

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КЛИНИЧЕН ЦЕНТЪР ПО НЕФРОЛОГИЯ
УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ”

д-р Васил Венциславов Василев

**АВТОАНТИТЕЛА СРЕЩУ КОМПОНЕНТИ НА
КОМПЛЕМЕНТА ПРИ ПАЦИЕНТИ С
ЛУПУСНА НЕФРОПАТИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

за

присъждане на образователна и научна степен

„доктор”

Научен ръководител: доц. д-р Валентин Лазаров, д.м.

Научен консултант: проф. Любка Руменина, д.б.

Научна специалност: 03.01.15. Нефрология

София, 2018

Дисертацията е написана върху 359 стандартни страници.
Онагледена е със 172 фигури и 64 таблици.
Използвани са 158 литературни източника, от които 5 на кирилица и 153 на латиница.

Номерата на фигурите и таблиците в автореферата не съответстват на тези в дисертацията.

Дисертационният труд е обсъден, одобрен и насочен за официална защита на редовно заседание на Катедрен съвет на Клиничен център по нефрология на Медицински факултет на МУ – София.

Официалната защита на дисертационния труд ще се проведе на **04.09.2018 г.** от часа

в
.....
.....

пред утвърдено със Заповед на Ректора на МУ – София № РК 36-1065/21.06.2018 г. Научно жури в състав:

1. Проф. д-р Емил Паскалев Димитров, д.м.н. – вътрешен член за МУ – София, Клиничен център по нефрология на Медицински факултет при МУ – София.

2. Доц. д-р Валентин Йорданов Лазаров, д.м. – вътрешен член за МУ – София, Клиничен център по нефрология на Медицински факултет при МУ – София.

3. Доц. д-р Светла Василева Стайкова, д.м. – външен член за МУ – София, Медицински университет – Варна.

4. Доц. д-р Велислава Димитрова Димитрова, д.м. – външен член за МУ – София, Медицински факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски”, УБ „Лозенец”.

5. Проф. д-р Валентина Христова Маджова, д.м. – външен член за МУ – София, Медицински университет – Варна.

Резервни членове:

1. Проф. д-р Боряна Петрова Делийска, д.м.н. – вътрешен резервен член за МУ – София, Клиничен център по нефрология на Медицински факултет при МУ – София.

2. Проф. д-р Здравко Илиев Киряков, д.м.н. – външен резервен член за МУ – София, пенсиониран преподавател повече от 5 години от академичния състав на Медицински факултет при МУ – София.

Материалите по защитата на дисертацията са публикувани на интернет страницата на Медицински университет – София: <http://www.mu-sofia.bg/>.

СЪДЪРЖАНИЕ

Използвани съкращения	4
I. Увод	5
II. Цел и задачи	6
III. Материал и методи	7
IV. Резултати	14
1. Автоантитела срещу C1q компонента на комплемента	14
2. Автоантитела срещу C1r компонента на комплемента	34
3. Автоантитела срещу C1s компонента на комплемента	48
4. Автоантитела срещу C4 компонента на комплемента	62
5. Автоантитела срещу C3 компонента на комплемента	79
6. Значение на комбинации от автоантитела срещу различните компоненти на комплемента за оценка на лупусната нефропатия	99
V. Дискусия	113
VI. Обобщени основни изводи	120
VII. Основни приноси на дисертационния труд	121
VIII. Списък на публикациите във връзка с темата на дисертационния труд	122

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ГБМ – гломерулна базална мембрана
ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина
ЕМ – електронна микроскопия (електронномикроскопско изследване)
ИФ – имунофлуоресцентна микроскопия
ЛН – лупусна нефропатия (лупусен нефрит)
ПББ – пункционна бъбречна биопсия
РНК – рибонуклеинова киселина
СЗО – Световна здравна организация
СЛЕ – системен еритематозен лупус
СМ – светлинна микроскопия (светлинномикроскопско изследване)
ЦИК – циркулиращи имунни комплекси
ACR – American College of Rheumatology
ANA – антинуклеарни антитела
Anti-C1q – антитела срещу C1q
Anti-C1r – антитела срещу C1r
Anti-C1s – антитела срещу C1s
Anti-C3 – антитела срещу C3 компонента на комплемента
Anti-C4 – антитела срещу C4 компонента на комплемента
Anti-dsDNA – антитела срещу двойноверижна ДНК
BILAG – British Isles Lupus Assessment Group
eGFR – изчислена скорост на гломерулна филтрация
ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay
ISN – International Society of Nephrology
n.s. (ns) – несигнификантно (незначимо)
PBS – фосфатно буфериран физиологичен разтвор
RPS – Renal Pathology Society

I. УВОД

Системният еритематозен лупус (СЛЕ) е автоимунно заболяване, засягащо различни тъкани и органи в човешкия организъм. Характерна черта на това заболяване е производството на различни по епитопна специфичност автоантитела срещу собствени за организма антигени (ядрени, цитоплазмени, мембранни, плазмени гликопротеини и други). Често срещана проява на това мултиорганно заболяване е бъбречното засягане, известно като лупусна нефропатия (лупусен нефрит) (ЛН), която се разпознава клинично-лабораторно в една четвърт до една втора от пациентите при дебюта на заболяването и за която се установяват хистологични признаци при провеждане на пункционна бъбречна биопсия в над 95% от случаите със СЛЕ.

Каскадата на комплемента участва в патогенезата на СЛЕ и ЛН и това твърдение се подкрепя от редица клинични факти, най-важни сред които са:

1. Наличието на компоненти на комплемента, установявани в хистологични материали от бъбречни биопсии при пациенти с ЛН, посредством методите на имунофлуоресцентната микроскопия и на имунохистохимичните техники по типа на "full house".

2. Намалването на плазмените концентрации на компоненти на комплемента – С3 и С4 при пациенти със СЛЕ и ЛН, което корелира с активността на заболяването, показва най-често активиране на комплемента и неговата консумация.

3. Наличие на автоантитела към компоненти на комплемента при пациенти със СЛЕ и ЛН, което насочва към, но не доказва непосредствената им значение за развитие на болестен процес.

4. Наличие на зависимости между генетични мутации, засягащи компоненти на комплемента, и болестни прояви при пациенти със СЛЕ и ЛН (например, наследствени дефицити на С1q и С4 са тясно свързани с развитието на СЛЕ), което е доказателно, особено когато е установено при членове на една и съща фамилия.

Установяването на автоантитела срещу компонентите на комплементната каскада при пациентите със системен еритематозен лупус, сред които най-проучено до момента е антитялото срещу С1q, показва, че системата на комплемента както основен компонент, организиращ правилното функциониране на вродения и придобития имунитет, може да бъде и обект на автоимунна агресия при СЛЕ. Данните за наличие на генетични дефекти на компоненти на комплемента при болшинството от случаите на унаследено предразположение за развитие на СЛЕ са основание за множество изследвания на патогенетичната роля и на придобитите дефекти на комплементната система, значима част от които се предизвикват от антикомплементните автоантитела. Все още, обаче остават неясни ролята и значението на автоантителата срещу някои други компоненти на комплементната каскада, на които е посветен настоящия труд.

Своевременната диагностика и адекватното мониториране на заболяването с цел максимално ефективно и безвредно лечение налагат комплексното изучаване на връзката на антикомплементния автоимунитет с етиологията, патогенезата, основните клинично-лабораторни, имунологични, хистологични и прогностични признаци на ЛН.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на настоящото изследване е да се проучи значението на автоантителата срещу компоненти на каскадата на комплемента за комплексната диагностична оценка при пациенти с лупусна нефропатия.

За изпълнение на дефинираната цел бяха поставени следните задачи:

1. Да се проучи ролята на автоантителата срещу компоненти на каскадата на комплемента при пациенти с лупусна нефропатия чрез анализ на литературните данни.

2. Да се определи наличието и честотата на автоантителата срещу компоненти на каскадата на комплемента при пациенти с лупусна нефропатия.

3. Да се изясни връзката на автоантителата срещу компоненти на каскадата на комплемента с основни маркери за клинично-лабораторна, имунологична и хистологична оценка на лупусната нефропатия.

4. Да се проследят в динамика нивата на автоантителата срещу компоненти на каскадата на комплемента, като се съпоставят с останалите маркери за комплексната оценка на лупусната нефропатия.

5. Да се определи диагностичното и прогностичното значение на автоантителата срещу компоненти на каскадата на комплемента при пациенти с лупусна нефропатия.

6. Да се проследи динамиката на нивата на автоантителата срещу компоненти на каскадата на комплемента в зависимост от проведеното лечение на пациентите.

