BM, 2011 [179]	Системен лупус	полска	+P-алел	+x-алел
Wang J, 2010 [175]	Системен лупус	американска	+PP генотип	+XX генотип
Hoshi M, 2008 [180]	Системна склероза	японска	-	+x алел
Masi L, 2007 [181]	Ревматоиден артрит	италианска	+Pr генотип	+Xx генотип
Savettieri G, 2002 [182]	Множествена склероза	италианска	-	-
Liu ZH, 2002 [183]	Лупус нефрит	китайска	+ PpXx генотип	
Niino M, 2000 [184]	Множествена склероза	японска	+P-алел	-

Забележка С „+” е означено наличието на връзка с изследваните полиморфизми, а с „-” съответно липсата на асоциация.

Модулиращият ефект, който ER α оказва върху Th1/Th2 имунния отговор и недоизяснената му роля по отношение на автоимунния процес, дават основания да бъдат проведени допълнителни изследвания. Практическият принос от тези изследвания е свързан с възможността за създаването на генетични маркери, спомагащи за избора на терапевтичен подход.

7. СИСТЕМЕН ЛУПУС ЕРИТЕМАТОЗУС

Системният лупус еритематозус (СЛЕ) е комплексно автоимунно заболяване с хронично-рецидивиращ ход на протичане и неизвестна етиология и затова е необходим мултидисциплинарен подход при неговото изучаване.

Заболеемостта от СЛЕ варира между 20 и 50 души на 100 000, като за България тя е средно около 38/100 000 [185]. Въпреки че СЛЕ се наблюдава във всички раси, трябва да се отбележи, че афроамериканците и латиноамериканците страдат по-често в сравнение с индивиди от бялата раса, а най-висока честота в света е регистрирана в Бразилия. Друга характерна особеност за СЛЕ е, че женският пол е значително по-засегнат, като съотношението мъже/жени достига до 1:9. Системният лупус може да се прояви във всяка възраст, но обикновено първата изява на болестта е в периода между 2^{-рата} и 4^{-тата} декада. Поради влошеното качество на живот и повишената смъртност на болните [186] СЛЕ представлява социално значим проблем.

7.1. Етиопатогенеза на СЛЕ

Системният лупус е мултифакторно заболяване, за развитието на което роля играят екзогенни и ендогенни фактори. Към първите спадат промени в околната среда, бактериални и вирусни инфекции, употребата на медикаменти. Ендогенните фактори включват променен имунен отговор с формирането на автоантитела, промяна в клетъчните популации, хормонални нарушения, променен цитокинов отговор, дефицит на компоненти от системата на комплемента, абстрактна сигнална трансдукция, генетична предразположеност.

7.2. Промени в хуморалния имунен отговор при СЛЕ

Имунологичните промени при СЛЕ са свързани с откриването на антитуклеарни антитела в серума на до 95% от болните. Антитела спрямо нативна ДНК са положителни в до 80% от случаите. С диагностична и прогностична важност са автоантителата към Sm-антигена, каквито се доказват в 30% от случаите и често са асоциирани с анти-RNP антитела. При част от пациентите са възможни фалшиво положителни неспецифични проби за сифилис, дължащи се на антикардиолипиновите или антифосфолипидни антитела. Левкопенията, гранулопенията и тромбоцитопенията се дължат на автоантитела от класовете IgG и IgM спрямо левкоцитите и тромбоцитите.

7.3. Промени в клетъчните популации при СЛЕ – роля на цитокините

Промените в основните клетъчни популации се свързват с нарушения в съотношението на различните субтипове клетки или с техни функционални промени. Относно Т лимфоцитите се наблюдава намален брой Т регулаторни клетки ($CD4^+FoxP3^+$) и увеличен брой на двойно негативните Т лимфоцити. Те водят до абнормно провеждане на сигнала от Т-клетъчния рецептор чрез далачната тирозин киназа (Syk), а не чрез конвенционалната ζ -свързаната протеинкиназа 70 (ZAP-70) [187], както и до променен профил на цитокиновата продукция от Т хелперната популация. Сред В клетъчната популация в периферната кръв се наблюдават значително по-малко наивни $CD19^+CD27^-$ клетки за сметка на повишения брой плазматични клетки $CD19^{dim}CD20^-CD27^{high}CD138^+$, които чрез производството на антитела лежат в основата на определени деструктивни процеси [188]. Отдавна е известна ролята на автореактивните В-клетъчни клонове в патогенезата на системния лупус [189], като контролът върху предаването на определени растежни сигнали е изключително важен фактор за развитие на болестния процес. Не случайно В-лимфоцитите се превръщат в мишена на терапия чрез инхибирането на В-клетъчния активационен фактор (В лимфоцитен стимулатор) BAFF/BlyS от моноклоналното тяло belimumab. Дисрегулацията на тирозин киназа Lyn в В-клетъчните сигнали също

подчертават значението на сигнала трансдукция при СЛЕ [190, 191], тъй като Lyp корелира с повишена продукция на IL-10, пролиферация на В клетките, повишена продукция на анти-ДНК антитела и органна деструкция [192]. Поради способността на НКТ-клетките и дендритните клетки да произвеждат различни цитокини и растежни фактори, те също се считат за потенциален регулатор на автоимунния процес при СЛЕ [193]. Следователно установените множество патологични отклонения на клетъчно ниво при системния лупус показват, че причините за развитието на автоимунния процес се крият в сложен комплекс от взаимодействия.

7.4. Цитокинов дисбаланс при СЛЕ

В последното десетилетие фокусът на проучванията е насочен към цитокините, тяхната експресия и участието им в сигналната трансдукция. Въпреки противоречивите данни по отношение на конкретната промяна в цитокиновия профил при системния лупус, със сигурност става ясно, че цитокиновият дисбаланс играе важна роля за възникването и развитието на болестта. Резултатите досега показват безспорната роля на IFN α като основен цитокин в патогенезата на СЛЕ [194]. Ролята на TNF α и механизмите му на действие при СЛЕ не са напълно изяснени. Повече от десетилетие продължават противоречията относно данните за серумните нива на TNF- α . Някои автори установяват значимо повишаване на концентрацията на цитокина при пациенти със СЛЕ [195], докато други не откриват подобна връзка [196, 197]. С развитието на научните изследвания и приложението на TNF- α инхибиторите, се появила редица съобщения за появата на лупус-подобен синдром във връзка с приложението на това лечение, наречен ATIL [198, 199]. В миши модели на лупус също се доказва, че развитието на болестта се наблюдава както при високи нива TNF- α , така и при ниски нива на цитокина [200]. Някои авторски екипи наблюдават значимо повишени нива на IFN, IL-6 и IL-10 при СЛЕ [117], а тези интерлевкини имат свойството да потискат секрецията на TNF- α . Известно е, че TNF- α блокадата първоначално оказва благоприятен ефект върху болестта, но впоследствие е възможно да доведе до влошаване на състоянието с появата на новообразувани антитела. Някои автори обясняват тези ефекти с инхибиране на провъзпалителните и имунорегулаторните свойства на протеина, като все повече автори се обединяват около идеята за двойствената роля на TNF- α в автоимунитета [201]. Способността на TNF- α да предизвиква некроза, наред с про- и антиапоптоичните му свойства като сигнална молекула, също биха могли да са причина за двойствения му характер, но засега няма много данни в тази насока, тъй като downstream ефектите на TNF- α са все още в процес на изучаване. В полза на това предположение са

установените при СЛЕ по-високи нива на левкоцитна апоптоза [202], значително по-високата експресия на TNF-RII [197], установеният аберантен сигнал в TNF- α /TNF-I рецепторния път при NZM2410 мишки с лупус [203].

До момента не съществува консенсус за това дали автоимунитетът е резултат предимно от локалното действие на цитокините или от техния системен ефект. Като медиатор на възпалението TNF- α води до органни увреди. Така например Takemura и сътр. [204] установяват отчетлива продукция на TNF- α от макрофаги, ендотелни и мезангиални клетки в гломерулите на всички изследвани от тях пациенти с лупусен нефрит клас III и IV и сред нито един от изследваните здрави индивиди. Синергичният ефект на TNF- α с IL-1, обаче, е системен и води до повишаване на секрецията на IL-6 [205], крайна B-клетъчна диференциация с появата на плазматични клетки и антитялообразуване. Някои автори считат, че този механизъм е пряко свързан с появата на антитела срещу двойноверижната ДНК и развитието на СЛЕ [206]. Като се имат предвид мезангиопролиферативните свойства на този цитокин, установяването на повишени нива на IL-6 в урината на пациенти с лупус-нефрит [207] също предполагат механизъм за локално действие на цитокина. В полза на системния ефект обаче са проучвания, които демонстрират сигнификантно повишение на нивата му, корелиращи с активността на заболяването [208]. Подобни данни се установяват и за IL-10 [63]. Те свидетелстват, че освен ролята на инхибитор на моноцитно/макрофагиалното активиране, IL-10 притежава и други имунорегулаторни свойства. Едно от убедителните предположения за механизма, по който този интерлевкин осъществява своя патологичен ефект върху автоимунния процес, е ролята му на ко-фактор в B-клетъчната пролиферация [63]. Неслучайно според някои автори TNF- α , IL-6 и IL-10 могат да служат като биомаркери за мониторинг на болестта [209]. От друга страна не липсват и съобщения, които оспорват тяхното значение и считат, че е възможно в някои случаи те да бъдат рефлекторно повишени в резултат на общото повишаване на острофазовите белтъци [210].

7.5. Полиморфизми в цитокиновите гени – роля при СЛЕ

Наличието на доказателства за генетична предразположеност към развитието на СЛЕ и влиянието на генетичните полиморфизми в цитокиновите гени върху нивата на генна експресия е причина напоследък да се провеждат множество асоциативни проучвания, имащи за цел да установят дали и доколко те играят роля в етиопатогенезата на системния лупус. Интересът към изучаването на цитокиновите полиморфизми при СЛЕ личи и от няколко наскоро проведени

проучвания в българската популация, разглеждащи *интерлевкин-12В* гена [211] и *IL-10* -1082G/A полиморфизма [123].

Първоначалните изследвания върху *TNFA* гена при СЛЕ обхващат отделни полиморфизми, сред които централно място заемат -308G/A и -238G/A. Асоциацията между СЛЕ и -308А алела и съответно -308АА генотипа е обект на най-голяма дискусия. Поради получените разнопосочни данни само в рамките на последните шест години са проведени два метаанализа, при които се отчита значимо по-висока честота на -308А алела при пациенти със СЛЕ само в европейската популация, но не и сред азиатци и афринканци [60, 212]. За тайванската популация се установява асоциация между СЛЕ и -863А алела, 489А алела и 489АА генотипа [213]. При мексикански пациенти със СЛЕ се наблюдава статистически значима по-висока честота на -238А алела, която не се доказва при пациенти от европейски произход [214]. Тези вариации са причина някои автори да считат хаплотипния анализ като по-информативен подход при оценката на цитокиновите полиморфизми, което налага едновременното изследване на повече полиморфизми [215, 216]. Hirankarn и сътр. [215] намират връзка между хаплотипа -863А/-308G/-238G и възприемчивостта към СЛЕ в тайванската популация, а Miceli-Richard и сътр. [216] установяват, че хаплотипният анализ по-добре корелира с отговора на лечение с адалимумаб в сравнение с отделните полиморфни маркери. Подобни данни дават основание да се проучи функционалното значение на *TNFA* хаплотипите за развитието на автоимунитета.

От всички полиморфизми в *IL-6* гена най-голямо значение се отдава на -174G/C полиморфизма, поради възможността му за модулация на генната експресия на *IL-6* *in vitro* и *in vivo*. Въпреки че в някои проучвания не се открива асоциация между този полиморфизъм и пациенти със СЛЕ [217], ролята на -174G алела се потвърждава в наскоро проведен мета-анализ [218]. Значението на -174G/C полиморфизма за възприемчивостта към СЛЕ би могла да спомогне за изясняването на част от противоречията по отношение на клиничните проучвания с моноклоналното анти тяло tocilizumab и неговия ефект.

Данните относно значението на полиморфизмите в *IL-10* гена за унаследяването на СЛЕ са спорни. Проксималните цитокинови полиморфизми в *IL-10* гена при пациенти със СЛЕ са добре проучени и много автори определят *IL-10* гена като locus на възприемчивост при СЛЕ [187]. В подкрепа на това становище е установената корелация между серумните нива на цитокина и активността на болестта и описаните асоциации между СЛЕ и високосекретиращите алели -592С, -1082G и -3575Т в някои етноси [121]. Резултатите от наскоро проведен метанализ също показват, че *IL10.G* микросателитите, полиморфизмите *IL-10* -1082G/A и -592С/A, както и хаплотипът *IL-10* -1082G/-819С/-592С са асоциирани със СЛЕ [121]. Сред българската

популация също се доказва повишена честота на -1082GG генотипа при пациенти със СЛЕ, макар че не се установява статистически значима асоциация [123]. При предходни изследвания се установява, че генотипната честота на -592C/A полиморфизма в българската популация е сравнима с тази на кавказката популация, но засега ролята му при български пациенти със СЛЕ не е проучвана. Gibson и сътр. доказват, че дисталните полиморфизми също могат да бъдат асоциирани с болестта [105]. Те установяват връзка между високопродуциращия -3575T алел и СЛЕ при афро-американци и по-ниска секреция на IL-10 за -2849A алела и -2849AA генотипа. Тези данни дават основание да се проучи ролята на дисталните полиморфизми и сред европейската популация.

При определяне на значението на единичните полиморфизми в цитокиновите гени се забелязва, че в много проучвания не се откриват асоциации със самото заболяване, а само с отделни негови клинични прояви. Такива асоциации са установени за *TNFA* -308A алела и присъствието на антитела (анти-Ro, анти-La, анти-Sm) [219, 220], наличието на кожни прояви, фоточувствителност, серозит [213]. За високопродуциращия *IL6* -174G алел се открива връзка с присъствието на антитела, като носителите му имат по-чести прояви на хематурия [217]. В едно единствено проучване се съобщава за склонност на носителите на *IL6* -174C варианта към развитие на лупус нефрит, което най-вероятно се дължи на маскиращия ефект на *IL6* -174C алела при хетерозиготи [221]. Има съобщения, че *IL-10* -1082G алелът се асоциира с дискоидни лезии [222], а *IL-10* -592C алелът - с лупус-нефрит [223]. При извършените хаплотипни анализи на проксималните полиморфизми се установява, че хаплотипът *IL-10* -1082G/-819C/-592C и *IL-10* -1082A/-819T/-592A се асоциира съответно с наличието на антитела и невропсихиатрична симптоматика. Подобни резултати са причина фокусът на част от проучванията да се измести към определяне на прогностичната роля на цитокиновия генен полиморфизъм за тежестта на протичане на СЛЕ и възможните органни увреждания.

7.6. Система на комплемента, MBL и MBL2 полиморфизми – роля при СЛЕ.

Съществуват категорични доказателства, че системата на комплемента и нейните фракции участват в патогенезата на СЛЕ. Отдавна известен факт е, че при пациенти с активна форма на заболяването се наблюдава промяна в серумните нива на C3 и C4 фракциите. При част от пациентите с това заболяване се установява генетично обусловен дефицит на C1q, C1r, C1s, C2 или C4 [224]. По литературни данни липсата на C1q фракцията е рядък, но много сигурен фактор за развитие на СЛЕ. Той и анти-C1q антителата имат съществено значение за развитието на лупусния нефрит [225, 226]. Разработките по отношение на системата на комплемента

показат, че манозосвързващият лектин много наподобява структурата на C1q [227] и затова се счита, че неговият дефицит би могъл да се изяви със сходна клинична симптоматика. Участието на MBL в патогенезата на СЛЕ е спорно, т.к. механизмите за това не са уточнени. Проучванията върху серумните нива на MBL при СЛЕ показват, че те варират значително при отделните индивиди, както и в хода на болестта [228]. Доказателство за участието на MBL в патогенезата на СЛЕ са установените отлагания на MBL в гломерулите на пациенти с лупус нефрит. Съществуват данни, че при активност на заболяването могат да се наблюдават, както високи така и ниски нива на MBL. Предполага се, че ниските нива на MBL водят до нарушен клиърънс на апоптотичен материал и поява на циркулиращи имунни комплекси, които впоследствие се отлагат в тъканите, докато високите нива на MBL чрез активиране на комплемента са причина за директна органна деструкция [133]. Установено е, че плазмените нива на MBL корелират с индекса SLEDAI, анти-ДНК антителата и степента на протеинурия. Високи нива на MBL са описани в асоциация с лупус нефрит, както и с други системни прояви на болестта като кардит и плеврит. По литературни данни ниските нива на MBL по-често се свързват с кожно-мускулно засягане.

През 1995 г. Davies и сътр. за първи път откриват по-висока алелна честота на 54В сред европейски пациенти със СЛЕ [230]. Три години по-късно екипът разширява проучванията сред южноафрикански пациенти със СЛЕ, при които се оказва, че освен 54В алелът 57С алелът също би могъл да бъде асоцииран с болестта. Подобни резултати получават Sullivan и сътр. [231] при изследване на афроамерикански пациенти със СЛЕ. В своите проучвания Villarreal и сътр. [232] потвърждават наблюденията на Davies и сътр., но само по отношение на 54В алела, докато резултатите, получени от Garred и сътр. [233] и Garcia Laoren и сътр. [234], отхвърлят значението му. В своя мета-анализ Lee и сътр. доказват ролята на *MBL2* 54В полиморфизма като фактор на възприемчивостта при СЛЕ, който е зависим от етническата принадлежност [235]. Въз основа на своя мета-анализ Garred и сътр. [233] заключават, че носителството на алели В, С или D увеличава риска за развитие на SLE с около 1.6 пъти. Според Tsutsumi и сътр., [150] обаче, дефицитът на MBL сам по себе си не е достатъчно условие за развитието на аутоимунно заболяване. Техният екип счита, че при индивиди с генотип MBL 00 са необходими и други фактори, за да се развие СЛЕ, които засега остават неизвестни.

От промоторните полиморфизми интерес представлява асоциацията на хаплотипа LX със СЛЕ, която се установява главно при пациенти от азиатски произход. Тази хаплотипна комбинация [144], както и X алелът самостоятелно, се асоциират от една страна с ниски серумни нива на MBL при пациенти със СЛЕ, а от друга с определени клинични

характеристики на заболяването - ранно начало, кожна симптоматика, серозит [236], антифосфолипидни антитела [156]. Някои автори не откриват асоциации между промоторните полиморфизми и клиничните изяви на болестта [228]. Част от причините за получените разнопосочни резултати се крият в полиморфната природа на *MBL2* гена и значителните популационни различия.

7.7. Естрогени и полиморфизми в гена за естрогенов рецептор- α – роля при СЛЕ.

Счита се, че един от най-значимите рискови фактори за развитие на СЛЕ е женският пол [237]. Предполага се, че този полов диморфизъм се дължи на хормонални фактори. Поради тази причина естрогените се превръщат в обект на интензивно изследване. Въпреки че първоначално не се открива сигнификантна разлика в нивата на естрадиола между здрави жени и такива със СЛЕ, впоследствие се установява, че при болни има значително повишени нива на естрогенови метаболити. Така при бременност, когато се увеличават 16-хидрокси метаболитите, се наблюдава обостряне на заболяването, а при синдрома на Клайнфелтер (XXY), при който е налице абнормно съотношение между естрогени/ андрогени, честотата на СЛЕ е по-висока.

Още през 1986 г. веднага след откриването на естрогеновите рецептори в тимоцити и моноцити от периферната кръв на пациенти със СЛЕ, Weusten и сътр. [238] предполагат участието им в патогенезата на заболяването. По същото време Kelly и Vertosick [239] изказват хипотезата, че естрогеновият рецептор може да играе ролята на автоантиген при СЛЕ. Според тях поради структурни промени в рецептора естрогеновият метаболизъм се нарушава с последващо повишаване на лигандното свързване. Поради тази причина множество проучвания целят да установят наличието или отсъствието на количествени и качествени промени в естрогеновите рецептори при СЛЕ. В мононуклеарни периферни кръвни клетки на болни с лупус се установява повишена експресия на матрична РНК за ER α и понижена - за ER β в сравнение със здрави хора [240]. Сред азиатските популации се разкрива асоциация на PvuII и XbaI полиморфизмите в интрон I със СЛЕ [241], докато сред кавказката популация тяхната роля не се доказва категорично [242]. Данните от изследването на китайски пациенти със СЛЕ показват връзка между генотипа PpXx и по-високата честота на кожни прояви и артрит [183]. Проведените от същия екип проучвания показват, че генотипът PpXx се асоциира с бъбречни промени - лупусен нефрит с увреждания на интерстициума. Проучване сред полски пациенти със СЛЕ доказва, че P-алелът може да бъде и самостоятелен рисков фактор за нефрологично засягане [179]. Значението на естрогеновите полиморфизми за развитието на СЛЕ в българската популация е изследвано сред пациентки със СЛЕ, при което се наблюдава асоциация между

PPXX генотипа и фоточувствителността [243]. Интересен факт е, че полиморфизмите в *ESR1* проявяват полов диморфизъм. Установено е, че генотипът PpXx играе роля в унаследяването на СЛЕ само при мъже [183], докато при жени са установени асоциации на заболяването с P-алела и генотипите Pp и ppXx.

Много оригинална е идеята на Lu и сътр. [244], които доказват, че влиянието на полиморфизмите в *ESR1* при лупусно болни пациенти може да бъде резултат от модулация в цитокиновата секреция на IL-10, IL-4, IL-2 и IFN- γ . По този начин те обясняват връзката между генотипите PpXx и PpXx и доминиращия Th2 отговор, който спомага за развитието на болестта. Описаните клинични асоциации доказват връзки между фундаментални структурни звена като имунната и ендокринната система, поради което в последните години се засилва интересът към изучаване на съответните механизми, по които се осъществява този “cross talk”.

8. ДЕРМАТОМИОЗИТ

Дерматомиозитът е рядка болест, засягаща и двата пола, като жените страдат около три пъти по-често отколкото мъжете. Характеризира се с типични клинични белези, от които водещи са прогресиращата мускулна слабост и кожните прояви. Дерматологичната симптоматика може да предхожда мускулните поражения или да бъде единствена проява на болестта. Нерядко дерматомиозитът е проява на overlap синдром, който съчетава симптоми и имунологични характеристики и на други болести на съединителната тъкан като прогресивна склеродермия, ревматоиден артрит, системен лупус еритематозус или синдром на Sjogren. Възможна е проявата на полимиозит/дерматомиозит като паранеопластичен процес.

Диагностичните критерии при дерматомиозит продължават да се основават на работата на Bohan (1972) и Peter (1975), но натрупаните данни през последните години хвърлят нова светлина върху имунологичните механизми и молекулярните пътища, водещи до развитието на болестта.

8.1. Етиопатогенеза

Етиологията на болестта не е напълно изяснена. Факторите, които могат да отключат болестния процес, са подобни на описаните при СЛЕ. Въпреки че няма единно становище за отключващите механизми, които предизвикват болестта, схващанията за развитието на автоимунна миопатия се свързват с наличието на автоантитела, насочени към различни мускулни компоненти и съдовите им структури. В присъствието на антителата се активира

класическият път на системата на комплемента. Доказателство за включилата се каскада са грануларните депозити от C3b и C5b-9 мембрано-атакуващи комплекси в кожните лезии, които се откриват при класическия и амиопатичния ДМ [245]. Наред с компонентите на системата на комплемента се откриват отложени IgG и IgM. Впоследствие в деструктивния процес се включват и различни клетъчни линии. Установено е участието на активирани цитотоксични CD3⁺CD8⁺ лимфоцити и макрофаги, както и на миелоидни дендритни клетки (mDCs; BDCA1⁺) при полимиозит. При дерматомиозита в мускулите преобладават смесени инфилтрати от различни Т-клетъчни линии, предимно CD3⁺CD4⁺, както и В-лимфоцити, които са разположени в перимизиума и перифасциално. И при ПМ и при ДМ броят на регулаторните Т-клетки в лезиите е увеличен и корелира директно със степента на мускулна увреда.

8.2. Роля на цитокините и цитокиновите генни полиморфизми при ДМ.

Напоследък се счита, че ключово значение за възникването на повечето автоимунни болести оказват промените, свързани с аберантна сигнална трансдукция. Основна роля в патогенезата на ДМ/ПМ играят интерферони тип I (IFN I), които водят до активиране на STAT3 или до алтернативна активация на NF-κB [246]. При това може да се осъществи интерфериране с действието на някои цитокини. Ролята на цитокините в патогенезата на ДМ се потвърждава от проучвания, които доказват патологични отклонения в тъканните и серумните им концентрации. De Bleecker и сътр. [247] доказват, че при пациенти с ДМ нивата на TNF-α в мускулни биопсии са значително повишени. In vitro изследвания показват, че UV B лъчите потенцират освобождаването на TNF-α от човешки кератиноцити и фибробласти, като по този начин се предизвиква тяхната апоптоза [248]. Не е изключено увеличената апоптоза на кератиноцити в кожните лезии при ДМ да е следствие от подобни механизми. Повишените нива на TNF-α са директно токсични и за миофибрилите като в същото време потискат мускулната регенерация.

Според някои автори освен локалните промени, роля за възникването на ДМ оказват системните прояви на цитокинов дисбаланс. Hassan и сътр. [16] установят, че при пациенти с ДМ са налице повишени серумни нива на TNF-α и на IL-10. От една страна те разглеждат наблюдаваните промени като следствие от цитокиновия генен полиморфизъм, а от друга се изследва генетичната предразположеност за развитието на определен серологичен антителен фенотип. Така се установява генетично детерминиран дисбаланс при жени, който се изразява в повишено съотношение на TNF-α/IL-10 във връзка с *TNFA* -308A алела (p=0.021) и хаплотип MICA5.1/TNF2/TNFA2/DRB1*03. Авторите допълнително демонстрират връзката между TNF-α/IL-10 съотношението и наличието на анти-Ro52 (p=0.010) и анти-Jo1 (p=0.041) антитела.

За разлика от тези резултати повечето изследователски екипи не откриват статистически значими разлики в разпределението на генотипните и алелните честоти в *TNFA* гена между пациенти с ПМ/ДМ и здрави лица [249]. Аналогично на проучванията при СЛЕ, при ДМ често се установяват асоциации само с определени клинични признаци на болестта. Алелът *TNFA* -308A се свързва с определени клинични форми на ДМ [16, 250-252], както и с някои усложнения като калциноза и улцерации [249]. Chinoу и сътр. [252] си поставят за цел да изготвят хаплотипен анализ на базата на четири SNPs в *TNFA* гена при пациенти от бялата раса с автоимунни миопатии. То обхваща 109 пациента с ДМ, 121 пациента с ПМ и 73 със смесена съединително-тъканна болест. От получените резултати се установява, че рисков фактори за развитието на миопатия в английската популация са носителството на *TNFA* -1031T алела и на *TNFA* -308A алела - като независим фактор и като част от хаплотипите *TNFA* -1031T/-863C/-308A/+489G и HLA-B*08/*TNFA*-308A/DRB1*03/DQA1*05/DQB1*02. В горепосочения общ европейски хаплотип алелите *TNFA* -1031T и *TNFA* -308A се срещат с по-голяма честота сред пациентите с антисинтетазни и анти-PM-Scl антитела и се характеризират с повишен риск от развитие на интерстициална белодробна болест. Обратно, данните относно хаплотип *TNFA* -1031C/-863C/-308G/489G показват, че той по-скоро играе протективна роля по отношение на болестта. IL-6 също би могъл да има отношение към развитието на ДМ, тъй като възпрепятства миогенезата [253], но ролята на полиморфизмите в гена *IL-6* не е проучвана до момента. Проведено е едно единствено изследване, в което на базата на *IL-6* -174 G/C полиморфизма се оценява биологичния отговор към лечение с Rituximab [254]. В него се съобщава, че честотата на *IL-6* -174 CC генотипа е статистически значимо по-висока сред нон-респондрите (23.5% към 7.1%; $p=0.049$; (OR)=4.03, 95%CI 0.78-16.97). Поради антагонизиращия ефект на IL-10 спрямо TNF- α изследването на този цитокин също представлява интерес. Установените по-високи серумни нива на IL-10 при пациенти с ДМ, предполагат неговото участие в развитието на болестта. До момента, обаче, е проведено едно единствено генетично проучване върху *IL-10* -1087A/G полиморфизма, в което не се откриват значими разлики между пациенти и контроли [16]. В литературата няма други изследвания, които да изясняват ролята на *IL-10* полиморфизмите и значението на хаплотипите в патогенезата на ДМ. Ето защо цитокиновия генен полиморфизъм представлява актуална сфера за проучване, още повече, че резултатите биха могли да имат отношение към избора на лечение.

8.3. Система на комплемента, MBL и MBL2 полиморфизми при пациенти с ДМ.

Съществуват множество доказателства, които показват, че системата на комплемента участва в патогенезата на дерматомиозита. За това свидетелстват грануларните депозити от C3b и C5b-9 мембрано-атакуващи комплекси в кожните лезии, които се откриват при класическия и амиопатичния ДМ [245]. Точните механизми на това участие, обаче, остават не напълно изяснени. Възможно е те да са вторична проява, но част от направените проучвания предполагат, че функционалните различия, дължащи се на генетични промени, също могат да бъдат причина за възникването на болестта. Още през 1975 г. Leddy и сътр. публикуват клиничен случай на наследствен дефицит на C2, асоцииран с дерматомиозит [255]. По-късно през 1988 г. Robb и сътр. [256] правят пилотно генетично изследване на пациенти с ювенилен ДМ върху регионите на HLA системата I, II, III, при което се открива, че освен повишена честота на B8, DR3, съществува силна асоциация между заболяването и C4 нулевите алели. Въпреки че Moulds и сътр. [13] не намират асоциация с C4A*Q0 алела, те отчитат по-висок риск за развитие на ДМ при носителството му. Мястото на MBL в системата на комплемента предполага, че неговият дефицит по пътя на каскадата би могъл да доведе до понижаване на функционално активния C4. Според Werth и сътр. едно от най-важните следствия от тези взаимодействия е нарушеният клиърънс на апоптотични клетки, който е причина за появата на патологичен отговор с развитието на фоточувствителни автоимунни заболявания [293]. Според същите автори друга причина, която прави MBL особено интересен обект на изследване при ДМ е неговото участие в контрола на проинфламаторните цитокини и взаимодействията му с адхезионните молекули върху клетките, свързани с процесите на възпалението. При изследването на 4те полиморфизма - 54A/B, 57A/C, -221Y/X и -550H/L, тяхното пилотно проучване установява, че комбинациите от ниско-секретиращи варианти са значително по-застъпени сред пациентите с ДМ, а 57C алелът е асоцииран със заболяването. Едновременното изследване на полиморфизмите в *TNFA* гена им дава основание да прецизират значението на MBL дефицита като независим фактор за развитието на ДМ. Опитът от изследвания на *MBL2* полиморфизмите при други автоимунни заболявания показва, че получените резултати обикновено са популационно зависими. За да бъде изяснена ролята и участието на MBL и *MBL2* полиморфизмите в патогенезата на ДМ, са необходими допълнителни проучвания.

8.4. Естрогени и полиморфизми в гена *ESR1* при дерматомиозит

ДМ е заболяване, което се среща около три пъти по-често сред женския пол. Причините за това все още не са изяснени, но този факт поставя въпроса дали генетично детерминирани

промени в нивата на женските полови хормони и в частност на естрогените и неговите рецептори не оказват влияние върху развитието на болестта. В подкрепа на тази теза е проучването на Kovats и сътр. [257], което доказва, че синтезата на проинфламаторните цитокини и интерферони тип I (IFN I) в дендритните клетки, така важни при ДМ, зависи от TLR-ния сигнал, регулиран от ER- α . Освен фундаменталните проучвания в литературата се откриват и клинични съобщения, предполагащи наличието на подобни механизми. Sereda и сътр. [258] описват два случая на жени с паранеопластичен ДМ и рак на гърдата, при които лечението с docetaxel (селективен модулатор на естрогеновия рецептор) и anatsazole (ароматазен инхибитор) са довели до регресия на кожната симптоматика. Авторите допускат, че наблюдаваните от тях промени вероятно се дължат на инхибиране на TNF- α продукцията от антиестрогените. От друга страна Vassago и сътр. [259] не потвърждават опита на Sereda и сътр., тъй като в хода на лечението с антиестрогени, те не наблюдават промяна в дерматологичния статус на пациентка с ДМ. Авторите посочват необходимостта от допълнителни проучвания върху по-големи групи за изясняване на връзката между автоимунните заболявания и хормоналния статус, което безспорно би дало възможност за допълнително терапевтично повлияване. Въпреки множеството изследвания върху естрогеновия генен полиморфизъм при различни автоимунни заболявания, засега връзката с ДМ не е проучвана.

9. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализът на литературните данни показва, че в патогенезата на автоимунните болести и в частност на СЛЕ и ДМ дисбалансът в цитокиновата продукция, факторите от системата на комплемента и хормоналните нарушения играят ключова роля. Предвид генетичната predisпозиция към развитие на автоимунна болест се правят множество опити да бъдат идентифицирани подлежащите молекулярно-биологични механизми. Данните от последното десетилетие очертават възможната роля на единичните нуклеотидни полиморфизми като фактори на възприемчивостта към автоимунитета, тъй като се счита, че някои от тях са свързани със стимулиране или потискане на генната експресия. В подкрепа на тази хипотеза са резултатите от множество асоциативни проучвания, които установяват връзка между полиморфизми в гени с различно функционално значение при СЛЕ и ДМ. Някои алели се очертават като рискови фактори за възникване на тези заболявания, а за други се предполага, че играят протективна роля. Въпреки това получените данни не са напълно категорични и показват значителни популационни вариации. Дори наскоро проведените метаанализи посочват необходимостта от натрупването на по-голям брой научно базирани данни, за да се направи

извод за тяхното значение. Търсят се нови подходи за тяхната оценка, които включват анализ на хаплотипи, локуси на количествени белези, епистатични и хипостатични ефекти в генната експресия. Единствено едновременното и комплексно проучване на локусите на автоимунитет би дало отговор относно тяхната роля.

Изводите от тези проучвания са важни, тъй като освен за изясняване на патогенезата на автоимунните болести, те биха могли да доведат и до появата на нови диагностични и прогностични маркери по отношение на очакваната клинична изява и тежест на протичане на автоимунния процес.

ГЛАВА II. 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 (цитокини, 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 (*ESR1*) за възникването и развитието на двете заболявания.
6. Да се определи функционалното значение на хаплотипите и ролята им за развитието на СЛЕ и ДМ.

ГЛАВА III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. МАТЕРИАЛИ

1.1. ИЗСЛЕДВАНИ ЛИЦА

Проучването обхваща общо 157 индивида, разделени в три групи – контролна група от 79 здрави неродствени индивиди, 45 пациента със СЛЕ и 33 пациента с ДМ. Характеристиките на всяка група са посочени на таблица 2.

Таблица 2. Характеристика на изследваните групи :

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

I-ва група - здрави лица

Контролната група се състои от 79 здрави неродствени индивиди, не проявяващи клинични признаци на автоимунно заболяване, без анамнестични данни за фамилна обремененост, подбрани от биобанка към Молекулярен център по медицина, така че да съответстват по пол, възраст и етническа принадлежност на изследваните пациенти.

II-ра група - пациенти със СЛЕ

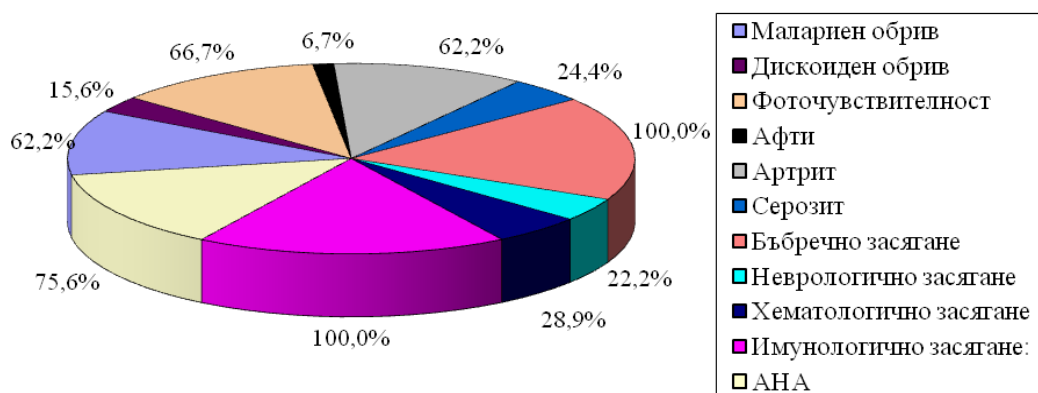
В периода от 2007-2013г. е извършен подбор на пациенти със системен лупус от Клиника по нефрология към УМБАЛ “Александровска” и Клиника по нефрология към Медицински институт на МВР.

Диагнозата системен лупус еритематозус беше поставена по модифицираните критерии на ACR от 1997г. [260]:

- пеперудообразен обрив
- дискоиден лупус
- фоточувствителност
- орална афтоза
- артрит/артралгии
- серозити - плеврит или перикардит
- бъбречно засягане - протеинурия над 0,5 г/л; биопсично доказан лупус нефрит
- неврологични промени (19 синдрома)

- хематологични нарушения - анемия, левкопения, лимфопения, тромбопения
- наличие на антинуклеарни антитела
- имунологични нарушения - антикардиолипинови антитела, антитела срещу ДНК, анти-Smith антитела

Диагнозата беше поставяна при наличие на поне 4 критерия. При всички пациенти бяха регистрирани - възрастта към момента на изследването, възрастта на поява на болестта, формите на болестта, проявени от началото на заболяването и видовете позитивирани автоантитела. Наличието на цереброваскулит беше обективизирано с инструментални методи (КТ, ЯМР, ЕЕГ). Разпределението на пациентите спрямо клиничните критерии е показана на фигура 7.



Фигура 7. Характеристика на клиничните прояви при пациенти със СЛЕ според критериите на ACR.

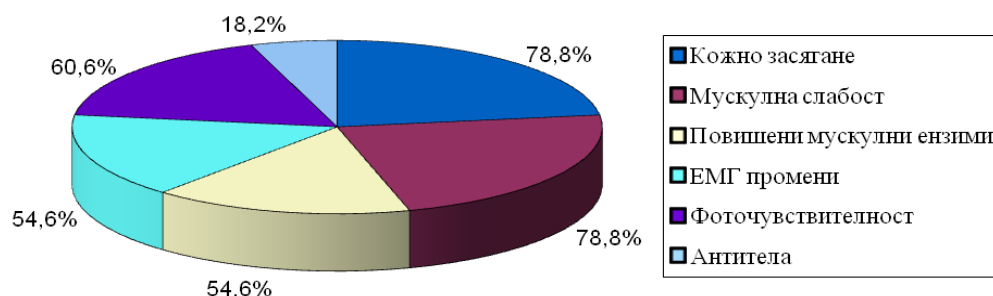
III-та група пациенти с ДМ

Пациентите с дерматомиозит са диагностицирани и проследявани в Кожна клиника към УМБАЛ „Александровска“ за периода 2007-2013г. Диагнозата дерматомиозит беше поставена по критериите на Bohan и Peter [261-262]

- типичен кожен обрив (папули и симптом на Gottron, хелиотропен еритем)
- проксимална мускулна слабост
- повишени мускулни ензими (СРК, ASAT, ALAT, LDH)
- миогенни промени в ЕМГ
- хистологични данни за миозит

Диагнозата беше поставяна при наличие на поне 4 критерия, отговарящи на условието за сигурен ДМ. Допълнително при пациентите беше определено наличието или присъствието на:

- фоточувствителност
- антисинтетазни и/или антимиозит-специфични антитела



Фигура 8. Характеристика на клиничните прояви при пациенти с ДМ.

Изключващи критерии – от всички групи бяха изключени пациенти с инфекциозни заболявания, други аутоимунни заболявания, кожен хроничен лупус еритематозус, склеродермия, ревматоиден артрит, смесена съединително тъканна болест.

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.

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 h, поради което пробите бяха съхранявани при +4°C.

1.2.2. Материал за генетично изследване - изолиране на ДНК

За извършване на генетичния анализ след подписване на информирано съгласие беше взимана венозната кръв в епруветка (с обем 10 ml), съдържаща K₃EDTA (етилен диамин тетраацетат) на BD. Кръвта се съхраняваше при +4°C в продължение на максимум 48 часа, след което се изолираше ДНК чрез машинна магнитна сепарация – Chemagen magnetic separation station. След оценка на концентрацията получената ДНК се разделяше в две криоепруветки, които се съхраняваха в ДНК банка към Молекулярния медицински център при – 20°C. Преди това бяха изготвяни работни проби, при които концентрацията на ДНК се довеждаше до 100ng/µl. Те се съхраняваха при +4°C до момента на изследването.

Изолиране на високомолекулна ДНК от кръв чрез робот CHEMAGEN® magnetic separation station с фабричен кит за изолиране chemagic DNA Blood10k Kit PerkinElmer®

Съдържание на реактивите:

- магнитни частици
- лизиращ буфер 1 (до 1/3 от разтвора)
- свързващ буфер 2 (представлява 60% от разтвора)
- промиващ буфер 3-6, съдържащи етанол
- елуиращ буфер съдържа 10 mM Трис–НСI рН=8.0.ТЕ буфер с рН 8.0. Може да се използва и Н₂О, но крайният добив е намален.