III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

1. Материал

1.1. Пациенти

В проучването са включени 97 пациенти над 18-годишна възраст с биопсично доказана ЛН, подписали Информирано съгласие, които са били хоспитализирани в Клиника по Нефрология на УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ” за периода от месец декември 2005 година до месец септември 2016 година. През този период са провеждани стандартните клинични, клинично-лабораторни, имунологични и хистологични изследвания, като са заделяни и проби от кръвна плазма (вземана за стандартните имунологични изследвания и съхранявана при -80°C), за определяне на автоантитела срещу компоненти на системата на комплемента. Горепосочените изследвания за период от над 10 години са провеждани от еднократно до 11 пъти при различните пациенти с ЛН с оглед проследяване на динамиката на показателите, като са обработени и изследвани общо 301 проби от кръвна плазма.

Прилагани са следните включващи критерии по отношение на пациентите:

1. Декларирано писмено информирано съгласие от страна на пациента.
2. Възраст над 18 години.
3. Диагностицирани СЛЕ и ЛН съгласно общоприетите критерии.
4. Липса на съпътстващо инфекциозно възпалително заболяване.

Прилагани са следните изключващи критерии по отношение на пациентите:

1. Нежелание за участие в изследването.
2. Възраст под 18 години.
3. Наличие на съпътстващо инфекциозно възпалително заболяване
4. Наличие на друго съпътстващо автоимунно или неопластично заболяване, което би могло да повлиява лабораторните или имунологичните резултати.

Диагнозата СЛЕ е поставяна на базата на анамнеза, клиничен преглед, клинично-лабораторни и имунологични изследвания, съгласно критериите на ACR. Хистологичната верификация на ЛН е била провеждана при пациенти с протеинурия над $0,5\text{ g}/24\text{ часа}$ и/или патологично активен уринен седимент и/или ограничена бъбречна функция след изключване на друга причина за лабораторните отклонения.

1.1.1. Разпределение по пол на пациентите с ЛН

В проучването са включени 17 (17,5%) мъже и 80 (82,5%) жени.

1.1.2. Разпределение по възраст на пациентите с ЛН

Проучваните пациенти са на средна възраст $43,69 \pm 14,28$ (от 19 до 87) години, като статистическото разпределение на възрастта е нормално (тест на Колмогоров-Смирнов, $p=0,09$).

Според възрастовото разпределение по СЗО, в млада възраст (от 18 до 44 години) са 55 човека (56,7%), в средна (зряла) възраст (от 45 до 59 години) са 28 човека (28,9%), възрастни (от 60 до 74 години) са 11 човека (11,3%) и в старческа възраст (от 75 до 89 години) са 3 човека (3,1%).

Средната възраст при мъжете е 41,8 (от 25 до 87) години, като статистическото разпределение на възрастта в групата на мъжете не е нормално (тест на Колмогоров-Смирнов, $p=0,009$). Средната възраст при жените е $44,23 \pm 14,21$ (от 19 до 81) години, като статистическото разпределение на възрастта в групата на жените е нормално (тест на Колмогоров-Смирнов, $p>0,1$). Липсва сигнификантна разлика в средната възраст между мъже и жени ($p=0,2688$).

1.1.3. Давност на лупусната нефропатия при проучваните пациенти

Давността на ЛН е определена за всеки пациент по анамнеза и по данни от медицинската документация за първа поява на симптомите или признаците на заболяването. Средната давност на ЛН сред проучваните пациенти е 10,36 (от 0,02 до 41) години. При мъжете средната давност на ЛН е $9,93 \pm 8,27$ (от 0,1 до 28) години, а при жените средната давност на ЛН е $10,45 \pm 9,96$ (от 0,02 до 41) години. Не се установи значима статистическа разлика в давността на ЛН при пациентите от двата пола ($p=0,99$). При различните възрастови групи, давността е както следва: в групата от 18 до 44 годишна възраст средната давност на ЛН е $6,95 \pm 5,81$ (от 0,02 до 19) години; в групата от 45 до 59 годишна възраст средната давност на ЛН е $14,64 \pm 11,21$ (от 0,17 до 34) години; в групата от 60 до 74 годишна възраст средната давност на ЛН е $15,88 \pm 13,06$ (от 0,2 до 41) години; в групата от 75 до 89 годишна възраст средната давност на ЛН е $10,95 \pm 13,74$ (от 0,9 до 30) години.

1.2. Контролна група донори на плазми

С оглед определяне на референтните нива на автоантителата срещу компоненти на комплементната каскада бяха изследвани 72 доброволци, пролежавали в Клиника по Ортопедия и Травматология на УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ”, също след подписване на Информационно съгласие. Заделяни са проби от кръвна плазма в хода на стандартните клинично-лабораторни изследвания при всеки един от пациентите и са съхранявани при -80°C . При контролната група доброволци бяха изключени възпалителни инфекциозни или автоимунни заболявания, както и активно бъбречно заболяване по анамнестични, клинични, лабораторни и документални данни. Разпределението по пол сред доброволците е 15 (20,8%) мъже и 56 (77,8%) жени на средна възраст $44,85 \pm 15,73$ (от 18 до 86) години. Средната възраст при мъжете доброволци е $42,30 \pm 14,63$ (от 18 до 86) години, а средната възраст при жените доброволци е $41,40 \pm 15,96$ (от 21 до 74) години, като липсва сигнификантна разлика във възрастта между мъже и жени ($p=0,6251$).

2. Методи

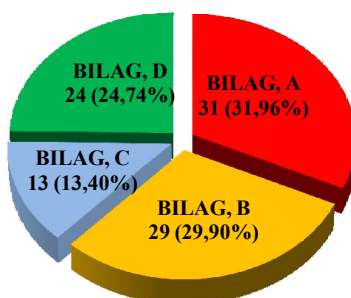
2.1. Клинични изследвания

Диагнозата на пациентите е изградена въз основа на подробна анамнеза и пълен обективен статус, като акцентът е бил върху бъбречните прояви на системното автоимунно заболяване. Диагнозата СЛЕ е поставена при наличие на най-малко 4 от 11 критерия на American College of Rheumatology, 1982, ревизирани през 1997 г.

Диагностичната система от критерии на British Isles Lupus Assessment Group (BILAG) – Renal score дава възможност за комплексна оценка на активността на ЛН въз основа на клинични, лабораторни и хистологични белези (Таблица 1). Разпределението на пациентите според активността на ЛН е както следва: в категория А попадат 31 пациента (31,96% от изследваните с ЛН); в категория В попадат 29 пациенти (29,90% от изследваните с ЛН); в категория С попадат 13 пациента (13,40% от изследваните с ЛН); в категория D попадат 24 пациенти (24,74% от изследваните с ЛН). Липсват пациенти в категория Е (Фигура 1).

Таблица 1. BILAG Renal Score

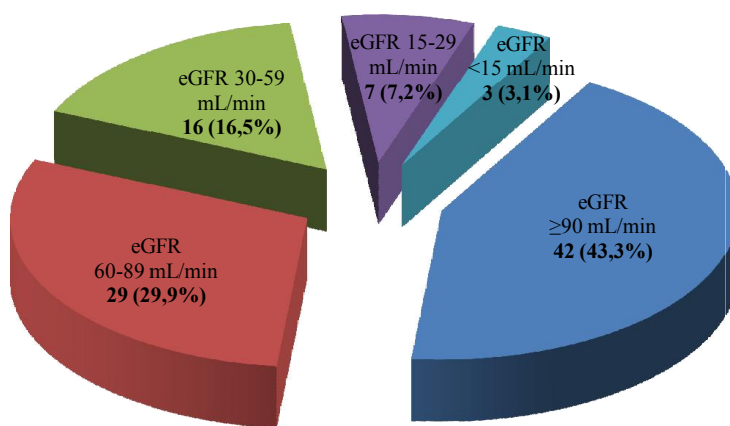
Категория А Приема се, че заболяването е достатъчно активно, за да налага провеждане на модифициращо хода на заболяването лечение, prednisolone > 20 mg дневно или имunosуpресор Необходимо е наличие на два или повече от следните посочени, при условие че присъстват (1), (4) или (5): (1) Протеинурия , дефинирана като: Резултат от тест-лента, нарастващ с два или повече пункта; или Протеинурия от 24-часова урина, нарастнала от <0,20 g до >1,0 g; или Протеинурия от 24-часова урина, нарастнала от >1,0 g със 100%; или Новоустановена протеинурия от 24-часова урина над 1,0 g (2) Акцелерирала артериална хипертония (3) Влошена бъбречна функция , дефинирана като: Плазмен креатинин >130 $\mu\text{mol/L}$ и повишил се до >130% от предходната стойност; или Креатининов клирънс, спаднал до <67% от предходната стойност; или Креатининов клирънс <50 mL/min и предходно измерван >50 mL/min или неизмерван предходно (4) Активен уринен седимент (от нецентрифугирана проба урина): пиурия (>5 левкоцита на поле при голямо увеличение), хематурия (>5 еритроцита на поле при голямо увеличение) или еритроцитни цилиндри при липса на инфекция или друга причина за активен уринен седимент (5) Хистологични данни за активен нефрит съгласно критериите на СЗО в рамките на последните 3 месеца (или след предишна оценка, ако е проведена в рамките на 3 месеца; склероза без възпаление не се брои)
Категория В Заболяването изисква само симптоматично лечение Необходимо е наличие на едно от следните: (1) Един от критериите от категория А (2) Протеинурия , дефинирана като: Резултат от тест-лента, нарастващ с един или повече пункта, до поне 2+; или Протеинурия от 24-часова урина, нарастнала от >1,0 g с >50%, но с <100% (3) Повишен плазмен креатинин : Плазмен креатинин >130 $\mu\text{mol/L}$ и повишил се до 115% от предходната стойност
Категория С Стабилно, леко заболяване Необходимо е наличието на един от следните: (1) Протеинурия от 24-часова урина >0,20 g (2) Резултат от тест-лента 1+ или повече (3) Повишаващо се артериално налягане , дефинирано като повишение на систолното артериално налягане от ≥ 30 mmHg и повишение на диастолното налягане от ≥ 15 mmHg (при условие, че установените стойности са >140/90 mmHg)
Категория D Предходно бъбречно заболяване
Категория Е Липсва предходно бъбречно заболяване



Фигура 1. Разпределение на пациентите според активността на ЛН въз основа на BILAG Renal score.

2.2. Стандартни лабораторни изследвания

Лабораторните изследвания при пациентите с ЛН са извършени в Отделение по Клинична лаборатория на УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ” и включват: пълна кръвна картина (ПКК) (еритроцити, хемоглобин, левкоцити, диференциално броене на левкоцити, тромбоцити), скорост на утаяване на еритроцитите (по Westergreen); биохимични изследвания (креатинин, урея, пикочна киселина, общ белтък, серумен албумин, аспартат аминотрансфераза (ASAT), аланин аминотрансфераза (ALAT), гама-глутамил трансептидаза (GGT), алкална фосфатаза (AP), кръвна захар, общ холестерол, триглицериди, С-реактивен протеин, тотален желязо-свързващ капацитет на плазмата (ТЖСК)); изследвания на електролити и киселинно-алкално състояние на кръвта (калий, натрий, хлор, калций, фосфор, серумно желязо). Лабораторното изследване на урина включва: общо химично изследване на урина (ОХИ) (с тест-лента), в това число качествено определяне на белтък в урината, количествено определяне на белтък в урината – прясна и 24-часова урина, микроскопско изследване на уринен седимент, при показания – екскреция в урината на калций, калий, фосфор, креатинин, пикочна киселина, фосфати; при показания – микробиологично изследване на урина. Скоростта на гломерулната филтрация е изчислявана по формулата CKD-EPI Creatinine 2009 въз основа на концентрацията на серумния креатинин. Всички резултати са представяни като стойности в мерни единици в система SI.

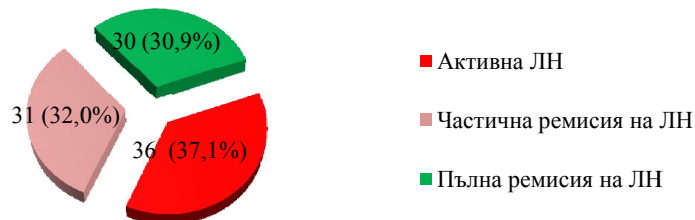


Фигура 2. Разпределение на пациентите според стойността на eGFR.

В зависимост от стойността на изчислената скорост на гломерулна филтрация (eGFR), проучваните пациенти с ЛН бяха разпределени в следните групи: 42 пациенти (43,3%) в групата с $eGFR \geq 90$ mL/min; 29 пациенти (29,9%) в групата с eGFR от 60 до 89 mL/min; 16 пациенти (16,5%) в групата с eGFR от 30 до 59 mL/min; 7 (7,2%) пациенти в групата с eGFR от 15 до 29 mL/min и 3 пациенти (3,1%) в групата с $eGFR < 15$ mL/min. (Фигура 2)

За пълна клинично-лабораторна ремисия на ЛН приемаме състояние без патологична протеинурия, без патологично активен уринен седимент и с компенсирана бъбречна функция. Частична клинично-лабораторна ремисия на ЛН се приема при намаляване на протеинурията с над 50% спрямо изходно изследвана протеинурия, когато протеинурията е под 3,0 g/24 часа и концентрацията на серумния албумин е 30 g/L или по-висока, при липса на повишение на серумния креатинин спрямо изходно

измерен с над 25% или при спадане на серумния креатинин под 130 $\mu\text{mol/L}$ при пациенти с изходно измерен серумен креатинин от 130 до 260 $\mu\text{mol/L}$ или при спадане на серумния креатинин с над 50% от изходно измерения при пациенти с изходен серумен креатинин над 260 $\mu\text{mol/L}$. Проучваните пациенти са разпределени според клинично-лабораторната активност на ЛН, както е показано на Фигура 3: с активна ЛН са 36 пациенти (37,1%), с частична клинично-лабораторна ремисия на ЛН са 31 пациенти (32,0%) и с пълна клинично-лабораторна ремисия са 30 пациенти (30,9%).



Фигура 3. Разпределение на изследваните пациенти според клинично-лабораторната активност на ЛН.

2.3. Стандартни имунологични изследвания

Стандартните имунологични изследвания са извършени в Отделение по Клинична лаборатория на УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ” и в Централна имунологична лаборатория на Клиниката по Клинична имунология на УМБАЛ „Александровска”. При 71 от изследваните пациенти с ЛН първоначално са изследвани нивата на С4 и С3 компоненти на комплементната каскада в кръвна плазма с антикоагулант EDTA (имунодифузионен метод). Впоследствие, нивата на С4 и С3 при пациентите с ЛН са проследени в динамика, като са изследвани общо 264 проби за плазмени нива на С4 и С3. След провеждане на изследванията за плазмени концентрации на С4 и С3, пробите от кръвни плазми с антикоагулант EDTA са заделени и съхранявани за определяне на антикомплементни автоантитела.

При 28 (39,4%) от първоначално изследваните за ниво на С4 пациенти е установена хипокомплементемия за С4. При 14 (19,7%) от първоначално изследваните за ниво на С3 пациенти е установена хипокомплементемия за С3. При изследване в динамика, при 107 (40,5%) от пробите се установява хипокомплементемия за С4, а хипокомплементемия за С3 се установява при 32 (12,1%) от пробите.

При изследваните пациенти са определяни титрите на антинуклеарни антитела (ANA) и нивата на анти-двойноверижна ДНК антитела (anti-dsDNA) в Централна имунологична лаборатория на УМБАЛ „Александровска”. При 72 (74,2%) от пациентите с ЛН първоначално са изследвани титрите на ANA чрез индиректна имуофлуоресценция върху клетъчна линия от човешки епителни клетки (HEp-2 клетъчна линия). При 76 (78,4%) от пациентите с ЛН първоначално са определени нивата на анти-двойноверижна ДНК антитела (anti-dsDNA) с ELISA в U/mL. Патологично повишени титри на ANA (над 1:80) са установени при 50 (69,4%) от пациентите при първоначалното изследване, а патологично повишени нива на anti-dsDNA са установени при 31 (40,8%) от пациентите при първоначалното изследване. При изследване на пациентите с ЛН в динамика, титрите на ANA са изследвани в общо 237 проби, а нивата на anti-dsDNA в общо 242 проби, като патологично повишени титри на ANA са установени в общо 187 (78,9%) от пробите, изследвани за ANA, а патологично повишени нива на anti-dsDNA – в общо 133 (55,0%) от пробите, изследвани за anti-dsDNA.