Позициониране на плаки и контейнери в модула на работа

Позиция 1: Поставка за контейнер с налични типове за еднократна употреба

Позиция 2: Панел с 50 ml епруветки съдържащи:

- 10ml кръв;
- 50µl протеиназа;
- 15 ml лизиращ буфер;
- 25 ml свързващ буфер;
- 1000µl магнитни частици.

Позиция 3: 50 ml епруветка с 15 ml миеш буфер 3

Позиция 4: 50 ml епруветка с 15 ml миеш буфер 4

Позиция 5: 50 ml епруветка с 15 ml миеш буфер 5

Позиция 6: 50 ml епруветка с 7.5 ml миеш буфер 6

Позиция 7: 50 ml епруветки с 15 ml миеш буфер 6

Позиция 8: 13 ml епруветки с 1 ml елуиращ буфер 7

Изпълнение на метода:

Етап 1. В епруветки от 50 ml, съдържащи 10ml кръв взета върху K₃EDTA (етилен диамин тетраацетат) се добавят 2x7.5ml лизиращ разтвор 1, необходим за разкъсване на клетъчните мембрани. Инкубира се за 5 минути, след което се добавя 50µl протеиназа K - за разграждане на клетъчните белтъци. Стартира се програмата 'blood 10k' за лизиране на клетките за 24 минути.

Етап 2. След като изтекат 24 минути към епруветките с кръв се добавя 25ml свързващ буфер 2 и 1000µl магнитни частици. Движещият модул се зарежда на позиции от 3-8, както е посочено по-горе. След изтичане на програмата изолираните ДНК проби (на позиция 8) се оставят за около 15 минути и ДНК се разпределя в 2 криоепруветки.

Очакваният добив от цяла кръв на здрави индивиди е 200-400µg ДНК.

Качествена и количествена оценка на изолираната ДНК

Качествената и количествена оценка на изолираната ДНК се определи спектрофотометрично (спектрофотометър BioPhotometer, Eppendorf и програма NANODROP). Методът се базира на специфичното поглъщане на светлина с дължина на вълната $\lambda=260$ nm от пуриновите и пиримидиновите бази на ДНК. Отношението на абсорбциите, измерени съответно при λ 260 nm и λ 280 nm, определя чистотата на ДНК. За граници приемахме стойности между 1.7 и 2.0, тъй като такива под 1.6 се свързват с наличието на примеси от белтъци, а над 2.0 – с примеси от РНК.

2. МЕТОДИ

2.1. СЕРОЛОГИЧНИ МЕТОДИ

За осъществяването на серологичните методи бяха използвани ELISA strip reader DAS (Digital and analog systems) srl модел B1 M07 и флуоресцентен микроскоп Jenamed 2.

2.1.1. Определяне на серумна концентрация на TNF- α

За определянето на серумните нива на TNF- α бе използван ELISA кит на фирмата Diaclone Gen-Probe за in vitro диагностика в Европейския съюз и научни изследвания с каталожен номер 950.090.192, Besançon Cedex, France. Тестът е изпълнен съгласно указанията на производителя. Съдържанието на кита е представено на таблица 3:

Таблица 3. Съдържание на ELISA кит за TNF- α :

Компонент / Количество
№1 1- 96-гнездова предварително натоварена плака
№2 Покривно фолио 2 бр.
№3 Стандарт 2 бр. 800pg/ml
№4 Буфер за разреждане за стандартите 10x 1 бр. (25 ml) (при клетъчни култури)
№5 Разрежител за стандартите 1 бр. (при изследване на човешки серум или плазма)
№6 Контроли 2 бр.
№7 Биотинилиран анти –TNF- α 1 бр.
№8 Разрежител за биотинилираното антитяло 1бр. (0,4ml)
№9 Стрептавидин - HRP (пероксидаза от хрян) 2 бр. (5 μ l)
№10 Миещ буфер 200x 1 бр. (10 ml)
№11 TMB субстрат 1 бр. (20 ml)
№12 Стоп разтвор 1 бр. (20 ml)
№13 Сертификат за качествен контрол 1бр.

Таблица 4. Приготвяне на стандартите чрез серийни падащи разреждания на основния стандарт - директно накапване.

Епр.№	V на разрежител № 5 във всяка епруветка		Разреждане	Конц. на стандартите (μg/L)
1	100 μ l	+	100 μ l	0
2	100 μ l	+	100 μ l	25
3	100 μ l	+	100 μ l	50
4	100 μ l	+	100 μ l	100
5	100 μ l	+	100 μ l	200
6	100 μ l	+	100 μ l	400
7	100 μ l	+	200 μ l Стандарт	800

Процедура:

1. Темперирание на китовите и пробите на стайна температура 20-25°C за около час.
2. За активиране на плаката се накапват по 150 μ l от предварително разредения активационен буфер във всички кладенчета.
3. Следва инкубация в термостат на 37°C за 30 минути.
4. Съдържанието в кладенчетата се изхвърля и те се промиват четирикратно с по 200 μ l миещ разтвор, подсушават се върху филтърна хартия.
5. В кладенчетата се накапват по 100 μ l от стандартите, разредените проби и контролите.
6. Следва инкубация на плаката за 1 час на 30°C.
7. Стъпка 4 се повтаря.
8. Накапват се по 100 μ l от предварително разреденото биотинилирано антитяло във всички кладенчета.
9. Следва инкубация за 1 час на стайна температура.
10. Стъпка 4 се повтаря.
11. Накапват се по 100 μ l от предварително разредената стрептавидин-пероксидаза във всички кладенчета.

12. Следва инкубация за 1 час на стайна температура.
13. Стъпка 4 се повтаря.
14. Пипетират се по 100µl от TMB субстрат във всички кладанчета.
15. Инкубиране на плаката за 30 минути на стайна температура, на тъмно.
16. За спиране на реакцията се добавят по 100µl стоп-разтвор във всички кладанчета.
17. Отчитане на резултата до 30 минути след прибавянето на стоп-разтвора при дължина на вълната 450 nm.

2.1.2. Определяне на серумна концентрация на манозо-свързващия лектин

Определянето на манозо-свързващия лектин се осъществи чрез метода „захваната” ELISA. Използван е фабрично приготвен набор за научни изследвания - Hycult biotech каталожен номер НК 323 Uden, the Netherlands. Тестът е изпълнен съгласно указанията на производителя. Съдържанието на кита е посочено в таблица 5, а на таблица 6 са отразени концентрациите на използваните стандарти, получени при падащи разреждания на основния стандарт в 225 µl от MBL-свързващия буфер.

Таблица 5. Съдържание на ELISA кит за MBL:

Компонент / Количество
№1 Активиращ плаката буфер 5x 1 бр. (6 ml)
№2 Миещ буфер 40x 1 бр. (20 ml)
№3 MBL-свързващ буфер 1x 2 бр. (20 ml)
№4 Буфер за разреждане 10x 1 бр. (10 ml)
№5 Стандарт 2 бр., 0.5 ml лиофилизиран
№6 Трейсър, биотинилиран 2 бр., 1 ml лиофилизиран
№7 Стрептавидин-пероксидаза 1 бр., 1 ml лиофилизиран
№8 TMB субстрат 1 бр. (20 ml)
№9 Стоп разтвор 1 бр. (20 ml)
№10 2 x 96-гнездови предварително натоварени плаки
№11 Рамка 2 бр.
№12 Покривно фолио 4 бр.
№13 Сертификат за качествен контрол 1бр.

Таблица 6. Концентрации на използваните стандарти, получени при падащи разреждания на основния стандарт.

Епр.№	V на MBL-свързващ буфер	V на стандарта	Конц. на стандартите (ng/L)
1	от сертификата	+ 150µl от № 5	100
2	225 µl	+ 150µl	40
3	225 µl	+ 150µl	16
4	225 µl	+ 150µl ↓	6.4
5	225 µl	+ 150µl	2.6
6	225 µl	+ 150µl	1.0
7	225 µl	+ 150µl	0.4
8	225 µl	-	0

Процедура:

1. Темперирание на китовите и пробите на стайна температура 20-25°C за около час.
2. За активиране на плаката се накапват по 150µl от предварително разредения активационен буфер във всички кладенчета.
3. Следва инкубация в термостат на 37°C за 30 минути.
4. Съдържанието в кладенчетата се изхвърля и те се промиват четирикратно с по 200µl миеш разтвор, подсушават се върху филтърна хартия.
5. В кладенчетата се накапват по 100µl от стандартите, разредените проби и контролите.
6. Следва инкубация на плаката за 1 час на 30°C.
7. Стъпка 4 се повтаря.
8. Накапват се по 100µl от предварително разреденото биотинилирано анти тяло във всички кладенчета.
9. Следва инкубация за 1 час на стайна температура.
10. Стъпка 4 се повтаря.
11. Накапват се по 100µl от предварително разредената стрептавидин-пероксидаза във всички кладенчета.
12. Следва инкубация за 1 час на стайна температура.
13. Стъпка 4 се повтаря.
14. Пипетират се по 100µl от ТМВ субстрат във всички кладанчета.
15. Инкубиране на плаката за 30 минути на стайна температура, на тъмно.
16. За спиране на реакцията се добавят по 100µl стоп-разтвор във всички кладенчета.
17. Отчитане на резултата до 30 минути след прибавянето на стоп-разтвора при дължина на вълната 450 nm.

Отчитането на резултатите е извършено с помощта на ELISA strip reader.

Оценка на качеството и изчисляване на резултатите

1. Бяха направени изчисления на средната абсорбция от дублираните проби.
2. При разлика по-голяма от 15% от средната, резултатът не беше считан за валиден.
3. Разликата в средната абсорбция на нулевия стандарт беше по-малка от 0.3
4. Отчитането на резултатите стана чрез построяването на стандартна крива в логаритмична скала. Средната абсорбция бе нанесена по вертикалната ос Y, а концентрацията се отчиташе по хоризонталната ос X.
5. Т.к. серумите бяха разредени четирикратно, както е препоръчано от производителя, получените резултати бяха умножени по множителя на разреждане.
6. Не наблюдавахме резултати, които да имат по-голяма абсорбция от най-големия стандарт на теста.

2.1.3. Определяне на антитела

Определени бяха серумните антитела, посочени в таблица 7, съгласно стандартните оперативни процедури в Клиника по клинична имунология на УМБАЛ „Александровска”

Таблица 7. Използвани методи за определянето на антитела при изследваните пациенти със СЛЕ и ДМ

Антитела	Метод	Реактиви с каталожен номер	Заболяване
Антинуклеарни антитела (АНА)	ИФ	FS001.3 Binding site Hep2-slides PF004 НЦЗПБ античовешки ИгГ FA105 Binding site – (+) контрола FA108 Binding site – (+) контрола CON92 Binding site – (-) контрола	СЛЕ, ДМ
Анти-ДНК (скрининг)	ELISA	ORG604S ORGENTEC	СЛЕ
Анти-Sm	ELISA	ORG510 ORGENTEC	СЛЕ
Анти-кардиолипинови ИгГ/ИгМ	ELISA	ORG515 ORGENTEC	СЛЕ
Анти-Jo1	ELISA	ORG513 ORGENTEC	ДМ

Забележка: Всички ELISA процедури са изпълнени съгласно изискванията на производителя ORGENTEC Diagnostica, Mainz, Germany

2.2. МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧНИ МЕТОДИ

За генотипизиране на изследваните полиморфизми бяха използвани методи, основаващи се на PCR-RFLP анализ, съгласно предходни проучвания, посочени в таблица 8.

Таблица 8. Изследвани гени и единични полиморфизми в тях, номенклатура, референция на използваните методи

Ген	SNP	rs	Референция на методологията	
<i>TNFA</i>	-1031 T/C	rs1799964	T Asghar и сътр. 2004 [263]	
	-863 C/A	rs1800630		
	-857 C/T	rs1799724		
	-308 G/A	rs1800629	A.G. Wilson и сътр. 1992[264]	
	-238 G/A	rs 361525	H.Q. Li и сътр. 2005 [265]	
	489 G/A	rs1800610	M. Küçükaşan и сътр. 2002 [266]	
	<i>IL-6</i>	-174 G/C	rs1800795	M. Libra и сътр. 2006 [267] (модификация на праймери)
		<i>IL-10</i>	-3575 T/A	rs1800890
-2849 G/A	rs6703630		W. P. Chong и сътр. 2004 [269]	
-2763 C/A	rs6693899			
	-592 C/A	rs1800872	H. J. Chin и сътр. 2005 [270]	
	<i>MBL2</i>	-550 G/C (H/L)	rs11003125	A. Tsutsumi и сътр. 2001 [139]
		-221 G/C (Y/X)	rs7096206	R. W. Roelofs и сътр. 2003 [142]
		223 C/T (A/D)	rs5030737	R. Ramasawmy и сътр. 2008 [271]
230 G/A (A/B)		rs1800450		
239 G/A (A/C)		rs1800451		
<i>ESR1</i>	397 C/T PvuII (P/p)	rs2234693	A. Jakimiuk и сътр. 2007 [272]	
	351 G/A XbaI (X/x)	rs9340799		

2.2.1. Полимеразна верижна реакция (polymerase chain reaction-PCR)

Полимеразната верижна реакция (PCR) е техника за ензимна амплификация на избрани нуклеотидни последователности *in vitro*, съдържаща следните реагенти в амплификационната смес:

- ДНК едноверижна матрица
- Таq-полимераза
- Синтетични олигонуклеотиди праймери - прав (F) и обратен (R)
- Дезоксинуклеотидтрифосфати – дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ
- Реакционен буфер

Приготвяне на PCR реакционна смес за амплификация.

За анализираниите от нас 18 SNPs бяха приготвяни реакционни смеси в различни обеми, като съдържанието им е показано на таблица 9. При изследването на полиморфизмите в *TNFA*, *IL-6*, *IL-10*, както и *MBL2* -550H/L и -221Y/X, се работеше в стандартен обем 10µl. Поради възможността близко разположени полиморфизми да бъдат амплифицирани с помощта на едни и същи праймери, реакционната смес за XbaI и PvuII в естрогеновия рецептор се правеше в обем 25 µl, а тази за *MBL2* 223C/T, 230G/A и 239G/A в общ обем 40 µl (таблица 9).

Таблица 9. Съдържание на амплификационната смес и обем на реакцията за всеки от изследваните полиморфизми.

Съдържание на амплификационната смес	<i>TNFA</i> , <i>IL-6</i> , <i>IL-10</i> (-3575,-592) <i>MBL2</i> (-550, -221) V= 10 µl	<i>ESR1</i> <i>IL-10</i> (-2849,-2763) V=25 µl	<i>MBL2</i> (-223, -230,-239) V=40 µl
ДНК /100 ng/ul	1.0 µl	1.0 µl	2.0 µl
Pr F*/20 pmol/ul	0.2 µl	0.5 µl	0.8 µl
Pr R*/20 pmol/ul	0.2 µl	0.5 µl	0.8 µl
DNTP-s/10mM/ul	0.4 µl	1.5 µl	1.6 µl
Буфер 10x	1.0 µl	2.5 µl	4.0 µl
Таq полимераза	0.05 µl	0.1 µl	0.2 µl
H ₂ O	7.15 µl	18.9 µl	30.6 µl

Последователността на двойките праймери (прав и обратен) за генотипизиране на изследваните полиморфизми са представени на таблица 10:

Таблица 10. Използвани двойки праймери за изследваните SNPs, rs номенклатура.

Ген	SNP	rs	Праймери
<i>TNFA</i>	-1031 T/C	rs1799964	F-5'-TATGTGATGGACTCACCAGGT-3' R-5'-CCTCTACATGGCCCTGTCTT-3'
	-863 C/A	rs1800630	F-5'-GGCTCTGAGGAATGGGTTAC-3' R-5'-CTACATGGCCCTGTCTTCGTTACG-3'
	-857 C/T	rs1799724	F-5'-GGCTCTGAGGAATGGGTTAC-3' R-5'-CCTCTACATGGCCCTGTCTAC-3'
	-308 G/A	rs1800629	F-5'-AGGCAATAGGTT TTGAGGGCCAT-3' R-5'-TCCTCCCTGCTCCCGGATTTCCG-3'
	-238 G/A	rs 361525	F-5'-AGAAGACCCCTCGGAACC-3' R-5'-ATCTGGAGGAAGCGGTAGTG-3'
	+489 G/A	rs1800610	F-5'-GGAGAGAAGCAACTACAGAC-3' R-5'-CACACTTAGTGAGCACCTTC-3'
<i>IL-6</i>	-174 G/C	rs1800795	F-5'-TGACTTCAGCTTTACTCTTTGT-3' R-5'-CTGATTGGAAACCTTATTAAG-3'
<i>IL-10</i>	-3575 T/A	rs1800890	F-5'-GGTTTTCCCTTCATTTGCAGC-3' R-5'-ACACTGTGAGCTTCTTGAGG-3'
	-2849 G/A	rs6703630	F-5'-TTCAGCAAATGGCTTGAGAT-3' R-5'-TCTCAGCTCACTGCAAGCTC-3'
	-2763 C/A	rs6693899	
	-592 C/A	rs1800872	F-5'-GACTGGCTTCCTACAGT-3' R-5'-CTGGCTCCACAGG-3'
<i>MBL2</i>	-550 G/C (H/L)	rs11003125	F-5'-GGGGCTAGGCTGCTGAGGTTTC-3' R-5'-TTGCTTCCCCTTGGTGTGTA-3'
	-221 G/C(Y/X)	rs7096206	F-5'-GTTTCCACTCATTCTCATTCCCTAAG-3', R-5'-GAAAACCTCAGGGAAGGTTAATCTCAG-3'
	223 C/T (A/D)	rs5030737	
	230 G/A (A/B)	rs1800450	F-5'-CATCAACGGCTTCCCAGGCAAAGATGCG-3' R-5'-CAGGCAGTTTCC TCTGGAAGGTAAG-3'
	239 G/A (A/C)	rs1800451	
<i>ESR1</i>	397 C/T (P/p)	rs2234693	F-5'-CTGCCACCCTATCTGTATCTTTTCCCTATTCTCC-3' R-5'-TCTTTCTCTGCCACCCTGGCGTCGATTATCTGA3'
	351 G/A (X/x)	rs9340799	

Условия на амплификация:

Като обща стъпка на полимеразната верижна реакция за всички изследвани фрагменти е първоначална денатурация при 95°C за 5 минути. Броят на амплификационните цикли и условията за тяхното протичане, включващи температура на термична денатурация, хибридизация (annealing) и нарастване (елонгация) в серията на един цикъл бяха оптимизирани след провеждането на градиентен PCR и са посочени на таблица 11. За амплифициране на желаните фрагменти беше използван Quanta Biotech (QB) 96 Thermal Cycler.

Таблица 11. Оптимизирани условия за протичане на амплификация на изследваните SNPs.

Ген	SNPs	Бр. цикли	Условия на амплификация PCR		
<i>TNFA</i>	-1031 T/C	35	D:95°C 00:30	A:60°C 00:50	E:72°C 00:40
	-863 C/A	35	D:95°C 00:30	A:60°C 00:30	E:72°C 00:30
	-857 C/T	35			
	-308 G/A	35			
	-238 G/A	35			
	+489 G/A	35	D:95°C 00:30	A:58°C 00:30	E:72°C 00:50
<i>IL-6</i>	-174 G/C	35	D:95°C 00:30	A:60°C 00:30	E:72°C 00:30
<i>IL-10</i>	-3575 T/A	35	D:95°C 00:30	A:62°C 01:00	E:72°C 01:00
	-2849 G/A	35			
	-2763 C/A	35			
	-592 C/A	35	D:95°C 00:30	A:60°C 01:00	E:72°C 01:00
<i>MBL2</i>	-550 G/C	35	D:95°C 00:30	A:56°C 00:30	E:72°C 00:45
	-221 G/C	35	D:95°C 00:30	A:60°C 00:30	E:72°C 00:45
	223 C/T	35	D:95°C 00:30	A:62°C 00:30	E:72°C 00:30
	230 G/A	35			
	239 G/A	35			
<i>ESR1</i>	X и P	35	D:95°C 01:00	A:58°C 01:00	E:72°C 02:30

След протичане на амплификационната реакция се извършваше тест на получения продукт с боя (loading buffer / dye) в съотношение 1:1 върху 2.0% агарозен гел 1xTBE (TRIS - 90mmol/l; Борна киселина – 90mmol/l; Na₂EDTA – 1mmol/l) и 5 µl етидиев бромид в електрофоретична вана при 130 - 150V. В общия случай бяха тествани по 3 µl ДНК. Визуализацията на PCR продукта се осъществяваше посредством включилия се в ДНК етидиев бромид с помощта на ултравиолетова светлина на фотодокументационна система. Дължината на получения PCR-фрагмент беше контролирана с ДНК - маркер за молекулно тегло (100 bp DNA Ladder, New England Biolabs). След успешна амплификация се пристъпваше към рестрикционна реакция.

2.2.2. Рестрикционен анализ на полиморфизми по дължината на фрагмента (RFLP)

Рестрикционните ендонуклеази са бактериални ензими, които режат и двете вериги на ДНК на специфично място на разпознаване, обикновено с дължина 4-6bp. Съдържанието на рестрикционната реакция е посочено в таблица 12:

Таблица 12. Съдържание на рестрикционната реакция:

Съдържание	
PCR продукт	7.0 µl
10x рестрикционен буфер	1.5 µl
Рестриктаза 10U/ µl	0.3 µl
H ₂ O*	6.2 µl

*Забележка: В случаите, които изискваха добавяне на BSA 100x, се следваха инструкциите на производителя.

Рестрикцията протичаше с инкубация за 4 часа или за цяла нощ в съответствие с указанията на производителя. Използваните рестриктази за всеки от изследваните в настоящата работа полиморфизми и техните характеристики – рестрикционни места, условия, при които се осъществява рестрикцията и дължината на получените рестрикционни фрагменти в зависимост от алелните полиморфни позиции са посочени в таблица 13:

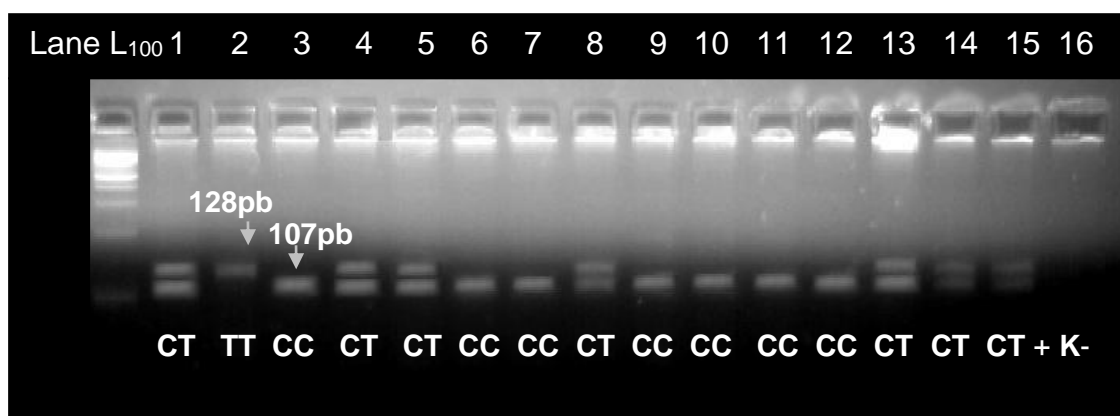
Таблица 13. Характеристика на използваните рестриктази и рестрикционни фрагменти на реакцията за всеки от изследваните SNPs.

Ген	SNP	Рестриктаза	С°	Рестрикционно място	PCR-Продукт	Фрагменти при рестрикция
TNFA	-1031 T/C	BbsI	37	5'...GAAGAC(2/6)...3'	264bp	T=251+13; C=180+71+13
	-863 C/A	HpyCH4IV	37	5'...A/CGT...3'	125bp	C=125; A=101+24
	-857 C/T	HpyCH4IV	37	5'...A/CGT...3'	128bp	T=128; C=107+21
	-308 G/A	NcoI	37	5'...C/CATGG...3'	107bp	G=87+20; A=107
	-238 G/A	MspI	37	5'...C/CGG...3'	152bp	G=20+132; A=152
	+489 G/A	HpyCH4IV	37	5'...A/CGT...3'	551bp	G=111+159+281; A=159+392
IL-6	-174 G/C	SfaI	37	5'...GCATC(5/9)...3'	198bp	G=140+58; C=198
IL-10	-3575 T/A	Tsp509I	65	5'.../AATT...3'	231bp	T=121+110; A=231
	-2849 G/A	AlwI	37	5'...GGATC(4/5)...3'	308bp	G=124+184; A=308
	-2763 C/A	DdeI	37	5'...C/TNAG...3'	308bp	C=48+49+97+114; A=48+97+163
	-592 C/A	RsaI	37	5'...GT/AC...3'	412bp	C=412; A=176+236
MBL2	-550 G/C (H/L)	XmiI	37	5'...GT/МКAC...3'	261bp	G=261; C=239+22
	-221 G/C (Y/X)	BsajI	60	5'...C/CNNGG...3'	350bp	C=242+108; G=166+76+108
	223 C/T (A/D)	HhaI	37	5'...GCG/C...3'	119bp	C=91+28; T=119
	230 G/A (A/B)	BanI	37	5'...G/GYRCC...3'	119bp	G=84+35; A =119
	239 G/A (A/C)	MboII	37	5'...GAAGA(8/7)...3'	119bp	G=119; A =63+56
ESR1	397 C/T (P/p)	PvuII	37	5'...CAG/CTG...3'	1361bp	C=1361; T=980 +381
	351 G/A (X/x)	XbaI	37	5'...T/CTAGA...3'	1361bp	G=1361; A=935+ 426

Забележка: всички използвани рестриктази са на New England BioLabs Inc 240 Country Road Ipswich, MA019382723, с изключение на XmiI, която е на Thermo scientific.

При полиморфизмите *TNFA* -1031T/C, -863C/A, *IL-10* -592C/A, *MBL2* -550G/C, *ESR1* 397C/T и 351G/A в присъствието на полиморфния алел се създава рестрикционно място, докато в останалите случаи рестрикционното място съществува в присъствието на дивия тип, а полиморфният алел води до неговото премахване.

Визуализирането на рестрикционните фрагменти ставаше на 3% агарозна гел електрофореза при 135V милиампери, посредством оцветяване с етидиев бромид, както беше посочено. С помощта на UV светлина чрез фотодокуметационна система MiniBIS Pro DNR се отчиташе включилия се в рестрикционните фрагменти етидиев бромид (фигура 9). Дължината им се контролираше с ДНК-маркер за молекулно тегло (100 bp DNA Ladder, New England Biolabs). Задължително в серията се поставяше положителна контрола (хетерозигот).



Фигура 9. Полиморфизъм *TNFA* -857C/T - визуализация на рестрикционните продукти. Използван е Ladder от 100bp. Получените рестрикционни фрагменти са съответно 107bp и 128bp с по-голяма дължина от контролния фрагмент 100bp на използвания Ladder, следователно по-близо до стартовата позиция, но преди следващия контролен фрагмент на Ladder от 100bp. На стартова позиция 15 е поставена положителната контрола (хетерозигот), а на 16 – отрицателна контрола.

2.3. СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ

Статистическата обработка на получените резултати беше направена с помощта на следните програми:

- SPSS 16.0
- Haploview 4.2
- PHASE
- PLINK

2.3.1. Описателни методи: Проведен беше вариационен анализ на количествените променливи – средна стойност, стандартно отклонение и/или стандартна грешка (за показателите с нормално разпределение) и медиана с минимална и максимална стойност,

персентили 25-ти и 75-ти (за показателите с различно от Гаусовото разпределение), което е отразено и в графичните изображения.

2.3.2. Методи за проверка на хипотези

Проверка за нормалност на разпределението чрез тест на Колмогоров-Смирнов (Shapiro Wilk при пациенти под 50):

1. Параметрични (при нормалност на разпределението)

1.1. Т-тест за проверка на равенство между две независими извадки (Independent Samples T-test)

1.2. Еднофакторен дисперсионен анализ (One-way ANOVA) при сравняване на повече от две средни стойности.

1.3. Корелационен анализ по Pearson за изследване на връзка между две количествени променливи

2. Непараметрични (при разпределение различно от нормалното)

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. Болест-асоциираното проучване от типа случай-контрола беше осъществено чрез метод χ -квадрат или точен тест на Фишер (two-tailed Fisher's exact test) при малки извадки. При множествени сравнения беше прилагана и корекция по Bonferroni. Допълнително беше изчислена стойността на отношението на шансовете (odd ratio=OR) в 95% доверителен интервал (95 % CI), измерващ относителния риск (шанс) за развитие на болестта при експозиция на анализирания фактор. Разгледани бяха доминантен, рецесивен и кодоминантен модел на генотипно взаимодействие (таблица 14), като таблично бяха представени данните от рецесивния модел. Този подход беше използван и при оценка на генотипно влияние на всеки от изследваните полиморфизми върху клиничните признаци при СЛЕ и ДМ. С NS беше отбелязван общия случай, когато липваше статистическа значимост за всеки един от тях. При наличие на статистическа значимост тя беше допълнително графично представена.

Таблица 14. Изследвани модели на генетично влияние.

Доминантен модел	Рецесивен модел	Кодоминантен модел
XX+XУ	XX	XX
уу	XУ+уу	уу

2.4. Корелационен анализ по Spearman за изследване на връзка между две количествени променливи.

Всички описани статистически методи бяха осъществени с програма SPSS 16.0 IBM. За статистически достоверни се приеха стойности на $p < 0.05$.

2.3.3. Методи за оценка на неравновесна връзка, хаплотипна реконструкция и епистатични взаимодействия

Допълнително в настоящата работа беше изчислена неравновесната връзка [D'] в гените *TNFA*, *IL-10*, *MBL2*, *ESR1* в изследваната група здрави лица чрез програма Haploview 4.2. [273]. Стойността на [D'] е от 0-1, като 1 отговаря на пълна положителна неравновесна връзка. Резултатите от установените неравновесни връзки в последствие бяха използвани за реконструиране на хаплотипи. Трябва да има предвид, че програмата Haploview 4.2 изключва анализа на хаплотипи с честота под 1%, поради което беше направена и реконструкция с програма PHASE. Чрез програма PLINK беше направена проверка за съответствие на получените резултати със закона на Харди-Вайнберг и бяха определени епистатичните взаимодействия при изследваните полиморфизми (SNPхSNP).

ГЛАВА IV. РЕЗУЛТАТИ

1. ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ ЦИТОКИНИ И ПОЛИМОРФИЗМИ В ЦИТОКИНОВИТЕ ГЕНИ

Въз основа на хипотезата за съществуването на цитокинов дисбаланс при болните със СЛЕ и ДМ, изследвахме полиморфизми в гените, кодиращи ключови про- и антивъзпалителни цитокини. Проучването обхваща единични нуклеотидни полиморфизми в гени на цитокините - *TNFA*, *IL-6* и *IL-10*, за които съществуват данни, че водят до промяна в генната експресия и съответно в серумните нива на тези цитокини. Анализирани бяха както честотата на индивидуалните полиморфизми, така и хаплотипното и епистатично влияние на комбинации от цитокинови генни полиморфизми с оглед изясняване на ролята им в патогенезата на СЛЕ и ДМ сред българи.

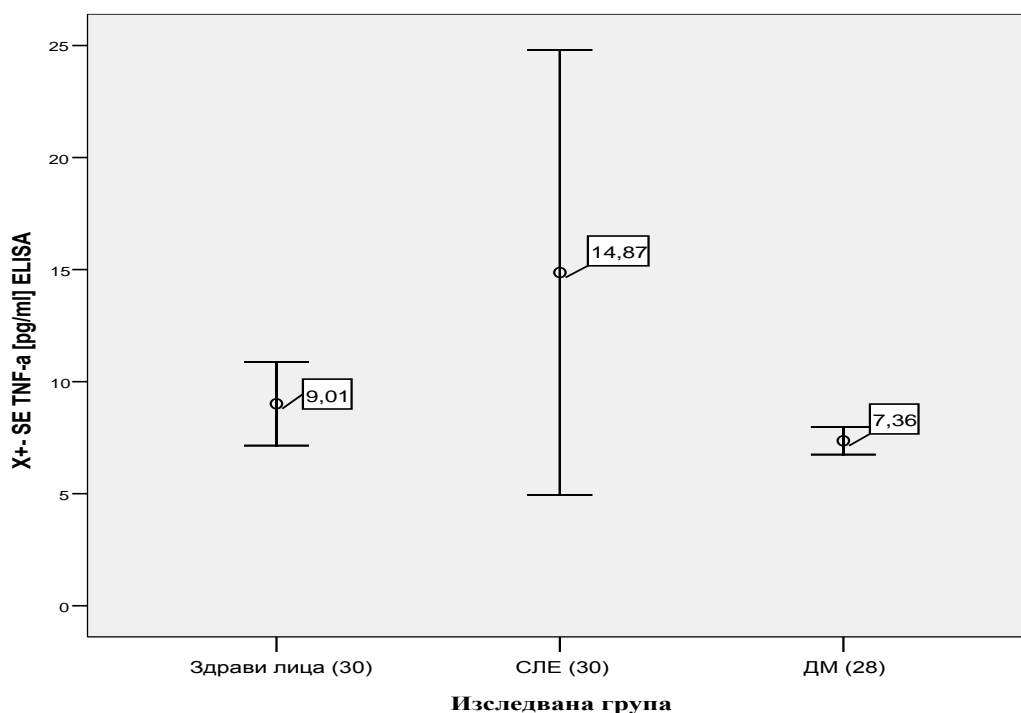
1.1. ТУМОР НЕКРОТИЗИРАЩ ФАКТОР - АЛФА (TNF- α)

За да бъде определено функционалното значение на TNF- α , от една страна бяха изследвани серумните нива на този цитокин сред болни и здрави индивиди, а от друга бяха проучени единичните нуклеотидни полиморфизми, които се счита, че повлияват генната му експресия.

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 пациента със СЛЕ и 28 пациента с ДМ. Средната концентрация в групата на контролите е 9.01pg/ml. Най-висока средна стойност беше установена в групата на пациентите със СЛЕ – 14.87pg/ml, а най-ниска в тази на пациентите с ДМ -7.36pg/ml (фигура 10):



Фигура 10. 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)

Чрез теста на Kolmogorov-Smirnov се установи 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 15). 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 статистическа незначими ($p=0.27$ за СЛЕ; $p=0.76$ за ДМ). При сравнение групите в 25-ти, 75-ти и 90-ти перцентил също не бяха установени статистически значими различия (таблица 15).

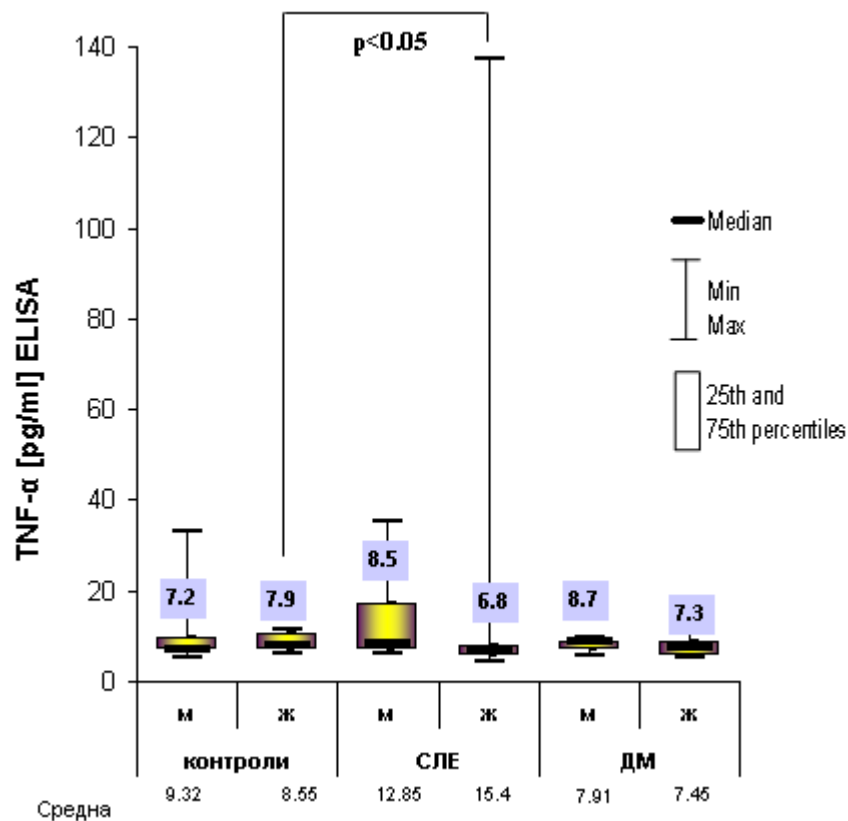
Таблица 15. Концентрация на TNF- α – представени са медианите и съответно 25-ти, 75-ти и 90-ти перцентил в изследваните групи.

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 и възрастта върху серумните нива на TNF- α

А. Влияние на пола

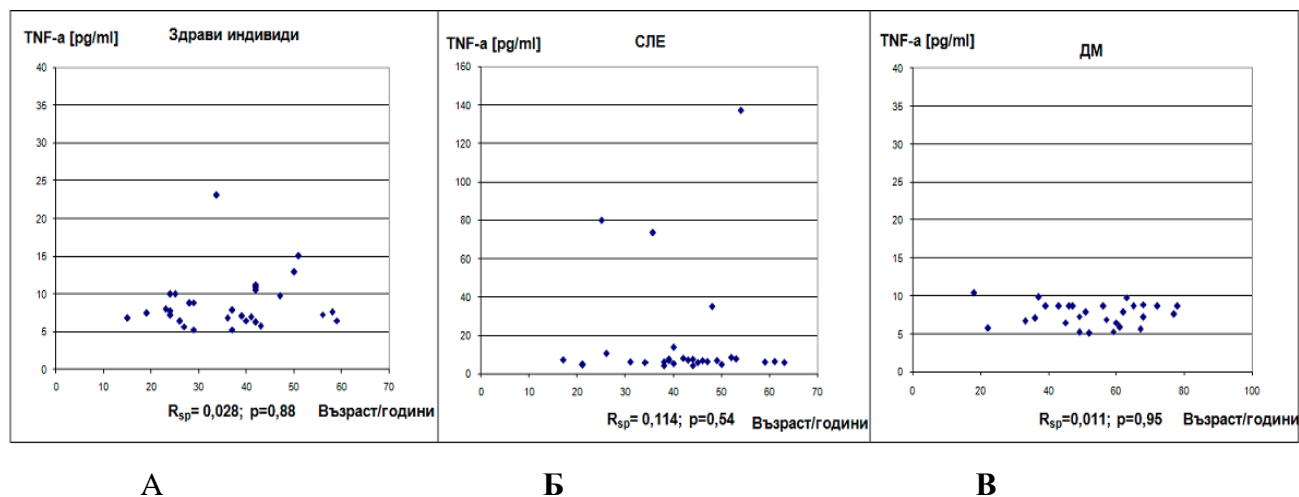
За да се оцени влиянието на пола върху продукцията на TNF- α , всяка от изследваните групи – здрави индивиди, пациенти със СЛЕ и с ДМ, беше разделена на подгрупи - мъже/жени. При сравнение на нивата на протеина между двата пола в рамките на всяка група не се установиха значими различия (фигура 11). В 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 11). 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 11). 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 11. 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.

Б. Влияние на възрастта

Беше потърсена линейна корелация между възрастта и нивата на TNF- α , но не беше установена значимост нито сред здравите индивиди ($p=0.88$), нито сред пациентите със СЛЕ ($p=0.54$) и ДМ ($p=0.95$) (фигура 12):



Фигура 12. Линеен корелационен анализ между TNF- α и възрастта А. при здрави индиви Б. при пациенти със СЛЕ В. при пациенти с ДМ; R-коефициент на Spearman, p-вероятност.

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

При определяне 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 ($p=0.06$) (таблица 16), 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, както и с положителни АНА.

Таблица 16. Влияние на високите серумни концентрации на TNF- α върху клиничните признаци на СЛЕ.