2.4. Хистоморфологични изследвания

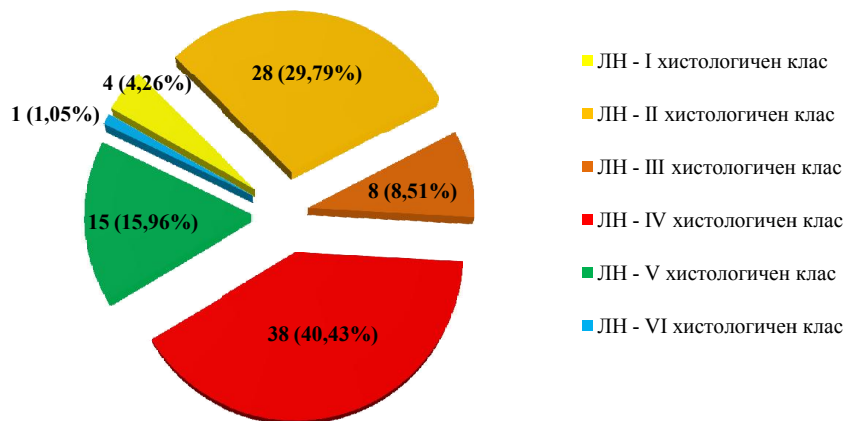
Всички хистологични материали от пункционни бъбречни биопсии (преди и по време на настоящото проучване) са обработени и диагностицирани от нефропатолози: д-р Д. Дойчинов, дм; доц. д-р В. Минкова, дм; доц. д-р Т. Тодоров, дм; доц. д-р Т. Бақърджиев, дм; доц. д-р В. Ценова, дм в Отделение по Патологична анатомия на УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ” и Имуноморфологична лаборатория на Катедра по патологична анатомия на Медицински университет, гр. София. Биопсично диагностицирани са 94 (96,91%) от включените в изследването пациенти, като при 3 от тях ПББ не е проведена, поради анатомични противопоказания или поради отказ на пациент. При част от пациентите са проведени повторни бъбречни биопсии (при показания за това) с оглед актуална оценка на хистологичната активност в динамика.

Обработката на хистологичните материали за светлинномикроскопско (СМ) изследване включва оцветяване с хематоксилин-еозин (HE), с трихром по Masson, с периодна киселина-Schiff (PAS), със сребърна импрегнация по Wilder.

Обработката на хистологичните материали за имунофлуоресцентно изследване (ИФ) включва инкубация на хистологичния материал със свързани с флуорохроми моноспецифични античовешки IgG срещу IgG, IgM, IgA, C1, C4, C2, C3.

Диагнозата ЛН е поставяна на базата на минимум 6 гломерула, изследвани в хистологичния материал. За определяне на хистологичните промени и класа на ЛН са използвани критериите на International Society of Nephrology (ISN) и Renal Pathology Society (RPS).

Хистологично диагностицираните пациенти с ЛН (общо 94) при включване в изследването са разпределени в зависимост от хистологичния клас на заболяването, както следва: 4 пациенти (4,26%) с I хистологичен клас ЛН; 28 пациенти (29,79%) с II хистологичен клас ЛН; 8 пациенти (8,51%) с III хистологичен клас ЛН; 38 пациенти (40,43%) с IV хистологичен клас ЛН; 15 пациенти (15,96%) с V хистологичен клас ЛН и 1 пациент (1,05%) с VI хистологичен клас ЛН (Фигура 4). Смесени хистологични класове на ЛН не бяха установени. При 10 от изследваните пациенти в рамките на периода на проучването са проведени бъбречни ребиопсии (с показания и при десетте случая – оценка хистологичната активност на ЛН с оглед излизане от имунопатогенетичното лечение), като при 2 от тях се установява трансформация на класа ЛН (при една пациентка от III във II хистологичен клас и при една пациентка от IV в III хистологичен клас).



Фигура 4. Разпределение на проучваните пациенти с ЛН в зависимост от хистологичния клас по ISN/RPS.

Изменения като хипертрофия на мезангиалния матрикс, мезангиалноклетъчна пролиферация, левкоцитна инфилтрация на гломерулите, полулуния (целуларни, фиброцелуларни или фиброзни), фибриноидна некроза, гломерулна склероза, интерстициална инфилтрация, интерстициална фиброза, тубулна дистрофия, тубулна атрофия са категоризирани полуколичествено, като липсата на такива е отчитана като 0, леката степен на изразеност като 1, умерената степен на изразеност като 2 и силната степен на изразеност като 3. Отчетени са хистологичните индекси на активност и хроничност съгласно критериите на National Institutes of Health (NIH) (Таблица 2).

Таблица 2. Индекси на активност и хроничност според NIH.

Индекс на активност (0 – 24 точки)	Точки
Ендокапиларна пролиферация	0, 1, 2 или 3
Гломерулна левкоцитна инфилтрация	0, 1, 2 или 3
Субендотелни депозити, формиращи „телени бримки“	0, 1, 2 или 3
Фибриноидна некроза и/или кариорексис	(0, 1, 2 или 3) × 2
Клетъчни (целуларни) полулуния	(0, 1, 2 или 3) × 2
Интерстициално възпаление	0, 1, 2 или 3
Индекс на хроничност (0 – 12 точки)	
Гломерулна склероза	0, 1, 2 или 3
Фиброзни полулуния	0, 1, 2 или 3
Тубулна атрофия	0, 1, 2 или 3
Интерстициална фиброза	0, 1, 2 или 3

2.5. Други клинични методи

При всички пациенти с ЛН е провеждана ехография на пикочна система. Според състоянието и съгласно възникнали показания са провеждани и различни рентгенологични, компютъртомографски, допълнителни лабораторни, микробиологични, имунологични, патоморфологични изследвания, както и консултации с други специалисти.

При наличие на клинична, лабораторна, имунологична или хистологична активност, при пациентите с ЛН е провеждано активно имунопатогенетично лечение с различна давност, с приложение на кортикостероиди (methylprednisolone, prednisolone, prednisone), cyclophosphamide, azathioprine, mycophenolate mofetil, cyclosporine A, интравенозен имуноглобулин (IVIG), лечение с плазмафереза. Провеждано е и антикоагулантно лечение, както и антихипертензивно, нефропротективно, гастропротективно, антиагрегантно, урикоинхибиращо, антилипемично, антиинфекциозно, антианемично, корекция на изменения в киселинно-алкалния и водно-електролитния статус на организма, лечение на вторичен хиперпаратиреоидизъм и минерално костно бъбречно заболяване, както и терапия на съпътстващи заболявания, където това е било показано.

2.6. Определяне на антикомплементните автоантитела

Изследването на нивата на автоантителата срещу компоненти на каскадата на комплемента при проучваните пациенти с ЛН и при доброволните донори на плазма от контролната група без автоимунни заболявания, както и функционалното характеризирание на автоантителата срещу C3 компонента на комплемента, са осъществени в Националната референтна лаборатория за изследване на белтъците от системата на комплемента, при Европейската болница “Georges Pompidou”, Париж от проф. Любка Руменина, д. б., в Катедра „Биохимия, молекулна медицина и нутригеномика” на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов”, гр. Варна от доц. Мария Раданова, д. б. и в Катедра „Биохимия” при Биологически факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски” от доц. Иванка Цачева, д. б.

Определени са нивата на антитела срещу C1q (anti-C1q); антитела срещу C1r (anti-C1r); антитела срещу C1s (anti-C1s); антитела срещу C4 (anti-C4); антитела срещу C3 (anti-C3).

Определянето на нивата на автоантителата срещу компонентите на комплемента е проведено в EDTA-плазми от изследваните пациенти и доброволните донори. Определянето на нивата на съответните автоантитела срещу компонентите на комплементната каскада в плазмите от контролната група доброволни донори послужи за определяне на граничните стойности (cut-off), над които нивата, определени при проучваните пациенти с ЛН, се приемат за повишени (положителни), а под които – за референтни (отрицателни). За гранични нива на стойностите на съответните антикомплементни автоантитела се приеха средните стойности от определените нива на съответните автоантитела срещу комплемента при доброволните донори на плазми, събрани с 2 стандартни отклонения:

$$\text{Cut-off} = \text{Mean (контрола)} + 2\text{SD}.$$

Всяко определяне на нива на автоантитела срещу компоненти на комплемента от плазмите на проучваните пациенти е било проведено по 3 пъти, като за статистически достоверни са приети резултати, при които стойността от t-теста на р да е <0,05.

Нивата на всички автоантитела срещу компоненти на каскадата на комплемента са определени с ELISA съгласно долупосочената методика и са представени в количествен вид в единици оптична плътност на разтвора (OD) при дължина на вълната на оптичния лъч на анализатора от 450 nm.

Предвид определянето на антикомплементните автоантитела в три различни лаборатории (макар и съгласно унифицирани методики), с оглед хомогенизиране на кохортата, нивата на антикомплементните автоантитела са представяни като съотношение спрямо стойността на Cut-off за всяко антикомплементно

автоантитяло, като за патологично повишени стойности се приемат значения над 1,00, а за референтни стойности – под 1,00.

2.6.1. ELISA за определяне на anti-C1q

Пречистеният протеин C1q (Complement Technologies) е адсорбиран върху 96-ямкови микротитрационни плаки за 1 час при 37°C, като предварително е разреден с PBS (фосфатно буфериран физиологичен разтвор) до постигане на концентрация от 20 µg/mL. Блокирането на ямковите повърхности е осъществено с разтвор, съдържащ говежди серумен албумин, разтворен във фосфатно буфериран физиологичен разтвор – 2% BSA-PBS. Изследваната плазма е разредена в съотношение 1/100 с разтвор с висока йонна сила (2% BSA-PBS, 750 mM NaCl и 0,05% Tween 20), за да се предотврати взаимодействието между C1q и IgG, а да остане възможно само взаимодействието между антиген (C1q) и антитяло (anti-C1q) и е нанесена в ямките за 1 час. Свързаните anti-C1q антитела от клас IgG са проявявани с анти-човешки IgG, конюгирани с пероксидаза от хрян (IgG-HRP) (Southern Biotech), разредени в съотношение 1/1000 в PBS-0,05% Tween 20, с последващо добавяне на TMB-субстратна система за колориметрична визуализация. По подобен начин, пробите изследвана плазма са серийно разреждани като се започне от 1/50 и прилагани в адсорбираните и блокирани повърхности на ямките в микротитрационните плаки, за да се установи дозовия отговор на свързването на антителата.

2.6.2. ELISA за определяне на anti-C1r, anti-C1s, anti-C4, anti-C3

Пречистените протеини, съответно C1r, C1s, C4, C3 (Complement Technologies, а за C3 и допълнително Calbiochem), разредени с PBS до 20 µg/mL, се поставят в ямките на микротитрационните плаки за 1 час, за да се адсорбират върху повърхността им. Блокирането на ямковите повърхности се осъществява с PBS-0,05% Tween 20. Изследваната плазма, разредена предварително 1/100 в PBS-0,05% Tween 20, се поставя в ямките за 1 час. Свързаните антитела от клас IgG се проявяват чрез прилагането на анти-човешки IgG-HRP (Southern Biotech), разредени 1/1000 в PBS-0,05% Tween 20 с последващо прибавяне на TBM-субстратна система.

2.7. Дизайн на изследването

Изследването е организирано в два аспекта:

1. Проспективно едноцентрово кроссекционно изследване, включващо пациенти с диагностициран СЛЕ и ЛН (N=97), съгласно общоприетите клинични, лабораторни и имунологични критерии, в хода на което са проучени зависимости между клинични, лабораторни, имунологични и хистологични аспекти на ЛН и антикомплементните автоантитела.

2. Лонгитудинално кохортно изследване на пациентите със СЛЕ и ЛН, в хода на което са изследвани общо 301 проби за период от 129 месеца и са проучени динамични зависимости между промените в клинично-лабораторните и стандартните имунологични параметри и антикомплементните автоантитела.

2.8. Статистически методи за обработка на резултатите

Данните са въведени и обработени със софтуерни пакети Microsoft Office Excel[®], 2007 и GraphPad Prism[®], ver. 5.00.

За представяне и оценка на достоверността на получените резултати са прилагани следните статистически методи: дескриптивен анализ с представяне на количествените параметри като средна стойност ± стандартно отклонение (SD) или диапазон от стойности в зависимост от вида на честотното разпределение; непараметричен тест на Колмогоров-Смирнов за проверка типа на честотното разпределение; кростабулация с метод χ^2 и екзактен тест на Fisher за проверка на хипотези за наличие на връзка между категорийни признаци; непараметричен тест на Mann-Whitney за проверка на хипотези за различие между две независими извадки; непараметричен рангов тест на Wilcoxon за проверка на хипотези за различие между две зависими извадки; One-way ANOVA за сравнение на повече от две извадки с множествен сравнителен пост-тест на Bonferroni; Two-ways ANOVA за определяне влиянието на две независими категорийни променливи върху зависима параметрична променлива; корелационен анализ; линеен регресионен анализ; графично и таблично представяне на получените резултати.

Получените резултати приехме като статистически достоверни при прагово ниво на значимост на $p < 0,05$.

IV. РЕЗУЛТАТИ

1. АВТОАНТИТЕЛА СРЕЩУ C1q КОМПОНЕНТА НА КОМПЛЕМЕНТА.

Автоантитела срещу C1q (anti-C1q) са изследвани при всички 97 пациенти, първоначално включени в проучването, като в динамика са изследвани общо 301 проби на пациентите с ЛН. Anti-C1q са изследвани и при 72 здрави доброволци (контроли), без автоимунни и инфекциозни възпалителни заболявания, със запазена бъбречна, чернодробна и хемопоетична функции. При изследваните за anti-C1q в контролната група здрави доброволци се установиха плазмени нива на anti-C1q $0,235 \pm 0,213$ единици оптична плътност при дължина на вълната от 450 nm (OD 450 nm) на оптичния анализатор.

Въз основа на това определихме граничната стойност (cut-off), над която нивата на anti-C1q при изследваните пациенти с ЛН приехме за патологично повишени, а именно:

$$\text{Cut-off} = 0,235 + 2 \times 0,213 = 0,660.$$

Проведохме нормализиране на стойностите на нивата на anti-C1q в групите пациенти с ЛН, представяйки нивата на anti-C1q като съотношение на получените стойности за оптичната плътност към съответното ниво на cut-off за лабораторията. Така, за гранична стойност се приема 1,00, над която нормализираните нива на anti-C1q се приемат за повишени, а под която – за референтни.

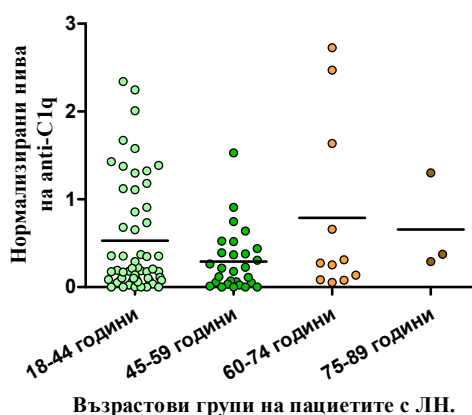
Установихме патологично повишени титри на anti-C1q при 18 (18,6%) от изходно изследваните пациенти с ЛН. Сред изследваните общо 301 проби от кръвни плазми на пациентите с ЛН в динамика установихме патологично повишени нива на anti-C1q при 68 (22,6%) проби.

1.1. Автоантитела срещу C1q и пола на пациентите с ЛН.

При мъжете с ЛН се установиха патологично повишени нива на anti-C1q при 5 от 17 пациенти (29,4%), докато при жените с ЛН – при 13 от 80 (16,3%). Не се установи статистически значимо влияние на пола на пациентите с ЛН върху наличието на патологично повишени нива на anti-C1q (Fisher's exact test, $p=0,299$). При анализ на нормализираните нива на anti-C1q се установи, че при мъжете с ЛН средното ниво на anti-C1q е $0,629 \pm 0,803$, а при жените с ЛН – $0,465 \pm 0,590$. Не се установи статистически значима разлика в нивата на anti-C1q при двата пола на пациентите с ЛН (Mann-Whitney, $p=0,628$).

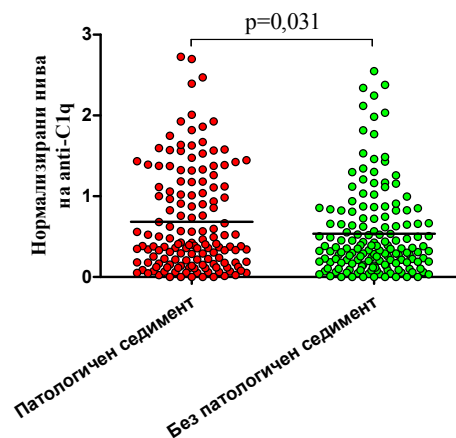
1.2. Автоантитела срещу C1q и възрастта на пациентите с ЛН.

Във възрастовата група от 18 до 44 години позитивни за anti-C1q са 13 (23,6%) пациенти; във възрастовата група от 45 до 59 години позитивен за anti-C1q е 1 (3,6%) пациент; във възрастовата група от 60 до 74 години позитивни за anti-C1q са 3 (27,3%) пациенти; във възрастовата група от 75 до 89 години позитивен за anti-C1q е 1 (33,3%) пациент. Във възрастовите групи по СЗО, средните нормализирани нива на anti-C1q са както следва: в групата от 18 до 44 години: $0,541 \pm 0,636$; в групата от 45 до 59 години: $0,267 \pm 0,338$; в групата от 60 до 74 години: $0,790 \pm 1,003$ и в групата от 75 до 89 години: $0,655 \pm 0,562$. (Фигура 5)



Фигура 5. Средни нива на anti-C1q в различните възрастови групи по СЗО при пациентите с ЛН.