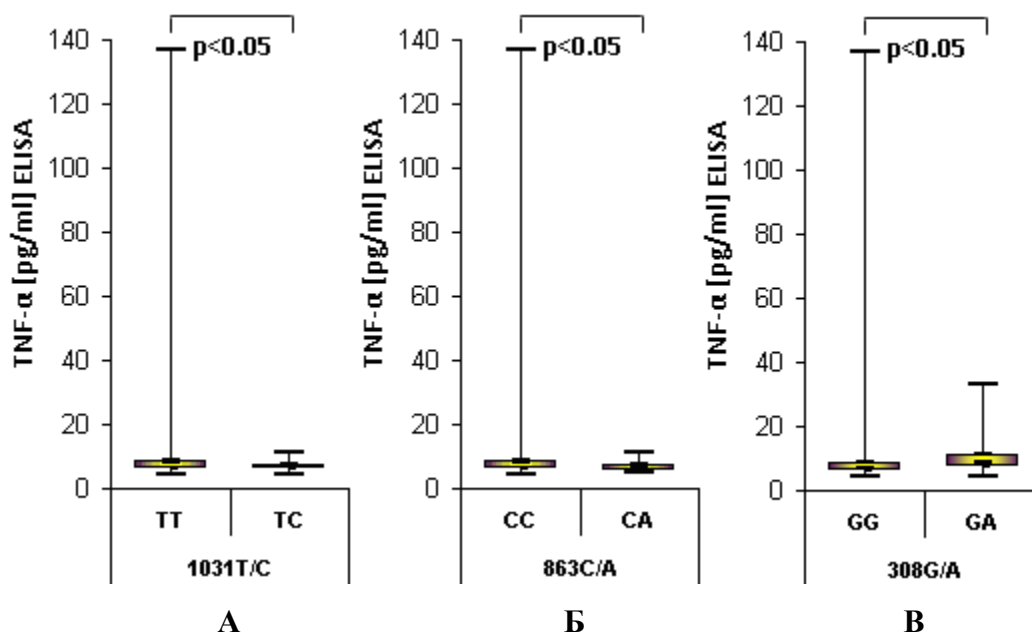
Клиничен признак		Брой пациенти с TNF- α под 90-ти перцентил	Брой пациенти с TNF- α над 90-ти перцентил	OR, 95% CI	p
Малариен обрив	отрицателни	11	2	1.36 (0.16-11.23)	1.00
	положителни	15	2		
Дискоиден обрив	отрицателни	23	3	0.39 (0.03-5.07)	0.45
	положителни	3	1		
Фоточувствителност	отрицателни	15	1	0.24 (0.02-2.67)	0.31
	положителни	11	3		
Артрит	отрицателни	12	0	NaN	0.12
	положителни	14	4		
Серозит	отрицателни	20	2	0.30 (0.03-2.60)	0.55
	положителни	6	2		
Хематологично засягане	отрицателни	20	1	0.10 (0.01-1.15)	0.06
	положителни	6	3		
Неврологично засягане	отрицателни	20	2	0.30 (0.03-2.60)	0.55
	положителни	6	2		
АНА	отрицателни	13	0	NaN	0.11
	положителни	13	4		
Анти-ДНК	отрицателни	12	0	NaN	0.12
	положителни	14	4		
Лупусен нефрит	положителни	26	4	-	-

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

1.1.2.1. Генотипно влияние върху продукцията на TNF- α при изследваните здрави и болни лица

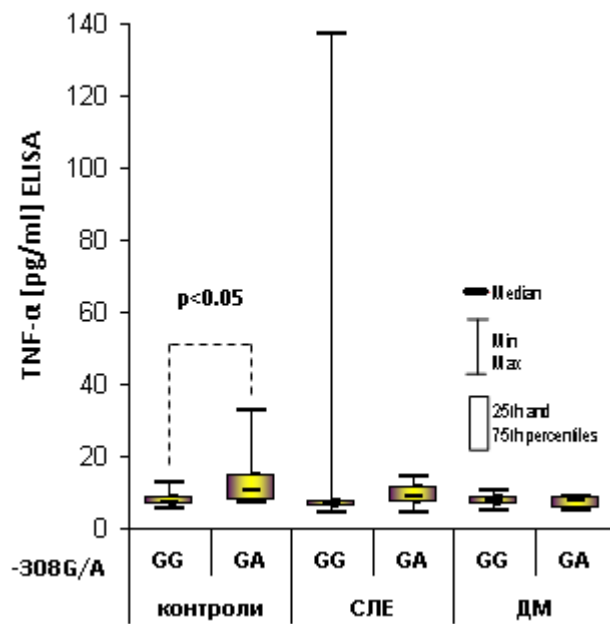
За да се определи влиянието на генотипите върху продукцията на TNF- α , първоначално беше изследвана цялата кохорта. Установиха се статистически значими разлики в серумните нива на протеина сред носителите на генотипи -1031ТТ и -1031ТС ($p=0.009$). За -1031ТТ генотипа беше установена средна стойност на TNF- α 12.0pg/ml и медиана 7.9pg/ml, а за -1031ТС генотипа съответно средна 6.9pg/ml и медиана 6.7pg/ml. (фигура 13А). Статистически значима разлика по отношение на концентрацията на TNF- α показва и скачаният с -1031Т/С полиморфизъм -863С/А ($p=0.018$) (фигура 13Б). За -863СС генотипа беше изчислена средна стойност на TNF- α 12.0pg/ml и медиана 7.9pg/ml, а за -863СА генотипа - съответно средна

7.1pg/ml и медиана 6.8pg/ml. Разликата в нивата на TNF- α при носителите на генотипи -308GG и -308GA също показва статистическа значимост ($p=0.008$). За -308GG генотипа беше установена средна стойност на TNF- α 10.6pg/ml и медиана 7.1 pg/ml (фигура 13B). От получените резултати може да се обобщи, че високите нива на TNF- α се свързват с генотипи -1031ТТ, -863СС и -308GA, а ниските - съответно с -1031ТС, -863СА, -308GG. Поради ниската честота на генотипи -1031СС, -863АА, -308АА, -238GA и -238АА, тяхното влияние не може да бъде оценено. Генотипните различия в полиморфизмите -857С/Т и 489G/A не показаха значими разлики в продукцията на TNF- α .

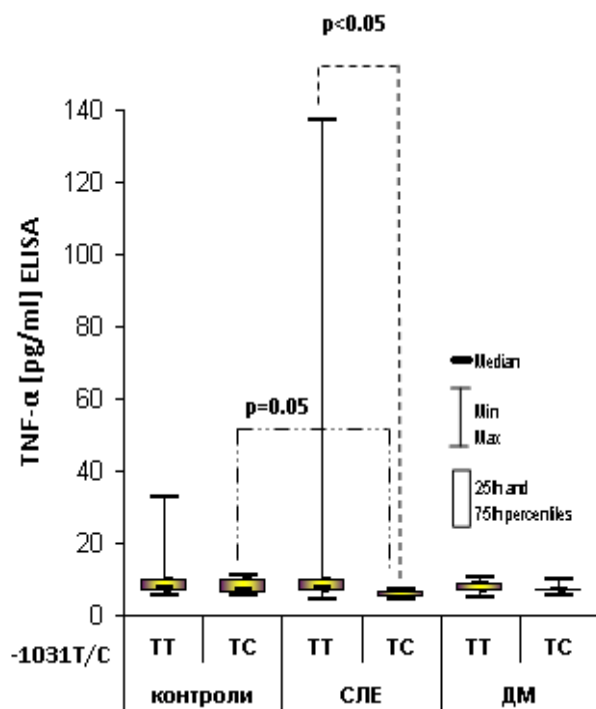


Фигура 13. Генотипно влияние върху концентрацията на TNF- α . Представени са статистически значимите разлики в нивата на TNF- α във връзка с генотипните различия в изследваните TNF- α полиморфизми за цялата кохорта А. полиморфизъм -1031Т/С Б. полиморфизъм -863С/А В. полиморфизъм -308G/A; Графиката отразява медианите, 25-ти и 75-ти персентил, както и минималната и максимална стойност.

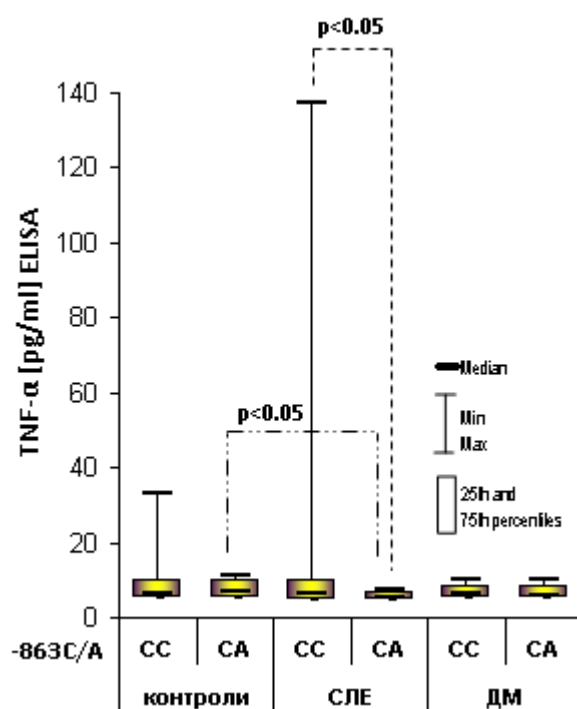
Като следваща стъпка, за да се оцени значението на генотипа върху продукцията на TNF- α при здрави индивиди и в условията на патологичен процес, изследваната кохорта беше разделена въз основа на изследваните групи – здрави лица, пациенти със СЛЕ, пациенти с ДМ. При сравнението на нивата на TNF- α между отделните генотипи в рамките на всяка група, се установиха следните значими различия: между -308GG и -308GA генотипите за контролната група ($p=0.012$) (фигура 14) и между двойките генотипи -1031ТТ и -1031ТС и -863СС и -863СА при пациенти със СЛЕ (съответно $p=0.015$ и $p=0.017$) (фигура 15) и (фигура 16).



Фигура 14. Влияние на полиморфизма -308G/A върху продукцията на TNF- α в зависимост от генотипа. Представена е установената статистически значима разлика в серумните нива на TNF- α за -308GG и -308GA генотипите при здрави лица.



Фигура 15. Влияние на полиморфизма -1031T/C върху продукцията на TNF- α в зависимост от генотипа и влияние на външни фактори.



Фигура 16. Влияние на полиморфизма -863C/A 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, изследваната кохорта беше разделена въз основа на генотипите на изследваните полиморфизми, като се сравниха стойностите на TNF- α при един и същ генотип между трите представени групи – контроли, СЛЕ, ДМ. Тестът на Mann-Whitney показва, че от всички изследвани полиморфизми статистически значима разлика се установява единствено за генотипа -863CA между пациентите със СЛЕ и здравите лица ($p=0.04$) (фигура 16). За генотипа -1031TC се установи само тенденция към подобна зависимост между същите групи ($p=0.054$) (фигура 15). При пациентите със СЛЕ с генотип -863CA беше установена средна стойност на TNF- α 6.23 pg/ml и медиана 6.4 pg/ml, а при здрави индивиди със същия генотип съответно средна 7.9 pg/ml и медиана 7.5 pg/ml. Така статистическият анализ показва, че при пациенти със СЛЕ, генотипът -863CA се свързва със значимо по-ниски нива на TNF- α в сравнение с контролната група. Получената средна стойност и медиана на TNF- α в групата на пациенти със СЛЕ с генотип -1031TC бяха съответно 6.1 pg/ml и 6.4 pg/ml, а при здрави индивиди със същия генотип стойностите бяха съответно средна 7.8 pg/ml и медиана 7.5 pg/ml. Сравнението на концентрациите на TNF- α по генотипи между пациентите с ДМ и контролите не показва статистически значими разлики. Влиянието на външните фактори върху секрецията на TNF- α при носителите на *TNFA* -308AA, -1031CC и 863AA не можеше да бъде оценено, тъй като тези генотипи се срещат с много ниска честота.

1.1.2.2. Влияние на хаплотипните комбинации в *TNFA* гена върху продукцията на TNF- α

Комбинацията от алелите на полиморфни позиции води до формиране на различни хаплотипи, които имат отношение към нивото на протеинова секреция. Тъй като отделните полиморфизми допринасят в различна степен за нивата на TNF- α , при генотипния анализ не може да бъде избегната интерференция от влиянието на различните генотипи. 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 17:

Таблица 17. Разширени генотипи за *TNFA* -1031/-863/-857/-308/-238/489 полиморфизмите. Представена е честотата на разширените генотипи сред изследваната кохорта и средна стойност, стандартно отклонение, медиана, минимална и максимална стойност на измерените серумни нива на TNF- α [pg/ml].

<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

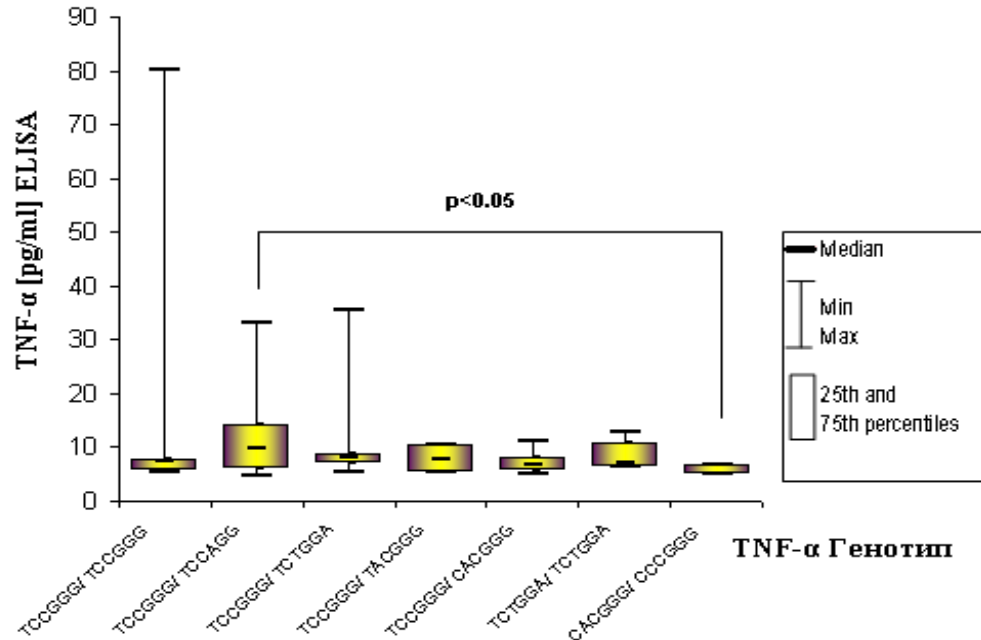
**Забележка – в по-тъмно черно са представени комбинациите, при които беше възможно реконструирането на хаплотипните секвенции, както е посочено в текста.*

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 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 18):

Таблица 18. 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 18), но статистическият анализ не показва значими различия между тях ($p > 0.05$). Статистически значима разлика беше установена единствено между хаплотипните двойки TCCGGG/TCCAGG и CACGGG/CCCGGG ($p = 0.03$), при които бяха установени съответно медиани 9.5 pg/ml и 6.7 pg/ml (фигура 17):



Фигура 17. 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 ($p = 0.03$). Различията между всички останали комбинации не достигнаха статистическа достоверност ($p > 0.05$)

За да бъде определена взаимовръзката между факторите на болестта и хаплотипната секреция на TNF- α , бяха разгледани и сравнени най-честите хаплотипни комбинации между здрави и болни, представени на таблица 19:

Таблица 19. Честота на *TNFA* 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	контроли		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

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 ($p=0.06$).

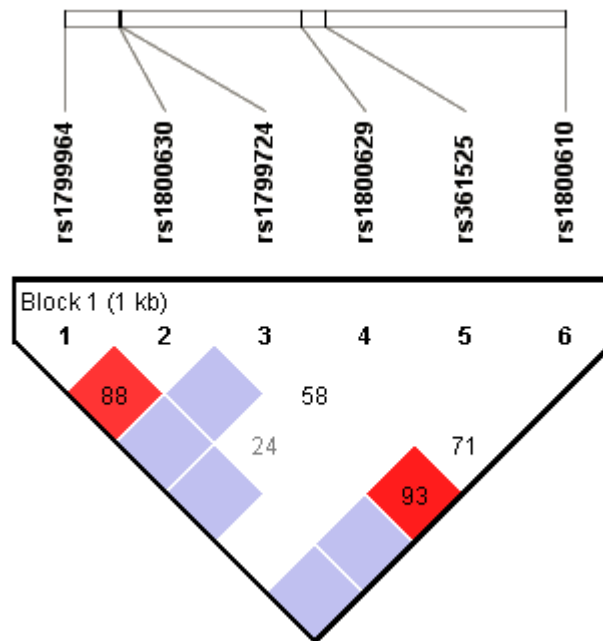
1.1.3. Генетичен анализ на полиморфизми в *TNFA* гена

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

В хода на настоящото проучване бе проведен анализ от вида случаи - контроли за връзката на шест единични нуклеотидни полиморфизма в *TNFA* гена (-1031C/T, -863C/A, -857C/T, -308G/A, -238G/A и 489G/A) с ДМ и СЛЕ. Честотата на полиморфизмите в цитокиновите гени бе проучена в група от 45 болни със СЛЕ и 33 пациента с ДМ и беше сравнена с тази на 79 здрави, неродствени индивиди.

Всички изследвани SNPs са в съответствие със закона на Hardy-Weinberg.

От изследваните полиморфизми в *TNFA* гена се откриха две двойки, които са в неравновесна връзка. Първата е между полиморфизмите *TNFA* -857T/C и *TNFA* 489G/A, при която се наблюдава почти пълна скаченост ($D^2=0.93$), а втората е между *TNFA* -1031T/C и *TNFA* -863C/A ($D^2=0.88$), установени с χ -квадрат чрез програма Haploview 4.2 (фигура 18):



Фигура 18. Неравновесна връзка (LD) между изследваните полиморфизми в *TNF-α* гена в 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.

Получените резултати относно генотипните и алелни честоти на всички изследвани единични нуклеотидни полиморфизми в *TNFA* гена при пациенти със СЛЕ и ДМ са обобщени в таблици 20 и 22. От всички изследвани полиморфизми единствено при разпределението на генотипите в *TNFA* -1031Т/С полиморфизма се установи статистически достоверна разлика между групата на пациентите със СЛЕ и контролната група ($p=0.046$). Сред пациентите със СЛЕ беше наблюдавана по-висока честота на -1031СС генотипа (6.7%) и по-ниска честота на -1031ТТ генотип (73.3%) в сравнение със здравите лица, за които стойностите бяха съответно 0% за генотип -1031СС и 77.7 % за генотип -1031ТТ. От направения статистически анализ се установи, че рискът от развитие на СЛЕ, свързани с -1031С алела, е почти два пъти по-висок (OR 1.78; 95%CI 0.86-3.66). При пациенти с ДМ генотопът -1031СС 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 *TNFA* 489GG в сравнение с контролите съответно 60.0% към 50.6% за генотип -857CC и 57.8% към 50.6% за генотип 489GG, което се свързва с повишен риск от заболяване, без 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). Когато пациентите бяха разделени по пол, се разкри, че при жени носителки на генотипите *TNFA* -857CC и *TNFA* 489GG рискът за развитие на СЛЕ е почти два пъти по-висок. (p=0.21, OR 1.78 95%CI 0.75-4.20, таблица 21). Носителството на генотипите *TNFA* -857CC и *TNFA* 489GG се свързва и с два пъти по-висок риск за развитие на ДМ (OR 1.95, 95%CI 0.83- 4.55; p=0.14, таблица 22), а при жени с ДМ носителство на тези генотипи води до трикратно повишен риск за развитие на болестта (OR 2.97 95%CI 0.95-9.26; p=0.21, таблица 23).

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 със здравите лица.

Честотата на -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 20. 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>rs1799964</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 21. Алелни и генотипни честоти на изследваните *TNFA* полиморфизми сред пациентки със СЛЕ и здрави жени.

Ген <i>TNFA</i> / полиморфизъм	Генотипи и алели		Група, брой (%)		OR	95% CI	p-стойност (точен тест на Фишер)
			Жени със СЛЕ (38)	Здрави жени (54)			
<i>rs1799964</i> <i>-1031T/C</i>	Генотипи	TT	27 (71.1)	38 (70.4)	1.03	0.41 – 2.57	1.0000
		TC	8 (21.0)	16 (29.6)	0.63	0.23 – 1.67	0.4707
		CC	3 (7.9)	0 (0.0)	NaN	0-NaN	0.0617
	Алели	T	81.6	85.2	0.67	0.35 – 1.69	0.5474
		C	18.4	14.8	1.39	0.59 – 2.85	
<i>rs1800630</i> <i>-863C/A</i>	Генотипи	CC	27 (71.1)	37 (73.4)	1.12	0.45– 2.79	0.8223
		CA	10 (26.3)	17 (31.5)	0.77	0.31 – 1.95	0.6475
		AA	1 (2.6)	0 (0.0)	NaN	0-NaN	0.4130
	Алели	C	84.2	84.3	0.99	0.44 – 2.22	1.0000
		A	15.8	15.7	1.01	0.44 – 2.25	
<i>rs1799724</i> <i>-857C/T</i>	Генотипи	CC	25 (65.8)	28 (51.9)	1.78	0.75 – 4.20	0.2048
		CT	9 (23.7)	23 (42.6)	0.42	0.17 – 1.05	0.0768
		TT	4 (10.5)	3 (5.5)	0.50	0.12 – 2.50	0.4416
	Алели	C	77.6	73.1	1.40	0.71 – 2.69	0.3978
		T	22.4	26.9	0.71	0.36 – 1.40	
<i>rs1800629</i> <i>-308G/A</i>	Генотипи	GG	30 (78.9)	39 (72.2)	1.44	0.54 – 3.84	0.6255
		GA	8 (21.1)	14 (25.9)	0.76	0.28– 2.04	0.6289
		AA	0 (0.0)	1 (1.9)	NaN	0-NaN	1.0000
	Алели	G	89.5	85.2	1.47	0.59 – 3.65	0.5063
		A	10.5	14.8	0.67	0.27 – 1.67	
<i>rs361525</i> <i>-238G/A</i>	Генотипи	GG	35 (92.1)	54 (100.0)	NaN	0-NaN	0.0817
		GA	3 (7.9)	0 (0.0)	NaN	0-NaN	0.0817
		AA	0 (0.0)	0 (0.0)	NaN	0-NaN	1.0000
	Алели	G	96.1	100.0	NaN	0-NaN	0.0639
		A	3.9	0.0			
<i>rs1800610</i> <i>489G/A</i>	Генотипи	GG	25 (65.8)	28 (51.9)	1.78	0.75 – 4.20	0.2048
		GA	9 (23.7)	23 (42.6)	0.42	0.17 – 1.05	0.0768
		AA	4 (10.5)	3 (5.5)	0.50	0.12 – 2.50	0.4416
	Алели	G	77.6	73.1	1.40	0.71 – 2.69	0.3978
		A	22.4	26.9	0.71	0.36 – 1.40	

Таблица 22. 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>rs1799964</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	

Таблица 23. Алелни и генотипни честоти на изследваните *TNFA* полиморфизми сред пациентки с ДМ и здрави жени.

Ген <i>TNFA</i> / полиморфизъм	Генотипи и алели		Група, брой (%)		OR	95% CI	p-стойност (точен тест на Фишер)
			Жени с ДМ (21)	Здрави жени (54)			
<i>rs1799964</i> <i>-1031T/C</i>	Генотипи	TT	16 (76.2)	38 (70.4)	1.34	0.42 – 4.30	0.7767
		TC	3 (14.3)	16 (29.6)	0.39	0.10 – 1.53	0.2405
		CC	2 (9.5)	0 (0.0)	NaN	0-NaN	0.0703
	Алели	T	83.3%	85.2%	1.29	0.48 – 3.43	0.6386
		C	16.7%	14.8%	0.78	0.29 – 2.06	
<i>rs1800630</i> <i>-863C/A</i>	Генотипи	CC	15 (71.4)	37 (73.4)	1.14	0.37 – 3.47	1.0000
		CA	5 (23.8)	17 (31.5)	0.68	0.21 – 2.16	0.5833
		AA	1 (4.8)	0 (0.0)	NaN	0-NaN	0.2800
	Алели	C	83.3%	84.3%	0.93	0.84 – 1.15	1.0000
		A	16.7%	15.7%	1.07	0.40 – 2.80	
<i>rs1799724</i> <i>-857C/T</i>	Генотипи	CC	16 (76.2)	28 (51.9)	2.97	0.95 – 9.26	0.0698
		CT	4 (19.0)	23 (42.6)	0.31	0.09 – 1.06	0.0660
		TT	1 (4.8)	3 (5.5)	0.85	0.08 – 8.66	1.0000
	Алели	C	85.7%	73.1%	2.20	0.84 – 5.77	0.1328
		T	14.3%	26.9%	0.45	0.17 – 1.18	
<i>rs1800629</i> <i>-308G/A</i>	Генотипи	GG	18 (85.7)	39 (72.2)	2.30	0.59 – 8.98	0.2499
		GA	2 (9.5)	14 (25.9)	0.60	0.62 – 1.45	0.2078
		AA	1 (2.8)	1 (1.9)	2.65	0.15 – 44.42	0.4843
	Алели	G	90.5%	85.2%	1.65	0.51 – 5.26	0.4400
		A	9.5%	14.8%	0.60	0.18 – 1.92	
<i>rs361525</i> <i>-238G/A</i>	Генотипи	GG	21 (100.0)	54 (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	16 (76.2)	28 (51.9)	2.97	0.95 – 9.26	0.0698
		GA	4 (19.0)	23 (42.6)	0.31	0.09 – 1.06	0.0660
		AA	1 (4.8)	3 (5.5)	0.85	0.08 – 8.66	1.0000
	Алели	G	85.7%	73.1%	2.20	0.84 – 5.77	0.1328
		A	14.3%	26.9%	0.45	0.17 – 1.18	

1.1.3.2. Алелно и генотипно влияние на *TNFA* полиморфизмите върху клиничните признаци при СЛЕ

При проучването на връзката между изследваните SNPs и клиничните признаци при СЛЕ, бе установена единствено асоциация на носителството на -308GA генотип с наличието на артрит (OR 7.6, 95%CI 0.9-66.4; p=0.04, таблица 24).

Таблица 24. Генотипно разпределение на *TNFA* -308G/A полиморфизма при СЛЕ спрямо критериите на АСР.

<i>Генотип</i>	<i>GG (n=35)</i>	<i>GA (n=10)</i>	<i>p</i>
Кожен обрив	22 (62.9%)	7 (70.0%)	NS
Дискоиден обрив	7 (20.0%)	0 (0.0%)	NS
Фоточувствителност	23 (65.7%)	5 (50.0%)	NS
Афтоза	3 (8.6%)	0 (0.0%)	NS
Артрит	19 (54.3%)	9 (90.0%)	0.04**
Серозит	8 (22.9%)	3 (30.0%)	NS
Бъбречно засягане	35(100.0%)	10 (100.0%)	-
Неврологично засягане	7 (20.0%)	3 (30.0%)	NS
Хематологично засягане	9 (25.7%)	4 (40.0%)	NS
Имунологично засягане	35 (100.0%)	10 (100.0%)	NS
АНА	26 (74.3%)	8 (80.0%)	NS

*NS- статистически незначим резултат ** GA/GG

Между *TNFA* -1031T/C полиморфизма и клиничните признаци на СЛЕ не бяха открити асоциации (Таблица 25):

Таблица 25. Генотипно разпределение на *TNFA* -1031T/C полиморфизма при СЛЕ спрямо критериите на АСР.

<i>Генотип</i>	<i>TT (n=33)</i>	<i>TC (n=9)</i>	<i>CC (n=3)</i>	<i>p</i>
Кожен обрив	22 (66.7%)	6 (66.7%)	1 (33.3%)	NS*
Дискоиден обрив	3 (9.1%)	3 (33.3%)	1 (33.3%)	NS
Фоточувствителност	21 (63.6%)	5 (55.6%)	2 (66.7%)	NS
Афтоза	1 (3.0%)	2 (22.2%)	0 (0.0%)	NS
Артрит	21 (63.6%)	5 (55.6%)	2 (66.7%)	NS
Серозит	8 (24.2%)	2 (22.2%)	1 (33.3%)	NS
Бъбречно засягане	33 (100.0%)	9 (100.0%)	3 (100.0%)	-
Неврологично засягане	9 (27.3%)	1 (11.1%)	0 (0.0%)	NS
Хематологично засягане	10 (30.3%)	2 (22.2%)	1 (33.3%)	NS
Имунологично засягане	33 (100.0%)	9 (100.0%)	3 (100.0%)	NS
АНА	24 (72.7%)	7 (77.8%)	3 (100.0%)	NS

NS*- статистически незначим резултат

Генотипният анализ относно -863C/A полиморфизма не показва асоциации със СЛЕ (таблица 26):

Таблица 26. Генотипно разпределение на *TNFA* -863C/A полиморфизма при СЛЕ спрямо критериите на ACR.

<i>Генотип</i>	<i>CC (n=33)</i>	<i>CA (n=11)</i>	<i>AA (n=1)</i>	<i>p</i>
Кожен обрив	21 (63.6%)	7 (63.6%)	1 (100.0%)	NS*
Дискоиден обрив	4 (12.1%)	2 (18.2%)	1 (100.0%)	NS
Фоточувствителност	22 (66.7%)	5 (45.5%)	1 (100.0%)	NS
Афтоза	2 (6.1%)	1 (9.1%)	0 (0.0%)	NS
Артрит	22 (66.7%)	5 (45.5%)	1 (100.0%)	NS
Серозит	9 (27.3%)	2 (18.2%)	0 (00.0%)	NS
Бъбречно засягане	33 (100.0%)	11 (100.0%)	1 (100.0%)	-
Неврологично засягане	8 (24.2%)	2 (18.2%)	0 (0.0%)	NS
Хематологично засягане	10 (30.3%)	3 (30.0%)	0 (0.0%)	NS
Имунологично засягане	33 (100.0%)	11 (100.0%)	1 (100.0%)	NS
АНА	24 (72.7%)	9 (81.8%)	1 (100.0%)	NS

*NS- статистически незначим резултат

Поради наличната силна неравновесна връзка между полиморфизмите *TNFA* -857C/T и 489G/A, получените резултати бяха сходни и не показаха асоциация с клиничните параметри при СЛЕ.

Таблица 27. Генотипно разпределение на *TNFA* -857C/T и *TNFA* 489G/A полиморфизмите при СЛЕ спрямо критериите на ACR.

<i>Генотип</i>	<i>-857CC</i>	<i>-857CT</i>	<i>-857TT</i>	<i>p</i>	<i>489GG</i>	<i>489GA</i>	<i>489AA</i>	<i>p</i>
<i>Клинични прояви</i>	<i>(n=27)</i>	<i>(n=14)</i>	<i>(n=4)</i>		<i>(n=26)</i>	<i>(n=15)</i>	<i>(n=4)</i>	
Кожен обрив	19 (70.4%)	6 (42.9%)	4 (100.0%)	NS*	18 (69.2%)	7 (46.7%)	4 (100.0%)	NS
Дискоиден обрив	3 (11.1%)	4 (28.6%)	0 (0.0%)	NS	3 (11.5%)	4 (26.7%)	0 (0.0%)	NS
Фоточувствителност	18 (66.7%)	6 (42.9%)	4 (100.0%)	NS	17 (65.4%)	7 (46.7%)	4 (100.0%)	NS
Афтоза	1 (3.7%)	2 (14.3%)	0 (0.0%)	NS	1 (3.9%)	2 (13.3%)	0 (0.0%)	NS
Артрит	16 (59.3%)	9 (64.3%)	3 (75.0%)	NS	16 (61.5%)	9 (60.0%)	3 (75.0%)	NS
Серозит	5 (18.5%)	5 (35.7%)	1 (25.0%)	NS	5 (19.2%)	5 (33.3%)	1 (25.0%)	NS
Бъбречно засягане	27 (100.0%)	14 (100.0%)	4 (100.0%)	-	26 (100.0%)	15 (100.0%)	4 (100.0%)	-
Неврологични прояви	7 (25.9%)	3 (21.4%)	0 (0.0%)	NS	7 (26.9%)	3 (20.0%)	0 (0.0%)	NS
Хематологични прояви	7 (25.9%)	6 (42.9%)	0 (0.0%)	NS	7 (26.9%)	6 (40.0%)	0 (0.0%)	NS
Имунологични прояви	27 (100.0%)	14 (100.0%)	4 (100.0%)	NS	26 (100.0%)	15 (100.0%)	4 (100.0%)	NS
АНА	20 (74.1%)	11 (78.6%)	3 (75.0%)	NS	20 (76.9%)	11 (73.3%)	3 (75.0%)	NS

*NS- статистически незначим резултат

1.1.3.3. Алелно и генотипно влияние на *TNFA* полиморфизмите върху клиничните признаци при ДМ

При проучването на връзката между изследваните единични нуклеотидни полиморфизми и клиничните белези при ДМ не бяха установени асоциации, но статистическият анализ разкри, че носителството на алел -863А в комбинацията от доминантния (СА+АА) спрямо СС генотипа е с по-висока честота сред пациенти с ЕМГ промени при ДМ спрямо тези без такива (OR 4.0, 95%CI 0.84-19.2; p=0.077, таблица 28).

Таблица 28. Генотипно разпределение на *TNFA* -863С/А полиморфизма спрямо клиничните признаци при ДМ.

<i>Генотип</i>	<i>СС (n=21)</i>	<i>СА (n=11)</i>	<i>АА (n=1)</i>	<i>p</i>
Мускулна слабост	15 (71.4%)	8 (72.7%)	1 (100.0%)	NS*
Повишени мускулни ензими	10 (47.6%)	7 (63.6%)	1 (100.0%)	NS
ЕМГ промени	9 (42.9%)	8 (72.7%)	1 (100.0%)	NS (0.077) **
Кожна болест	15 (71.4%)	10 (90.9%)	1 (100.0%)	NS
Фоточувствителност	13 (61.9%)	6 (54.6%)	1 (100.0%)	NS
Имунологично засягане	4 (19.1%)	2 (18.2%)	0(0.0%)	NS

*NS- статистически незначим резултат ** СА+АА/СС

Между *TNFA* -1031Т/С полиморфизма и клиничните признаци на ДМ не бяха открити асоциации (Таблица 29):

Таблица 29. Генотипно разпределение на *TNFA* -1031Т/С полиморфизма спрямо клиничните признаци при ДМ.

<i>Генотип</i>	<i>ТТ (n=23)</i>	<i>ТС (n=8)</i>	<i>СС (n=2)</i>	<i>p</i>
Мускулна слабост	17 (73.9%)	7 (87.5%)	2 (100.0%)	NS
Повишени мускулни ензими	12 (47.6%)	4 (63.6%)	2 (100.0%)	NS
ЕМГ промени	12 (42.9%)	6 (75.0%)	1 (50.0%)	NS
Кожна болест	17 (73.9%)	7 (87.5%)	2 (100.0%)	NS
Фоточувствителност	14 (60.9%)	5 (62.5%)	1 (50.0%)	NS
Имунологично засягане	4 (19.1%)	2 (18.2%)	0(0.0%)	NS

*NS- статистически незначим резултат

Поради наличната силна неравновесна връзка между полиморфизмите *TNFA* -857С/Т и *TNFA* 489G/А, получените резултати бяха напълно идентични и не показаха асоциация с клиничните параметри на ДМ (таблица 30):

Таблица 30. Генотипно разпределение на *TNFA* -857C/T и *TNFA* 489G/A полиморфизмите спрямо клиничните признаци при ДМ.

<i>Генотип</i>	<i>-857CC/ 489GG</i> (<i>n=22</i>)	<i>-857CT/ 489GA</i> (<i>n=10</i>)	<i>-857TT/ 489AA</i> (<i>n=1</i>)	<i>p</i>
Мускулна слабост	17 (77.3%)	7 (70.0%)	1 (100.0%)	NS*
Повишени мускулни ензими	14 (63.6%)	4 (40.0%)	0 (0.0%)	NS
ЕМГ промени	12 (54.5%)	5(50.0%)	1 (100.0%)	NS
Кожна болест	18 (81.8%)	7 (70.0%)	1 (100.0%)	NS
Фоточувствителност	13 (59.1%)	7 (70.0%)	0 (0.0%)	NS
Имунологично засягане	4 (18.2%)	2 (20.0%)	0(0.0%)	NS

*NS- статистически незначим резултат

Между *TNFA* -308G/A полиморфизма и клиничните признаци на дерматомиозит не се установиха асоциации (Таблица 31):

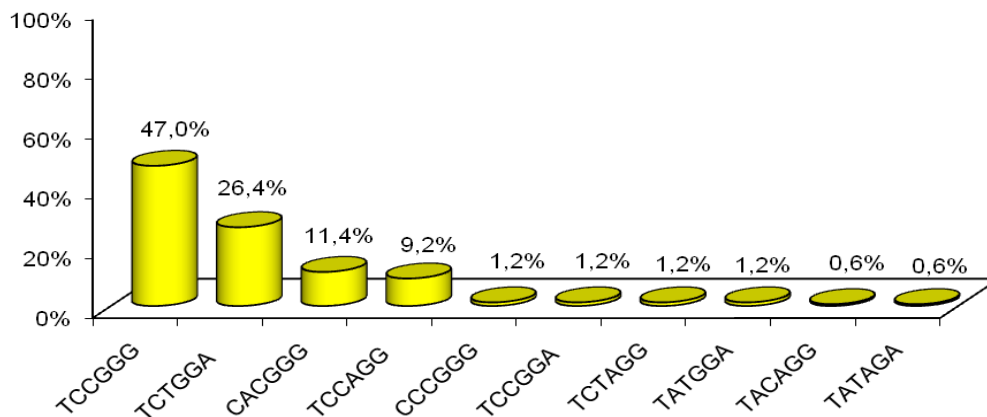
Таблица 31. Генотипно разпределение на *TNFA* -308G/A полиморфизма спрямо клиничните признаци при ДМ.

<i>Генотип</i>	<i>GG (n=28)</i>	<i>GA (n=4)</i>	<i>AA (n=1)</i>	<i>p</i>
Мускулна слабост	13 (46.4%)	4 (100.0%)	0 (0.0%)	NS*
Повишени мускулни ензими	14 (50.0%)	4 (100.0%)	0 (0.0%)	NS
ЕМГ промени	13 (46.4%)	4 (100.0%)	0 (0.0%)	NS
Кожна болест	23 (82.1%)	3 (75.0%)	1 (100.0%)	NS
Фоточувствителност	16 (57.1%)	3 (75.0%)	1 (100.0%)	NS
Имунологично засягане	5 (17.9%)	1 (25.0%)	0(0.0%)	NS

*NS- статистически незначим резултат

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

На базата на данните от генотипния анализ на изледваните 6 SNPs в *TNFA* гена бяха реконструирани 10 хаплотипа с помощта на софтуерна програма PHASE. Разпределението им е показано на фигура 19. Категоричен превес показва хаплотипът TCCGGG с честота от 47.0%, следван от TCTGGA 26.4%, CACGGG 11.4% и TCCAGG 9.2% (фигура 19). Хаплотипите CCCGGGG, TCCGGA, TCTAGG, TATGGA, TACAGG, TATAGA показаха честота под 3%.



Фигура 19. Честотно разпределение на хаплотипи *TNFA* -1031/-863/-857/-308/-238/489 сред здрави лица.

Сравнението на хаплотипите между здравите индивиди и пациентите със СЛЕ и ДМ чрез програма Haploview 4.2. 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 здравите лица - хаплотип TACGGG. При сравняване на честота между изследваните групи пациенти и здрави индивиди не се установиха статистически значими различия, което е демонстрирано на фигури 20 и 21.

Haplotype	Freq.	Case, Control Ratios	Chi Square	p value
Haplotype Associations				
Block 1				
TCCGGG	0.470	0.472, 0.470	0.001	0.9769
TCTGGA	0.245	0.211, 0.265	0.899	0.3431
CACGGG	0.118	0.122, 0.115	0.027	0.8701
TCCAGG	0.093	0.094, 0.092	0.004	0.9491
CCCGGG	0.021	0.034, 0.013	1.222	0.2691
TCCGGA	0.010	0.006, 0.013	0.296	0.5863

Фигура 20. *TNFA* -1031/-863/-857/-308/-238/489 хаплотипи при болни със СЛЕ и здрави лица. Представени са общите хаплотипи между пациентите със СЛЕ и здравите индивиди, общата им честота за двете групи, честотата при пациентите, честотата при контролите, χ -стойността и p-стойността.

Haplotype	Freq.	Case, Control Ratios	Chi Square	p value
Haplotype Associations				
Block 1				
TCCGGG	0.486	0.529, 0.467	0.733	0.3919
TCTGGA	0.234	0.162, 0.266	2.869	0.0903
CACGGG	0.125	0.147, 0.115	0.438	0.5083
TCCAGG	0.092	0.088, 0.093	0.016	0.9006
CCCGGG	0.018	0.030, 0.013	0.719	0.3964
TACGGG	0.014	0.030, 0.007	1.687	0.194

Фигура 21. *TNFA* -1031/-863/-857/-308/-238/489 хаплотипи при болни с ДМ и здрави индивиди. Представени са общите хаплотипи между пациентите с ДМ и здравите индивиди, общата им честота за двете групи, честотата при пациентите, честотата при контролите, χ -стойността и р-стойността.

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 ($p=0.038$), така и с ДМ ($p=0.007$) (фигури 22 и 23):

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 22. *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 спрямо честотата при здравите жени, χ -стойността и р-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 23. *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 р-стойността.

1.2. ИНТЕРЛЕВКИН 6 (IL-6)

1.2.1. Асоциативно проучване на IL-6 -174 G/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 32. 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=0.12). Високопродуциращият -174G алел 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 32).

Таблица 32. Генотипни и алелни честоти на IL-6 -174G/C полиморфизма при пациенти със СЛЕ и здрави лица.

Ген IL-6/ 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 33), която се запази и след корекция по Bonferroni (p=0.01).

Таблица 33. 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	

Честотата на -174GG генотипа и сред пациентите с ДМ и сред контролите е 40%. Разпределението в честотите на -174GC и -174CC генотипите също не показва значими различия. За алелите G и C не беше установена връзка със заболяването (таблица 34).

Таблица 34. Генотипни и алелни честоти на *IL-6 -174G/C* полиморфизма при пациенти с ДМ и здрави лица.