Не се установи статистически значима зависимост на влиянието на възрастта като фактор върху нивата на anti-C1q (One-way ANOVA, $p=0,086$). Не се установи статистически значима корелационна

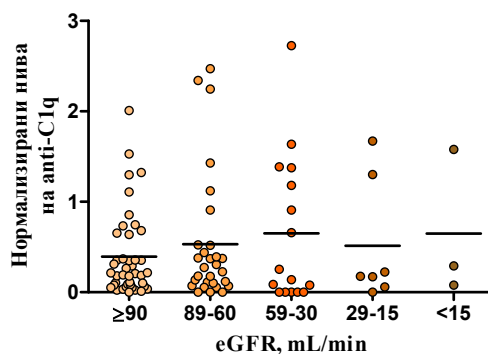


Фигура 7. Нормализирани нива на anti-C1q при пациентите с и без патологично активен уринен седимент, при всички проби, изследвани в динамика.

1.4.3. Автоантитела срещу C1q и бъбречна функция.

Патологично повишените нива на anti-C1q статистически значимо определят декомпенсация на бъбречната функция в изследваната група пациенти с ЛН ($\chi^2=3,51$, $p=0,031$). Горепосоченото влияние на серологичния статус по отношение на anti-C1q се потвърди при изследване на общия брой проведени в динамика проби – позитивните нива на anti-C1q определят декомпенсирана бъбречна функция ($\chi^2=4,12$, $p=0,043$).

В групата от пациенти с $eGFR \geq 90$ mL/min нормализираното ниво на anti-C1q е $0,394 \pm 0,466$ (от 0,000 до 2,008); в групата пациенти с $eGFR$ от 89 до 60 mL/min нормализираното ниво на anti-C1q е $0,531 \pm 0,714$ (от 0,000 до 2,471); в групата пациенти с $eGFR$ от 59 до 30 mL/min нормализираното ниво на anti-C1q е $0,652 \pm 0,812$ (от 0,000 до 2,727); в групата пациенти с $eGFR$ от 29 до 15 mL/min нормализираното ниво на anti-C1q е $0,515 \pm 0,677$ (от 0,000 до 1,671) и в групата пациенти с $eGFR < 15$ mL/min нормализираното ниво на anti-C1q е $0,649 \pm 0,811$ (от 0,079 до 1,578). Не се установи статистически значима зависимост между нивата на anti-C1q в групите, обособени въз основа на $eGFR$, и нивата на anti-C1q (One-way ANOVA, $p=0,677$) (Фигура 8)

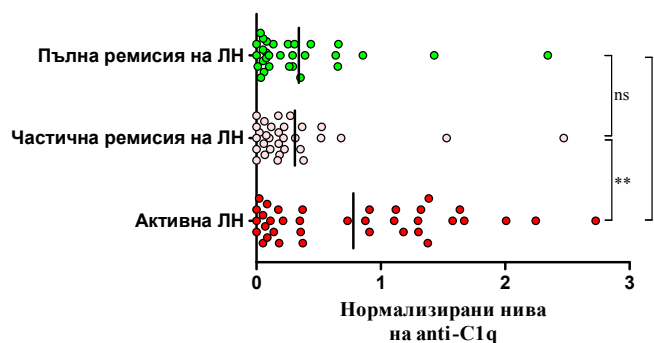


Фигура 8. Средни нива на anti-C1q в обособените според $eGFR$ групи от пациенти с ЛН, първоначално изследвани в проучването.

1.4.4. Автоантитела срещу C1q и комплексната клинично-лабораторна оценка на активността на ЛН.

В групата с активна ЛН се установиха 14 (38,9%) пациенти, позитивни за anti-C1q, в групата с частична ремисия на ЛН позитивни за anti-C1q са 2 (6,5%) пациенти и в групата с пълна клинично-лабораторна ремисия на ЛН позитивни за anti-C1q са 2 (6,7%) пациенти. Средните нормализирани нива на anti-C1q в трите групи пациенти с ЛН са както следва: в групата с активна ЛН – $0,779 \pm 0,739$ (от 0,000 до 2,727); в групата с частична ремисия на ЛН – $0,310 \pm 0,497$ (от 0,000 до 2,471); в групата с пълна клинично-лабораторна ремисия на ЛН – $0,342 \pm 0,491$ (от 0,000 до 2,342), както е показано на Фигура 9.

Установи се статистически значима зависимост между нивата на anti-C1q и активността на ЛН – по-високите нива на anti-C1q са свързани с по-изразена активност на ЛН (One-way ANOVA, $p=0,002$).



Фигура 9. Разпределение на пациентите с ЛН в зависимост от комплексната клиничко-лабораторна оценка активността на ЛН. Представени са средните нормализирани нива на anti-C1q в трите групи.

Нивата на anti-C1q при пациентите с активна ЛН са статистически значимо по-високи от нивата на anti-C1q при пациентите с пълна клиничко-лабораторна ремисия на ЛН ($p < 0,05$) и значимо по-високи от нивата на anti-C1q при пациентите с частична клиничко-лабораторна ремисия на ЛН ($p < 0,05$). Не се установи статистически значима разлика между нивата на anti-C1q при пациентите с частична клиничко-лабораторна ремисия на ЛН и нивата на anti-C1q при пациентите с пълна ремисия на ЛН ($p > 0,05$) (Фигура 9, Таблица 3) (One-way ANOVA, Bonferroni's Multiple Comparison Test).

Таблица 3. Множествен сравнителен тест на Bonferroni за изследване разликите в нивата на anti-C1q в групите от пациенти с активна ЛН, с частична ремисия на ЛН и с пълна ремисия на ЛН.

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	p<0,05	95% CI of diff.
Нива на anti-C1q при пациенти с активна ЛН с				
Нива на anti-C1q при пациенти с частична ремисия на ЛН	0,4692	3,205	Да (**)	0,1123 до 0,8260
Нива на anti-C1q при пациенти с активна ЛН с				
Нива на anti-C1q при пациенти с пълна ремисия на ЛН	0,4372	2,960	Да (*)	0,07717 до 0,7972
Нива на anti-C1q при пациенти с частична ремисия на ЛН с				
Нива на anti-C1q при пациенти с пълна ремисия на ЛН	-0,03195	0,2088	Не (ns)	-0,4049 до 0,3410

Сред позитивните за anti-C1q пациенти с ЛН, 14 (77,8%) са с активна ЛН, 2 (11,1%) от пациентите са с частична ремисия на ЛН и 2 (11,1%) от пациентите са в състояние на пълна клиничко-лабораторна ремисия на ЛН. Сред пациентите с ЛН с референтни нива на anti-C1q, 22 (27,8%) са с активна ЛН, 29 (36,7%) са с частична ремисия на ЛН и 28 (35,4%) са с пълна клиничко-лабораторна ремисия на ЛН. При отчитане на липсата на клиничко-лабораторна активност на ЛН (имайки предвид само пациентите в състояние на пълна клиничко-лабораторна ремисия на ЛН) и наличието на активност на ЛН (обединявайки групите с активна ЛН и частична ремисия на ЛН) (Таблица 4) установихме, че позитивните нива на anti-C1q определят статистически значимо наличието на активност на ЛН (Fisher's exact test, $p = 0,036$).

Таблица 4. Разпределение на пациентите с ЛН, първоначално изследвани в проучването с активност и без активност на ЛН в зависимост от серологичния статус по отношение на anti-C1q.

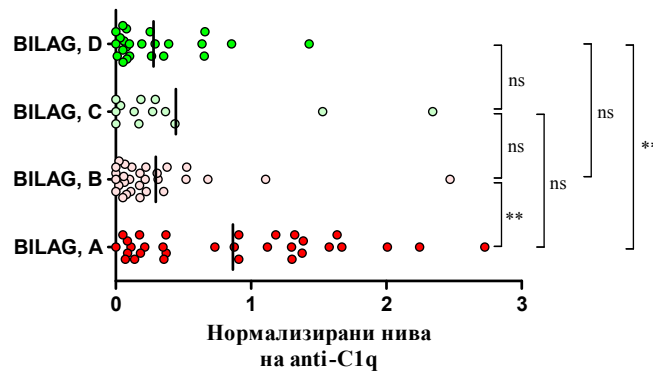
Пациенти	С активност на ЛН	Без активност на ЛН	Общо
Повишени anti-C1q	16	2	18
Референтни anti-C1q	51	28	79
Общо	67	30	97

1.4.5. Автоантитела срещу C1q и комплексната оценка на ЛН (категиите) по BILAG Renal score.

При пациентите с ЛН от категория А по BILAG Renal score позитивните за anti-C1q са 13 (41,9%); при пациентите от категория В позитивни за anti-C1q са 2 (6,9%); при пациентите от категория С позитивни за anti-C1q са 2 (15,4%) и 1 (4,2%) от пациентите от категория D е позитивен за anti-C1q.

Средните нормализирани нива на anti-C1q при различните категории пациенти с ЛН по BILAG Renal score са както следва: при категория А: $0,866 \pm 0,741$ (от 0,000 до 2,727); при категория В: $0,295 \pm 0,485$ (от 0,000 до 2,471); при категория С: $0,444 \pm 0,697$ (от 0,000 до 2,342) и при категория D: $0,279 \pm 0,347$ (от 0,000 до 1,429), както е показано на Фигура 10.

Налице е статистически значима връзка между нивата на anti-C1q и активността на ЛН по BILAG Renal score, като по-високите нива на anti-C1q са свързани с по-висока активност (One-way ANOVA, $p=0,0005$).



Фигура 10. Разпределение на пациентите с ЛН в зависимост от комплексната клинично-лабораторна оценка активността на ЛН по BILAG Renal score. Представени са средните нормализирани нива на anti-C1q в отделните категории.

Нивата на anti-C1q при пациентите от категория А по BILAG Renal score са статистически значимо по-високи от нивата при пациентите от категория В ($p<0,05$) и от нивата при пациентите от категория D ($p<0,05$). Не се установи статистически значима разлика между нивата на anti-C1q при пациентите от категории А и С, В и С, С и D, В и D (Таблица 5) (Bonferroni's Multiple Comparison Test).

Таблица 5. Множествен сравнителен тест на Bonferroni за изследване разликите в нивата на anti-C1q в отделните категории по BILAG Renal score на пациентите с ЛН.

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	p<0,05	95% CI of diff
BILAG, А с BILAG, В	0,5710	3,789	Да (**)	0,1648 до 0,9773
BILAG, А с BILAG, С	0,4223	2,191	Не (ns)	-0,09731 до 0,9419
BILAG, А с BILAG, D	0,5871	3,702	Да (**)	0,1596 до 1,015
BILAG, В с BILAG, С	-0,1487	0,7640	Не (ns)	-0,6736 до 0,3761
BILAG, В с BILAG, D	0,01611	0,1001	Не (ns)	-0,4178 до 0,4501
BILAG, С с BILAG, D	0,1648	0,8207	Не (ns)	-0,3767 до 0,7064

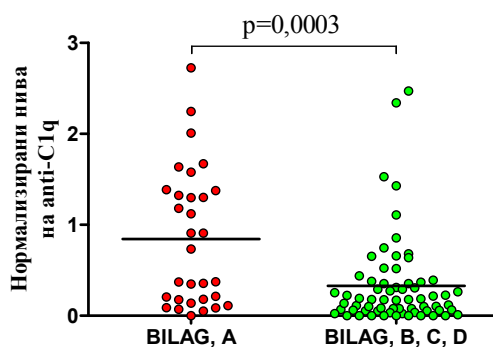
Сред всички изследвани в динамика проби на пациенти с ЛН (N=301), които са позитивни за anti-C1q, пробите на пациенти от категория А по BILAG Renal score са 28 (41,2%), пробите на пациенти от категория В са 18 (26,5%), пробите на пациенти от категория С са 6 (8,8%), пробите на пациенти от категория D са 16 (23,5%). Сред всички изследвани в динамика проби на пациенти с ЛН, които са с референтни нива на anti-C1q, пробите на пациенти от категория А по BILAG Renal score са 37 (15,9%), пробите на пациенти от категория В са 92 (39,5%), пробите на пациенти от категория С са 33 (14,2%), пробите на пациенти от категория D са 71 (30,5%). Таблица 6 показва разпределението на всички изследвани проби от пациентите с ЛН в категория А и в другите останали категории по BILAG Renal score (В, С и D) в зависимост от серологичния статус по отношение на anti-C1q.

Таблица 6. Разпределение на всички изследвани в динамика проби от пациентите с ЛН в категория А и останалите категории по BILAG Renal score в зависимост от серологичния статус по отношение на anti-C1q.

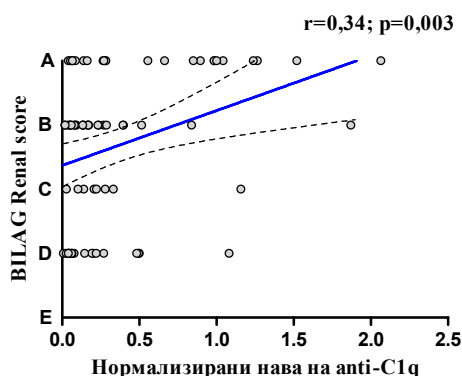
Пациенти	BILAG, А	BILAG, В, С, D	Общо
Повишени anti-C1q	28	40	68
Референтни anti-C1q	37	196	233
Общо	65	236	301

Наличието на патологично повишени нива на anti-C1q определя статистически значимо наличието на категория А по BILAG Renal score на ЛН, т. е. наличие на активно заболяване, налагащо провеждане на имунопатогенетично лечение (Fisher's exact test, $p < 0,0001$) с чувствителност от 43,1%, специфичност от 83,1%, позитивна предиктивна стойност от 41,2% и негативна предиктивна стойност от 84,1%. Релативният риск (RR) за наличие на категория А по BILAG Renal score на ЛН при позитивен статус за anti-C1q определихме на 2,6.

Средното нормализирано ниво на anti-C1q при пациентите от категория А е статистически значимо по-високо от средното нормализирано ниво на anti-C1q при пациентите от останалите категории по BILAG Renal score (Mann-Whitney, $p = 0,0003$) (Фигура 11).



Фигура 11. Нива на anti-C1q при пациенти с ЛН с категория А по BILAG Renal score и при пациенти от останалите категории по BILAG Renal score.



Is slope significantly non-zero?	
F	8.874
DFn, DFd	1.000, 72.00
P value	0.0039
Deviation from zero?	Significant

Фигура 12. Корелационна зависимост между нормализираните нива на anti-C1q и категорията по BILAG Renal score (Spearman, $r = 0,34$; $p = 0,003$). На графиката е показан и линеен регресионен модел (в синьо) с граници на 95% CI (с пунктир). Данните от линейния регресионен анализ са дадени в таблицата под графиката.

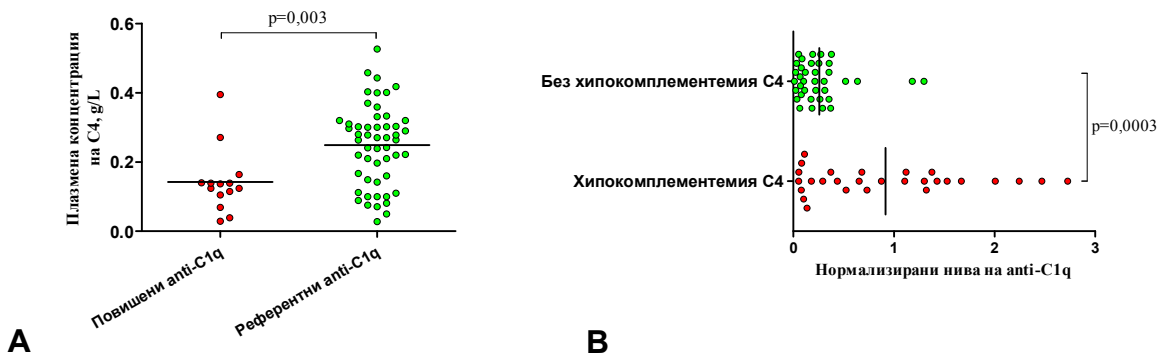
При изследване на зависимостта между нормализираните нива на anti-C1q и категорията по BILAG Renal score (след квантифициране на категориите: категория А – 5; категория В – 4; категория С – 3; категория D – 2 и категория Е – 1 (в последната категория Е липсват пациенти) установихме статистически значима средна по сила позитивна корелационна зависимост между нивата на anti-C1q и категорията по BILAG Renal score (Spearman, $r = 0,34$; $p = 0,003$). Тази зависимост се потвърди и при прилагане на линеен регресионен анализ (Фигура 12).

1.5. Автоантитела срещу C1q и някои основни имунологични маркери при ЛН.

1.5.1. Автоантитела срещу C1q и нива на комплемента C4 и C3.

Сред пациентите с ЛН с повишени нива на anti-C1q в началото на проучването, плазмени концентрации на C4 са изследвани при 14 (77,8%), като хипокомplementемия C4 се установи при 12 (85,7%) от тези пациенти. Сред пациентите с референтни нива на anti-C1q в началото на проучването, плазмени концентрации на C4 са изследвани при 52 (65,8%), като хипокомplementемия C4 се установи при 16 (30,8%) от тези пациенти (Таблица 7). Плазмената концентрация на C4 при пациентите с повишени anti-C1q е $0,142 \pm 0,093$ g/L и е статистически значимо по-ниска от плазмената концентрация на C4 при пациентите с референтни нива на anti-C1q, която е $0,249 \pm 0,116$ g/L (Mann-Whitney, $p=0,003$), както е показано на Фигура 13А. Средното нормализирано ниво на anti-C1q при пациентите с хипокомplementемия C4 е $0,917 \pm 0,795$ и е статистически значимо по-високо от средното нормализирано ниво на anti-C1q при пациентите без хипокомplementемия C4, което е $0,257 \pm 0,280$ (Mann-Whitney, $p=0,0003$), както е показано на Фигура 13В.