Ген <i>IL-6/</i> полиморфизъм	Генотипи и Алели		Група, брой (%)		OR	95% CI	p-стойност (точен тест на Фишер)
			ДМ (35)	Контроли (80)			
<i>rs1800795</i> <i>-174G/C</i>	Генотипи	GG	14 (40.0)	32 (40.0)	1.00	0.44 – 2.24	1.0000
		GC	11 (31.4)	21 (26.3)	1.28	0.53 – 3.07	0.6523
		CC	10 (28.6)	27 (33.7)	0.78	0.32 – 1.86	0.6675
	Алели	G	55.7%	53.1%	1.13	0.64 – 1.99	0.6703
		C	44.3%	46.9%	0.87	0.50 – 1.54	

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

Между *IL-6 -174G/C* полиморфизма и клиничните прояви на СЛЕ не бяха установени асоциации (таблица 35):

Таблица 35. Генотипно разпределение на *IL-6* -174G/C полиморфизма при СЛЕ спрямо критериите на ACR

<i>Генотип</i>	<i>GG (n=29)</i>	<i>GC (n=13)</i>	<i>CC (n=10)</i>	<i>p-стойност</i>
Кожен обрив	20 (69.0%)	5 (38.5%)	9 (90.0%)	NS
Дискоиден обрив	6 (20.7%)	3 (23.1%)	0 (0.0%)	NS
Фоточувствителност	17 (58.6%)	8 (61.5%)	5 (50.0%)	NS
Артрит	18 (56.5 %)	9 (69.2%)	7 (70.0%)	NS
Серозит	6 (20.7%)	4 (30.8%)	1 (11.1%)	NS
Бъбречно засягане	29 (100.0%)	13 (100.0%)	10 (100.0%)	-
Неврологично засягане	6 (26.1%)	2 (15.4%)	2 (20.0%)	NS
Хематологично засягане	11 (37.9%)	4 (30.8%)	5 (50.0%)	NS
Имунологично засягане	20 (69.0%)	6 (46.2%)	6(60.0%)	NS
АНА	22 (75.9%)	7 (53.8%)	7 (70.0%)	NS

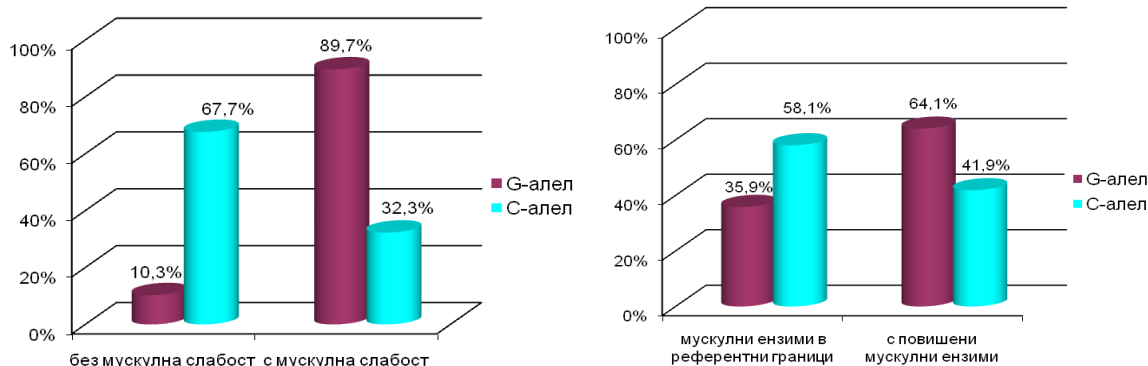
*NS- статистически незначим резултат

При болните с ДМ -174G алелът показва асоциация с наличието на мускулна слабост (OR 4.2, 95%CI 1.2-15; p=0.023, таблица 37) и тенденция към асоциация с повишените нива на мускулните ензими (OR 2.5, 95%CI 0.9-6.5; p=0.054, таблица 36). За яснота на получените резултати допълнително на фигура 24 е представено процентното алелно разпределение за установените асоциации.

Таблица 36. Генотипно разпределение на *IL-6* -174G/C полиморфизма спрямо клиничните признаци при дерматомиозит.

<i>Генотип</i>	<i>GG (n=14)</i>	<i>GC (n=11)</i>	<i>CC (n=10)</i>	<i>p-стойност</i>
Мускулна слабост	12 (85.7%)	11 (100.0%)	5 (50.0%)	G-p=0.023
Повишени мускулни ензими	8 (57.1%)	9 (81.8%)	2 (20.0%)	G-p=0.054
ЕМГ промени	7 (50.0%)	8 (72.7%)	5 (50.0%)	NS*
Кожна болест	11 (78.6%)	9 (81.8%)	7 (70.0%)	NS
Фоточувствителност	10 (71.4%)	6 (54.5%)	5 (50.0%)	NS
Имунологично засягане	3 (21.4%)	4 (36.4%)	2 (20.0%)	NS

*NS- статистически незначим резултат

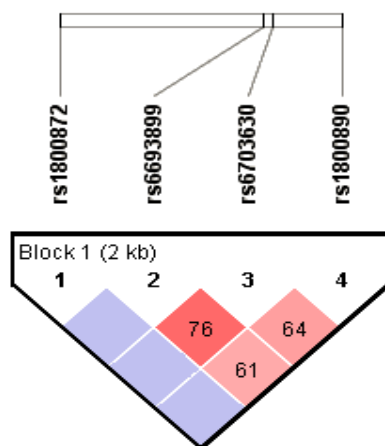


Фигура 24. Алелно разпределение на *IL-6* -174G/C полиморфизма според А. наличие и отсъствие на мускулна слабост Б. наличие или отсъствие на повишени мускулни ензими.

1.3. ИНТЕРЛЕВКИН IL-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 изследване на връзката на четири полиморфизма в *IL-10* гена (-3575Т/А, -2763С/А, -2849G/А и -592С/Т) с предразположението за появата на ДМ и СЛЕ и клиничните им прояви. Всички изследвани SNPs в гена на *IL-10* бяха в съответствие със закона на Hardy-Weinberg. Между IL-10 -2763С/А и IL-10 -2849 G/А полиморфизма беше установена неравновесна връзка ($D'=0.76$) (фигура 25). Останалите двойки сред дисталните полиморфизми също показаха скаченост, но с по-ниска степен (фигура 25).



Фигура 25. Представена е неравновесната връзка (LD) на изследваните полиморфизми в *IL-10* гена в здрави индивиди от българската популация. Всеки квадрат представя силата на LD [D'] между съответната двойка полиморфизми, изразена цифрово. Тъмните квадрати демонстрират скачеността между дисталните промоторни полиморфизми, което стои в основата на изграждането на хаплотипи с различно функционално значение.

Наблюдаваните алелни и генотипни честоти на изследваните *IL-10* полиморфизми сред пациентите със СЛЕ са представени в таблица 37. Никой от изследваните полиморфизми не показва асоциация със заболяването. Установено беше, че -3575Т алелът се свързва с по-висок риск за възприемчивост към СЛЕ (OR 1.44, 95% CI 0.78-2.65). Статистическият анализ разкри, че -2849GG генотипът, както и -2849G алелът водят до двукратно по-висок риск за развитие на СЛЕ (съответно OR 2.03, 95% CI 0.78-5.26 и OR 1.82, 95% CI 0.75-4.44). Генотипът -2849AA пък показва по-висока честота сред здравите индивиди (6%) в сравнение с болните, сред които той не беше наблюдаван. Алелът -2849А сред здравите индивиди също преобладаваше в сравнение с пациентите със СЛЕ (16.9% към 7.8% таблица 37).

Таблица 37. 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	

Въпреки че никой от изследваните полиморфизми не показва асоциация със СЛЕ, трябва да се отбележи, че честотата на комбинацията от генотипите -592AA и -592CA се оказва по-висока сред пациентите със СЛЕ (48.9%) спрямо здравите лица (36.4%), което съответства на повишен риск за развитието на болестта (OR 1.67, 95%CI 0.8-3.5).

Таблица 38. 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	

От направения статистически анализ на дисталните промоторни полиморфизми 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 38).

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

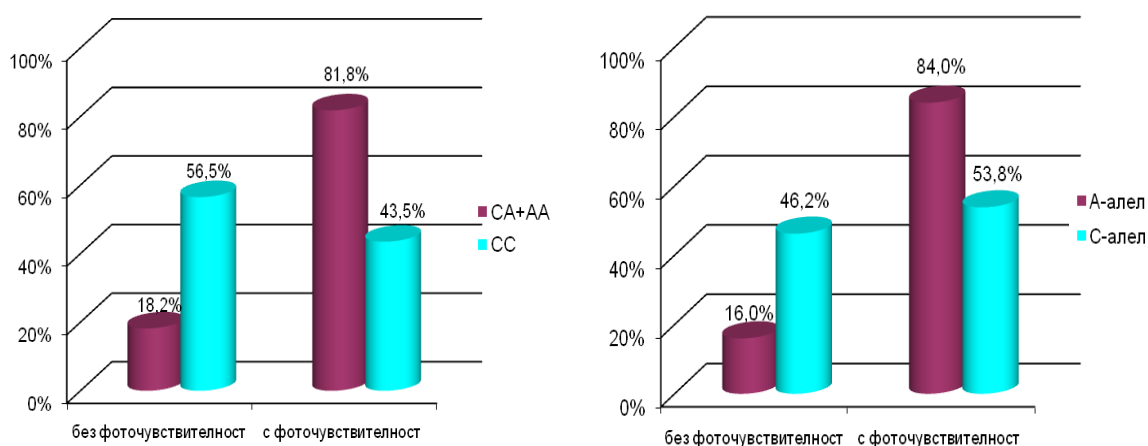
За *IL-10* полиморфизмите и клиничните прояви при СЛЕ съгласно критериите на Американския колеж по ревматология се установиха асоциации, както за изследвания проксимален промоторен полиморфизъм, така за дисталните полиморфизми.

Присъствието на алел -592А в генотипите (AA+CA) и А-алелът показаха асоциация с наличието на фоточувствителност (OR 5.85, 95%CI 1.5-22.8; p=0.009 и съответно OR 4.5, 95%CI 1.4-14.6; p=0.007; таблица 39). За яснота процентното разпределение на получените асоциации е представено на фигура 26.

Таблица 39. Генотипно разпределение на *IL-10* -592C/A полиморфизма при СЛЕ спрямо критериите на ACR.

Генотип	CC (n=23)	CA (n=19)	AA (n=3)	p-стойност
Кожен обрив	16 (69.6%)	11 (57.9%)	2 (66.7%)	NS*
Дискоиден обрив	2 (8.7%)	4 (21.1%)	1 (33.3%)	NS
Фоточувствителност	10 (43.4%)	15 (78.9%)	3 (100.0%)	CA+AA - 0.009, A 0.007
Афтоза	1 (4.3%)	2 (10.5%)	0 (0.0%)	NS
Артрит	13 (56.5%)	13 (68.4%)	2 (66.7%)	NS
Серозит	3 (13.0%)	7 (36.8%)	1 (33.3%)	NS
Бъбречно засягане	23 (100.0%)	19 (100.0%)	3 (100.0%)	NS
Неврологично засягане	4 (17.4%)	5 (26.3%)	1(33.3%)	NS
Хематологично засягане	4 (17.4%)	7 (36.8%)	2 (66.7%)	NS
Имунологично засягане	23(100.0%)	19 (100.0%)	3 (100.0%)	NS
АНА	16 (69.6%)	16 (84.2%)	2 (66.7%)	NS

*NS- статистически незначим резултат



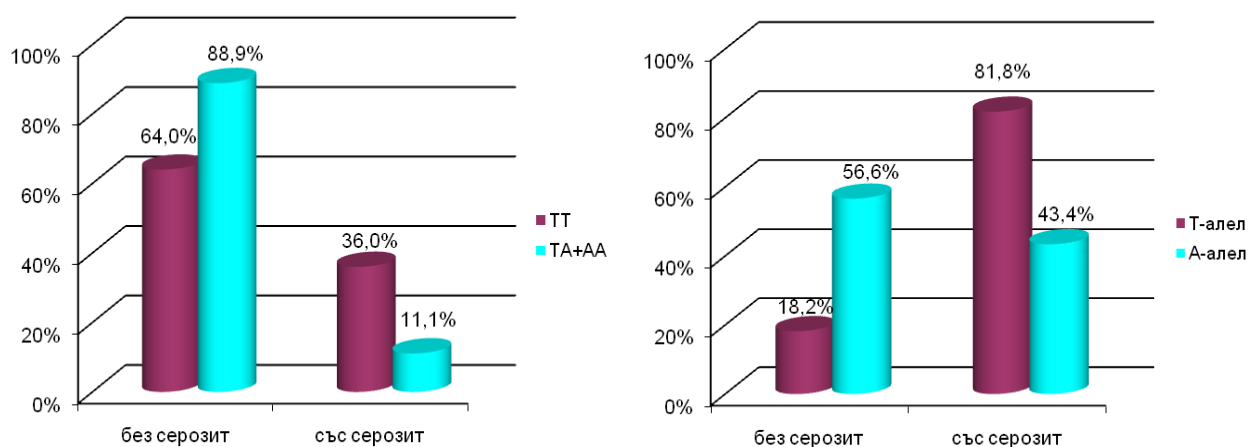
Фигура 26. Процентно разпределение на *IL-10* -592C/A полиморфизма според наличието и отсъствието на фоточувствителност при А. доминантен модел CA+AA/CC Б. за алелите -592С и -592А.

Намерена беше връзка между -3575ТТ генотипа и съответно Т-алела и наличието на серозит (за ТТ генотипа $p=0.045$, OR 5, 95%CI 0.95-27; за Т алела $p=0.044$, OR 4.2, 95%CI 0.9-19.5 таблица 40). За яснота на получените резултати процентното разпределение при установените асоциации е демонстрирано на фигура 27. Открита беше силна асоциация 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, фигура 28) и наличието на АНА (таблица 41). Заслужава да се отбележи фактът, че същият генотип, както и -2849G алелът показаха тенденция към асоциация с хематологичните показатели (за GG генотипа $p=0.07$; за G алела $p=0.08$) (таблица 41). За генотипа -2763CC и -2763C алела се установи асоциация с изявата 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 таблица 43). Процентното алелно и генотипно разпределение при установените асоциации е демонстрирано на фигура 29.

Таблица 40. Генотипно разпределение на *IL-10* -3575Т/А полиморфизма при пациенти със СЛЕ спрямо критериите на ACR.

Генотип	ТТ (n=25)	ТА (n=18)	АА (n=2)	p-стойност
Кожен обрив	16 (64.0%)	12 (66.7%)	1 (50.0%)	NS*
Дискоиден обрив	4 (16.0%)	3 (16.7%)	0 (0.0%)	NS
Фоточувствителност	16 (64.0%)	11 (61.1%)	1 (50.0%)	NS
Артрит	15 (62.5%)	12 (66.7%)	1 (50.0%)	NS
Серозит	9 (36.0%)	2 (11.1%)	0 (0.0%)	ТТ-p=0.045; Т-p=0.044
Бъбречно засягане	25 (100.0%)	18 (100.0%)	2 (100.0%)	NS
Неврологично засягане	6 (24.0%)	4 (22.2%)	0 (0.0%)	NS
Хематологично засягане	7 (28.0%)	5 (27.8%)	1 (50.0%)	NS
Имунологично засягане	25 (100.0%)	18 (100.0%)	2 (100.0%)	NS
АНА	20 (80.0%)	12 (66.7%)	2 (100.0%)	NS

*NS- статистически незначим резултат

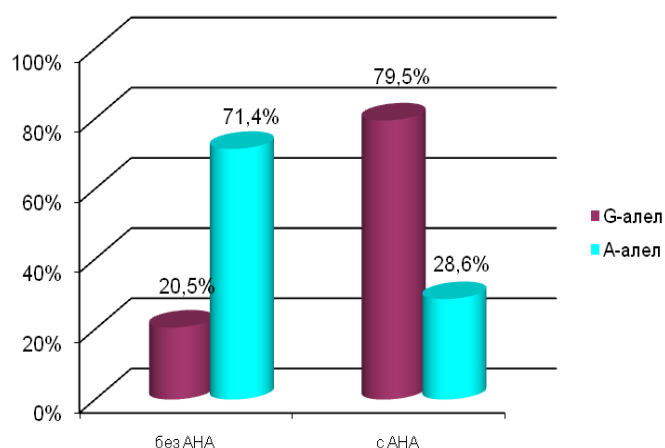


Фигура 27. Процентно разпределение на *IL-10* -3575Т/А полиморфизма според отсъствието или наличието на серозит при А. рецесивен модел ТТ/ТА+АА Б. за алелите -3575Т и -3575А.

Таблица 41. Генотипно разпределение на *IL-10* -2849G/A полиморфизма при пациенти със СЛЕ спрямо критериите на ACR.

<i>Генотип</i>	<i>GG (n=38)</i>	<i>GA (n=7)</i>	<i>p-стойност</i>
Кожен обрив	24 (63.2%)	5 (71.4%)	NS*
Дискоиден обрив	7 (18.4%)	0 (0.0%)	NS
Фоточувствителност	23 (60.5%)	5 (71.4%)	NS
Афтоза	3 (7.9%)	0 (0.0%)	NS
Артрит	25 (65.8%)	3 (42.9%)	NS
Серозит	11 (28.9%)	0 (0.0%)	NS
Бъбречно засягане	38 (100.0%)	7 (100.0%)	NS
Неврологично засягане	9 (23.7%)	1 (14.3%)	NS
Хематологично засягане	13 (34.2%)	0 (0.0%)	GG-p=0.07/G-p=0.08
Имунологично засягане	38 (100.9%)	7 (100.0%)	NS
АНА	32 (84.2%)	2 (28.6%)	GG-p=0.006/G-p=0.009

*NS- статистически незначим резултат

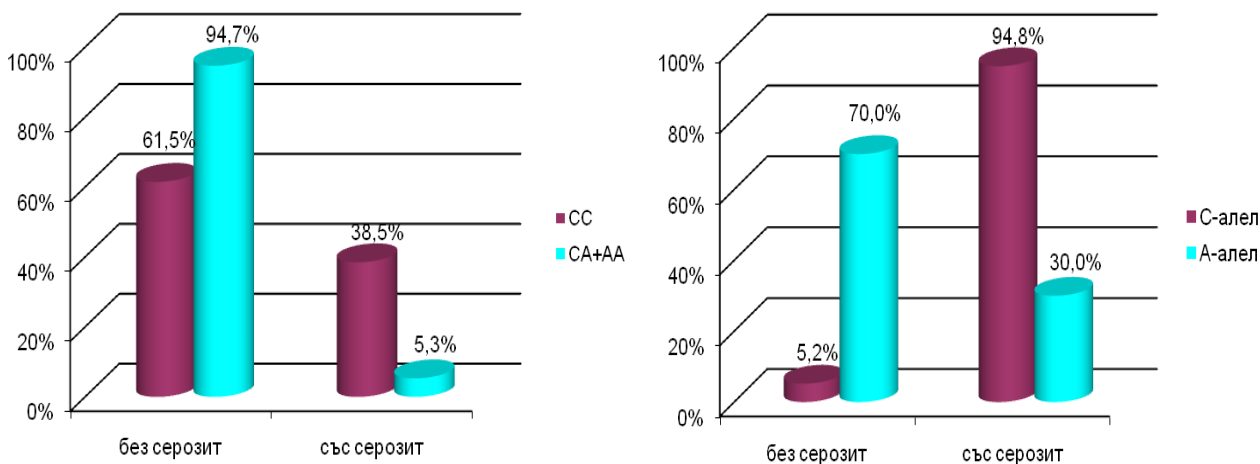


Фигура 28. Процентно разпределение на алелите -2849G и -2849A от *IL-10* -2849G/A полиморфизма сред пациенти със СЛЕ според отсъствието или наличието на АНА.

Таблица 42. Генотипно разпределение на *IL-10* -2763C/A полиморфизма спрямо критериите на ACR при пациенти със СЛЕ.

<i>Генотип</i>	<i>CC (n=26)</i>	<i>CA (n=18)</i>	<i>AA (n=1)</i>	<i>p-стойност</i>
Кожен обрив	16 (61.5%)	12 (66.7%)	1 (100.0%)	NS*
Дискоиден обрив	5 (47.6%)	2 (11.1%)	0 (0.0%)	NS
Фоточувствителност	17 (65.4%)	11 (61.1%)	0 (0.0%)	NS
Афтоза	3 (11.5%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	NS
Артрит	17 (65.4%)	10 (55.6%)	1 (100.0%)	NS
Серозит	10 (38.5%)	1 (5.6%)	0 (0.0%)	CC-p=0.01, C-p=0.016
Бъбречно засягане	26 (100.0%)	18 (100.0%)	1(100.0%)	NS
Неврологично засягане	5 (19.2%)	5 (27.8%)	0 (0.0%)	NS
Хематологично засягане	10 (38.5%)	2 (11.1%)	1 (100.0%)	NS
Имунологично засягане	26 (100.0%)	18 (100.0%)	1 (100.0%)	NS
АНА	21 (80.8%)	12 (66.7%)	1 (100.0%)	NS

*NS- статистически незначим резултат



Фигура 29. 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 на изследваните *IL-10* полиморфизми върху клиничните признаци при ДМ.

Между *IL-10* полиморфизмите и клиничните параметри при ДМ не бяха установени асоциации. Генотипните разпределения за проксималния полиморфизъм *IL-10* -592C/A и изследваните дистални полиморфизми са посочени съответно в таблици 43 и 44:

Таблица 43. Генотипно разпределение на *IL-10* -592C/A полиморфизма спрямо клиничните признаци на ДМ

Генотип	CC (n=19)	CA (n=13)	AA (n=1)	p-стойност
Мускулна слабост	17 (73.9%)	7 (87.5%)	2 (100.0%)	NS*
Повишени мускулни ензими	12 (47.6%)	4 (63.6%)	2 (100.0%)	NS
ЕМГ промени	12 (42.9%)	6 (75.0%)	1 (50.0%)	NS
Кожна болест	17 (73.9%)	7 (87.5%)	2 (100.0%)	NS
Фоточувствителност	14 (60.9%)	5 (62.5%)	1 (50.0%)	NS
Имунологично засягане	4 (19.1%)	2 (18.2%)	0(0.0%)	NS

*NS- статистически незначим резултат

Таблица 44. Генотипно разпределение на дисталните полиморфизми в промотора на *IL-10* гена спрямо клиничните признаци на ДМ

<i>Генотип</i>	<i>-3575TT</i> (<i>n=24</i>)	<i>-3575TA</i> (<i>n=7</i>)	<i>-3575AA</i> (<i>n=2</i>)	<i>p</i>	<i>-2849GG</i> (<i>n=23</i>)	<i>-2849GA</i> (<i>n=9</i>)	<i>-2849AA</i> (<i>n=1</i>)	<i>p</i>	<i>-2763CC</i> (<i>n=20</i>)	<i>-2763CA</i> (<i>n=13</i>)	<i>p</i>
Мускулна слабост	17 (73.9%)	7 (87.5%)	2 (100.0%)	NS*	18 (78.3%)	7 (77.8%)	1 (100.0%)	NS	17 (73.9%)	7 (87.5%)	NS
Повишени мускулни ензими	12 (47.6%)	4 (63.6%)	2 (100.0%)	NS	12 (52.2%)	5 (55.6%)	1(100.0%)	NS	12 (47.6%)	4 (63.6%)	NS
ЕМГ промени	12 (42.9%)	6 (75.0%)	1 (50.0%)	NS	12 (52.2%)	5 (55.6%)	1 (100.0%)	NS	12 (42.9%)	6 (75.0%)	NS
Кожна болест	17 (73.9%)	7 (87.5%)	2 (100.0%)	NS	19 (82.6%)	6 (55.6%)	1 (100.0%)	NS	17 (73.9%)	7 (87.5%)	NS
Фоточувствителност	14 (60.9%)	5 (62.5%)	1 (50.0%)	NS	14 (60.9%)	5 (55.6%)	1(100.0%)	NS	14 (60.9%)	5 (62.5%)	NS
Имунологична болест	4 (19.1%)	2 (18.2%)	0(0.0%)	NS	3 (13.0%)	4 (44.4%)	0(0.0%)	NS	4 (19.1%)	2 (18.2%)	NS

*NS- статистически незначим резултат

1.3.4. Хаплотипно разпределение на *IL-10 -3575/-2849/-2763/-592* при здрави и болни лица със СЛЕ и ДМ.

Хаплотипният анализ за изследваните *IL-10* полиморфизми не показва асоциация със СЛЕ (фигура 30). Хаплотипът *-3575/-2849/-2763/-592 > TGCC* показва слаба тенденция за асоциация с ДМ ($p=0.0647$) (фигура 31).

Haplotype	Freq.	Case, Control Ratios	Chi Square	p value
Haplotype Associations				
Block 1				
TGCC	0.415	0.429, 0.406	0.12	0.7293
TGCA	0.246	0.278, 0.227	0.781	0.3767
AGAC	0.116	0.114, 0.117	0.004	0.9513
AAAC	0.082	0.059, 0.095	0.958	0.3277
AGCC	0.060	0.066, 0.057	0.096	0.7565
TAAC	0.033	0.014, 0.044	1.569	0.2104
TGAC	0.028	0.035, 0.024	0.242	0.6226
AAAC	0.021	0.005, 0.030	1.862	0.1724

Фигура 30. *IL-10 -3575/-2849/-2763/-592* хаплотипи при болни със СЛЕ и здрави индивиди. Представени са общите хаплотипи между пациентите със СЛЕ и здравите индивиди, общата честота за двете групи, честота при пациентите със СЛЕ, честота при контролите, χ -стойността и p -стойността.

Haplotype	Freq.	Case, Control Ratios	Chi Square	p value
Haplotype Associations				
Block 1				
TGCC	0.448	0.543, 0.408	3.413	0.0647
TGCA	0.222	0.211, 0.226	0.059	0.8082
AGAC	0.106	0.067, 0.122	1.448	0.2288
AAAC	0.083	0.066, 0.091	0.369	0.5437
TAAC	0.050	0.062, 0.045	0.284	0.594
AGCC	0.041	0.010, 0.054	2.239	0.1345
AAAC	0.029	0.023, 0.032	0.143	0.7053
TGAC	0.016	0.001, 0.022	1.236	0.2663

Фигура 31. *IL-10 -3575/-2849/-2763/-592* хаплотипи 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 с ДМ, честота при контролите, χ -стойността и p -стойността.

Хаплотипът *IL-10 -3575T/-2763C* показва асоциация с ДМ ($p=0.0479$) (фигура 32), 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 32. 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 с ДМ, 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 ($p=0.012$).

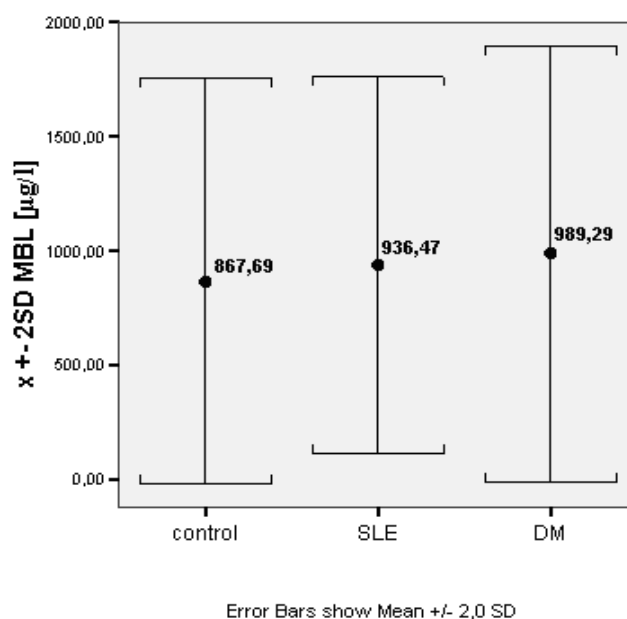
2. ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ МАНОЗО-СВЪРЗВАЩ ЛЕКТИН И ПОЛИМОРФИЗМИ В *MBL2* ГЕНА

2.1. Серумни нива на MBL

2.1.1. Серумни нива на MBL при изследваните здрави и болни 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 тестът на Колмогоров-Смирнов ($p > 0.05$) и на Shapiro-Wilk ($p > 0.05$) показаха, че разпределението на променливата - концентрация на MBL във всяка от изследваните групи е нормално, а тестът на Levene доказа, че между дисперсиите в изследваните групи не се установяват значими разлики, т.е. наличие на хомогенност.

Следователно за оценка на серумните нива беше проведен вариационен анализ One-Way ANOVA, който показва, че разликите в концентрациите в сравняваните групи не са сигнификантни $dF(2;88) = 0.285$; $p = 0.753$. Резултатите от изследваните серумни нива на MBL са представени на фигура 33.



Фигура 33. 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 на СЛЕ и ДМ

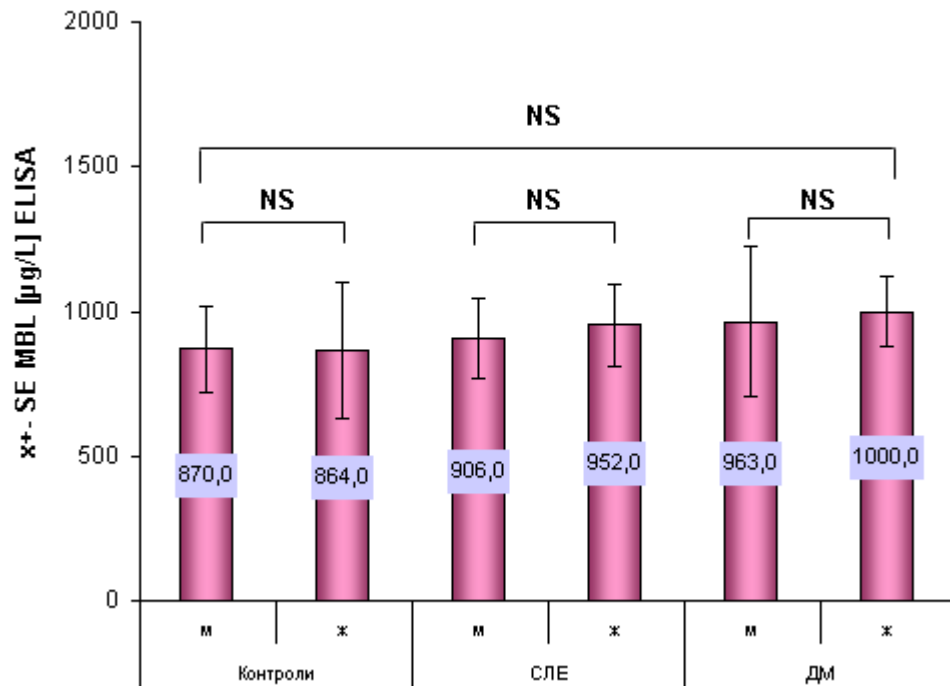
При изследване на връзката между серумните нива на MBL и клиничните признаци на изследваните заболявания, не бяха открити статистически значими резултати (таблица 45).

Таблица 45. Влияние на серумните нива на MBL върху клиничните признаци на изследваните заболявания. Сравнени са средните стойности в нивата на MBL между пациенти без и с наличие на посочения признак.

Клиничен признак СЛЕ	p-стойност	Клиничен признак ДМ	p-стойност
Кожен обрив	0.28	Мускулна слабост	0.61
Дискоиден обрив	0.84	Мускулни ензими	0.41
Фоточувствителност	0.19	ЕМГ промени	0.92
Артрит	0.51	Кожна болест	0.30
Серозит	0.12	Фоточувствителност	0.19
Бъбречно засягане	-	Имунологично засягане	0.79
Неврологично засягане	0.27		
Хематологично засягане	0.52		
Имунологично засягане	0.96		
АНА	0.96		

2.1.3. Влияние на пола и възрастта върху серумните нива на MBL

При здрави индивиди нивата на MBL при мъже и жени са сходни ($p=0.95$). При СЛЕ и ДМ средните стойности на MBL при жени са съответно 952 и 1000 $\mu\text{g/L}$ и са по-високи от тези при мъжете – 906 и 963 $\mu\text{g/L}$, но статистическият анализ не показва значими различия между половете в рамките на всяка от изследваните групи ($p=0.88$ за СЛЕ и $p=0.81$ за ДМ). При сравнение на серумните нива на MBL по пол между здрави индивиди и пациенти, също не бяха наблюдавани значими резултати (фигура 34).



Фигура 34. Сравнение на концентрациите на MBL по пол сред изследваните групи – здрави индивиди, пациенти със СЛЕ и ДМ. С NS е отбелязана липсата на статистически значима разлика в нивата на MBL при мъже и жени във всяка от изследваните групи, както и между групите по признак пол.

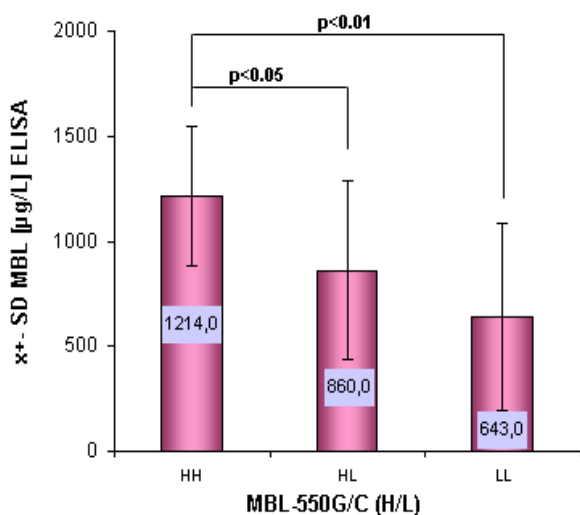
При провеждане на корелационен анализ между серумните нива на MBL и възрастта не беше установена връзка.

2.2. Влияние на *MBL2* полиморфизмите върху продукцията на MBL

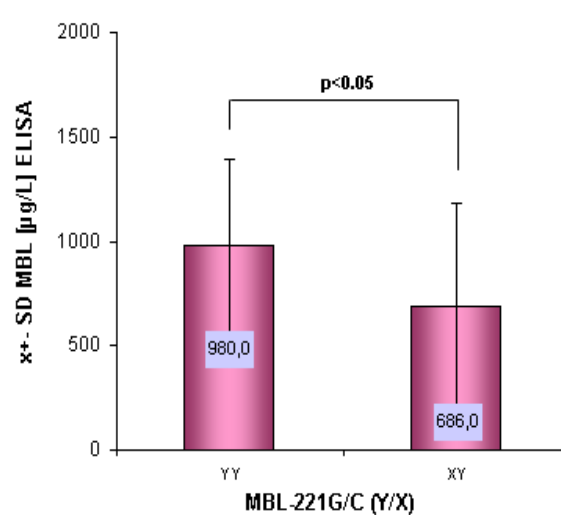
2.2.1. Генотипно влияние върху серумните нива на MBL при здрави и болни лица

Разпределението на серумните нива на MBL сред полиморфизмите беше правилно, поради което беше проведен вариационен анализ One-Way ANOVA за сравнение на множествени вариабилни и Т-независим тест в случаите за две вариабилни. От промоторните полиморфизми -221X алелът в най-голяма степен повлиява нивата на MBL. Индивидите, носители на -221XY генотипа показаха с 30% по-ниски нива в сравнение с -221YY генотипа ($p=0.048$) (фигура 46). 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 45). 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 47 и 48). От всички изследвани лица, носители на генотип 54BB бяха само двама мъже, при които беше отчетена концентрация 0 µg/L. Поради ниската честота на 54BB генотипа, той беше изключен от

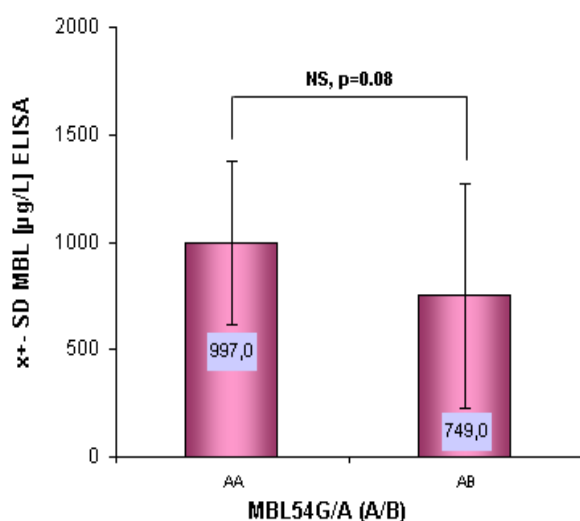
статистическия анализ. Поради своята мономорфност, 57A/C полиморфизмът не позволи да бъде определено значението му за серумните нива на MBL.



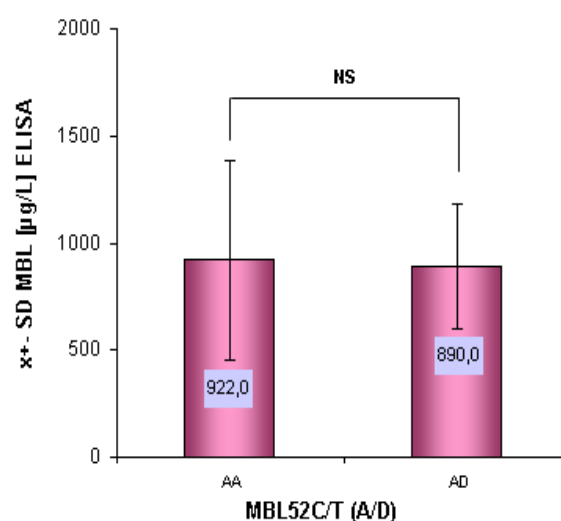
Фигура 45. Влияние на полиморфизма -550G/C върху продукцията на MBL в зависимост от генотипа



Фигура 46. Влияние на полиморфизма -221G/C върху продукцията на MBL в зависимост от генотипа



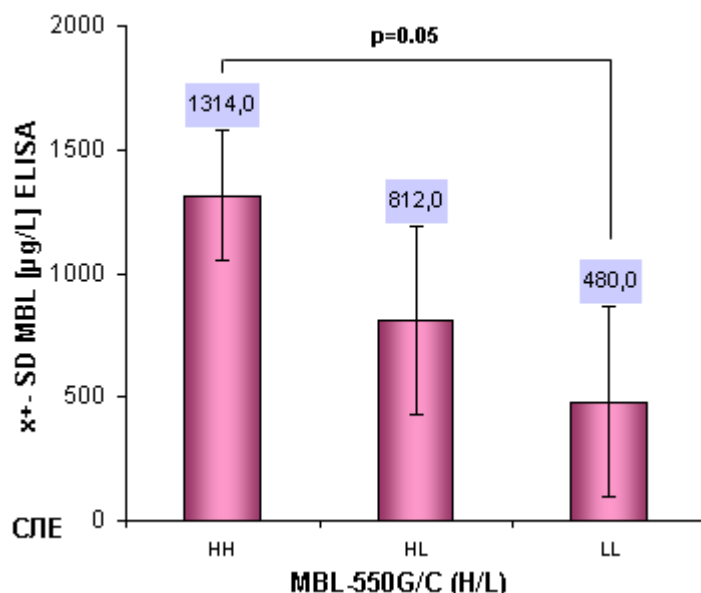
Фигура 47. Влияние на полиморфизма A/B в кодон 54 върху продукцията на MBL в зависимост от генотипа



Фигура 48. Влияние на полиморфизма A/D в кодон 52 върху продукцията на MBL в зависимост от генотипа

За да се оцени значението на генотипа върху продукцията на MBL при здрави индивиди и в условията на патологичен процес, изследваната кохорта беше разделена на 3 групи – пациенти със СЛЕ, ДМ и контроли. За всеки полиморфизъм бяха определени различията в нивата MBL между генотипите в рамките на всяка група чрез тест One way ANOVA. Така се установи наличие на статистически значима разлика в концентрациите на MBL за полиморфизма -550G/C (H/L) в групата на СЛЕ – $dF(2;30)=4,309$ $p=0.033$, докато в останалите две групи не се наблюдаваха подобни различия ($p=0.198$ за контролната група и

$p=0.202$ за пациентите с ДМ). Като следваща стъпка за групата на СЛЕ беше използван *post hoc* анализ (Bonferroni), който показва тенденция към значимост между високите нива свързани с -550НН генотипа и ниските нива характерни за -550LL ($p=0.053$) (фигура 49). Между генотипите НН и НL и НL и LL не се установиха значими разлики (съответно $p=0.089$ и $p=0.741$).



Фигура 49. Генотипно сравнение на концентрациите на MBL за -550Н/Л полиморфизма при пациенти със СЛЕ. Демонстрирана е установената статистически значима разлика в концентрациите на MBL между -550НН и -550LL генотипите.

Въпреки че и в трите изследвани групи по-високите нива на MBL преобладаваха сред индивидите с генотипи -221УУ, 52АА, 54АА спрямо генотипи -221ХУ, 52АD, 54АВ, в нито една от изследваните клинични групи, не се установиха статистически значими различия в серумните концентрации.

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 представени групи - СЛЕ, ДМ и контроли. Не бяха открити статистически значими различия при нито един от изследваните полиморфизми (таблица 46):

Таблица 46. Мултивариационен междугрупов анализ за сравнение на концентрацията на MBL по генотипи между изследваните групи. Използван One-Way ANOVA с корекция по Bonferroni

Полиморфизъм	Групи (сравнение)	Средна разлика за MBL	p-стойност
<i>MBL2</i> -550G/C (H/L)			
HH	Контроли : СЛЕ	-315,60000	0.47
	Контроли : ДМ	-387,60000	0.26
HL	Контроли : СЛЕ	-60,57143	1.00
	Контроли : ДМ	-46,76190	1.00
LL	Контроли : СЛЕ	-88,00000	1.00
	Контроли : ДМ	-610,66667	0.34
<i>MBL2</i> -221G/C (Y/X)			
YY	Контроли : СЛЕ	-159,65812	1.00
	Контроли : ДМ	-183,43590	0.83
XY	Контроли : СЛЕ	-325,33333	1.00
	Контроли : ДМ	-598,40000	0.51
<i>MBL2</i> 52 A/D			
AA	Контроли : СЛЕ	-182,40207	0.78
	Контроли : ДМ	-177,80472	0.24
<i>MBL2</i> 54 A/B			
AA	Контроли : СЛЕ	-182,40207	1.00
	Контроли : ДМ	-177,80472	1.00
AB	Контроли : СЛЕ	-42,66667	1.00
	Контроли : ДМ	-410,6667	0.75

2.2.2. Влияние на хаплотипните комбинации в *MBL2* гена върху секрецията на MBL

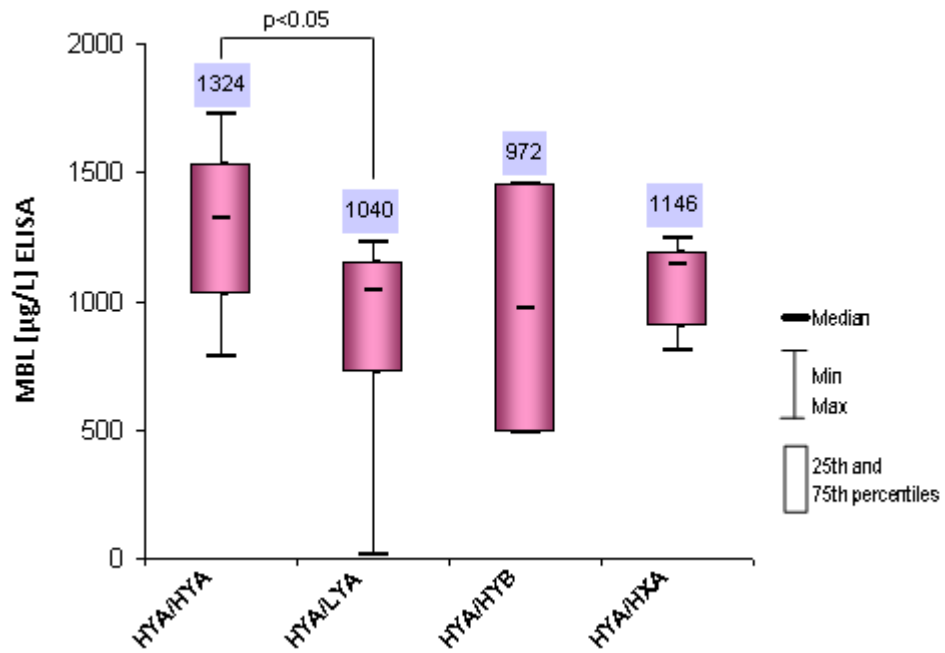
Комбинациите от промоторните и структурните полиморфизми води до формирането на т.нар. „секреторни хаплотипи”, които се свързват с различни нива на продукцията на MBL и честотата им варира сред различните популации. Получени бяха 14 комбинации от разширените генотипи, които са представени в таблица 47.

Таблица 47. MBL2 разширени генотипи, честота, концентрация на MBL [$\mu\text{g/L}$] –средна стойност, стандартно отклонение, медиана, минимална и максимална стойност.

<i>MBL2 -550/-221/ 223/230/239</i>	Честота	Средна	$\pm\text{SD}$	Медиана	Min	Max
550 (HL); 221 (XY); 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 (XY); 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 (XY); 52 (AA); 54 (AA); 57 (AA)	3.4%	900.4	393.7	1146.0	806.7	1246.4
550 (HL); 221 (XY); 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 (XY); 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

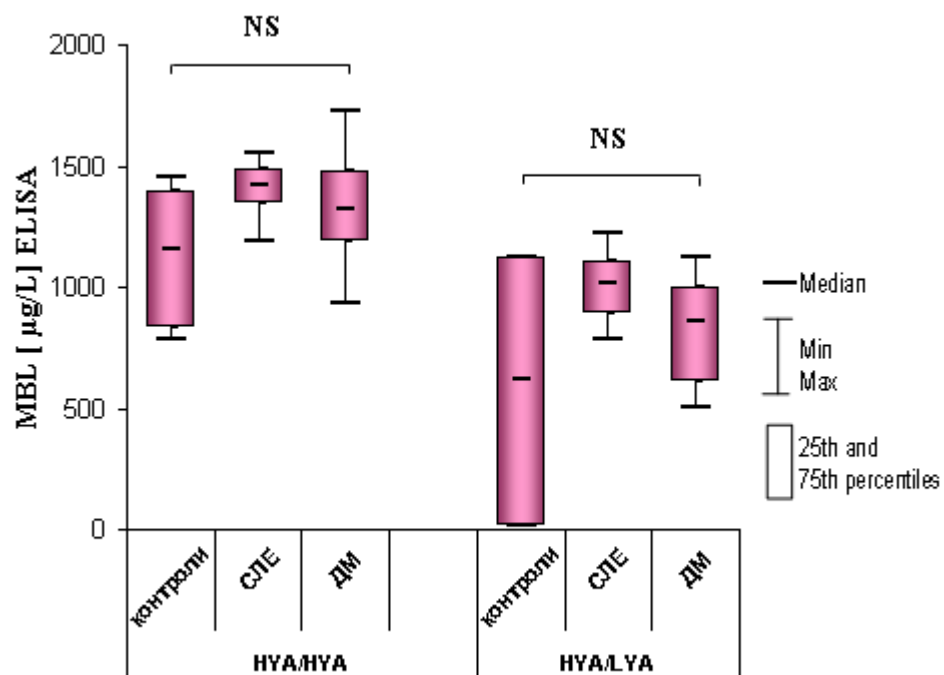
**Забележка – в по-тъмно черно са представени комбинациите, при които могат с точност да бъдат определени хаплотипните секвенции, както е посочено в текста.*

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 HYA/HYA и HYA/LYA (фигура 50):



Фигура 50. Сравнение на серумните концентрации на MBL в хаплотипни двойки за всички изследвани лица *MBL2* -550/-221/223/230/239. Представена е установената статистическа значимост в концентрацията на MBL между хаплотипните двойки HYA/HYA и HYA/LYA ($p<0.05$)

За да се определи взаимовръзката между хаплотипната секреция и влиянието на патологичния процес, бяха сравнени концентрациите на MBL по между здрави и болни лица за най-честите хаплотипи, но не беше установена значима разлика (фигура 51):



Фигура 51. Сравнение на концентрациите на MBL сред трите изследвани групи спрямо комбинацията от хаплотипи. Не беше открита статистическа значимост, което е отбелязано с NS.

2.3. Генетичен анализ на секреторните полиморфизми в *MBL2* гена

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

В хода на настоящото проучване бе проведено асоциативно проучване от типа случай - контрола за връзката на пет SNPs в *MBL2* гена -550G/C (H/L), -221G/C (Y/X), 223C/T (A/D), 230G/A (A/B), 239G/A (A/C) със СЛЕ и ДМ. Честотата на полиморфизмите бе проучена сред 45 болни със СЛЕ и 33 пациента с ДМ и беше сравнена с тази на 78 здрави лица. Полиморфизмът *MBL2* 57A/C показва мономорфност. Останалите изследвани SNPs бяха в съответствие със закона на Hardy-Weinberg. Наблюдаваните алелни и генотипни честоти на *MBL2* полиморфизмите сред пациенти със СЛЕ, ДМ и здрави лица са обобщени в таблици 48 и 49. Въпреки че никой от изследваните полиморфизми не показва асоциация с изучаваните болести, сред пациентите със СЛЕ се установи по-висока честота на генотипа -221XY, свързваща се с риск от 1.74 (OR 1.74, 95%CI 0.81-3.75, таблица 48).

Таблица 48. Генотипни и алелни честоти на изследваните полиморфизми в *MBL2* гена при пациенти със СЛЕ и здрави индивиди.

Ген <i>MBL2</i> / полиморфизъм	Генотипи и алели		Група, брой (%)		OR	95% CI	p-стойност (точен тест на Фишер)
			Пациенти СЛЕ (45)	Контроли (78)			
<i>rs11003125</i> -550G/C (H/L)	Генотипи	HH	13 (28.9)	26 (33.3)	0.81	0.36 – 1.80	0.6896
		HL	26 (57.8)	37 (47.5)	1.51	0.72 – 3.17	0.3493
		LL	6 (13.3)	15 (19.2)	0.64	0.23 – 1.80	0.4642
	Алели	H	57.8%	57.1%	1.03	0.60 – 1.74	1.0000
		L	42.2%	43.9%	0.97	0.57 – 1.64	
<i>rs17096206</i> -221G/C (Y/X)	Генотипи	YY	26 (57.8)	54 (69.2)	0.82	0.36 – 1.85	0.6803
		YX	19 (42.2)	23 (29.5)	1.74	0.81 – 3.75	0.1706
		XX	0 (0.0)	1 (1.3)	NaN	0-NaN	1.0000
	Алели	Y	78.9%	84.0%	0.71	0.36 – 1.38	0.3879
		X	21.1%	16.0%	1.40	0.72 – 2.72	
<i>rs5030737</i> 223C/T (A/D)	Генотипи	AA	36 (80.0)	66 (84.6)	0.72	0.27 – 1.88	0.6199
		AD	9 (20.0)	10 (12.8)	1.70	0.63 – 4.56	0.3095
		DD	0 (0.0)	2 (2.6)	NaN	0-NaN	0.5321
	Алели	A	90.0%	91.0%	1.03	0.42 – 2.49	1.0000
		D	10.0%	9.0%	0.96	0.40 – 2.34	
<i>rs1800450</i> 230C/T (A/B)	Генотипи	AA	34 (75.6)	57 (73.1)	1.13	0.48 – 2.64	0.8331
		AB	11 (24.4)	20 (25.6)	0.93	0.40 – 2.19	1.0000
		BB	0 (0.0)	1 (1.3)	NaN	0-NaN	1.0000
	Алели	A	87.8%	85.9%	1.17	0.54 – 2.56	0.7038
		B	12.2%	14.1%	0.84	0.39 – 1.84	

<i>rs1800451</i> 239 G/A (A/C)	Генотипи	AA	45 (100.0)	78 (100.0)	NaN	0-NaN	0.0791
		AC	0 (100.0)	0 (100.0)	NaN	0-NaN	0.0791
		CC	0(0.0)	0 (0.0)	NaN	0-NaN	1.0000
	Алели	A	100.0%	100.0%	NaN	0-NaN	1.0000
		C	0.0%	0.0%	NaN	0-NaN	

Таблица 49. Генотипни и алелни честоти на изследваните полиморфизми в *MBL2* гена при пациенти с ДМ и здрави индивиди.

Ген <i>MBL2</i> / полиморфизъм	Генотипи и алели		Група, брой (%)		OR	95% CI	p-стойност (точен тест на Фишер)
			Пациенти с ДМ (33)	Контроли (78)			
<i>rs11003125</i> -550G/C (H/L)	Генотипи	HH	14 (42.4)	26 (33.3)	1.47	0.63 – 3.99	0.3924
		HL	16 (48.5)	37 (47.5)	1.04	0.46 – 2.35	1.0000
		LL	3 (9.1)	15 (19.2)	0.42	0.11 – 1.56	0.2624
	Алели	H	66.7%	57.1%	1.51	0.82 – 2.74	0.2306
		L	33.3%	43.9%	0.66	0.36 – 1.21	
<i>rs17096206</i> -221G/C (Y/X)	Генотипи	YY	22 (66.7)	54 (69.2)	0.88	0.37 – 2.11	0.8253
		YX	11 (33.3)	23 (29.5)	1.19	0.49 – 2.86	0.8220
		XX	0 (0.0)	1 (1.3)	NaN	0-NaN	1.0000
	Алели	Y	83.3%	84.0%	0.95	0.43 – 2.07	1.0000
		X	16.7%	16.0%	1.05	0.78 – 2.27	
<i>rs5030737</i> 223C/T (A/D)	Генотипи	AA	31 (96.6)	66 (84.6)	2.81	0.59 – 13.36	0.2237
		AD	2 (3.4)	10 (12.8)	0.43	0.09 – 2.12	0.3454
		DD	0 (0.0)	2 (2.6)	NaN	0-NaN	0.5783
	Алели	A	93.9%	91.0%	1.39	0.74 – 3.22	0.1574
		D	6.1%	9.0%	0.79	0.14 – 1.46	
<i>rs1800450</i> 230C/T (A/B)	Генотипи	AA	22 (66.7)	57 (73.1)	0.73	0.30 – 1.77	0.6471
		AB	10 (30.3)	20 (25.6)	1.26	0.51 – 3.10	0.6444
		BB	1 (3.0)	1 (1.3)	2.40	0.14 – 39.66	1.0000
	Алели	A	81.8%	85.9%	0.73	0.34 – 1.59	0.5409
		B	18.2%	14.1%	1.35	0.62 – 2.92	
<i>rs1800451</i> 239 G/A (A/C)	Генотипи	AA	33 (100.0%)	78 (100.0)	NaN	0-NaN	1.0000
		AC	0 (0.0)	0 (100.0)	NaN	0-NaN	1.0000
		CC	0 (0.0)	0 (0.0)	NaN	0-NaN	1.0000
	Алели	A	100.0%	100.0%	NaN	0-NaN	1.0000
		C	0.0%	0.0%	NaN	0-NaN	

Анализът по пол показва, че генотипът 52AD е по-чест при жени със СЛЕ (OR 2.6, 95%CI 0.78-8.73; p=0.068, таблица 50). Алелът 57C не беше открит нито сред пациенти, нито сред контроли.

Таблица 50. Генотипно и алелно разпределение на *MBL2* 223 C/T (52 A/D) полиморфизма при пациентки със СЛЕ и здрави жени.

Ген <i>MBL2</i> / полиморфизъм	Генотипи и Алели		Група, брой (%)		OR	95% CI	p-стойност (точен тест на Фишер)
			СЛЕ жени (38)	Здрави жени (58)			
<i>rs5030737</i> <i>223C/T (A/D)</i>	Генотипи	AA	30 (78.9)	49 (90.7)	0.38	0.11 – 1.27	0.1349
		AD	8 (21.1)	3 (5.6)	2.63	0.78 – 8.73	0.0681
		DD	0 (0.0)	2 (3.7)	NaN	0-NaN	0.5097
	Алели	A	89.5%	93.5%	0.59	0.20 – 1.70	0.4137
		D	10.5%	6.5%	1.69	0.59– 4.89	

2.3.2. Алелно и генотипно влияние на *MBL2* полиморфизмите върху клиничните признаци при СЛЕ и ДМ

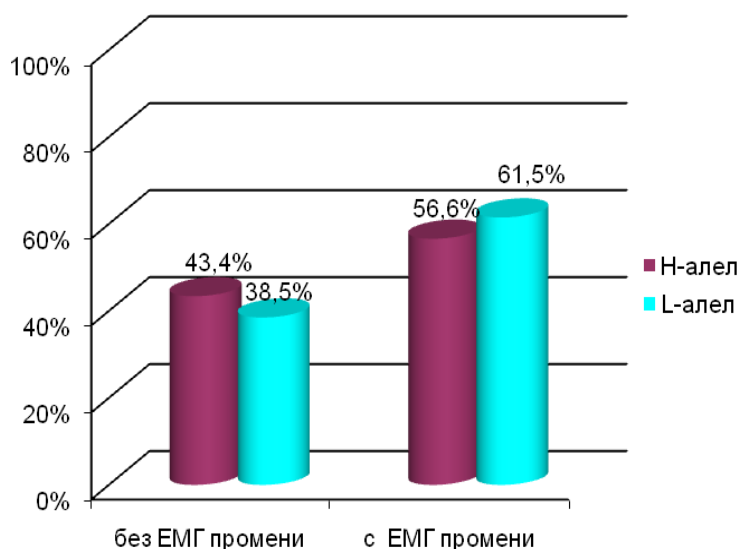
2.3.2.1. *MBL2* промоторни полиморфизми и клинични признаци при СЛЕ и ДМ

Анализът на данните от промоторните полиморфизми по отношение на клиничните симптоми и лабораторните показатели у пациенти с ДМ показва асоциация на L алела с ЕМГ находката (p=0.03, OR 3.2, 95%CI 1.1-9.7, фигура 55) и по-висока честота при кожните прояви на болестта (OR 3.75, 95%CI 0.76-18.5, таблица 51), мускулната слабост (OR 3.75, 95%CI 0.76-18.5) и повишените нива на мускулните ензими (OR 2.35, 95%CI 0.8-6.9 таблица 51). При генотипния анализ се разкри тенденция към асоциация на генотипа -550LL с наличието на ЕМГ промени (p=0.065, OR 3.9, 95%CI 0.9-16.8, таблица 52) и на генотипа -221XY с наличието на АНА при пациенти със СЛЕ (p=0.06, OR 4.5, 95%CI 0.8-24, таблица 54).

Таблица 51. Генотипно разпределение на *MBL2* -550H/L полиморфизма спрямо клиничните прояви при ДМ.

Генотип	-550HH (n=14)	-550HL (n=16)	-550LL (n=3)	p-стойност
Мускулна слабост	9 (64.3%)	14 (72.7%)	3 (100.0%)	NS*
Мускулни ензими	6 (42.9%)	9 (56.3%)	3 (100.0%)	NS
ЕМГ промени	5 (35.7%)	10 (62.5%)	3 (100.0%)	L, p=0.03
Кожна болест	9 (64.3%)	14 (87.5%)	3 (100.0%)	NS
Фоточувствителност	7 (50.0%)	11 (68.8%)	2 (66.7%)	NS
Имунологично засягане	1 (7.1%)	5 (31.3%)	0 (0.0%)	NS

*NS- статистически незначим резултат



Фигура 55. Процентно разпределение на H и L алела сред пациенти с ДМ според наличието или липсата на ЕМГ промени.

Таблица 52. Генотипно разпределение на *MBL2* -221Y/X полиморфизма спрямо клиничните прояви при ДМ.

Генотип Брой (n)	-221YY (n=22)	-221XY (n=11)	p-стойност
Мускулна слабост	17 (77.3%)	9 (81.8%)	NS
Мускулни ензими	10 (45.5%)	8 (72.7%)	NS
ЕМГ промени	11 (50.0%)	7 (63.6%)	NS
Мускулна биопсия	0 (0.0%)	0 (0.0%)	NS
Кожна болест	16 (72.7%)	10 (90.9%)	NS
Фоточувствителност	12 (54.5%)	8 (72.7%)	NS
Имунологично засягане	4 (18.2%)	3 (27.3%)	NS

*NS- статистически незначим резултат

Таблица 53. Генотипно разпределение на *MBL2* -550H/L полиморфизма спрямо клиничните критерии по АСR

Генотип Брой(n)	-550HH (n=13)	-550HL (n=26)	-550LL (n=6)	p-стойност
Кожен обрив	9 (69.2%)	15 (57.7%)	5 (83.3%)	NS*
Дискоиден обрив	2 (15.4%)	4 (15.4%)	1 (16.7%)	NS
Фоточувствителност	10 (76.9%)	14 (53.8%)	4 (66.7%)	NS
Афтоза	2 (15.4%)	1 (3.8%)	0 (0.0%)	NS
Артрит	8 (61.5%)	18 (69.2%)	2 (33.3%)	NS
Серозит	5 (38.5%)	5 (19.2%)	1 (16.7%)	NS
Бъбречно засягане	13 (100.0%)	26 (100.0%)	6 (100.0%)	NS
Неврологично засягане	3 (23.1%)	4 (15.4%)	3 (50.0%)	NS
Хематологично засягане	6 (46.2%)	6 (23.1%)	1 (16.7%)	NS
Имунологично засягане	13 (100.0%)	26 (100.0%)	6 (100.0%)	NS
АНА	10 (76.9%)	19 (73.1%)	5 (83.3%)	NS

*NS- статистически незначим резултат

Таблица 54. Генотипно разпределение на *MBL2* -221Y/X полиморфизма спрямо клиничните критерии по ACR

<i>Генотип Брой (n)</i>	<i>-221YY (n=26)</i>	<i>-221YX (n=19)</i>	<i>p-стойност</i>
Кожен обрив	15 (57.7%)	14 (73.7%)	NS*
Дискоиден обрив	3 (11.5%)	4 (21.1%)	NS
Фоточувствителност	14 (53.8%)	14 (73.7%)	NS
Афтоза	3 (11.5%)	0 (0.0%)	NS
Артрит	14 (53.8%)	14 (73.7%)	NS
Серозит	6 (23.1%)	5 (26.3%)	NS
Бъбречно засягане	26 (100.0%)	19 (100.0%)	NS
Неврологично засягане	6 (23.1%)	4 (21.1%)	NS
Хематологично засягане	8 (30.8%)	5 (26.3%)	NS
Имунологично засягане	26 (100.0%)	19 (100.0%)	NS
АНА	17 (65.4%)	17 (89.5%)	NS, YX-0.06

*NS- статистически незначим резултат

2.3.2.2. *MBL2* структурни полиморфизми и клинични признаци 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, таблица 55), както и обратна зависимост спрямо наличието на ANA ($p=0.014$, OR 7, 95%CI 1.5-31.8, таблица 55).

Таблица 55. Генотипно разпределение на *MBL2* 54A/B полиморфизма спрямо клиничните критерии по ACR.

<i>Генотип Брой (n)</i>	<i>54AA (n=34)</i>	<i>54AB (n=11)</i>	<i>p-стойност</i>
Кожен обрив	19 (55.9%)	10 (90.9%)	AB, p=0.035
Дискоиден обрив	7 (20.6%)	0 (0.0%)	NS*
Фоточувствителност	22 (67.7%)	6 (54.5%)	NS
Афтоза	2 (5.9%)	1 (9.1%)	NS
Артрит	21 (61.8 %)	7 (63.6%)	NS
Серозит	10 (29.4%)	1 (9.1%)	NS
Бъбречно засягане	34 (100.0%)	11 (100.0%)	NS
Неврологично засягане	7 (20.6%)	3 (27.3%)	NS
Хематологично засягане	10 (29.4%)	3 (27.3%)	NS
Имунологично засягане	34 (100.0%)	11 (100.0%)	NS
АНА	29 (85.3%)	5 (45.5%)	AA, p=0.014

*NS- статистически незначим резултат

Полиморфизмът *MBL2* 52A/D не показва асоциация с клиничните признаци на СЛЕ (таблица 56):

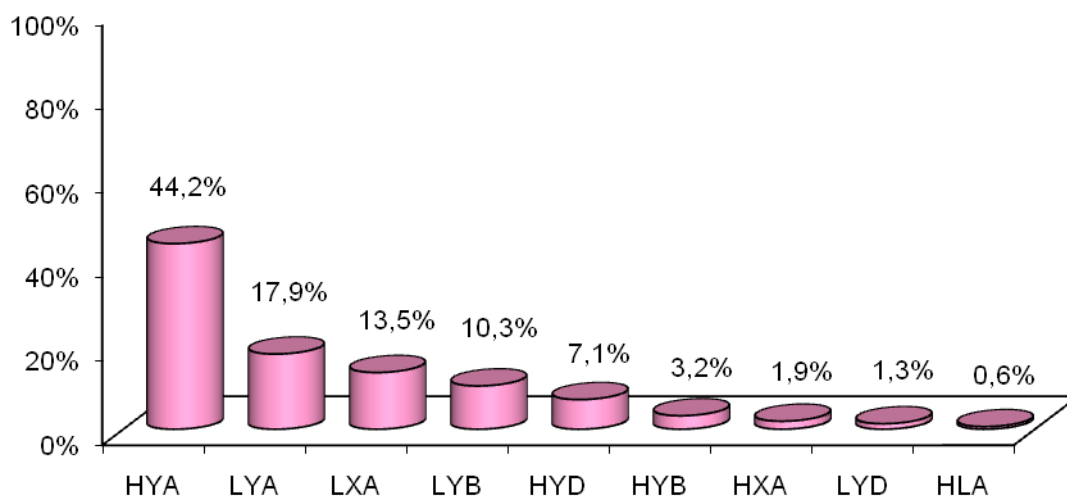
Таблица 56. Генотипно разпределение на *MBL2* 52A/D полиморфизъм спрямо клиничните критерии по АСР.

<i>Генотип Брой (n)</i>	<i>52AA (n=36)</i>	<i>52AD (n=9)</i>	<i>p-стойност</i>
Кожен обрив	24 (66.7%)	5 (55.6%)	NS*
Дискоиден обрив	5 (13.9%)	2 (22.2%)	NS
Фоточувствителност	23 (63.9%)	5 (55.6%)	NS
Афтоза	2 (5.6%)	1 (11.1%)	NS
Артрит	23 (63.9%)	5 (55.6%)	NS
Серозит	9 (25.0%)	2 (22.2%)	NS
Бъбречно засягане	36 (100.0%)	9 (100.0%)	NS
Неврологично засягане	7 (19.4%)	3 (33.3%)	NS
Хематологично засягане	10 (27.8%)	3 (33.3%)	NS
Имунологично засягане	36 (100.0%)	9 (100.0%)	NS
АНА	26 (72.2%)	8 (88.9%)	NS

*NS- статистически незначим резултат

Сред изследваните здрави индивиди преобладаваха хаплотипите НУА, LYA, LXA, LYB и НУО (фигура 52).

2.3.3. Хаплотипно разпределение на *MBL2* -550/-221/223/230/239 полиморфизмите при здрави и болни лица със СЛЕ и ДМ



Фигура 52. Хаплотипно разпределение на *MBL2* -550Н/Л -221Y/X 223А/Д 230А/В 239А/С полиморфизмите сред здрави българи.

Никой от изследваните хаплотипи не показва асоциация с изследваните аутоимунни болести (фигура 53 и 54).

Haplotype	Freq.	Case, Control Ratios	Chi Square	p value
Haplotype Associations				
Block 1				
GGCGG	0.427	0.415, 0.434	0.081	0.7762
GGCGC	0.160	0.152, 0.164	0.062	0.8039
GGCCC	0.142	0.165, 0.128	0.657	0.4175
GACGC	0.089	0.081, 0.094	0.112	0.7381
GGTGG	0.087	0.089, 0.086	0.005	0.9464
GGCCG	0.038	0.050, 0.030	0.605	0.4368
GACGG	0.028	0.028, 0.028	0.001	0.9754
GGTGC	0.020	0.006, 0.028	1.434	0.2312

Фигура 53. MBL -550/-221/223/230/239 хаплотипи при болни със СЛЕ и здрави индивиди. Представени са общите хаплотипи между пациентите със СЛЕ и здравите индивиди, общата им честота за двете групи, честотата при пациентите, честотата при контролите, χ –стойността и р-стойността.

Haplotype	Freq.	Case, Control Ratios	Chi Square	p value
Haplotype Associations				
Block 1				
GGCGG	0.443	0.484, 0.426	0.62	0.4312
GGCGC	0.162	0.157, 0.164	0.017	0.8959
GGCCC	0.116	0.087, 0.128	0.734	0.3916
GACGC	0.086	0.069, 0.093	0.33	0.5658
GGTGG	0.068	0.031, 0.083	1.914	0.1665
GACGG	0.055	0.103, 0.036	3.966	0.1464
GGCCG	0.048	0.069, 0.039	0.911	0.3398
GGTGC	0.023	0.000, 0.032	2.127	0.1447

Фигура 54. MBL -550/-221/223/230/239 хаплотипи при болни с ДМ и здрави индивиди. Представени са общите хаплотипи между пациентите с ДМ и здравите индивиди, общата им честота за двете групи, честотата при пациентите, честотата при контролите, χ –стойността и р-стойността.

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

3.1. Асоциативно проучване върху изследваните *ESR1* полиморфизми при СЛЕ и ДМ

Изследваните SNPs 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 с ДМ, СЛЕ и здрави контроли са представени на таблица 57. 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 сигнификантни разлики. Анализът по пол също не доведе до статистически значим резултат.

Таблица 57. Генотипни и алелни честоти на *ESR1* XbaI x/X и PvuII p/P полиморфизмите сред пациенти с ДМ, СЛЕ и контроли.

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

Преобладаващият генотип във всички изследвани групи е XxPp, последван от xxpp и ХХР, без да се наблюдават статистически различия в разпределението между пациенти и здрави индивиди. Честотата на разширените генотипи е представена на таблица 58.

Таблица 58. Честотата на разширените генотипи сред изследваните групи:

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

3.2. Влияние на *ESR1* полиморфизмите върху клиничните признаци на СЛЕ и ДМ

При проучване на влиянието на полиморфизмите върху клиничните признаци върху изследваните заболявания се откри асоциация между XX+Xx генотипите (OR 6.1, 95%CI 1.2-30.1; p=0.025, фигура 56) и съответно X алела (OR 2.9 95%CI 1.1-7.9; p=0.03, фигура 57) с фоточувствителността при пациенти с ДМ. Съответно P алелът (OR 2.2, 5%CI 0.83-6; p=0.09) и PP+Pr генотипи (OR 4.7, 95CI 0.4-23; p=0.056, таблица 59) също преобладаваха сред фоточувствителните пациенти с ДМ. Комбинациите от генотипи, съдържащи доминантните алели (XXPP, XxPr, XXPr), също показват връзка с фоточувствителността сред пациенти с ДМ (OR 1.3, 95%CI 0.36-4.9; p=0.025). 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 (OR 6.5, 95%CI 0.68-61.2; p=0.085, таблица 59), а pp генотипът доминира при пациенти с ДМ и повишени мускулни ензими (OR 4.7, 95%CI 0.82-27.1; p=0.07).

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

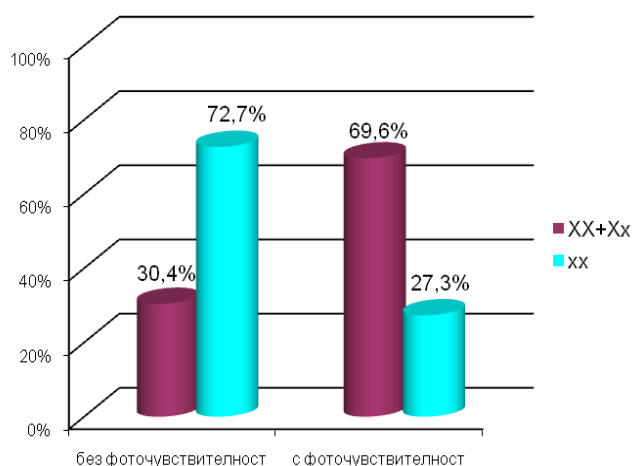
Между генотипите XX+Xx (p=0.035, таблица 60) и PP+Pr (p=0.008 таблица 60) и пациентите със СЛЕ с хематологично засягане се откри силна асоциация, която беше изрезена и на алелно ниво – за X алела (OR 1.9, 95%CI 1.07-3.49; p=0.038, фигура 58) и за P алела (OR 3.8, 95%CI 1.53-9.44; p=0.005, фигура 59).

Таблица 59. Разпределение на *ESRI* XbaI x/X и PvuII p/P полиморфизмите спрямо клиничните параметри при ДМ.

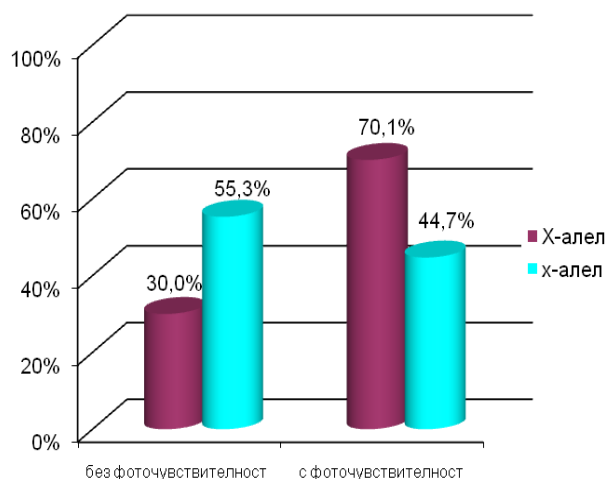
Клинични признаци при ДМ	Генотип							p
	XbaI			p	PvuII			
	xx (n=11)	xX (n=16)	XX (n=7)		pp (n=10)	pP (n=18)	PP (n=6)	
Мускулна слабост	9 (81.8%)	12 (75.0%)	6 (85.7%)	NS*	9 (90.0%)	13 (72.2%)	5 (83.3%)	NS
Мускулни ензими	8 (72.7%)	7 (43.8%)	4 (57.1%)	NS	8 (80.0%)	7 (38.9%)	4 (66.7%)	0.07
ЕМГ промени	6 (54.6%)	7 (43.8%)	6 (85.7%)	0.085	6 60.0%	9 (50.0%)	4 (66.7%)	NS
Кожна болест	7 (63.6%)	13 (81.3%)	6 (85.7%)	NS	7 (70.0%)	14 (77.8%)	5 (83.3%)	NS
Фоточувствителност	3 (27.3%)	11 (68.8%)	5 (71.4%)	0.025	3 (30.0%)	12 (66.7%)	4 (66.7%)	0.056
Имунологично засягане	4 (36.4%)	4 (25.0%)	0 (0.0%)	NS	4 (40.0%)	3 (16.7%)	1 (16.7%)	NS

Таблица 60. Разпределение на *ESRI* XbaI x/X и PvuII p/P полиморфизмите спрямо клиничните параметри при СЛЕ.

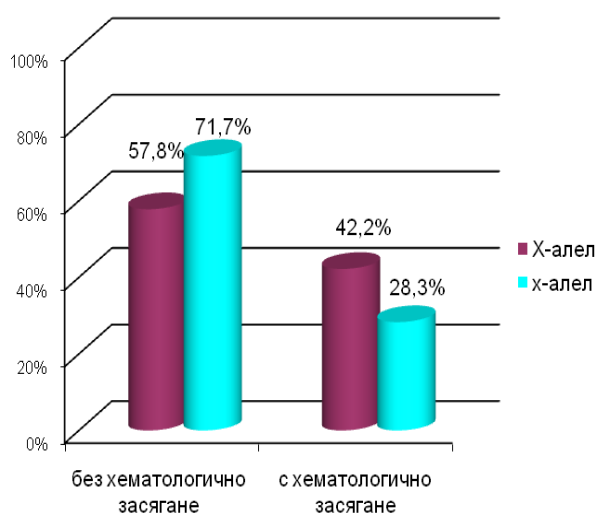
Клинични признаци при СЛЕ	Генотип							p
	XbaI			p	PvuII			
	xx (n=15)	xX (n=23)	XX (n=11)		pp (n=10)	pP (n=26)	PP (n=13)	
Кожен обрив	7 (46.7%)	16 (69.6%)	9 (81.8%)	NS	5 (50.0%)	17 (65.4%)	10 (76.9%)	NS
Дискоиден обрив	4 (77.8%)	3 (13.0%)	1 (9.1%)	NS	2 (20.0%)	5 (19.2%)	1 (7.7%)	NS
Фоточувствителност	11 (73.3%)	11 (47.8%)	6 (54.6%)	NS	6 (60.0%)	15 (57.7%)	7 (53.8%)	NS
Афтоза	2 (13.3%)	1 (4.4%)	0 (0.0%)	NS	1 (10.0%)	2 (7.7%)	0 (0.0%)	NS
Артрит	9 (60.0%)	14 (60.9%)	8 (72.7%)	NS	6 (60.0%)	11 (42.3%)	6 (46.2%)	NS
Серозит	4 (33.3%)	4 (78.6%)	3 (71.4%)	NS	3 (40.0)	4 (70.6%)	4 (66.7%)	NS
Бъбречно засягане	15 (100.0%)	23 (100.0%)	11 (100.0%)	NS	10 (100.0%)	26 (100.0%)	13 (100.0%)	NS
Неврологично засягане	2 (13.3%)	5 (21.7%)	3 (27.3%)	NS	1 (10.0%)	6 (23.1%)	3 (23.1%)	NS
Хематологично засягане	2 (13.3%)	11 (47.8%)	4 (36.4)	0.035	0 (0.0%)	9 (34.4%)	8 (61.5%)	0.008
Имунологично (Анти-ДНК, Анти-Sm, АКЛА)	9 (60.0%)	13 (56.5%)	7 (63.6%)	NS	6 (60.0%)	14 (53.9%)	9 (69.2%)	NS
АНА	10 (66.7%)	15 (65.2)	8 (72.7%)	NS	7 (70.0%)	16 (61.5%)	10 (76.9%)	NS



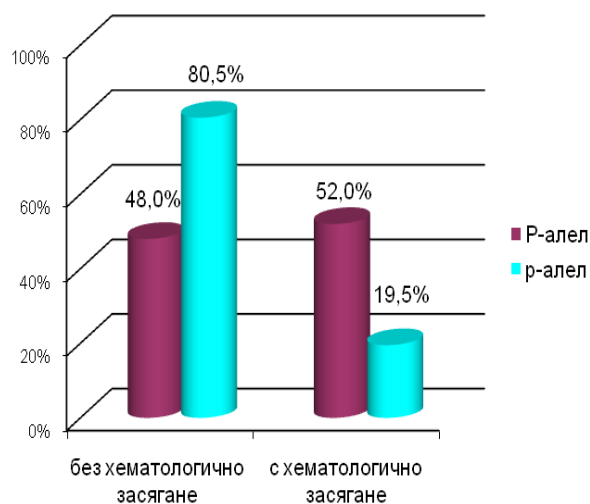
Фигура 56. Процентно разпределение на доминантен модел $XX+Xx/xx$ по признак фоточувствителност при ДМ



Фигура 57. Процентно разпределение на алелите X и x по признак фоточувствителност при ДМ



Фигура 58. Процентно разпределение на алелите X и x по признак хематологично засягане при СЛЕ



Фигура 59. Процентно разпределение на алелите P и p по признак хематологично засягане при СЛЕ

ГЛАВА V. 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 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 автоимунната болест 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 няколко въпроса: 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 има 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.

Въпреки наличието на различни методи за определяне на серумните нива на TNF- α , ELISA методите са най-широко използвани. Ojeda и сътр. [274] доказват, че независимо от значителните индивидуални вариации в серумните концентрации, ELISA методът притежава необходимата информативна стойност за оценка на състоянието на клетъчния имунитет на индивида.

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

Въпреки наблюдаваните разлики в серумните нива на TNF α в 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 [275] и ДМ. От друга страна е възможно 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. 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 ревматологична, 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 [276]. Данните в литературата по отношение на връзката между серумните нива на TNF- α и ДМ са недостатъчни. Тъй като в настоящото проучване не бяха установени разлики в серумните нива на TNF- α между пациентите с ДМ и контролната група, резултати ни не могат да подкрепят заключението на A.M. Reed и сътр. [277], 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 C. Gabau и сътр. [278] и подкрепят тяхното становище, че серумните нива на TNF- α не се асоциират с 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. Въпреки че в много проучвания оценката на серумните нива на TNF- α се прави приоритетно на базата на сравняването на средните нива [40], неравномерното разпределение изисква

употребата на непараметричен тест. По този начин в настоящото проучване се установи, че при жени със СЛЕ, въпреки високите средни стойности на TNF- α , статистическа значимост имат ниските нива. Тези резултати са очаквани предвид инхибиращият ефект на естрогените спрямо TNF- α и NF κ B сигнализацията [279], който е по-изразен при женския пол. Това още веднъж подчертава значението на транскрипционните фактори като мишена за външни въздействия с последващо влияние върху сигнализацията и появата на автоимунен процес. В други проучвания, използващи непараметрични методи [280] 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. Роля на *TNFA* полиморфизмите за продукцията на TNF- α

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

Получените в настоящото проучване 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 резултатите от предходни проучвания [36]. По този начин настоящото проучване подкрепя данните 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. [42], които съобщават за наличието на значимо по-ниски нива на TNF- α у носителите на -1031C и -863A алелите. Skoog и сътр. [41] 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 водеща роля и на полиморфизма -1031T/C.

За разлика от проучванията на D. A. van Heel и сътр. [35], 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 нашата 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 [281]. 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 [282] 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, свързването на транскрипционните фактори зависи и от редица външни фактори, които също са обект на интензивни проучвания [283]. 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 *TNFA* 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 [42], 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. [35]. 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. [40] 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. Все пак при генотип TCCGGG/TCCAGG се наблюдават завишени нива на TNF- α , а генотипът TCCGGG/CACGGG показва тенденцията за асоциация с ниски нива. Получените данни показват, че въпреки установените статистически значими разлики в серумните нива на TNF- α , подкрепящи ролята на хаплотипите, са необходими допълнителни проучвания за изясняване на механизмите, чрез които те влияят върху продукцията на TNF- α .

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. На таблица 61 са обобщени проведените проучвания относно СЛЕ през последното десетилетие и за сравнение са представени данните от настоящото изследване.

Таблица 61. Проучвания върху *TNFA* цитокинови полиморфизми при СЛЕ

Референция	Популация	Брой пациенти/ контроли	<i>TNFA</i> SNPs	Асоциация със СЛЕ	Асоциации с клинични прояви
Настоящо проучване	българи	45/79	1031/- 863 /-857/ -308/ -238/ 489	-1031CC генотип и -1031C алел	-308GA с артрит
Angelo и сътр. 2012 [284]	бразилци	98/76	- 308	-308A с повишен риск	-308A със серозит
Santos и сътр. 2012 [285]	португалци	115/152	- 308	-	-308A с лупус нефрит и анти- Sm антитела
Rap и сътр. 2012 [60]	метаанализ	2992/4326	- 308	-308A в бялата раса	nd*
Jimenez-Morales и сътр. 2009 [214]	мексиканци	328/400	-238/ - 308	повишена честота на -238A	-**
Lin и сътр. 2009 [213]	тайванци	162/213	-1031/- 863 /-857/ -308/ -238/ 489	-863A, 489A-алела и 489AA генотипа	-308A с афти, малариен и дискоиден обрив, фоточувствител- ност и серозит
Hirankarn и сътр. 2007 [215]	тайванци	154/154	-238/ - 308/ - 863	-863A/ - 308G/- 238G хаплотип	nd
G-Zuccardi и сътр. 2007 [219]	колумбийци	120/102	-308	повишена честота на -308A алела	-308A с анти-Sm и анти-SSa
Lee и сътр. 2006 [212]	мета-анализ	3060/4479	-308	повишена честота на -308 AA генотипа сред европейци, но не и сред азиатци	nd

Schotte и сътр. 2005 [51]	германци	205/157	-308	повишена честота на -308A	nd
Tobon и сътр. 2005 [286]	колумбийци	113/65	-308	-	nd
Suarez и сътр. 2005 [222]	испанци	248/343	-308	повишена честота на -308A	-308A с анти-SSa антители
Parks и сътр. 2004 [287]	северно американци	230/276	-238/ - 308	повишена честота на -308A сред бялата раса, но не сред афроамериканци	-
Azizah и сътр. 2004 [220]	китайци	70/59	-308	повишена честота на -308A	-308A с анти-SSb и неврологично засягане
van der Linden и сътр. 2001 [288]	кавказка популация	91/253	-308	повишена честота на -308A	nd
Zuniga и сътр. 2001 [289]	мексиканци	51/55	-238/ - 308	повишена честота на -238A	nd

Забележка* nd = няма данни, ** „-“ липсва асоциация

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 [60]. 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 [53]. В подкрепа на неговото значение е наблюдавана асоциация между -308GA генотипа с артритните прояви при пациентите със СЛЕ. Тези данни показват, че -308A алелът има отношение за клиничната изява на болестта сред българските пациенти. Получените резултати са в съответствие и с проучвания, които отчитат роля на *TNFA* -308G/A полиморфизма по отношение тежестта на протичане на ревматоидния артрит [290]. 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 [291].

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 процеси. 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 [292]. Резултатите от настоящото изследване са в съответствие с други две проучвания [41], 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 [252], не се потвърждава сред български пациенти със същото заболяване. В настоящото проучване за пръв път се установява асоциация между -1031CC генотипа и СЛЕ, с което се доказва ролята му на рисков фактор за развитие към това заболяване. 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 [53]. 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 намаляване на проапоптотичните му свойства с потискане на антитуморния му ефект и създаване предпоставки за антиядлообразуване. Описаната роля на *TNFA* -1031C алела вероятно е въпрос на популационна особеност, тъй като този алел се оказва фактор на възприемчивост за автоимунни заболявания и сред други популации, близки до нашата [293]. Описаната от нас асоциация доказва ролята му на рисков фактор сред българските пациенти и затвърждава значението му на споделен локус за автоимунитет [294]. Поради сравнително ниската честота на -1031CC генотипа в изследваните групи е необходимо установената връзка със СЛЕ да бъде потвърдена в по-голяма кохорта.

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 [213]. 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 [53]. В представената работа, обаче, се установи по-висока честота на -863A алела в хомо- и хетерозиготно състояние сред пациентите със СЛЕ и имунологично засягане, като този алел преобладава и сред пациентите с ДМ и ЕМГ промени, което е в подкрепа на ролята му в патогенезата на автоимунния процес.

Въпреки че не беше наблюдавана асоциация между -857C/T полиморфизма и изследваните заболявания, беше установена по-висока честота на -857CC генотипа сред двете групи изследвани пациенти, особено сред жени със СЛЕ, което подкрепя ролята му на модулиращ фактор при автоимунитета. Възможно обяснение за наличието на полови различия е описаното взаимодействие на NFκB p65 протеина и OCT1 в присъствието на -857C алела [35], което допълнително подлежи на естрогенова модулация [279]. Тези особености на *TNFA* -857C/T 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 [295, 296].

Анализът на настоящите резултати показва, че полиморфизмът *TNFA* 489G/A е в силна неравновесна връзка с *TNFA* -857C/T, което е в пълно съответствие с данните, получени за гръцката популация [295]. Тези наблюдения са в унисон и с предходни проучвания, доказващи голямото генетично сходство на българската и гръцката популация [297]. 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 потвърждават установената асоциация на *TNFA* 489A алела със СЛЕ сред други популации, при които липсва подобна неравновесна връзка [213]. Настоящите резултати демонстрират популационната обусловеност на неравновесните връзки, с което се подкрепя тезата на Ваена и сътр. [54], че единичните нуклеотидни полиморфизми в промоторния регион на *TNFA* отразяват родословната еволюция. Получените резултати относно по-високата честота на 489GG генотипа при пациенти със СЛЕ биха могли да се дължат и на евентуален протективен ефект, който някои автори описват за 489A алела при автоимунните заболявания [298]. Липсата, обаче, на убедително потвърждение за наличието на по-ниска генна експресия на *TNFA* във връзка с 489A алела по-скоро отхвърлят функционалната роля на този полиморфизъм [282]. В съответствие с тези данни в настоящото проучване също не се откри статистически значима разлика в нивата на TNF-α по отношение на *TNFA* 489G/A полиморфизма нито сред контролите, нито сред пациентите. Данните ни не показват асоциация на този полиморфизъм с развитието на ДМ, което е в съответствие с резултатите на Н. Chinoу и сътр. [252].

В настоящото проучване за пръв път се изследва честотата на *TNFA* -238G/A полиморфизма сред българи. Получените резултати показаха ниска честота на *TNFA* -238A 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 честота на *TNFA* -238AA генотипа сред кавказката популация варира от 0 до 6%, като сред португалци е най-висока [299]. 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. [300] *TNFA* -238A алелът е асоцииран с по-тежко протичане на ревматоидния артрит, докато Mamurova и сътр. [249] установяват, че *TNFA* -238GA генотипът оказва протективен ефект по отношение на ювенилния ДМ. В съответствие с резултатите на Mamurova и сътр., Kaluza и сътр. [45] откриват, че у пациенти с псориазис, носители на *TNFA* -238A алела, се наблюдава по-ниска транскрипционна активност на *TNFA* гена. Ниската честота на *TNFA* -238A алела сред българи, обаче, не позволи да определим функционалната роля на този полиморфизъм.

Една от задачите, която си поставихме в настоящата работа, е не само да изследваме влиянието на отделните SNPs, но да направим комплексна оценка на хаплотипното влияние върху изследваните автоимунни болести. Хаплотипният анализ не показва статистически значим резултат при изследване на отделните групи, но при разделяне на пациентите по пол, хаплотипът *TNFA* -1031C/-863C/-857C/-308G/-238G/489G показва силна асоциация с развитието на ДМ и СЛЕ у жени. Наличието на асоциация на този хаплотип с развитието на двете заболявания предимно у жени вероятно се дължи на описаното по-горе кръстосано взаимодействие между транскрипционните фактори и естрогените, които модулират генната експресия [279, 301].

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 *IL-6* -174G/C. Въпреки това данните за неговото влияние продължават да бъдат противоречиви. Асоциация между *IL-6* -174GG генотипа и СЛЕ се установява в египетската [302] и малайзийската [221] популации, докато при германци [303], португалци [304] и китайци [305] не се откриват различия в алелното и генотипното разпределение между болни и здрави индивиди. Настоящата работа подкрепя ролята на високосекретиращия *IL-6* -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 *IL-6* -174G алелът е асоцииран със СЛЕ основно сред европейската популация, докато значението му при азиатци не е така отчетливо [28]. Сравнение на получените резултати с тези в други популации е представено на таблица 62.

Таблица 62. Проучвания върху *IL-6* -174G/C на цитокинов полиморфизъм при СЛЕ

Референция	Популация	Брой пациенти/ контроли	<i>IL-6</i> SNP	Асоциация със СЛЕ	Асоциации с клинични прояви
Настоящо проучване	българи	52/80	-174	-174G алел с лупус нефрит	-*
Asano NM и сътр. 2013 [306]	бразилци	80/60	-174	-174G алелът се свързва с повишен риск от 1.98.	-
Yang Z и сътр. 2013 [307]	мета-анализ	2346/2847	-174	-174G/C полиморфизма се асоциира с риск за развитие на СЛЕ при рецесивен модел	-174G с дискоидни лезии
Lee YH и сътр. 2012 [218]	мета-анализ	1345/1677	-174	-174G асоциация със СЛЕ.	nd**
Santos MJ и сътр. 2011 [304]	португалци	115/152	-174	-	-174C асоцииран с нефрит
Godarzi EM и сътр. 2011 [217]	иранци	401/400	-174	-	-174G с наличие на антитела, обрив, хематурия
Chua KH и сътр. 2009 [221]	малазийци	100/100	-174	-	-
Guarnizo-Zuccard и сътр. 2007[219]	колумбийци	120/102	-174	-	-
Huang SM и сътр. 2006 [305]	китайци	135/130	-174	-	-
Schotte и сътр. 2001 [303]	германци, кавказка популация	211/158/383 UK	-174	-	-174G с дискоидни лезии и наличие на анти-His антитела

Забележка *, „-“ липсва асоциация, ** nd = няма данни

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 [308]. В настоящата работа за първи път се проучва ролята на -174G/C полиморфизма в патогенезата на ДМ, при което не се установява 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 проучване и при двете изследвани заболявания. До този момент е установено, че носителите на нискосекретирания -174CC генотип по-трудно отговарят на лечение с rituximab и TNF- α блокери [309]. 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 с лупус нефрит [310-313], както и наличието на единични съобщения за благоприятен ефект при автоимунните миопатии [314].

В много от проведените проучвания се установява ролята на *IL-6* -174G-алела и GG-генотипа в клиничните изяви на автоимунните болести. Schotte и сътр. [303] съобщават за асоциация между *IL-6* -174G алела и дискоидните кожни лезии и антихистоновите антители при СЛЕ. Други автори посочват връзка на *IL-6* -174G алела и наличието на антинуклеарни антители, малариен обрив и хематурия при мъже [28]. В настоящото проучване се установи асоциация на *IL-6* -174G/C полиморфизма със СЛЕ, но тъй като 100% от изследваните 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. [305] не установяват асоциации между *IL-6* -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 *IL-6* -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. Алелът *IL-6* -174G в хомо- и хетерозиготно състояние се асоциира с мускулна слабост и показва тенденция за асоциация с повишени нива на мускулните ензими при ДМ. Тъй като не се открива връзка с болестта, получените резултати подкрепят наблюдението на Schaap и сътр., че високите нива на IL-6 водят до мускулна слабост [315], най-вероятно поради 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. ПОЛИМОРФИЗМИ В *IL-10* ГЕНА- 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 (таблица 63), а ролята на тези, намиращи се в дисталния участък, е слабо проучена.

Таблица 63. Сравнителен анализ за значението на проксималните *IL-10* полиморфизми при СЛЕ

Референция	Популация	Брой пациенти/контроли	<i>IL-10</i> SNPs	Асоциация със СЛЕ	Асоциации с клинични прояви
I. Manolova и сътр. [123]	българи	157/166	-1082	-	-*
P. Liu и сътр. 2013 [121]	мета-анализ	7948/11866	-1082/ - 819/ - 592	-1082G алела, GCC хаплотип	-
B. Wang и сътр. 2013 [316]	мета-анализ		-1082	Асоциация на рецесивния модел само сред азиатци	nd**
Song и сътр. 2013 [317]	мета-анализ	2828/4008	-1082/ - 819/ - 592	-1082G алела, GCC хаплотип сред европейци, АТА сред азиатци	nd
M. Zhou и сътр. 2013 [318]	мета-анализ	2396/3653	-1082	-1082G алела	nd
Lin и сътр. 2010 [319]	тайванци	172/215	-1082/ - 819/ - 592	АТА/АТА	-
Rosado и сътр. 2008 [320]	испанци	116/51	-1082/ - 819/ - 592	с GCC хаплотип	-
Guarnizo-Zuccardi и сътр. 2007 [219]	колумбийци	120/102	-1082/ - 819/ - 592	-	nd
Sung и сътр. 2006 [321]	корейци	350/330	- 592	- -592C асоцииран с тежест на протичане	nd
L. J. Zhu, 2005 [223]	китайци	265/100	-592	-592 А/С с тежестта на протичане	-592 С с дифузен пролиферативен гломерулонефрит
Nath и сътр. (2005) [322]	мета-анализ	2391/3483	-1082/ - 819/ - 592	Повишена честота на -1082G сред азиатци	nd
Khoa и сътр. 2005 [323]	виетнамци	64/57	-1082	Повишена честота на -1082G	nd
Chong и сътр. 2004 [269]	китайци	550/689	-1082/ - 819/ - 592	Повишена честота на -592СС	nd
Suarez и сътр. 2005 [222]	испанци	248/343	-1082, -819, -592	-	-1082G с дискоидни лезии
D'Alfonso и сътр. 2002 [324]	италианци	217/173	-1082/ - 592	-	-
Rood и сътр. 1999 [325]	холандци	92/162	-1082/ - 819/ - 592	-	Хаплотип АТА с неврулопус
C. Mok и сътр. 1998 [326]	китайци	83/88	-1082/ - 819/ - 592	-	Хаплотип АТА с лупус нефрит

Забележка *, „-“ липсва асоциация, ** nd = няма данни

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 [105]. С изключение на една единствена публикация, касаеща ролята на *IL-10* -1082G/A полиморфизма при автоимунните миопатии [16], 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 показваха честота над 5% сред здрави българи, което е в съответствие с резултатите на Gibson и сътр. [105] Установената от нас алелна честота от 70.1% за Т алела спрямо 29.9% за А алела в -3575T/A полиморфизма напълно съвпада с данните, получени за здрави индивиди от кавказки произход [105]. За разлика от мономорфната изява на полиморфизма *IL-10* -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 *IL-10* -2763C/A. Тези резултати също съответстват на проучванията на Gibson и сътр. [105] за кавказката популация, като същевременно очертават наличието на популационни различия. Генотипната честота на -592C/A полиморфизма не се различава от тази, описана в македонската и северната гръцка популации.

В своето проучване Gibson и сътр. [105] установяват висока честота на хаплотипите *IL-10* -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 *IL-10* -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 [16], 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 *IL-10* -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 *IL-10* -3575TT генотипа и Т алела и наличието на серозит при пациенти със СЛЕ. Така получените резултати се различават от тези на Gibson и сътр. [105], които намират асоциация на *IL-10* -

3575Т алела със СЛЕ сред афроамериканци, но не подкрепят напълно данните на W. Chong и сътр. [269], отхвърлящи ролята му в патогенезата на СЛЕ сред китайската популация. Причината за наблюдаваните различия най-вероятно е наличието на популационни особености. Настоящото проучване е първото, което изследва ролята на *IL-10* -3575Т/А полиморфизма сред европейци със СЛЕ и поради това не беше възможно да се направи сравнителен анализ с други близки до българската популационни групи. Ролята на *IL-10* -3575Т/А полиморфизма и необходимостта от неговото изследване се подчертава още повече от получените от нас резултати относно ДМ. В представената работа за пръв път беше установена асоциация между *IL-10* -3575ТТ генотипа и *IL-10* -3575Т алела и развитието на ДМ. Тези данни, потвърждават ролята на дисталните полиморфизми като споделен локус на автоимунитет и подкрепят становището на Gibson и сътр. [105], които препоръчват при изучаването на *IL-10* полиморфизмите да се провежда комплексен анализ от проксимално-дистален тип.

Генотипът *IL-10* -2849АА се свързва с по-ниски нива на IL-10 [105], поради което той би могъл да оказва протективна роля за развитието на СЛЕ и ДМ. Резултатите от настоящото проучване не показаха асоциация на този полиморфизъм със самото заболяване. Наблюдаваната по-висока честота на АА генотипа сред контролите е в полза на изказаното предположение. Беше установено, че генотипът *IL-10* -2849GG и алелът -2849G се срещат по-често сред пациенти със СЛЕ и наличие на АНА, което може да бъде резултат от алелните и генотипни ефекти върху продукцията на IL-10 и съответно производството на антитела [327]. Анализът на получените данни показва, че полиморфизмът *IL-10* -2849G/А не играе роля за развитието на ДМ и клиничното протичане на болестта сред българи.

IL-10 -2763С алелът се свързва с по-висока секреция на IL-10 в сравнение с А алела и допринася за развитието на СЛЕ сред афроамериканци [105]. Вероятно поради популационни особености подобна връзка не беше потвърдена за българските пациенти със СЛЕ. Въпреки това *IL-10* -2763СС генотипът и *IL-10* -2763С 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 [269]. Получените резултати в настоящата работа показват, че *IL-10* -2763С/А полиморфизмът няма отношение към развитието на ДМ, нито към клиничното протичане на болестта сред българи.

Полиморфизмът *IL-10* -592С/А е разположен в регион на негативно регулаторно влияние [110, 328]. Ролята на полиморфизма *IL-10* -592С/А в етиологията на автоимунните болести в отделните популации все още не е напълно изяснена. В едно проучване се съобщава за асоциация на генотипа *IL-10* -592СС със СЛЕ у китайски пациенти [269], докато в друго, че А алелът се свързва с развитието на лупусен нефрит [223, 326]. В допълнение към

тези противоречиви становища се прибавят данни, според които този полиморфизъм няма отношение към развитието на СЛЕ [324, 329]. Получените в настоящото проучване резултати за ролята на *IL-10* -592C/A полиморфизма при автоимунните болести също не са категорични. Те показват, че комбинацията от генотипи *IL-10* -592AA+CA са свързани с повишен риск за развитие на лупусен нефрит, серозит и наличието на фоточувствителност, докато *IL-10* -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. [113], които посочват, че в присъствието на *IL-10* -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, която осъществява негативен ефект по отношение на транскрипцията на *IL-10*, докато неактивната форма на PARP-1 не потиска транскрипцията.

Определянето на приноса на отделните полиморфизми за концентрацията на IL-10 и на 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. [330] установяват, че след стимулация със *S. pneumoniae*, периферните мононуклеарни клетки, носещи хаплотип *IL-10* -1082/-819/-592 > АТА имат значително по-високи нива на мРНК, отколкото тези с хаплотипи *IL-10* GCC и ACC. Други автори посочват, че транскрипционната активност на GCC хаплотипа е с около 20% по-висока в сравнение с тази на АТА и ACC [331]. 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. [105] дисталните хаплотипи *IL-10* -3575/-2849/-2763 > AAA или AGA 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 *IL-10* -1082/-819/-592 > ACC, АТА, GCC, 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 *IL-10* -3575/-2849/-2763/-592 > TGCC хаплотипа и ДМ е в съответствие с тяхното предположение.

Резултатите от настоящото 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 еволюционнообусловения адаптивен отговор при наличието на инфекции и други болестни причинители [332].

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

2.1. Серумни нива на MBL

Към момента няма общоприета дефиниция за понятието MBL дефицит. Eisen и сътр. [333] провеждат мета-анализ, обхващащ голяма кохорта от здрави лица и пациенти с пневмококова инфекция, при които са изследвани генетични полиморфизми в *MBL2* гена и са определени серумните нива на MBL посредством ELISA. В резултат на това проучване се определя cut-off за нивото на MBL от 500 µg/L. Екипът на Eisen и сътр. [333], както и повечето автори приемат, че при стойности под тази се касае за състояние на дефицит на MBL. В настоящото проучване също беше възприето това становище. Други изследователски групи определят нива, вариращи между 50 и 1000 µg/L като частичен дефицит, а за тежък дефицит се възприемат стойности на MBL под 50 µg/L [334, 335]. В проучване, обхващащо 22 деца със селективен хуморален и MBL дефицит за cut-off са приети стойности на MBL под 100 µg/L [336]. Към момента ELISA е основният метод на базата, на който се правят опити за дефиниране на състоянието MBL дефицит. Поради това в представената работа също беше използван този подход. Оценяването на MBL дефицита може да стане и посредством изследване на функционалната му активност по отношение на C4, при което най-често за cut-off се приема стойност 200 U/mL, но този метод за оценка е по-слабо разпространен. Независимо, че серумните нива на MBL варират в широки граници, един от най-значимите фактори, оказващи контрол върху неговата продукция са генетичните полиморфизми [135].

2.2. Честотата на полиморфизмите в *MBL2* гена сред българи

Честотата на полиморфизмите в *MBL2* гена сред българската популация не е проучвана. От проведените в настоящото проучване генетични изследвания установихме мономорфност единствено по отношение на A/C замяната в кодон 57, което е в унисон с резултати от други популационни проучвания [134]. Честотата на останалите полиморфизми беше над 5%. Промоторните и структурните полиморфизми в нашето проучване показват наличието на 9 хаплотипа - HYA, LYA, LXA, LYB, HYD, HYB, HXA, LYD, HLA. Честотата

на отделните хаплотипи варира в различните етнически групи. Счита се, че разликите в разпространението на хаплотипите е основната причина за междурасовите вариации в серумните нива на MBL.

2.3. 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. Също не беше установена асоциация между серумните нива и клиничните прояви при СЛЕ и ДМ, което е в съответствие с данните на Takahashi и сътр. [228]. 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 с бъбречно засягане [337]. 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 Vouwman и сътр. [338], според които високите и ниските нива на MBL отразяват различни аспекти 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 [339]. Интересно е да се отбележи, че при болните с лупус нефрит се открива реципрочност между нивата на MBL и наличието на антитела [234, 340], което се потвърждава и в настоящата работа. Този феномен е още по-силно изразен сред болните с ДМ.

2.4. Роля на нуклеотидните полиморфизми в *MBL2* гена 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 [144, 341]. 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 S. G. Lee и сътр. [129]. За разлика от резултатите на A. K. Panda и сътр. [342], които доказват, че и двата промоторни полиморфизма могат да доведат до ниски нива на MBL при пациенти със СЛЕ, в представената работа се установи значима асоциация само с -550LL генотипа. Като най-

вероятна причина за това може да се посочи установената по-ниска честота на -221Y/X полиморфизма сред българи и липсата на пациенти с XX генотип.

Мутантните полиморфизми D, B и C (52A/D, 54A/B и 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 резултатите потвърждават предишните наблюдения, че за разлика от отчетливия ефект при индивиди с 54BB генотип, които имат ниски до почти липсващи нива на циркулиращ MBL, полиморфизмът 52A/D не води до драстично понижаване в серумните нива на MBL [134]. 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 [135].

2.5. Генетични методи за определяне на *MBL2* полиморфизмите

Съществуват различни методи за определяне на *MBL2* полиморфизмите, базирани на принципа на PCR - RFLP, насочена мутагенеза - site directed mutagenesis (SDM), секвенционно-специфична олигонуклеотидна хибридикация (SSO)-dot blot или обратен dot blot, детекция чрез реакция на лигиране (LDR) и PCR със секвенционно специфични праймери PCR-SSP. Безспорен принос в изследването на *MBL2* полиморфизмите имат Ivanova и сътр. [147], които разработват иновативен метод, базиран на принципа на aptaу платформа с микросфери, наречен LimplexMAP. Въпреки че той предлага значителни предимства пред останалите методи, поради своята икономичност един от най-разпространените методи за определянето на *MBL2* полиморфизмите остава RFLP.

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

Макар и несигнификантно, в настоящото проучване се наблюдава по-висока честота на генотипа -221XY сред пациентите със СЛЕ, което се асоциира с повишен риск за развитие на болестта. 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 [163]. Предходни проучвания доказват връзката на -221X алела с някои клинични признаци на СЛЕ - по-ранна изява на болестта, кожно засягане, серозит Jakab и сътр. [236]. Sandrin-

García и сътр. [156] установяват връзка между X-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 почистване от апоптотичен материал, създавайки условия за антиядлообразуване. Не се установява достоверна разлика в честотата на -221XY полиморфизма между пациентите с ДМ и здравите контроли. Честотата на този генотип, обаче, е по-висока сред пациенти с ДМ и фоточувствителност, което потвърждава данните от наскоро проведено проучване [343]. Възможно обяснение на тези резултати дава работата на Lokitz и сътр. [344], 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 -550L не показаха асоциация с нито едно от изследваните заболявания. Разделянето на пациентите по пол и провеждането на статистически анализ в отделните групи също не доведе до статистически значим резултат. Така представеното изследване подкрепя резултатите на авторите, които не откриват асоциация между този полиморфизъм и унаследяването на СЛЕ [160, 345], въпреки че съществуват и други мнения [163, 232]. Сравнение между получените от нас резултати и тези на други автори е представено на таблица 64. В настоящото проучване се установи връзка между генотипа -550LL и L-алела и ЕМГ находката при пациенти с ДМ. Алелът -550L е с по-висока честота сред пациентите с увеличени мускулни ензими, мускулна слабост и кожно засягане, което вероятно се дължи на установената по-ниска продукция на MBL, свързана с L-алела. Дефицитът на MBL играе важна роля в кожния автоимунитет, тъй като този протеин участва във възпалителните реакции и регулацията на провъзпалителните цитокини, които контролират молекулната адхезия на клетките на възпалението и клиърънса на имунните комплекси [346]. Между този полиморфизъм и клиничните белези на СЛЕ според критериите на ACR не се установи връзка, което е в съответствие с данните от предходни проучвания.

Мутантните полиморфизми D, B и C (52A/D, 54A/B и 57A/C) често се обозначава 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. Те играят различна роля в етиологията и клиничната картина на изследваните

заболявания, поради което следва да се анализират поотделно. Данните, касаещи асоциацията на тези три полиморфизма със СЛЕ, не са еднопосочни. Част от авторите намират асоциация със СЛЕ [163, 228, 232, 347], докато друга част – не [348, 349]. Подобно на последните автори в представената работа не се наблюдава статистически значима асоциация на ДМ или СЛЕ с нито един от трите полиморфизма. По-подробно сравнение между получените от нас резултати и тези в популационни групи са представени на таблица 64. Мета-анализ, проведен наскоро показва, че степента на взаимовръзка на полиморфизма в кодон 54 със СЛЕ е различна в отделните етнически групи [235]. В настоящото изследване генотипът 54АВ показва завишена честота сред пациентите със СЛЕ и пеперудообразен обрив. Има данни, че пациенти със СЛЕ, които носят ниско-секретиращи генотипи имат по-висока честота на анти-ДНК, анти-Ro/SS-A и анти-La/SS-B, които често са свързани с кожни прояви [234, 340]. В настоящата работа се наблюдава статистически значима по-ниска честота на мутантния генотип 54АВ сред пациентите със СЛЕ и АНА и/или имунологична болест, което корелира с посочените данни. Нашите изследвания до момента показват, че полиморфизмите в *MBL2* гена имат значение не толкова за възникването на двете болести, колкото за степента на тяхната активност и фенотипни прояви, което корелира с резултатите и на други автори [124, 340].

Таблица 64. Проучвания върху *MBL2* генен полиморфизъм при СЛЕ

Референция	Популация	Брой пациенти/ контроли	MBL2 SNPs	Асоциация със СЛЕ	Асоциации с клинични прояви
Настоящо проучване	българи	45/78	-550, -221, 52, 54, 57,	-*	54 АВ генотип с кожен обрив
Panda и сътр. 2013 [342]	индийци	108/105	-550, -221, 54	LXA/LYB, LYB/LYB, LXВ/LXB	LXA/LYB, LYB/LYB, LXВ/LXB с автоимунна хемолитична анемия
Glesse N и сътр. 2011 [350]	африкански и европейски произход	325/344	-550, -221, 52, 54, 57,	Повишена честота на НУ при африкански произход и АО при европейски произход	-
Sandrin-Garcia P и сътр. 2011 [156]	бразилци	134/101	-550, -221, 52, 54, 57,	О – алела - повишен риск за развитие на СЛЕ	АО генотип с лупус нефрит, ХУ генотип с антифосфолипиден синдром
Monticieleo и сътр. 2010 [351]	европейски произход	249/244	52, 54, 57	52D алел	О/О с лупус антикоагулант и лимфопения
Monticieleo и сътр. 2010	афро-американски произход	78/101	52, 54, 57	-	-
Piao и сътр. 2007 [340]	северно американци	130/142	52, 54, 57	-	ОО и АО генотипи с dsDNA, Ro/SSA, La/SSB и лупус нефрит. АВ и АС с анти-Sm антитела

Jakab и сътр. 2007 [236]	унгарци	315/182	-221, 52, 54, 57	-	ХА/ХА с ранно начало, кожни прояви, серозит
Navarra и сътр. 2007 [352]	филипинци	144/138	-221	Повишена честота на LX генотипа	-
Li и сътр. 2006 [353]	китайци	40/30	-550, -221, +4, 52, 54, 57	54В алел	54В с по-леки прояви
Bertoli и сътр. 2006 [354]	смесена популация	417/486	52, 54, 57	-	А/А с лупус нефрит, серозит и антифосфолипиден синдром. О/О с левкопения, О/О преобладава при пациенти с анти-Ро и анти-ДНК
Takahashi и сътр. 2005 [228]	японци	147/160	54	54ВВ генотип	54ВВ с по-висока честота на инфекциите при лечение 54АА с СН50 и нива на С3
Jönsen и сътр. 2004 [355]	бяла раса	138/200	-550, -221, 52, 54, 57	-	-
García-Laorden и сътр. 2003 [234]	канарци	89/188	-550, -221, +4, 52, 54, 57	-	Мутантните алели с по-ниски нива на антитела и по-късно начало на болестта.
Huang и сътр. 2003 [356]	китайци	41/111	-550, -221, 52, 54, 57	LX хаплотип	-
Sullivan и сътр. 2003 [357]	афро-американци	85/57	-550, -221, 54, 57	54В и LX/LX	-
Sullivan и сътр. 2003 [357]	бяла раса	75/155	-550, -221, 54, 57	57С и LX/LX	-
Garred и сътр. 2001 [233]	датчани	99/250	-221, 52, 54, 57	О/О+АО	О/О+АО с инфекции, СУЕ и активност на болестта
Villareal и сътр. 2001 [232]	испанци	125/138	-550, -221, 52, 54, 57	54В алел	Високо секретиралите хаплотипи са протективни за възприемчивост

Забележка * с „-” е отразена липсата на асоциация

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 [124, 340, 349] 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 имуноензимни изследвания също са в съответствие с анализа от генетичните проучвания.

В заключение настоящата работа доказва наличието на генетичен контрол върху серумните концентрации на MBL и потвърждава становището, че *MBL2* генът е по-скоро локус с модулираща функция, а не фактор за възприемчивост по отношение на изследваните аутоимунни болести.

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 - *PvuII p/P* и *XbaI x/X*. Установено е, че доминантните варианти *PvuII P (C)* и *XbaI X (G)* са свързани с повишена активност на *ERα* [174, 175]. 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 *PvuII p/P* и *XbaI x/X* полиморфизмите със СЛЕ [241, 358]. Подобно на предходни проучвания, проведени сред европейската популация, в настоящата работа не се открива статистически значима разлика между алелното и генотипно разпределение на тези два полиморфизма сред пациентите със СЛЕ и контролите [173, 241, 242, 359]. Наблюдаваните различия в резултатите най-вероятно се дължат на етнически и полови различия, като получените от нас резултати подкрепят становището, че популационните вариации играят съществена роля в генетичната регулация на естрогена и естрогеновия рецептор [360].

Установено е, че доминантните алели *PvuII P* и *XbaI X* се свързват с повишена продукция на *E2* [361, 362], а високите концентрации на естрогени оказват ефект върху диференциацията на стволовите клетки и могат да доведат до панцитопения [363]. Подобни процеси биха могли да обяснят установената от нас връзка между *XXPP* генотипа и хематологичните промени при пациенти със СЛЕ.

X-алелът и генотипите *XX+Xx* показаха асоциация с малариен обрив при пациенти със СЛЕ, а *PPXX* генотипът се оказва преобладаващ сред фоточувствителните пациенти. Получените резултати съответстват напълно на данните от проучването на *Johansson* и сътр. [242] и са в потвърждение на познатата роля на естрогените като тригери на фоточувствителността [364]. Механизмът, по който това се осъществява, не е изяснен, но едно възможно обяснение на наблюдаваните промени е потискането на анти-възпалителните цитокини в кератиноцитите от 17β -естрадиола [365], което е резултат от свързването на хомодимера с различни транскрипционни фактори като *NF-κappa-B*, *AP-1/c-Jun*, *c-Fos*, *ATF-2*, *Sp1* и *Sp3*.

Ролята на полиморфизмите PvuII p/P и XbaI x/X в естрогеновия рецептор относно развитието на лупусния нефрит остава неясна. Проучвания при мишки показват, че ER- α има отношение към спонтанното развитие на лупусен нефрит за разлика от ER- β [366]. В своето проучване Thorburn и сътр. [241] установяват връзки между двата полиморфизма (съответно алелите P, X) и лупусния нефрит, но в настоящото проучване не се откриват статистически значими разлики в генотипното и алелно разпределение между контроли и пациенти, подобно на по-голяма част от проучванията [173, 242, 359]. Възможно е тези разлики да се дължат на популационни различия, но също така те биха могли да бъдат резултат и от съществуващия полов диморфизъм [179, 183], тъй като в по-голяма част от проучванията, както и в настоящата работа, предобладава женският пол.

Резултатите от проучванията при ДМ показват наличие на асоциация единствено между P и X алелите и фоточувствителността. Трябва да се отбележи, че XX генотипът преобладава сред пациентите с ЕМГ промени, а pp генотипът - сред тези с повишени мускулни ензими. Резултатите от проучванията при животински модели показват, че високите нива на естрогена пречат на повишаването на нивата на креатинин киназата след физически натоварвания [367]. Предполага се, че естрогените оказват мембранно-стабилизиращ ефект върху сакролемата и така може да се намали степента на разкъсването ѝ [368]. Може да се предположи, че понижената рецепторна активност, свързана с pp 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 XX и PP отговарят по-слабо на лечение с leflunomide, отколкото пациентките с генотипи xx и pp [369]. От друга страна двата полиморфизма не показват отношение към лечението с метотрексат на пациенти с ревматоиден артрит [370]. 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 [258, 259].

В обобщение, резултатите от изследването на ролята на полиморфизмите XbaI x/X и PvuII p/P в *ESR1* гена за развитието на СЛЕ и ДМ показват, че те са възможни модулиращи фактори, свързани предимно с клиничните прояви на двете автоимунни болести, но не са фактори за тяхната възприемчивост. Настоящата работа подкрепя категорично становището за естрогеновото участие в кожния автоимуниет и фоточувствителността и допринася за изясняването на ролята на XbaI x/X и PvuII p/P полиморфизмите при лупус нефрит сред

българи. С това проучване се поставя началото на изучаването на генетичните основи на естрогеновия рецепторен полиморфизъм в развитието на ДМ.

Таблица 65. Проучвания върху гена за естрогенов рецепторен полиморфизъм-а (ESR1) при СЛЕ

Референция	Популация	Брой пациенти/ контроли	Асоциация на СЛЕ	Асоциации с клинични прояви
Настоящо проучване	българи	49/69	-*	PPXX с фоточувствителност и хематологично засягане
Танев и сътр. [173]	българи	112/50	-	PPXX с фоточувствителност и ррхх с неврологично засягане
Kisiel и сътр., 2011 [179]	поляци	112/1001	P-алела при мъже	P-алела с лупус нефрит и склероза и с ранно начало, x - алела с късно начало
Thorburn и сътр., 2006 [241]	азиатци	633/656 (бяла раса 400, азиатци 97, латиноамериканци 86, афроамериканци 50)	P, X, PP с лупус нефрит	P, X, PP с лупус нефрит
Johansson и сътр., 2005 [242]	шведи	220/670	-	P-алела с обрив и късно начало, X-алела с фоточувствителност, хх генотипа със серозит
Wang и сътр., 2010 [175]	азиатци	49/102	PP, XX, PPXX при жени	-
Lee и сътр., 2004 [358]	корейци	268/137	Pp при жени	Xx, Xхрр с ранно начало, PP с късно начало.
Liu и сътр., 2002 [183]	китайци с лупус нефрит	245/172	PpXx при мъже	PpXx с обрив и артрит, ррхх с бъбречно и хематологично засягане, Ppхх с васкулит

Забележка * с „-“ е отразена липсата на асоциация

ГЛАВА VI. 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 полиморфизми. Част от получените резултати имат фундаментален характер. За пръв път в световен мащаб беше изследвана ролята на цитокинови полиморфизми в гените *IL-6*, *IL-10* и полиморфизми в гена за ER- α върху предразположението към ДМ, както и ролята на *TNFA*, *IL-6* и *MBL2* полиморфизми 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 TNF- α -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 различните автоимунни болести различни цитокини се явяват терапевтична мишена. 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 влиянието на нуклеотидните полиморфизми върху продукцията на MBL сред българи се установи значима роля на промоторни полиморфизми. Генотипите *MBL2* -550HH, -550HL, 550LL корелират добре с високи, средни и ниски нива на белтъка, а -221YY и -221XY 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 *MBL2* -550L показва асоциация с ЕМГ находката при ДМ, а 54AB 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 проучване допринася за обогатяване данните за ролята на PvuII p/P и XbaI x/X полиморфизмите при СЛЕ и поставя началото на изследвания 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.

ГЛАВА VII. 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 значително 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 полиморфизмите в *TNFA* гена имат второстепенно значение за възникването на ДМ.
- Полиморфизмът *IL-6* -174 G/C се асоциира със СЛЕ особено при жени и участва в патогенезата на лупус нефрита, докато неговата роля при ДМ не се свързва с предразположеност към болестта, а само с модулация на клиничните прояви най-вероятно поради ролята му на миокин.
- Алелът T 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 са асоциирани 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 фактор за тяхната възприемчивост.

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

ГЛАВА VIII. 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 от *IL-10* гена.
3. Проведено е за първи път асоциативно проучване на полиморфизми в гените *TNF- α* , *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.

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.

ГЛАВА VIII. СПРАВКА ЗА ПУБЛИКАЦИИ, ЦИТИРАНИЯ И ДОКЛАДИ

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 abstracts)

ЛИТЕРАТУРА:

1. Shiozawa, S., *Cause of systemic lupus erythematosus: a novel self-organized criticality theory of autoimmunity*, in *Expert Rev Clin Immunol*. 2011. p. 715-7.
2. Clark, R. and T. Kupper, *Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity*. *J Invest Dermatol*, 2005. 125(4): p. 629-37.
3. Ridgway, W.M., M. Fasso, and C.G. Fathman, *A new look at MHC and autoimmune disease*. *Science*, 1999. 284(5415): p. 749, 751.
4. Wucherpfennig, K.W. and J.L. Strominger, *Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein*. *Cell*, 1995. 80(5): p. 695-705.
5. Hacquard-Bouder, C., M. Ittah, and M. Breban, *Animal models of HLA-B27-associated diseases: new outcomes*. *Joint Bone Spine*, 2006. 73(2): p. 132-8.
6. Olivier, M., *From SNPs to function: the effect of sequence variation on gene expression. Focus on "a survey of genetic and epigenetic variation affecting human gene expression"*. *Physiol Genomics*, 2004. 16(2): p. 182-3.
7. Jeffries, M.A. and A.H. Sawalha, *Epigenetics in systemic lupus erythematosus: leading the way for specific therapeutic agents*. *Int J Clin Rheumatol*, 2011. 6(4): p. 423-439.
8. Jeffries, M.A., et al., *Genome-wide DNA methylation patterns in CD4+ T cells from patients with systemic lupus erythematosus*. *Epigenetics*, 2011. 6(5): p. 593-601.
9. Wong, D., et al., *Interferon and biologic signatures in dermatomyositis skin: specificity and heterogeneity across diseases*. *PLoS One*, 2012. 7(1): p. e29161.
10. Wang, M., et al., *Methylation alterations of WT1 and homeobox genes in inflamed muscle biopsy samples from patients with untreated juvenile dermatomyositis suggest self-renewal capacity*. *Arthritis Rheum*, 2012. 64(10): p. 3478-85.
11. Rhodes, B. and T.J. Vyse, *The genetics of SLE: an update in the light of genome-wide association studies*. *Rheumatology (Oxford)*, 2008. 47(11): p. 1603-11.
12. Наумова, Е., Иванова, М., *Главен комплекс на тъканната съвместимост - факти, хипотези , приложение в медицината* Е. Наумова, Иванова, М., Editor. 2006, "Лице": София.
13. Moulds, J.M., et al., *C4 null genes in American whites and blacks with myositis*. *J Rheumatol*, 1990. 17(3): p. 331-4.
14. Miller, F.W., et al., *Genome-wide association study of dermatomyositis reveals genetic overlap with other autoimmune disorders*. *Arthritis Rheum*, 2013. 65(12): p. 3239-47.
15. Ramos, P.S., et al., *A comprehensive analysis of shared loci between systemic lupus erythematosus (SLE) and sixteen autoimmune diseases reveals limited genetic overlap*. *PLoS Genet*, 2011. 7(12): p. e1002406.
16. Hassan, A.B., et al., *Genetically determined imbalance between serum levels of tumour necrosis factor (TNF) and interleukin (IL)-10 is associated with anti-Jo-1 and anti-Ro52 autoantibodies in patients with poly- and dermatomyositis*. *J Autoimmun*, 2006. 27(1): p. 62-8.
17. Nossent, J.C., et al., *Polymorphism in the 5' regulatory region of the B-lymphocyte activating factor gene is associated with the Ro/La autoantibody response and serum BAFF levels in primary Sjogren's syndrome*. *Rheumatology (Oxford)*, 2008. 47(9): p. 1311-6.
18. Cho, J.H. and P.K. Gregersen, *Genomics and the multifactorial nature of human autoimmune disease*. *N Engl J Med*, 2011. 365(17): p. 1612-23.
19. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Innate immunity: impact on the adaptive immune response*. *Curr Opin Immunol*, 1997. 9(1): p. 4-9.
20. Thornton, C.A. and G. Morgan, *Innate and adaptive immune pathways to tolerance*. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program*, 2009. 64: p. 45-57; discussion 57-61, 251-7.

21. Novotny, G.W., et al., *Transcriptional and translational regulation of cytokine signaling in inflammatory beta-cell dysfunction and apoptosis*. Arch Biochem Biophys, 2012. 528(2): p. 171-84.
22. Johnson, D.J. and P.S. Ohashi, *Molecular programming of steady-state dendritic cells: impact on autoimmunity and tumor immune surveillance*. Ann N Y Acad Sci, 2013. 1284: p. 46-51.
23. Kunz, M. and S.M. Ibrahim, *Cytokines and cytokine profiles in human autoimmune diseases and animal models of autoimmunity*. Mediators Inflamm, 2009. 2009: p. 979258.
24. Wang, L., et al., *Transcriptional crosstalk between nuclear receptors and cytokine signal transduction pathways in immunity*. Cell Mol Immunol, 2004. 1(6): p. 416-24.
25. Hart, P.H., et al., *Control by IFN-gamma and PGE2 of TNF alpha and IL-1 production by human monocytes*. Immunology, 1989. 66(3): p. 376-83.
26. Canto, E., et al., *TNF alpha production to TLR2 ligands in active IBD patients*. Clin Immunol, 2006. 119(2): p. 156-65.
27. Huang, P., et al., *Endothelial expression of TNF receptor-1 generates a proapoptotic signal inhibited by integrin alpha6beta1 in glioblastoma*. Cancer Res, 2012. 72(6): p. 1428-37.
28. Chu, W.M., *Tumor necrosis factor*. Cancer Lett, 2013. 328(2): p. 222-5.
29. Huangfu, W.C., et al., *Osmotic stress activates the TAK1-JNK pathway while blocking TAK1-mediated NF-kappaB activation: TAO2 regulates TAK1 pathways*. J Biol Chem, 2006. 281(39): p. 28802-10.
30. Hajeer, A.H. and I.V. Hutchinson, *Influence of TNFalpha gene polymorphisms on TNFalpha production and disease*. Hum Immunol, 2001. 62(11): p. 1191-9.
31. Stone, M.A. and R.D. Inman, *The genetics of cytokines in ankylosing spondylitis*. J Rheumatol, 2001. 28(6): p. 1203-6.
32. Mozes, T., et al., *Deviations in circulating TNFalpha levels and TNFalpha production by mononuclear cells in healthy human populations*. Mediators Inflamm, 2011. 2011: p. 972609.
33. Sullivan, K.E., et al., *3' polymorphisms of ETS1 are associated with different clinical phenotypes in SLE*. Hum Mutat, 2000. 16(1): p. 49-53.
34. Werth, V.P., et al., *Association of a promoter polymorphism of tumor necrosis factor-alpha with subacute cutaneous lupus erythematosus and distinct photoregulation of transcription*. J Invest Dermatol, 2000. 115(4): p. 726-30.
35. van Heel, D.A., et al., *Inflammatory bowel disease is associated with a TNF polymorphism that affects an interaction between the OCT1 and NF(-kappa)B transcription factors*. Hum Mol Genet, 2002. 11(11): p. 1281-9.
36. Karimi, M., et al., *A critical assessment of the factors affecting reporter gene assays for promoter SNP function: a reassessment of -308 TNF polymorphism function using a novel integrated reporter system*. Eur J Hum Genet, 2009. 17(11): p. 1454-62.
37. Braun, N., et al., *Gene polymorphism at position -308 of the tumor-necrosis-factor-alpha (TNF-alpha) in multiple sclerosis and its influence on the regulation of TNF-alpha production*. Neurosci Lett, 1996. 215(2): p. 75-8.
38. Smith, C.L. and G.L. Hager, *Transcriptional regulation of mammalian genes in vivo. A tale of two templates*. J Biol Chem, 1997. 272(44): p. 27493-6.
39. Bayley, J.P., T.H. Ottenhoff, and C.L. Verweij, *Is there a future for TNF promoter polymorphisms?* Genes Immun, 2004. 5(5): p. 315-29.
40. Mekinian, A., et al., *Functional study of TNF-alpha promoter polymorphisms: literature review and meta-analysis*. Eur Cytokine Netw, 2011. 22(2): p. 88-102.
41. Skoog, T., et al., *A common functional polymorphism (C-->A substitution at position -863) in the promoter region of the tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene associated with reduced circulating levels of TNF-alpha*. Hum Mol Genet, 1999. 8(8): p. 1443-9.

42. Sharma, S., et al., *Association of TNF haplotypes with asthma, serum IgE levels, and correlation with serum TNF-alpha levels*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2006. 35(4): p. 488-95.
43. Skoog, T., A. Hamsten, and P. Eriksson, *Allele-specific chromatin remodeling of the tumor necrosis factor-alpha promoter*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. 351(3): p. 777-83.
44. Farid, T.M., et al., *Association of tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms with juvenile systemic lupus erythematosus nephritis in a cohort of egyptian patients*. Iran J Kidney Dis, 2011. 5(6): p. 392-7.
45. Kaluza, W., et al., *Different transcriptional activity and in vitro TNF-alpha production in psoriasis patients carrying the TNF-alpha 238A promoter polymorphism*. J Invest Dermatol, 2000. 114(6): p. 1180-3.
46. Cui, G., et al., *Polymorphism of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) gene promoter, circulating TNF-alpha level, and cardiovascular risk factor for ischemic stroke*. J Neuroinflammation, 2012. 9: p. 235.
47. Cay, H.F., et al., *Polymorphism in the TNF-alpha gene promoter at position -1031 is associated with increased circulating levels of TNF-alpha, myeloperoxidase and nitrotyrosine in primary Sjogren's syndrome*. Clin Exp Rheumatol, 2012. 30(6): p. 843-9.
48. D'Alfonso, S. and P.M. Richiardi, *An intragenic polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha (TNFA) chain-encoding gene*. Immunogenetics, 1996. 44(4): p. 321-2.
49. de Jong, B.A., et al., *Polymorphisms in or near tumour necrosis factor (TNF)-gene do not determine levels of endotoxin-induced TNF production*. Genes Immun, 2002. 3(1): p. 25-9.
50. Knight, J.C., et al., *In vivo characterization of regulatory polymorphisms by allele-specific quantification of RNA polymerase loading*. Nat Genet, 2003. 33(4): p. 469-75.
51. Schotte, H., et al., *Extended haplotype analysis reveals an association of TNF polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus beyond HLA-DR3*. Scand J Rheumatol, 2005. 34(2): p. 114-21.
52. Crawford, D.C. and D.A. Nickerson, *Definition and clinical importance of haplotypes*. Annu Rev Med, 2005. 56: p. 303-20.
53. Николова, П., ed. *Проучване на цитокинов генен полиморфизъм при здрави и болни*. Дисертационен труд. 2008. 102-104,109.
54. Vaena, A., et al., *TNF-alpha promoter single nucleotide polymorphisms are markers of human ancestry*. Genes Immun, 2002. 3(8): p. 482-7.
55. Коларов, З., Алтънкова, И., Шейтанов, Й. и сътр., *Изследване на тумор-некротизиращ фактор-алфа в серума и ставната течност на болни с ревматоиден артрит*. Ревматология, 1995. 4: p. 23-29.
56. Sabry, A.A., et al., *Markers of inflammation and atherosclerosis in Egyptian patients with systemic lupus erythematosus*. Nephrology (Carlton), 2006. 11(4): p. 329-35.
57. Mussi, A., et al., *Serum TNF-alpha levels correlate with disease severity and are reduced by effective therapy in plaque-type psoriasis*. J Biol Regul Homeost Agents, 1997. 11(3): p. 115-8.
58. Zhuang, L., et al., *Associations between Tumor Necrosis Factor-alpha Polymorphisms and Risk of Psoriasis: A Meta-Analysis*. PLoS One, 2013. 8(12): p. e68827.
59. Song, G.G., et al., *Association between TNF-alpha promoter -308 A/G polymorphism and rheumatoid arthritis: a meta-analysis*. Rheumatol Int, 2013.
60. Pan, H.F., et al., *Association of TNF-alpha promoter-308 A/G polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus: a meta-analysis*. Rheumatol Int, 2012. 32(7): p. 2083-92.
61. Liang, Y., et al., *Meta-analysis of association between cytokine gene polymorphisms and Behcet's disease risk*. Int J Rheum Dis, 2013.
62. Tanaka, T. and T. Kishimoto, *Targeting interleukin-6: all the way to treat autoimmune and inflammatory diseases*. Int J Biol Sci, 2012. 8(9): p. 1227-36.

63. Davis, L.S., J. Hutcheson, and C. Mohan, *The role of cytokines in the pathogenesis and treatment of systemic lupus erythematosus*. J Interferon Cytokine Res, 2011. 31(10): p. 781-9.
64. Ruef, C., et al., *Interleukin 6 is an autocrine growth factor for mesangial cells*. Kidney Int, 1990. 38(2): p. 249-57.
65. Horii, Y., et al., *Role of interleukin-6 in the progression of mesangial proliferative glomerulonephritis*. Kidney Int Suppl, 1993. 39: p. S71-5.
66. Ryffel, B., et al., *Interleukin-6 exacerbates glomerulonephritis in (NZB x NZW)F1 mice*. Am J Pathol, 1994. 144(5): p. 927-37.
67. Grossman, R.M., et al., *Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. 86(16): p. 6367-71.
68. Neuner, P., et al., *Increased IL-6 production by monocytes and keratinocytes in patients with psoriasis*. J Invest Dermatol, 1991. 97(1): p. 27-33.
69. Yamamoto, T. and T. Osaki, *Characteristic cytokines generated by keratinocytes and mononuclear infiltrates in oral lichen planus*. J Invest Dermatol, 1995. 104(5): p. 784-8.
70. Turksen, K., et al., *Interleukin 6: insights to its function in skin by overexpression in transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89(11): p. 5068-72.
71. Cronstein, B.N., *Interleukin-6--a key mediator of systemic and local symptoms in rheumatoid arthritis*. Bull NYU Hosp Jt Dis, 2007. 65 Suppl 1: p. S11-5.
72. Rose-John, S., *IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6*. Int J Biol Sci, 2012. 8(9): p. 1237-47.
73. Cho, S.W., et al., *The soluble interleukin-6 receptor is a mediator of hematopoietic and skeletal actions of parathyroid hormone*. J Biol Chem, 2013. 288(10): p. 6814-25.
74. Robson-Ansley, P., et al., *The effect of exercise on plasma soluble IL-6 receptor concentration: a dichotomous response*. Exerc Immunol Rev, 2010. 16: p. 56-76.
75. Sawczenko, A., et al., *Intestinal inflammation-induced growth retardation acts through IL-6 in rats and depends on the -174 IL-6 G/C polymorphism in children*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(37): p. 13260-5.
76. Fishman, D., et al., *The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis*. J Clin Invest, 1998. 102(7): p. 1369-76.
77. Yuzhalin, A., *The role of interleukin DNA polymorphisms in gastric cancer*. Hum Immunol, 2011. 72(11): p. 1128-36.
78. Nikolova, P.N., et al., *Association of cytokine gene polymorphisms with malignant melanoma in Caucasian population*. Cancer Immunol Immunother, 2007. 56(3): p. 371-9.
79. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. Annu Rev Immunol, 2001. 19: p. 683-765.
80. D'Andrea, A., et al., *Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells*. J Exp Med, 1993. 178(3): p. 1041-8.
81. Fiorentino, D.F., et al., *IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages*. J Immunol, 1991. 147(11): p. 3815-22.
82. Pestka, S., et al., *Interleukin-10 and related cytokines and receptors*. Annu Rev Immunol, 2004. 22: p. 929-79.
83. Mocellin, S., et al., *The dual role of IL-10*. Trends Immunol, 2003. 24(1): p. 36-43.
84. Mocellin, S., et al., *IL-10 stimulatory effects on human NK cells explored by gene profile analysis*. Genes Immun, 2004. 5(8): p. 621-30.
85. Boulland, M.L., et al., *Human interleukin-10 expression in T/natural killer-cell lymphomas: association with anaplastic large cell lymphomas and nasal natural killer-cell lymphomas*. Am J Pathol, 1998. 153(4): p. 1229-37.

86. Llorente, L., et al., *Role of interleukin 10 in the B lymphocyte hyperactivity and autoantibody production of human systemic lupus erythematosus*. J Exp Med, 1995. 181(3): p. 839-44.
87. Kalampokis, I., A. Yoshizaki, and T.F. Tedder, *IL-10-producing regulatory B cells (B10 cells) in autoimmune disease*. Arthritis Res Ther, 2013. 15 Suppl 1: p. S1.
88. Maseda, D., et al., *Regulatory B10 cells differentiate into antibody-secreting cells after transient IL-10 production in vivo*. J Immunol, 2012. 188(3): p. 1036-48.
89. Fraser, D.A., et al., *CD14 and MBL, components of the innate immune system, influence monocyte cytokine expression*. J Leukoc Biol, 2006. 80(1): p. 107-16.
90. Tone, M., et al., *IL-10 gene expression is controlled by the transcription factors Sp1 and Sp3*. J Immunol, 2000. 165(1): p. 286-91.
91. Brightbill, H.D., et al., *A prominent role for Sp1 during lipopolysaccharide-mediated induction of the IL-10 promoter in macrophages*. J Immunol, 2000. 164(4): p. 1940-51.
92. Ma, W., et al., *The p38 mitogen-activated kinase pathway regulates the human interleukin-10 promoter via the activation of Sp1 transcription factor in lipopolysaccharide-stimulated human macrophages*. J Biol Chem, 2001. 276(17): p. 13664-74.
93. Steinke, J.W., et al., *Functional analysis of -571 IL-10 promoter polymorphism reveals a repressor element controlled by sp1*. J Immunol, 2004. 173(5): p. 3215-22.
94. Lucas, M., et al., *ERK activation following macrophage FcγR ligation leads to chromatin modifications at the IL-10 locus*. J Immunol, 2005. 175(1): p. 469-77.
95. Vega, M.I., et al., *Rituximab inhibits p38 MAPK activity in 2F7 B NHL and decreases IL-10 transcription: pivotal role of p38 MAPK in drug resistance*. Oncogene, 2004. 23(20): p. 3530-40.
96. Ziegler-Heitbrock, L., et al., *IFN-α induces the human IL-10 gene by recruiting both IFN regulatory factor 1 and Stat3*. J Immunol, 2003. 171(1): p. 285-90.
97. Schaefer, A., et al., *Mechanism of interferon-γ mediated down-regulation of interleukin-10 gene expression*. Mol Immunol, 2009. 46(7): p. 1351-9.
98. Unterberger, C., et al., *Role of STAT3 in glucocorticoid-induced expression of the human IL-10 gene*. Mol Immunol, 2008. 45(11): p. 3230-7.
99. Bodas, M., et al., *Inhibition of IL-2 induced IL-10 production as a principle of phase-specific immunotherapy*. J Immunol, 2006. 177(7): p. 4636-43.
100. Saraiva, M., et al., *Interleukin-10 production by Th1 cells requires interleukin-12-induced STAT4 transcription factor and ERK MAP kinase activation by high antigen dose*. Immunity, 2009. 31(2): p. 209-19.
101. Wessells, J., et al., *BCL-3 and NF-κB p50 attenuate lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in macrophages*. J Biol Chem, 2004. 279(48): p. 49995-50003.
102. Saraiva, M., et al., *Identification of a macrophage-specific chromatin signature in the IL-10 locus*. J Immunol, 2005. 175(2): p. 1041-6.
103. Mosser, D.M. and X. Zhang, *Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine*. Immunol Rev, 2008. 226: p. 205-18.
104. Powell, M.J., et al., *Posttranscriptional regulation of IL-10 gene expression through sequences in the 3'-untranslated region*. J Immunol, 2000. 165(1): p. 292-6.
105. Gibson, A.W., et al., *Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus*. J Immunol, 2001. 166(6): p. 3915-22.
106. Lazarus, R., et al., *Single nucleotide polymorphisms in innate immunity genes: abundant variation and potential role in complex human disease*. Immunol Rev, 2002. 190: p. 9-25.
107. Vicari, A.P. and G. Trinchieri, *Interleukin-10 in viral diseases and cancer: exiting the labyrinth?* Immunol Rev, 2004. 202: p. 223-36.
108. Smith, A.J. and S.E. Humphries, *Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality*. Cytokine Growth Factor Rev, 2009. 20(1): p. 43-59.

109. de Paz, B., et al., *Interleukin 10 and tumor necrosis factor-alpha genotypes in rheumatoid arthritis--association with clinical response to glucocorticoids*. J Rheumatol, 2010. 37(3): p. 503-11.
110. Kube, D., et al., *Isolation of the human interleukin 10 promoter. Characterization of the promoter activity in Burkitt's lymphoma cell lines*. Cytokine, 1995. 7(1): p. 1-7.
111. Turner, D.M., et al., *An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter*. Eur J Immunogenet, 1997. 24(1): p. 1-8.
112. Hsueh, K.C., et al., *Association of interleukin-10 A-592C polymorphism in Taiwanese children with Kawasaki disease*. J Korean Med Sci, 2009. 24(3): p. 438-42.
113. Chung, E.Y., et al., *Differential expression in lupus-associated IL-10 promoter single-nucleotide polymorphisms is mediated by poly(ADP-ribose) polymerase-1*. Genes Immun, 2007. 8(7): p. 577-89.
114. Mihailova, S., et al., *Pro- and anti-inflammatory cytokine gene polymorphism profiles in Bulgarian multiple sclerosis patients*. J Neuroimmunol, 2005. 168(1-2): p. 138-43.
115. Kanda, N., T. Tsuchida, and K. Tamaki, *Estrogen enhancement of anti-double-stranded DNA antibody and immunoglobulin G production in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1999. 42(2): p. 328-37.
116. Groux, H. and F. Cottrez, *The complex role of interleukin-10 in autoimmunity*. J Autoimmun, 2003. 20(4): p. 281-5.
117. Chun, H.Y., et al., *Cytokine IL-6 and IL-10 as biomarkers in systemic lupus erythematosus*. J Clin Immunol, 2007. 27(5): p. 461-6.
118. Anaya, J.M., et al., *Interleukin 10 (IL-10) influences autoimmune response in primary Sjogren's syndrome and is linked to IL-10 gene polymorphism*. J Rheumatol, 2002. 29(9): p. 1874-6.
119. Hasegawa, M., et al., *Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis*. J Rheumatol, 1997. 24(2): p. 328-32.
120. Zou, L., et al., *The association between three promoter polymorphisms of IL-10 and inflammatory bowel diseases (IBD): A meta-analysis*. Autoimmunity, 2013.
121. Liu, P., et al., *IL-10 gene polymorphisms and susceptibility to systemic lupus erythematosus: a meta-analysis*. PLoS One, 2013. 8(7): p. e69547.
122. Qin, B., et al., *The association between TNF-alpha, IL-10 gene polymorphisms and primary Sjogren's syndrome: a meta-analysis and systemic review*. PLoS One, 2013. 8(5): p. e63401.
123. Manolova, I., *Genes and Autoimmunity. Intracellular Signaling and Microbiome Contribution*, in *Gene Polymorphisms of Immunoregulatory Cytokines IL-10 and TGF-β1 in Systemic Lupus Erythematosus*, S.A. Stanilova, Editor. 2013, InTech: Rijeka, Croatia.
124. Seelen, M.A., et al., *A role for mannose-binding lectin dysfunction in generation of autoantibodies in systemic lupus erythematosus*. Rheumatology (Oxford), 2005. 44(1): p. 111-9.
125. Peterslund, N.A., et al., *Association between deficiency of mannose-binding lectin and severe infections after chemotherapy*. Lancet, 2001. 358(9282): p. 637-8.
126. Neth, O., et al., *Deficiency of mannose-binding lectin and burden of infection in children with malignancy: a prospective study*. Lancet, 2001. 358(9282): p. 614-8.
127. Valdimarsson, H., et al., *Human plasma-derived mannose-binding lectin: a phase I safety and pharmacokinetic study*. Scand J Immunol, 2004. 59(1): p. 97-102.
128. Kruse, C., et al., *Low serum level of mannan-binding lectin is a determinant for pregnancy outcome in women with recurrent spontaneous abortion*. Am J Obstet Gynecol, 2002. 187(5): p. 1313-20.
129. Lee, S.G., et al., *Analysis of mannose-binding lectin 2 (MBL2) genotype and the serum protein levels in the Korean population*. Mol Immunol, 2005. 42(8): p. 969-77.
130. Sallenbach, S., et al., *Serum concentrations of lectin-pathway components in healthy neonates, children and adults: mannan-binding lectin (MBL), M-, L-, and H-ficolin, and*

- MBL-associated serine protease-2 (MASP-2)*. *Pediatr Allergy Immunol*, 2011. 22(4): p. 424-30.
131. Wang, M., et al., *Mannan-binding lectin regulates dendritic cell maturation and cytokine production induced by lipopolysaccharide*. *BMC Immunol*, 2011. 12: p. 1.
 132. Bergman, I.M., *Toll-like receptors (TLRs) and mannan-binding lectin (MBL): on constant alert in a hostile environment*. *Ups J Med Sci*, 2011. 116(2): p. 90-9.
 133. Pradhan, V., P. Surve, and K. Ghosh, *Mannose binding lectin (MBL) in autoimmunity and its role in systemic lupus erythematosus (SLE)*. *J Assoc Physicians India*, 2010. 58: p. 688-90.
 134. Garred, P., *Mannose-binding lectin genetics: from A to Z*. *Biochem Soc Trans*, 2008. 36(Pt 6): p. 1461-6.
 135. Garred, P., et al., *Mannose-binding lectin and its genetic variants*. *Genes Immun*, 2006. 7(2): p. 85-94.
 136. Naito, H., et al., *Characterization of human serum mannan-binding protein promoter*. *J Biochem*, 1999. 126(6): p. 1004-12.
 137. Lipscombe, R.J., et al., *Distinct physicochemical characteristics of human mannanose binding protein expressed by individuals of differing genotype*. *Immunology*, 1995. 85(4): p. 660-7.
 138. Madsen, H.O., et al., *A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein*. *Immunogenetics*, 1994. 40(1): p. 37-44.
 139. Tsutsumi, A., et al., *Mannose-binding lectin gene: polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and Sjogren's syndrome*. *Genes Immun*, 2001. 2(2): p. 99-104.
 140. Sasaki, K., et al., *Mannose-binding lectin polymorphisms in patients with hepatitis C virus infection*. *Scand J Gastroenterol*, 2000. 35(9): p. 960-5.
 141. Madsen, H.O., et al., *Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from southeast Africa and South America*. *J Immunol*, 1998. 161(6): p. 3169-75.
 142. Roelofs, R.W., et al., *PCR-restriction fragment length polymorphism method to detect the X/Y polymorphism in the promoter site of the mannanose-binding lectin gene*. *Clin Chem*, 2003. 49(9): p. 1557-8.
 143. Verdu, P., et al., *Evolutionary insights into the high worldwide prevalence of MBL2 deficiency alleles*. *Hum Mol Genet*, 2006. 15(17): p. 2650-8.
 144. Madsen, H.O., et al., *Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein*. *J Immunol*, 1995. 155(6): p. 3013-20.
 145. Sorensen, C.M., et al., *Hormonal regulation of mannan-binding lectin synthesis in hepatocytes*. *Clin Exp Immunol*, 2006. 145(1): p. 173-82.
 146. Turner, M.W., *The role of mannanose-binding lectin in health and disease*. *Mol Immunol*, 2003. 40(7): p. 423-9.
 147. Ivanova, M., et al., *MBL2 single nucleotide polymorphism diversity among four ethnic groups as revealed by a bead-based liquid array profiling*. *Hum Immunol*, 2008. 69(12): p. 877-84.
 148. Casanova, J.L. and L. Abel, *Human Mannose-binding Lectin in Immunity: Friend, Foe, or Both?* *J Exp Med*, 2004. 199(10): p. 1295-9.
 149. Klein, N.J., *Mannose-binding lectin: do we need it?* *Mol Immunol*, 2005. 42(8): p. 919-24.
 150. Tsutsumi, A., R. Takahashi, and T. Sumida, *Mannose binding lectin: genetics and autoimmune disease*. *Autoimmun Rev*, 2005. 4(6): p. 364-72.
 151. Ogden, C.A., et al., *C1q and mannanose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells*. *J Exp Med*, 2001. 194(6): p. 781-95.
 152. Pettigrew, H.D., S.S. Teuber, and M.E. Gershwin, *Clinical significance of complement deficiencies*. *Ann N Y Acad Sci*, 2009. 1173: p. 108-23.

153. Sivaram, G., et al., *Association of genetic variants of mannan-binding (MBL) lectin-2 gene, MBL levels and function in ulcerative colitis and Crohn's disease*. *Innate Immun*, 2011. 17(6): p. 526-31.
154. Inanc, N., et al., *Serum mannose-binding lectin levels are decreased in behcet's disease and associated with disease severity*. *J Rheumatol*, 2005. 32(2): p. 287-91.
155. Hoffmann, C., et al., *Is there a role for mannan-binding lectin in the diagnosis of inflammatory bowel disease?* *Immunogenetics*, 2010. 62(4): p. 231-5.
156. Sandrin-Garcia, P., et al., *Mannose binding lectin gene (MBL2) functional polymorphisms are associated with systemic lupus erythematosus in southern Brazilians*. *Hum Immunol*, 2011. 72(6): p. 516-21.
157. Filho, C.B., et al., *Association of MBL2 gene exon 1 variants with autoimmune thyroid disease in Brazilian patients*. *Int J Immunogenet*, 2012. 39(4): p. 357-61.
158. Gergely, P., Jr., et al., *Structural polymorphisms in the mannose-binding lectin gene are associated with juvenile idiopathic arthritis*. *J Rheumatol*, 2009. 36(4): p. 843-7.
159. Turan, H., et al., *Does MBL2 codon 54 polymorphism play a role in the pathogenesis of psoriasis?* *Int J Dermatol*, 2012.
160. Horiuchi, T., et al., *Mannose binding lectin (MBL) gene mutation is not a risk factor for systemic lupus erythematosus (SLE) and rheumatoid arthritis (RA) in Japanese*. *Genes Immun*, 2000. 1(7): p. 464-6.
161. Im, C.H., et al., *Mannose-binding lectin 2 gene haplotype analysis in Korean patients with ankylosing spondylitis*. *Rheumatol Int*, 2012. 32(8): p. 2251-5.
162. Xie, Q., et al., *Association of MIF-173G/C and MBL2 codon 54 gene polymorphisms with rheumatoid arthritis: a meta-analysis*. *Hum Immunol*, 2012. 73(9): p. 966-71.
163. Lee, Y.H., et al., *The mannose-binding lectin gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus: two case-control studies and a meta-analysis*. *Arthritis Rheum*, 2005. 52(12): p. 3966-74.
164. Xu, W.D., et al., *Association of RANTES and MBL gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis*. *Mol Biol Rep*, 2013. 40(2): p. 941-8.
165. Cai, Y., J. Zhou, and D.C. Webb, *Estrogen stimulates Th2 cytokine production and regulates the compartmentalisation of eosinophils during allergen challenge in a mouse model of asthma*. *Int Arch Allergy Immunol*, 2012. 158(3): p. 252-60.
166. Tai, P., et al., *Induction of regulatory T cells by physiological level estrogen*. *J Cell Physiol*, 2008. 214(2): p. 456-64.
167. Liang, J. and Y. Shang, *Estrogen and cancer*. *Annu Rev Physiol*, 2013. 75: p. 225-40.
168. Straub, R.H., *The complex role of estrogens in inflammation*. *Endocr Rev*, 2007. 28(5): p. 521-74.
169. Babu, R.L., et al., *Effect of estrogen and tamoxifen on the expression pattern of AP-1 factors in MCF-7 cells: role of c-Jun, c-Fos, and Fra-1 in cell cycle regulation*. *Mol Cell Biochem*, 2013. 380(1-2): p. 143-51.
170. Stein, B. and M.X. Yang, *Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF-kappa B and C/EBP beta*. *Mol Cell Biol*, 1995. 15(9): p. 4971-9.
171. Cunningham, M. and G. Gilkeson, *Estrogen receptors in immunity and autoimmunity*. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2011. 40(1): p. 66-73.
172. Cai, Q., et al., *Genetic polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene and risk of breast cancer: results from the Shanghai Breast Cancer Study*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2003. 12(9): p. 853-9.
173. Танев, Д., Робева, Р., Андонова, С. и сътр., *Системен lupus erythematosus и естроген-рецепторен полиморфизъм при българки*. *Ревматология*, 2011. 19(3): p. 59-64.
174. Alonso, P., et al., *Variants in estrogen receptor alpha gene are associated with phenotypical expression of obsessive-compulsive disorder*. *Psychoneuroendocrinology*, 2011. 36(4): p. 473-83.

175. Wang, J., M. Nuite, and T.E. McAlindon, *Association of estrogen and aromatase gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus*. *Lupus*, 2010. 19(6): p. 734-40.
176. Li, L.W. and L. Xu, *Menopausal status modifies breast cancer risk associated with ESR1 PvuII and XbaI polymorphisms in Asian women: a HuGE review and meta-analysis*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012. 13(10): p. 5105-11.
177. Li, Y., et al., *Estrogen receptor-alpha gene PvuII (T/C) and XbaI (A/G) polymorphisms and endometriosis risk: a meta-analysis*. *Gene*, 2012. 508(1): p. 41-8.
178. Wang, K.J., et al., *Association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms with bone mineral density: a meta-analysis*. *Chin Med J (Engl)*, 2012. 125(14): p. 2589-97.
179. Kisiel, B.M., et al., *Differential association of juvenile and adult systemic lupus erythematosus with genetic variants of oestrogen receptors alpha and beta*. *Lupus*, 2011. 20(1): p. 85-9.
180. Hoshi, M., H. Yasuoka, and M. Kuwana, *Estrogen receptor gene polymorphisms in Japanese patients with systemic sclerosis*. *Clin Exp Rheumatol*, 2008. 26(5): p. 914-7.
181. Masi, L., et al., *The role of osteoprotegerin (OPG) and estrogen receptor (ER-alpha) gene polymorphisms in rheumatoid arthritis*. *Clin Cases Miner Bone Metab*, 2007. 4(2): p. 156-60.
182. Savettieri, G., et al., *Lack of association between estrogen receptor 1 gene polymorphisms and multiple sclerosis in southern Italy in humans*. *Neurosci Lett*, 2002. 327(2): p. 115-8.
183. Liu, Z.H., et al., *Sex differences in estrogen receptor gene polymorphism and its association with lupus nephritis in Chinese*. *Nephron*, 2002. 90(2): p. 174-80.
184. Niino, M., et al., *Estrogen receptor gene polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis*. *J Neurol Sci*, 2000. 179(S 1-2): p. 70-5.
185. Baleva M, N.K., Vinarova J, et al. , *The first retrospective and prospective database for immunological disease in Bulgaria ‘Imunolog’*. EMMIT 2007, 3rd, International Conference, 3–5 May Mangalia,, 2007. Romania, Book of Abstracts.
186. Chehab, G., R. Fischer-Betz, and M. Schneider, *[Changes in mortality and morbidity in systemic lupus erythematosus]*. *Z Rheumatol*, 2011. 70(6): p. 480-5.
187. Tsokos, G.C., *Systemic lupus erythematosus*. *N Engl J Med*, 2011. 365(22): p. 2110-21.
188. Odendahl, M., et al., *Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus*. *J Immunol*, 2000. 165(10): p. 5970-9.
189. Cappione, A., 3rd, et al., *Germinal center exclusion of autoreactive B cells is defective in human systemic lupus erythematosus*. *J Clin Invest*, 2005. 115(11): p. 3205-16.
190. Liossis, S.N., et al., *B-cell kinase lyn deficiency in patients with systemic lupus erythematosus*. *J Investig Med*, 2001. 49(2): p. 157-65.
191. Cornall, R.J., et al., *Polygenic autoimmune traits: Lyn, CD22, and SHP-1 are limiting elements of a biochemical pathway regulating BCR signaling and selection*. *Immunity*, 1998. 8(4): p. 497-508.
192. Flores-Borja, F., et al., *Decreased Lyn expression and translocation to lipid raft signaling domains in B lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 2005. 52(12): p. 3955-65.
193. Crispin, J.C., et al., *Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances*. *Trends Mol Med*, 2010. 16(2): p. 47-57.
194. Niewold, T.B., *Interferon alpha as a primary pathogenic factor in human lupus*. *J Interferon Cytokine Res*, 2011. 31(12): p. 887-92.
195. Studnicka-Benke, A., et al., *Tumour necrosis factor alpha and its soluble receptors parallel clinical disease and autoimmune activity in systemic lupus erythematosus*. *Br J Rheumatol*, 1996. 35(11): p. 1067-74.
196. Lacki, J.K., et al., *Cytokine concentration in serum of lupus erythematosus patients: the effect on acute phase response*. *J Med*, 1997. 28(1-2): p. 99-107.
197. Koenig, K.F., et al., *Serum cytokine profile in patients with active lupus nephritis*. *Cytokine*, 2012. 60(2): p. 410-6.

198. Wetter, D.A. and M.D. Davis, *Lupus-like syndrome attributable to anti-tumor necrosis factor alpha therapy in 14 patients during an 8-year period at Mayo Clinic*. Mayo Clin Proc, 2009. 84(11): p. 979-84.
199. Williams, E.L., S. Gadola, and C.J. Edwards, *Anti-TNF-induced lupus*. Rheumatology (Oxford), 2009. 48(7): p. 716-20.
200. Aringer, M. and J.S. Smolen, *The role of tumor necrosis factor-alpha in systemic lupus erythematosus*. Arthritis Res Ther, 2008. 10(1): p. 202.
201. Kodama, S., M. Davis, and D.L. Faustman, *The therapeutic potential of tumor necrosis factor for autoimmune disease: a mechanistically based hypothesis*. Cell Mol Life Sci, 2005. 62(16): p. 1850-62.
202. Su, Y.J., et al., *The association among leukocyte apoptosis, autoantibodies and disease severity in systemic lupus erythematosus*. J Transl Med, 2013. 11(1): p. 261.
203. Blenman, K.R., et al., *Aberrant signaling in the TNFalpha/TNF receptor 1 pathway of the NZM2410 lupus-prone mouse*. Clin Immunol, 2004. 110(2): p. 124-33.
204. Takemura, T., et al., *Cellular localization of inflammatory cytokines in human glomerulonephritis*. Virchows Arch, 1994. 424(5): p. 459-64.
205. Shalaby, M.R., et al., *Endotoxin, tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1 induce interleukin 6 production in vivo*. Clin Immunol Immunopathol, 1989. 53(3): p. 488-98.
206. Tarlinton, D.M. and P.D. Hodgkin, *Targeting plasma cells in autoimmune diseases*. J Exp Med, 2004. 199(11): p. 1451-4.
207. Reyes-Thomas, J., I. Blanco, and C. Putterman, *Urinary biomarkers in lupus nephritis*. Clin Rev Allergy Immunol, 2011. 40(3): p. 138-50.
208. Sabry, A., et al., *Proinflammatory cytokines (TNF-alpha and IL-6) in Egyptian patients with SLE: its correlation with disease activity*. Cytokine, 2006. 35(3-4): p. 148-53.
209. Postal, M. and S. Appenzeller, *The role of Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-alpha) in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus*. Cytokine, 2011. 56(3): p. 537-43.
210. al-Janadi, M., et al., *Cytokine profile in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other rheumatic diseases*. J Clin Immunol, 1993. 13(1): p. 58-67.
211. Miteva, L.D., et al., *Functional genetic polymorphisms in interleukin-12B gene in association with systemic lupus erythematosus*. Rheumatol Int, 2012. 32(1): p. 53-9.
212. Lee, Y.H., J.B. Harley, and S.K. Nath, *Meta-analysis of TNF-alpha promoter -308 A/G polymorphism and SLE susceptibility*. Eur J Hum Genet, 2006. 14(3): p. 364-71.
213. Lin, Y.J., et al., *Association of TNF-alpha gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus in Taiwanese patients*. Lupus, 2009. 18(11): p. 974-9.
214. Jimenez-Morales, S., et al., *Tumor necrosis factor-alpha is a common genetic risk factor for asthma, juvenile rheumatoid arthritis, and systemic lupus erythematosus in a Mexican pediatric population*. Hum Immunol, 2009. 70(4): p. 251-6.
215. Hirankarn, N., Y. Avihingsanon, and J. Wongpiyabovorn, *Genetic susceptibility to SLE is associated with TNF-alpha gene polymorphism -863, but not -308 and -238, in Thai population*. Int J Immunogenet, 2007. 34(6): p. 425-30.
216. Miceli-Richard, C., et al., *A single tumour necrosis factor haplotype influences the response to adalimumab in rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2008. 67(4): p. 478-84.
217. Godarzi, E.M., et al., *Interleukin-6 gene polymorphism in Iranian patients with systemic lupus erythematosus*. Clin Rheumatol, 2011. 30(2): p. 179-84.
218. Lee, Y.H., et al., *The association between interleukin-6 polymorphisms and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis*. Lupus, 2012. 21(1): p. 60-7.
219. Guarnizo-Zuccardi, P., et al., *Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with systemic lupus erythematosus*. Tissue Antigens, 2007. 70(5): p. 376-82.
220. Azizah, M.R., et al., *Association of the tumor necrosis factor alpha gene polymorphism with susceptibility and clinical-immunological findings of systemic lupus erythematosus*. Asian Pac J Allergy Immunol, 2004. 22(2-3): p. 159-63.

221. Chua, K.H., et al., *Interleukin-6 promoter polymorphisms (-174 G/C) in Malaysian patients with systemic lupus erythematosus*. Braz J Med Biol Res, 2009. 42(6): p. 551-5.
222. Suarez, A., et al., *Differential effect of IL10 and TNF{alpha} genotypes on determining susceptibility to discoid and systemic lupus erythematosus*. Ann Rheum Dis, 2005. 64(11): p. 1605-10.
223. Zhu, L.J., et al., *Association of interleukin-10 gene -592 A/C polymorphism with the clinical and pathological diversity of lupus nephritis*. Clin Exp Rheumatol, 2005. 23(6): p. 854-60.
224. Walport, M.J., *Inherited complement deficiency--clues to the physiological activity of complement in vivo*. Q J Med, 1993. 86(6): p. 355-8.
225. Seelen, M.A., L.A. Trouw, and M.R. Daha, *Diagnostic and prognostic significance of anti-C1q antibodies in systemic lupus erythematosus*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2003. 12(6): p. 619-24.
226. Stoyanova, V., et al., *New insight into the autoimmunogenicity of the complement protein C1q*. Mol Immunol, 2011. 48(4): p. 678-82.
227. Turner, M.W., *Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system*. Immunol Today, 1996. 17(11): p. 532-40.
228. Takahashi, R., et al., *Association of mannose binding lectin (MBL) gene polymorphism and serum MBL concentration with characteristics and progression of systemic lupus erythematosus*. Ann Rheum Dis, 2005. 64(2): p. 311-4.
229. Lhotta, K., R. Wurzner, and P. Konig, *Glomerular deposition of mannose-binding lectin in human glomerulonephritis*. Nephrol Dial Transplant, 1999. 14(4): p. 881-6.
230. Davies, E.J., et al., *Mannose-binding protein gene polymorphism in systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1995. 38(1): p. 110-4.
231. Sullivan, K.E., et al., *Mannose-binding protein genetic polymorphisms in black patients with systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1996. 39(12): p. 2046-51.
232. Villarreal, J., et al., *Mannose binding lectin and FcgammaRIIa (CD32) polymorphism in Spanish systemic lupus erythematosus patients*. Rheumatology (Oxford), 2001. 40(9): p. 1009-12.
233. Garred, P., et al., *Association of mannose-binding lectin gene variation with disease severity and infections in a population-based cohort of systemic lupus erythematosus patients*. Genes Immun, 2001. 2(8): p. 442-50.
234. Garcia-Laorden, M.I., et al., *Mannose binding lectin polymorphisms as a disease-modulating factor in women with systemic lupus erythematosus from Canary Islands, Spain*. J Rheumatol, 2003. 30(4): p. 740-6.
235. Lee, Y.H., et al., *The association between the mannose-binding lectin codon 54 polymorphism and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis update*. Mol Biol Rep, 2012. 39(5): p. 5569-74.
236. Jakab, L., et al., *Association between early onset and organ manifestations of systemic lupus erythematosus (SLE) and a down-regulating promoter polymorphism in the MBL2 gene*. Clin Immunol, 2007. 125(3): p. 230-6.
237. Cervera, R., et al., *Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. The European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus*. Medicine (Baltimore), 1993. 72(2): p. 113-24.
238. Weusten, J.J., et al., *Presence of oestrogen receptors in human blood mononuclear cells and thymocytes*. Acta Endocrinol (Copenh), 1986. 112(3): p. 409-14.
239. Kelly, R.H. and F.T. Vertosick, Jr., *Systemic lupus erythematosus: a role for anti-receptor antibodies?* Med Hypotheses, 1986. 20(1): p. 95-101.
240. Inui, A., et al., *Estrogen receptor expression by peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus*. Clin Rheumatol, 2007. 26(10): p. 1675-8.
241. Thorburn, C.M., Pawlikowska, L., Woo, J.M., et al., *641. Confirmation of Esr1 Polymorphism Association with Lupus Nephritis in a Multi-Ethnic Case-Control Cohort*. American College of Rheumatology, Annual Meeting 2006.

242. Johansson, M., et al., *Oestrogen receptor {alpha} gene polymorphisms in systemic lupus erythematosus*. *Ann Rheum Dis*, 2005. 64(11): p. 1611-7.
243. Robeva, R., et al., *Androgen receptor (CAG)_n polymorphism and androgen levels in women with systemic lupus erythematosus and healthy controls*. *Rheumatol Int*, 2013. 33(8): p. 2031-8.
244. Lu, Z.M., et al., *Association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms with cytokine genes expression in systemic lupus erythematosus*. *Croat Med J*, 2009. 50(2): p. 117-23.
245. Hausmann, G., et al., *Cell adhesion molecule expression in cutaneous lesions of dermatomyositis*. *Acta Derm Venereol*, 1996. 76(3): p. 222-5.
246. Du, Z., et al., *Non-conventional signal transduction by type 1 interferons: the NF-kappaB pathway*. *J Cell Biochem*, 2007. 102(5): p. 1087-94.
247. De Bleecker, J.L., et al., *Immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha and its receptors in inflammatory myopathies*. *Neuromuscul Disord*, 1999. 9(4): p. 239-46.
248. Werth, V.P. and W. Zhang, *Wavelength-specific synergy between ultraviolet radiation and interleukin-1 alpha in the regulation of matrix-related genes: mechanistic role for tumor necrosis factor-alpha*. *J Invest Dermatol*, 1999. 113(2): p. 196-201.
249. Mamyrova, G., et al., *Cytokine gene polymorphisms as risk and severity factors for juvenile dermatomyositis*. *Arthritis Rheum*, 2008. 58(12): p. 3941-50.
250. Pachman, L.M., et al., *TNFalpha-308A allele in juvenile dermatomyositis: association with increased production of tumor necrosis factor alpha, disease duration, and pathologic calcifications*. *Arthritis Rheum*, 2000. 43(10): p. 2368-77.
251. Werth, V.P., et al., *Associations of tumor necrosis factor alpha and HLA polymorphisms with adult dermatomyositis: implications for a unique pathogenesis*. *J Invest Dermatol*, 2002. 119(3): p. 617-20.
252. Chinoy, H., et al., *Tumour necrosis factor-alpha single nucleotide polymorphisms are not independent of HLA class I in UK Caucasians with adult onset idiopathic inflammatory myopathies*. *Rheumatology (Oxford)*, 2007. 46(9): p. 1411-6.
253. Langen, R.C., et al., *Tumor necrosis factor-alpha inhibits myogenesis through redox-dependent and -independent pathways*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002. 283(3): p. C714-21.
254. Robledo, G., et al., *Association between -174 interleukin-6 gene polymorphism and biological response to rituximab in several systemic autoimmune diseases*. *DNA Cell Biol*, 2012. 31(9): p. 1486-91.
255. Leddy, J.P., et al., *Hereditary complement (C2) deficiency with dermatomyositis*. *Am J Med*, 1975. 58(1): p. 83-91.
256. Robb, S.A., et al., *C4 complement allotypes in juvenile dermatomyositis*. *Hum Immunol*, 1988. 22(1): p. 31-8.
257. Kovats, S., *Estrogen receptors regulate an inflammatory pathway of dendritic cell differentiation: mechanisms and implications for immunity*. *Horm Behav*, 2012. 62(3): p. 254-62.
258. Sereda, D. and V.P. Werth, *Improvement in dermatomyositis rash associated with the use of antiestrogen medication*. *Arch Dermatol*, 2006. 142(1): p. 70-2.
259. Vaccaro, M., et al., *Dermatomyositis and cutaneous metastases from breast cancer: simultaneous development and parallel course*. *Rheumatol Int*, 2010. 30(8): p. 1091-3.
260. Hochberg, M.C., *Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 1997. 40(9): p. 1725.
261. Bohan, A. and J.B. Peter, *Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts)*. *N Engl J Med*, 1975. 292(8): p. 403-7.
262. Bohan, A. and J.B. Peter, *Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts)*. *N Engl J Med*, 1975. 292(7): p. 344-7.

263. Asghar, T., et al., *The tumor necrosis factor-alpha promoter -1031C polymorphism is associated with decreased risk of endometriosis in a Japanese population.* Hum Reprod, 2004. 19(11): p. 2509-14.
264. Wilson, A.G., et al., *Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product.* Hum Mol Genet, 1992. 1(5): p. 353.
265. Li, H.Q., et al., *Association of polymorphism of tumor necrosis factor-alpha gene promoter region with outcome of hepatitis B virus infection.* World J Gastroenterol, 2005. 11(33): p. 5213-7.
266. Kucukaycan, M., et al., *Tumor necrosis factor-alpha +489G/A gene polymorphism is associated with chronic obstructive pulmonary disease.* Respir Res, 2002. 3: p. 29.
267. Libra, M., et al., *Analysis of G(-174)C IL-6 polymorphism and plasma concentrations of inflammatory markers in patients with type 2 diabetes and peripheral arterial disease.* J Clin Pathol, 2006. 59(2): p. 211-5.
268. Moraes, M.O., et al., *Interleukin-10 promoter haplotypes are differently distributed in the Brazilian versus the Dutch population.* Immunogenetics, 2003. 54(12): p. 896-9.
269. Chong, W.P., et al., *Association of interleukin-10 promoter polymorphisms with systemic lupus erythematosus.* Genes Immun, 2004. 5(6): p. 484-92.
270. Chin, H.J., et al., *Interleukin-10 promoter polymorphism is associated with the predisposition to the development of IgA nephropathy and focal segmental glomerulosclerosis in Korea.* J Korean Med Sci, 2005. 20(6): p. 989-93.
271. Ramasawmy, R., et al., *Association of mannose-binding lectin gene polymorphism but not of mannose-binding serine protease 2 with chronic severe aortic regurgitation of rheumatic etiology.* Clin Vaccine Immunol, 2008. 15(6): p. 932-6.
272. Jakimiuk, A., et al., *Prevalence of estrogen receptor alpha PvuII and XbaI polymorphism in population of Polish postmenopausal women.* Folia Histochem Cytobiol, 2007. 45(4): p. 331-8.
273. Barrett, J.C., et al., *Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps.* Bioinformatics, 2005. 21(2): p. 263-5.
274. Ojeda Ojeda, M., et al., *TNFalpha production in whole blood cultures from healthy individuals.* Biochem Biophys Res Commun, 2002. 292(2): p. 538-41.
275. Maury, C.P. and A.M. Teppo, *Tumor necrosis factor in the serum of patients with systemic lupus erythematosus.* Arthritis Rheum, 1989. 32(2): p. 146-50.
276. Sabry, A., et al., *Correlation between levels of TNF-alpha and IL-6 and hematological involvement in SLE Egyptian patients with lupus nephritis.* Int Urol Nephrol, 2006. 38(3-4): p. 731-7.
277. Reed, A.M., et al., *Changes in novel biomarkers of disease activity in juvenile and adult dermatomyositis are sensitive biomarkers of disease course.* Arthritis Rheum, 2012. 64(12): p. 4078-86.
278. Gabay, C., et al., *Elevated serum levels of interleukin-1 receptor antagonist in polymyositis/dermatomyositis. A biologic marker of disease activity with a possible role in the lack of acute-phase protein response.* Arthritis Rheum, 1994. 37(12): p. 1744-51.
279. Xing, D., et al., *Estrogen modulates NFkappaB signaling by enhancing IkappaBalpha levels and blocking p65 binding at the promoters of inflammatory genes via estrogen receptor-beta.* PLoS One, 2012. 7(6): p. e36890.
280. Fathy, M., Kamal, M., El-Mougy, F. et al., *TNF-alpha-308 promoter G/A and PTPN22 (1858 C/T) genes polymorphisms in Egyptian patients with systemic lupus erythematosus.* Comparative Clinical Pathology, 2013. 22(5): p. 947-954.
281. Cerone, L. and Z. Neufeld, *Differential gene expression regulated by oscillatory transcription factors.* PLoS One, 2012. 7(1): p. e30283.

282. Kaijzel, E.L., et al., *Allele-specific quantification of tumor necrosis factor alpha (TNF) transcription and the role of promoter polymorphisms in rheumatoid arthritis patients and healthy individuals*. *Genes Immun*, 2001. 2(3): p. 135-44.
283. Gowers, I.R., et al., *Age-related loss of CpG methylation in the tumour necrosis factor promoter*. *Cytokine*, 2011. 56(3): p. 792-7.
284. Angelo, H.D., et al., *Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism -308 G/A in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus*. *Hum Immunol*, 2012. 73(11): p. 1166-70.
285. Santos, M.J., et al., *TNF promoter -308 G>A and LTA 252 A>G polymorphisms in Portuguese patients with systemic lupus erythematosus*. *Rheumatol Int*, 2012. 32(8): p. 2239-44.
286. Tobon, G.J., et al., *Lack of association between TNF-308 polymorphism and the clinical and immunological characteristics of systemic lupus erythematosus and primary Sjogren's syndrome*. *Clin Exp Rheumatol*, 2005. 23(3): p. 339-44.
287. Parks, C.G., et al., *Genetic polymorphisms in tumor necrosis factor (TNF)-alpha and TNF-beta in a population-based study of systemic lupus erythematosus: associations and interaction with the interleukin-1alpha-889 C/T polymorphism*. *Hum Immunol*, 2004. 65(6): p. 622-31.
288. van der Linden, M.W., et al., *Six microsatellite markers on the short arm of chromosome 6 in relation to HLA-DR3 and TNF-308A in systemic lupus erythematosus*. *Genes Immun*, 2001. 2(7): p. 373-80.
289. Zuniga, J., et al., *Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphisms in Mexican patients with systemic lupus erythematosus (SLE)*. *Genes Immun*, 2001. 2(7): p. 363-6.
290. Boechat, A.L., et al., *The influence of a TNF gene polymorphism on the severity of rheumatoid arthritis in the Brazilian Amazon*. *Cytokine*, 2013. 61(2): p. 406-12.
291. Zeng, Z., et al., *Association between tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) promoter -308 G/A and response to TNF-alpha blockers in rheumatoid arthritis: a meta-analysis*. *Mod Rheumatol*, 2013. 23(3): p. 489-95.
292. Higuchi, T., et al., *Polymorphism of the 5'-flanking region of the human tumor necrosis factor (TNF)-alpha gene in Japanese*. *Tissue Antigens*, 1998. 51(6): p. 605-12.
293. Bonyadi, M., et al., *TNF-alpha gene polymorphisms in Iranian Azeri Turkish patients with Behcet's Disease*. *Rheumatol Int*, 2009. 30(2): p. 285-9.
294. Zhou, Q., et al., *MicroRNA-146a and Ets-1 gene polymorphisms in ocular Behcet's disease and Vogt-Koyanagi-Harada syndrome*. *Ann Rheum Dis*, 2014. 73(1): p. 170-6.
295. Chatzikyriakidou, A., et al., *Combined tumour necrosis factor-alpha and tumour necrosis factor receptor genotypes could predict rheumatoid arthritis patients' response to anti-TNF-alpha therapy and explain controversies of studies based on a single polymorphism*. *Rheumatology (Oxford)*, 2007. 46(6): p. 1034-5.
296. Kang, C.P., et al., *The influence of a polymorphism at position -857 of the tumour necrosis factor alpha gene on clinical response to etanercept therapy in rheumatoid arthritis*. *Rheumatology (Oxford)*, 2005. 44(4): p. 547-52.
297. Наумова, Е., Иванова, М., *Главен комплекс на тъканната съвместимост - факти, хипотези, приложение в медицината*. *Лице, София 2006: 41-56*.
298. Fabris, M., et al., *Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism in severe and mild-moderate rheumatoid arthritis*. *J Rheumatol*, 2002. 29(1): p. 29-33.
299. Available from:
http://allelefrequencies.net/cyt6001a.asp?cyt_gene=TNFalpha%2F&cyt_allele1=TNFalpha%2F+-+238+AA&cyt_allele2=TNFalpha%2F+-+238+GG&cyt_selection=&cyt_population=&cyt_country=&cyt_dataset=&cyt_region=Western+Europe&cyt_ethnic=&cyt_study=&cyt_order=

300. Kaijzel, E.L., et al., *Functional analysis of a human tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) promoter polymorphism related to joint damage in rheumatoid arthritis*. Mol Med, 1998. 4(11): p. 724-33.
301. Kassi, E. and P. Moutsatsou, *Estrogen receptor signaling and its relationship to cytokines in systemic lupus erythematosus*. J Biomed Biotechnol, 2010. 2010: p. 317452.
302. Hamdy, E., Reham, A., Kamal, A., , *IL-6 promoter polymorphism (-174G/C) and systemic lupus erythematosus*. Comparative Clinical Pathology, 2012. 21(5): p. 975-979.
303. Schotte, H., et al., *Interleukin-6 promoter polymorphism (-174 G/C) in Caucasian German patients with systemic lupus erythematosus*. Rheumatology (Oxford), 2001. 40(4): p. 393-400.
304. Santos, M.J., et al., *Interleukin-6 promoter polymorphism -174 G/C is associated with nephritis in Portuguese Caucasian systemic lupus erythematosus patients*. Clin Rheumatol, 2011. 30(3): p. 409-13.
305. Huang, C.M., et al., *Lack of association of interleukin-6 and interleukin-8 gene polymorphisms in Chinese patients with systemic lupus erythematosus*. J Clin Lab Anal, 2006. 20(6): p. 255-9.
306. Asano, N.M., et al., *Interleukin-6 promoter polymorphisms -174 G/C in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus*. Hum Immunol, 2013. 74(9): p. 1153-6.
307. Yang, Z., et al., *A meta-analysis of the association of IL-6 -174 G/C and -572 G/C polymorphisms with systemic lupus erythematosus risk*. Rheumatol Int, 2013.
308. Borinskaya, S.A., et al., *[Allele frequency distributions of -174G/C polymorphism in regulatory region of interleukin 6 gene (IL6) in Russian and worldwide populations]*. Genetika, 2013. 49(1): p. 113-24.
309. Di Renzo, L., et al., *-174G/C IL-6 gene promoter polymorphism predicts therapeutic response to TNF-alpha blockers*. Pharmacogenet Genomics, 2012. 22(2): p. 134-42.
310. Ogata, A. and T. Tanaka, *Tocilizumab for the treatment of rheumatoid arthritis and other systemic autoimmune diseases: current perspectives and future directions*. Int J Rheumatol, 2012. 2012: p. 946048.
311. Kamata, Y. and S. Minota, *Successful treatment of massive intractable pericardial effusion in a patient with systemic lupus erythematosus with tocilizumab*. BMJ Case Rep, 2012. 2012.
312. Garcia-Hernandez, F.J., et al., *Tocilizumab for treating refractory haemolytic anaemia in a patient with systemic lupus erythematosus*. Rheumatology (Oxford), 2012. 51(10):p.1918-9.
313. Makol, A., L.E. Gibson, and C.J. Michet, *Successful use of interleukin 6 antagonist tocilizumab in a patient with refractory cutaneous lupus and urticarial vasculitis*. J Clin Rheumatol, 2012. 18(2): p. 92-5.
314. Narazaki, M., et al., *Therapeutic effect of tocilizumab on two patients with polymyositis*. Rheumatology (Oxford), 2011. 50(7): p. 1344-6.
315. Schaap, L.A., et al., *Inflammatory markers and loss of muscle mass (sarcopenia) and strength*. Am J Med, 2006. 119(6): p. 526 e9-17.
316. Wang, B., et al., *Association of the -1082G/A polymorphism in the interleukin-10 gene with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis*. Gene, 2013. 519(2): p. 209-16.
317. Song, G.G., et al., *Associations between interleukin-10 polymorphisms and susceptibility to systemic lupus erythematosus: a meta-analysis*. Hum Immunol, 2013. 74(3): p. 364-70.
318. Zhou, M., et al., *Association of the interleukin-10 gene polymorphism (-1082A/G) with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis*. Lupus, 2013. 22(2): p. 128-35.
319. Lin, Y.J., et al., *IL-10 and TNF-alpha promoter polymorphisms in susceptibility to systemic lupus erythematosus in Taiwan*. Clin Exp Rheumatol, 2010. 28(3): p. 318-24.
320. Rosado, S., et al., *Interleukin-10 promoter polymorphisms in patients with systemic lupus erythematosus from the Canary Islands*. Int J Immunogenet, 2008. 35(3): p. 235-42.

321. Sung, Y.K., et al., *Interleukin-10 gene polymorphisms are associated with the SLICC/ACR Damage Index in systemic lupus erythematosus*. Rheumatology (Oxford), 2006. 45(4): p. 400-4.
322. Nath, S.K., J.B. Harley, and Y.H. Lee, *Polymorphisms of complement receptor 1 and interleukin-10 genes and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis*. Hum Genet, 2005. 118(2): p. 225-34.
323. Khoa, P.D., T. Sugiyama, and T. Yokochi, *Polymorphism of interleukin-10 promoter and tumor necrosis factor receptor II in Vietnamese patients with systemic lupus erythematosus*. Clin Rheumatol, 2005. 24(1): p. 11-3.
324. S, D.A., et al., *Association tests with systemic lupus erythematosus (SLE) of IL10 markers indicate a direct involvement of a CA repeat in the 5' regulatory region*. Genes Immun, 2002. 3(8): p. 454-63.
325. Rood, M.J., et al., *Neuropsychiatric systemic lupus erythematosus is associated with imbalance in interleukin 10 promoter haplotypes*. Ann Rheum Dis, 1999. 58(2): p. 85-9.
326. Mok, C.C., et al., *Interleukin-10 promoter polymorphisms in Southern Chinese patients with systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1998. 41(6): p. 1090-5.
327. Iyer, S.S. and G. Cheng, *Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease*. Crit Rev Immunol, 2012. 32(1): p. 23-63.
328. Lazarus, M., et al., *Genetic variation in the interleukin 10 gene promoter and systemic lupus erythematosus*. J Rheumatol, 1997. 24(12): p. 2314-7.
329. van der Linden, M.W., et al., *High interleukin-10 production in first-degree relatives of patients with generalized but not cutaneous lupus erythematosus*. J Investig Med, 2000. 48(5): p. 327-34.
330. Temple, S.E., et al., *Alleles carried at positions -819 and -592 of the IL10 promoter affect transcription following stimulation of peripheral blood cells with Streptococcus pneumoniae*. Immunogenetics, 2003. 55(9): p. 629-32.
331. Reuss, E., et al., *Differential regulation of interleukin-10 production by genetic and environmental factors--a twin study*. Genes Immun, 2002. 3(7): p. 407-13.
332. Oleksyk, T.K., et al., *Extended IL10 haplotypes and their association with HIV progression to AIDS*. Genes Immun, 2009. 10(4): p. 309-22.
333. Eisen, D.P., et al., *Low serum mannose-binding lectin level increases the risk of death due to pneumococcal infection*. Clin Infect Dis, 2008. 47(4): p. 510-6.
334. Gadjeva, M., K. Takahashi, and S. Thiel, *Mannan-binding lectin--a soluble pattern recognition molecule*. Mol Immunol, 2004. 41(2-3): p. 113-21.
335. Hoefflich, C., et al., *Clinical manifestation of mannose-binding lectin deficiency in adults independent of concomitant immunodeficiency*. Hum Immunol, 2009. 70(10): p. 809-12.
336. Lotz, D.R., Knutsen A.P, *Concomitant selective antibody deficiency in pediatric patients with mannose-binding lectin deficiency*. Pediatric Allergy, Immunology, and Pulmonology, 2010. 23: p. 265-271.
337. Panda, A.K., et al., *Mannose binding lectin: a biomarker of systemic lupus erythematosus disease activity*. Arthritis Res Ther, 2012. 14(5): p. R218.
338. Bouwman, L.H., B.O. Roep, and A. Roos, *Mannose-binding lectin: clinical implications for infection, transplantation, and autoimmunity*. Hum Immunol, 2006. 67(4-5): p. 247-56.
339. Sandahl, T.D., et al., *The lectin pathway of the complement system is downregulated in Crohn's disease patients who respond to anti-TNF-alpha therapy*. J Crohns Colitis, 2013.
340. Piao, W., et al., *Mannose-binding lectin is a disease-modifying factor in North American patients with systemic lupus erythematosus*. J Rheumatol, 2007. 34(7): p. 1506-13.
341. Minchinton, R.M., et al., *Analysis of the relationship between mannose-binding lectin (MBL) genotype, MBL levels and function in an Australian blood donor population*. Scand J Immunol, 2002. 56(6): p. 630-41.
342. Panda, A.K., et al., *Low producer MBL genotypes are associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Odisha, India*. Hum Immunol, 2013. 74(1): p. 114-9.

343. Werth, V.P., et al., *Mannose binding lectin (MBL) polymorphisms associated with low MBL production in patients with dermatomyositis*. J Invest Dermatol, 2002. 119(6): p. 1394-9.
344. Lokitz, M.L., et al., *Ultraviolet-B recruits mannose-binding lectin into skin from non-cutaneous sources*. J Invest Dermatol, 2005. 125(1): p. 166-73.
345. Asgharzadeh, M., et al., *Mannose-binding lectin gene and promoter polymorphism in visceral leishmaniasis caused by Leishmania infantum*. Pak J Biol Sci, 2007. 10(11): p. 1850-4.
346. Jack, D.L., et al., *Mannose-binding lectin regulates the inflammatory response of human professional phagocytes to Neisseria meningitidis serogroup B*. J Infect Dis, 2001. 184(9): p. 1152-62.
347. Okasha K., S.A., Noor E. N. M., et al. , *Mannose Binding Lectin Serum Level and Gene Polymorphism in Patients with SLE and Its Relation to the Development of Lupus Nephritis* Int J Nephrol Urol 2010. 2: p. 401-413.
348. Tsai, Y.C., et al., *Lack of association of mannose-binding lectin gene polymorphisms with development and clinical manifestations of systemic lupus erythematosus in Chinese children*. Lupus, 2009. 18(4): p. 372-6.
349. Werth, V.P., M. Bashir, and W. Zhang, *Photosensitivity in rheumatic diseases*. J Investig Dermatol Symp Proc, 2004. 9(1): p. 57-63.
350. Glesse, N., et al., *Association of mannose-binding lectin 2 gene polymorphic variants with susceptibility and clinical progression in systemic lupus erythematosus*. Clin Exp Rheumatol, 2011. 29(6): p. 983-90.
351. Monticciolo, O.A., et al., *Mannose-binding lectin gene polymorphisms in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus*. Lupus, 2010. 19(3): p. 280-7.
352. Navarra, S.V., et al., *Increased frequency of mannose-binding lectin promoter LX haplotype among Filipinos with systemic lupus erythematosus*. Lupus, 2007. 16(2): p. 147-8.
353. Li, S.G., et al., *[The role of mannose binding lectin in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus]*. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2006. 86(7): p. 463-7.
354. Bertoli, A.M., et al., *Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort: XXXVI. Influence of mannose-binding lectin exon 1 polymorphisms in disease manifestations, course, and outcome*. Arthritis Rheum, 2006. 54(5): p. 1703-4.
355. Jonsen, A., et al., *Analysis of HLA DR, HLA DQ, C4A, FcgammaRIIa, FcgammaRIIIa, MBL, and IL-1Ra allelic variants in Caucasian systemic lupus erythematosus patients suggests an effect of the combined FcgammaRIIa R/R and IL-1Ra 2/2 genotypes on disease susceptibility*. Arthritis Res Ther, 2004. 6(6): p. R557-62.
356. Huang, Y.F., et al., *Increased frequency of the mannose-binding lectin LX haplotype in Chinese systemic lupus erythematosus patients*. Eur J Immunogenet, 2003. 30(2): p. 121-4.
357. Sullivan, K.E., et al., *Analysis of polymorphisms affecting immune complex handling in systemic lupus erythematosus*. Rheumatology (Oxford), 2003. 42(3): p. 446-52.
358. Lee, Y.J., et al., *Association of the oestrogen receptor alpha gene polymorphisms with disease onset in systemic lupus erythematosus*. Ann Rheum Dis, 2004. 63(10): p. 1244-9.
359. Doukas, C., et al., *Hormonal parameters and sex hormone receptor gene polymorphisms in men with autoimmune diseases*. Rheumatol Int, 2013. 33(3): p. 575-82.
360. Hsieh, Y.Y., et al., *Estrogen receptor alpha-351 XbaI*G and -397 PvuII*C-related genotypes and alleles are associated with higher susceptibilities of endometriosis and leiomyoma*. Mol Hum Reprod, 2007. 13(2): p. 117-22.
361. Zofkova, I., K. Zajickova, and M. Hill, *The estrogen receptor alpha gene determines serum androstenedione levels in postmenopausal women*. Steroids, 2002. 67(10): p. 815-9.
362. Schuit, S.C., et al., *Estrogen receptor alpha gene polymorphisms are associated with estradiol levels in postmenopausal women*. Eur J Endocrinol, 2005. 153(2): p. 327-34.
363. Cotter, S.M., *Hematology*, in *Drugs, toxins and metabolic causes of nonregenerative anemia*, . 2001, p53, Teton NewMedia: Jackson, USA.

364. Choi, K.W., et al., *The Photosensitivity Localized in a Vitiliginous Lesion Was Associated with the Intramuscular Injections of Synthetic Progesterone during an In Vitro Fertilization-embryo Transfer*. *Ann Dermatol*, 2009. 21(1): p. 88-91.
365. Hiramoto, K., et al., *Effect of 17beta-estradiol on immunosuppression induced by ultraviolet B irradiation*. *Arch Dermatol Res*, 2004. 295(8-9): p. 307-11.
366. Shim, G.J., et al., *Autoimmune glomerulonephritis with spontaneous formation of splenic germinal centers in mice lacking the estrogen receptor alpha gene*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(6): p. 1720-4.
367. Tiidus, P.M., *Influence of estrogen on muscle plasticity*. *Brazilian Journal of Biomotricity* 2011. 5(3): p. 143-155.
368. Enns, D.L. and P.M. Tiidus, *The influence of estrogen on skeletal muscle: sex matters*. *Sports Med*, 2010. 40(1): p. 41-58.
369. Dziedziejko, V., et al., *The effect of ESR1 and ESR2 gene polymorphisms on the outcome of rheumatoid arthritis treatment with leflunomide*. *Pharmacogenomics*, 2011. 12(1): p. 41-7.
370. Pawlik, A., et al., *Effect of ESR1 and ESR2 gene polymorphisms on rheumatoid arthritis treatment with methotrexate*. *Pharmacol Rep*, 2012. 64(1): p. 185-90.

СЪДЪРЖАНИЕ:

ВЪВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА I. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	5
1. АВТОИМУНИТЕТ	5
2. СЪВРЕМЕННИ НАПРАВЛЕНИЯ НА ИЗСЛЕДВАНИЯТА ПРИ АВТОИМУННИТЕ БОЛЕСТИ	6
2.1. ИМУНОГЕНЕТИКА	6
2.2. ЕПИГЕНЕТИКА	8
3. КАНДИДАТ-ГЕНИ ПРИ АВТОИМУННИТЕ БОЛЕСТИ - ОБЩИ (СПОДЕЛЕНИ) И СПЕЦИФИЧНИ ГЕНИ. ГЕНЕТИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ ПРИ СЛЕ И ДМ	9
4. РОЛЯ НА ЦИТОКИНИТЕ И ПОЛИМОРФИЗМИ В ЦИТОКИНОВИТЕ ГЕНИ ЗА ВЪЗНИКВАНЕТО НА АВТОИМУННИТЕ БОЛЕСТИ	10
4.1. ТУМОР НЕКРОТИЗИРАЩ ФАКТОР – АЛФА (TNF-α)	12
4.1.1. Биологични характеристики на TNF- α и механизъм на действие	12
4.1.2. Генетична организация на <i>TNFA</i> гена и генна експресия.....	14
4.1.3. Роля на <i>TNFA</i> хаплотипите	16
4.1.4. Популационни проучвания върху <i>TNFA</i> полиморфизмите.....	16
4.1.5. Проучвания върху серумните нива на TNF- α и полиморфизми в <i>TNFA</i> гена при автоимунни заболявания	17
4.2. ИНТЕРЛЕВКИН 6 (IL-6)	18
4.2.1. Биологични характеристики на IL-6 и механизъм на действие	18
4.2.2. Серумни нива IL-6, структурна организация на <i>IL-6</i> гена и генна експресия. Проучвания върху полиморфизми в <i>IL-6</i> гена при автоимунни болести.....	20
4.3. ИНТЕРЛЕВКИН 10 (IL-10)	21
4.3.1. Биологични характеристики на IL-10 и механизъм на действие	21
4.3.2. Структурна организация на <i>IL-10</i> гена и генна експресия	22
4.3.2.1. Проксимални промоторни полиморфизми в <i>IL-10</i> гена	22
4.3.2.2. Дистални промоторни полиморфизми в <i>IL-10</i> гена.....	23
4.3.3. Проучвания върху полиморфизми в <i>IL-10</i> гена при автоимунни болести.....	24
5. МАНОЗО-СВЪРЗВАЩ ЛЕКТИН	25
5.1. БИОЛОГИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА MBL И МЕХАНИЗЪМ НА ДЕЙСТВИЕ	25
5.2. ГЕНЕТИЧНА ОРГАНИЗАЦИЯ НА MBL2 ГЕНА. СТРУКТУРНИ И ПОМОТОРНИ ПОЛИМОРФИЗМИ	26

5.2.1. Структурни полиморфизми в <i>MBL2</i> гена, генна експресия и влияние върху серумната концентрация. Популационни различия	26
5.2.2. Организация на промоторния участък на <i>MBL2</i> гена - регулаторни SNPs, генна експресия и влияние върху серумната концентрация. Популационни различия	27
5.3. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА "СЕКРЕТОРНИ ХАПЛОТИПИ" - ГЕНЕТИЧНО	
ДЕТЕРМИНИРАНЕ НА СЕРУМНИТЕ НИВА НА MBL	28
5.4. ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ СЕКРЕТОРНИТЕ ПОЛИМОРФИЗМИ В <i>MBL2</i> ГЕНА ПРИ АВТОИМУННИ БОЛЕСТИ	29
6. ЕСТРОГЕНИ И ПОЛИМОРФИЗМИ В ГЕНА ЗА ЕСТРОГЕНОВ РЕЦЕПТОР - α	31
6.1. БИОЛОГИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ЕСТРОГЕНИТЕ	31
6.2. ЕСТРОГЕНОВИ РЕЦЕПТОРИ - РОЛЯ В СИГНАЛНАТА ТРАНСДУКЦИЯ	31
6.3. СТРУКТУРНА ОРГАНИЗАЦИЯ НА ГЕНА ЗА ЕСТРОГЕНОВ РЕЦЕПТОР - АЛФА. ПОЛИМОРФИЗМИ <i>Xba</i> I И <i>Pvu</i> II - РОЛЯ ПРИ АВТОИМУННИТЕ БОЛЕСТИ.....	32
7. СИСТЕМЕН ЛУПУС ЕРИТЕМАТОЗУС	33
7.1. ЕТИОПАТОГЕНЕЗА	34
7.2. ПРОМЕНИ В ХУМОРАЛНИЯ ИМУНЕН ОТГОВОР.....	34
7.3. ПРОМЕНИ В КЛЕТЪЧНИТЕ ПОПУЛАЦИИ - РОЛЯ НА ЦИТОКИНИТЕ.....	34
7.4. ЦИТОКИНОВ ДИСБАЛАНС.....	35
7.5. ПОЛИМОРФИЗМИ В ЦИТОКИНОВИТЕ ГЕНИ.....	36
7.6. СИСТЕМА НА КОМПЛЕМЕНТА, MBL И <i>MBL2</i> ПОЛИМОРФИЗМИ ПРИ СЛЕ.....	38
7.7. ЕСТРОГЕНИ И ПОЛИМОРФИЗМИ В ГЕНА <i>ESR1</i> ПРИ СЛЕ	40
8. ДЕРМАТОМИОЗИТ	41
8.1. ЕТИОПАТОГЕНЕЗА	41
8.2. РОЛЯ НА ЦИТОКИНИТЕ И ПОЛИМОРФИЗМИТЕ В ЦИТОКИНОВИТЕ ГЕНИ ПРИ ДМ.....	42
8.3. СИСТЕМА НА КОМПЛЕМЕНТА, MBL И <i>MBL2</i> ПОЛИМОРФИЗМИ ПРИ ДМ	44
8.4. ЕСТРОГЕНИ И ПОЛИМОРФИЗМИ В ГЕНА <i>ESR1</i> ПРИ ДМ	44
9. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	45
ГЛАВА II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	47
ГЛАВА III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	48
1. МАТЕРИАЛИ	48
1.1. ИЗСЛЕДВАНИ ЛИЦА	48
1.2. БИОЛОГИЧЕН МАТЕРИАЛ.....	50
2. МЕТОДИ	52
2.1. СЕРОЛОГИЧНИ МЕТОДИ	52

2.1.1. Определяне на серумни нива на TNF- α	52
2.1.2. Определяне на серумни нива на MBL	54
2.1.3. Определяне на антитела	55
2.2. МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧНИ МЕТОДИ	56
2.2.1. Полимеразна верижна реакция (PCR).....	57
2.2.2. Рестрикционен анализ на полиморфизми по дължината на фрагмента (RFLP).....	59
2.3. СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ	61
ГЛАВА IV. РЕЗУЛТАТИ	64
1. ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ ЦИТОКИНИ И ПОЛИМОРФИЗМИ В ЦИТОКИНОВИТЕ ГЕНИ	64
1.1. ТУМОР НЕКРОТИЗИРАЩ ФАКТОР - АЛФА (TNF-α)	64
1.1.1. Серумни нива на TNF- α	64
1.1.1.1. Серумни нива на TNF- α при изследваните болни и здрави лица	64
1.1.1.2. Влияние на пола и възрастта върху серумните нива на TNF- α	66
1.1.1.3. Влияние на серумните нива на TNF- α върху клиничните признаци на СЛЕ и ДМ	67
1.1.2. Влияние на <i>TNFA</i> полиморфизмите върху продукцията на TNF- α	68
1.1.2.1. Генотипно влияние върху продукцията на TNF- α при здрави и болни лица	68
1.1.2.2. Влияние на хаплотипните комбинации в <i>TNFA</i> гена върху продукцията на TNF- α	71
1.1.3. Генетичен анализ на полиморфизми в <i>TNFA</i> гена	74
1.1.3.1. Асоциативно проучване на изследваните <i>TNFA</i> полиморфизми при СЛЕ и ДМ.....	74
1.1.3.2. Алелно и генотипно влияние на <i>TNFA</i> полиморфизмите върху клиничните признаци при СЛЕ	81
1.1.3.3. Алелно и генотипно влияние на <i>TNFA</i> полиморфизмите върху клиничните признаци при ДМ	83
1.1.3.4. Хаплотипно разпределение на <i>TNFA</i> -1031/-863/-857/-308/-238/489 при здрави и болни лица със СЛЕ и ДМ	84
1.2. ИНТЕРЛЕВКИН 6 (<i>IL-6</i>)	87
1.2.1. Асоциативно проучване на <i>IL-6</i> -174G/C полиморфизма при СЛЕ и ДМ	87
1.2.2. Алелно и генотипно влияние на <i>IL-6</i> -174G/C полиморфизма върху клиничните признаци при СЛЕ и ДМ	88
1.3. ИНТЕРЛЕВКИН 10 (<i>IL-10</i>)	90
1.3.1. Асоциативно проучване на изследваните <i>IL-10</i> полиморфизми при СЛЕ и ДМ	90
1.3.2. Алелно и генотипно влияние на изследваните <i>IL-10</i> полиморфизми върху клиничните признаци при СЛЕ	93

1.3.3. Алелно и генотипно влияние на изследваните <i>IL-10</i> полиморфизми върху клиничните признаци при ДМ.....	96
1.3.4. Хаплотипно разпределение на <i>IL-10</i> -3575/-2849/-2763/-592 при здрави и болни лица със СЛЕ и ДМ.....	98
2. ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ МАНОЗО-СВЪРЗВАЩ ЛЕКТИН (MBL) И ПОЛИМОРФИЗМИ В <i>MBL2</i> ГЕНА	100
2.1. СЕРУМНИ НИВА НА MBL.....	100
2.1.1. Серумни нива на MBL при изследваните здрави и болни лица.....	100
2.1.2. Влияние на серумни нива на MBL върху клиничните признаци при СЛЕ и ДМ..	101
2.1.3. Влияние на пола и възрастта върху серумни нива на MBL.....	101
2.2. ВЛИЯНИЕ НА <i>MBL2</i> ПОЛИМОРФИЗМИТЕ ВЪРХУ ПРОДУКЦИЯТА НА MBL	102
2.2.1. Генотипно влияние на серумни нива на MBL при здрави и болни лица	102
2.2.2. Влияние на хаплотипите в <i>MBL2</i> гена върху секрецията на MBL.....	105
2.3. ГЕНЕТИЧЕН АНАЛИЗ НА СЕКРЕТОРНИТЕ ПОЛИМОРФИЗМИ В <i>MBL2</i> ГЕНА ...	108
2.3.1. Асоциативно проучване на изследваните <i>MBL2</i> полиморфизми при СЛЕ и ДМ ..	108
2.3.2. Алелно и генотипно влияние на <i>MBL2</i> полиморфизмите върху клиничните признаци при СЛЕ и ДМ	110
2.3.2.1. <i>MBL2</i> промоторни полиморфизми и клинични признаци при СЛЕ и ДМ.....	110
2.3.2.2. <i>MBL2</i> структурни полиморфизми и клинични признаци при СЛЕ и ДМ	112
2.3.3. Хаплотипно разпределение на <i>MBL2</i> -550/-221/223/230/239 при здрави и болни лица със СЛЕ и ДМ	113
3. ПРОУЧВАНЕ ВЪРХУ ПОЛИМОРФИЗМИ В ГЕНА ЗА ЕСТРОГЕНОВ РЕЦЕПТОР – АЛФА (<i>ESR1</i>).....	115
3.1. Асоциативно проучване на изследваните <i>ESR1</i> полиморфизми при СЛЕ и ДМ.....	115
3.2. Влияние на <i>ESR1</i> полиморфизмите върху клиничните признаци при СЛЕ и ДМ.....	116
ГЛАВА V. ОБСЪЖДАНЕ	119
1. ЦИТОКИНИ И ПОЛИМОРФИЗМИ В ЦИТОКИНОВИТЕ ГЕНИ – РОЛЯ ПРИ СЛЕ И ДМ	119
1.1. ТУМОР НЕКРОТИЗИРАЩ ФАКТОР - АЛФА (<i>TNFA</i>) – РОЛЯ ПРИ ЗДРАВИ И БОЛНИ ЛИЦА	119
1.1.1. Роля на TNF- α за развитието и клиничните прояви при СЛЕ и ДМ.....	120
1.1.2. Роля на <i>TNFA</i> полиморфизмите за продукцията на TNF- α	121
1.1.2.1. Генотипно влияние на <i>TNFA</i> полиморфизмите върху продукцията на TNF- α	121
1.1.2.2. Роля на <i>TNFA</i> хаплотипите за продукцията на TNF- α	122
1.1.3. <i>TNFA</i> полиморфизми и генетична предразположеност към СЛЕ и ДМ	123

1.2. ПОЛИМОРФИЗЪМ <i>IL-6</i> -174G/C – РОЛЯ ПРИ СЛЕ И ДМ.....	127
1.3. <i>IL-10</i> ПОЛИМОРФИЗМИ – РОЛЯ ПРИ СЛЕ И ДМ.....	130
1.3.1. Честотно разпределение на дисталните <i>IL-10</i> полиморфизми у здрави българи ..	131
1.3.2. Роля на <i>IL-10</i> полиморфизмите и генетична предразположеност към СЛЕ и ДМ	131
2. MBL И ПОЛИМОРФИЗМИ В <i>MBL2</i> ГЕНА - РОЛЯ ПРИ СЛЕ И ДМ.....	134
2.1. СЕРУМНИ НИВА НА MBL	134
2.2. ЧЕСТОТА НА СЕКРЕТОРНИТЕ ПОЛИМОРФИЗМИ В <i>MBL2</i> ГЕНА СРЕД БЪЛГАРИ	134
2.3. РОЛЯ НА СЕРУМНИТЕ НИВА НА MBL ЗА РАЗВИТИЕТО И КЛИНИЧНИТЕ ПРОЯВИ НА СЛЕ И ДМ.....	135
2.4. РОЛЯ НА НУКЛЕОТИДНИТЕ ПОЛИМОРФИЗМИ В <i>MBL2</i> ГЕНА ЗА СЕРУМНИТЕ НИВА НА MBL	135
2.5. ГЕНЕТИЧНИ МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА <i>MBL2</i> ПОЛИМОРФИЗМИТЕ	136
2.6. СЕКРЕТОРНИ ПОЛИМОРФИЗМИ В <i>MBL2</i> ГЕНА И ГЕНЕТИЧНА ПРЕДРАЗПОЛОЖЕНОСТ КЪМ СЛЕ И ДМ	136
3. ПОЛИМОРФИЗМИ В ГЕНА <i>ESR1</i> - РОЛЯ ПРИ СЛЕ И ДМ	140
ГЛАВА VI. ОБОБЩЕНИЕ.....	143
ГЛАВА VII. ИЗВОДИ.....	145
ГЛАВА VIII. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ	147
ГЛАВА IX. СПРАВКА ЗА ПУБЛИКАЦИИ, ЦИТИРАНИЯ И ДОКЛАДИ ...	148
ЛИТЕРАТУРА	149
СЪДЪРЖАНИЕ.....	167