Повишените нива на anti-C1q определят статистически значимо наличието на хипокомplementемия C4 (Fisher's exact test, $p=0,0004$) с чувствителност от 42,9%, специфичност от 94,7%, позитивна предиктивна стойност от 85,7% и негативна предиктивна стойност от 69,2%.

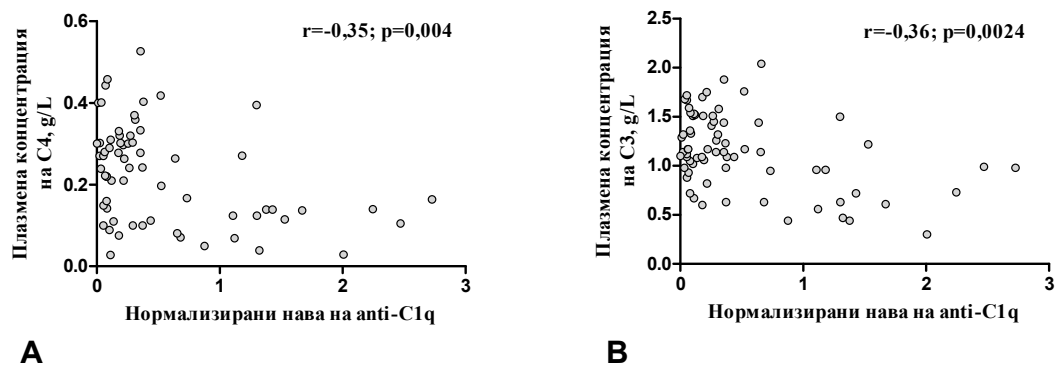


Фигура 13. А. Плазмени концентрации на C4 в зависимост от серологичния статус по отношение на anti-C1q при пациентите с ЛН. В. Нормализирани нива на anti-C1q в зависимост от наличието на хипокомplementемия C4 при пациентите с ЛН.

Таблица 7. Разпределение на пациентите с ЛН в зависимост от наличието или липсата на хипокомplementемия C4 и серологичния статус по отношение на anti-C1q.

Пациенти	Хипокомplementемия C4	Без хипокомplementемия C4	Общо
Повишени anti-C1q	12	2	14
Референтни anti-C1q	16	36	52
Общо	28	38	66

Налице е статистически значима слаба обратна корелационна зависимост между нормализираните нива на anti-C1q и плазмените концентрации на C4 при пациентите с ЛН (Spearman, $r=-0,35$; $p=0,004$), както е показано на Фигура 14А.



Фигура 14. *А. Корелационна зависимост между нивата на anti-C1q и плазмените концентрации на C4 при пациенти с ЛН (Spearman, $r=-0,35$; $p=0,004$). В. Корелационна зависимост между нивата на anti-C1q и плазмените концентрации на C3 при пациенти с ЛН (Spearman, $r=-0,36$; $p=0,0024$).*

Сред пациентите с ЛН с повишени нива на anti-C1q в началото на проучването, плазмени концентрации на C3 са изследвани при 15 (83,3%), като хипокомplementемия C3 се установи при 9 (50,0%) от тези пациенти. Сред пациентите с референтни нива на anti-C1q в началото на проучването, плазмени концентрации на C3 са изследвани при 57 (72,2%), като хипокомplementемия C3 се установи при 6 (10,5%) от тези пациенти (Таблица 8). Плазмената концентрация на C3 при пациентите с повишени anti-C1q е $0,791 \pm 0,329$ g/L и е статистически значимо по-ниска от плазмената концентрация на C3 при пациентите с референтни нива на anti-C1q, която е $1,239 \pm 0,344$ g/L (Mann-Whitney, $p=0,0001$), както е показано на Фигура 15А. Средното нормализирано ниво на anti-C1q при пациентите с хипокомplementемия C3 е $1,055 \pm 0,698$ и е статистически значимо по-високо от средното нормализирано ниво на anti-C1q при пациентите без хипокомplementемия C3, което е $0,379 \pm 0,540$ (Mann-Whitney, $p=0,0006$), както е показано на Фигура 15В.



Фигура 15. *А. Плазмени концентрации на C3 в зависимост от серологичния статус по отношение на anti-C1q при пациентите с ЛН. В. Нормализирани нива на anti-C1q в зависимост от наличието или липсата на хипокомplementемия C3 при пациентите с ЛН.*

Повишените нива на anti-C1q определят статистически значимо наличието на хипокомplementемия C3 (Fisher's exact test, $p=0,0005$) с чувствителност от 57,1%, специфичност от 89,5%, позитивна предиктивна стойност от 57,1% и негативна предиктивна стойност от 89,5%.

Таблица 8. *Разпределение на пациентите с ЛН в зависимост от наличието или липсата на хипокомplementемия C3 и серологичния статус по отношение на anti-C1q.*

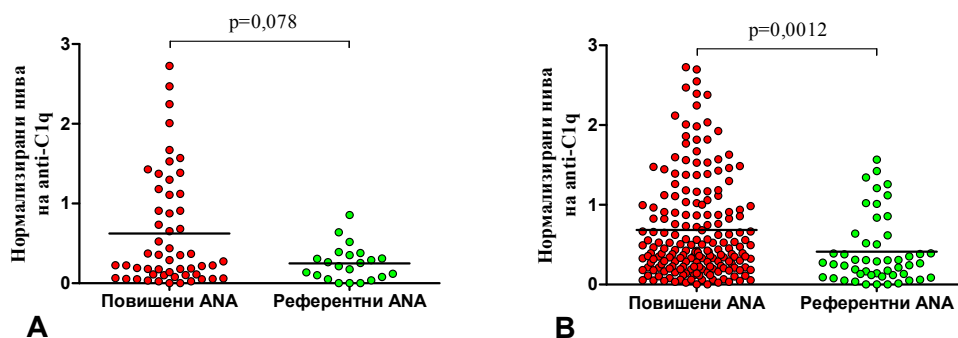
Пациенти	Хипокомplementемия C3	Без хипокомplementемия C3	Общо
Повишени anti-C1q	8	6	14
Референтни anti-C1q	6	51	57
Общо	14	57	71

Аналогично, както при C4, установихме статистически значима слаба обратна корелационна зависимост между нормализираните нива на anti-C1q и плазмените концентрации на C3 при пациентите с ЛН (Spearman, $r=-0,36$; $p=0,0024$), както е показано на Фигура 14В.

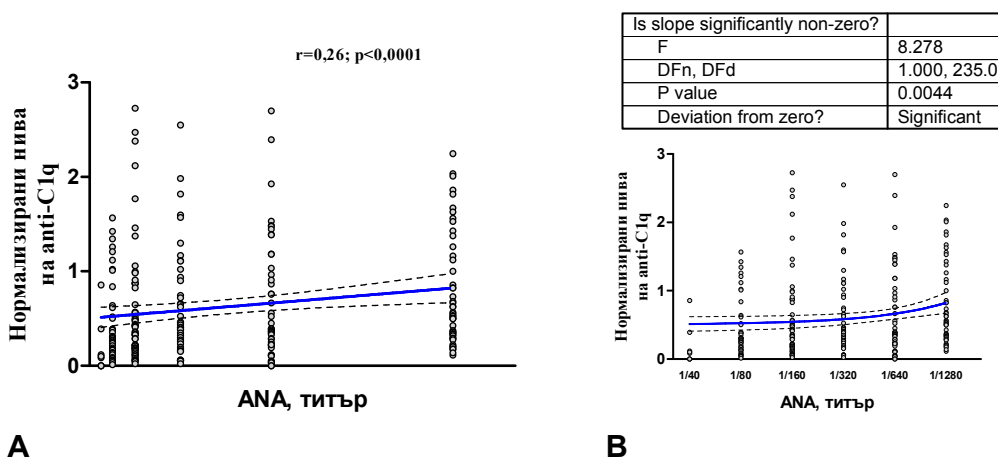
1.5.2. Автоантитела срещу C1q и антинуклеарни автоантитела (ANA).

Сред пациентите с ЛН ANA са изследвани при 72 (74,2%) и в общо 237 (78,7%) от всички изследвани в динамика проби. Патологично повишени титри на ANA ($>1:80$) установихме при 50 (69,4%) от първоначално изследваните за ANA и anti-C1q пациенти с ЛН и при 187 (78,9%) от всички изследвани в динамика за ANA и anti-C1q проби от пациенти с ЛН.

Средното нормализирано ниво на anti-C1q при изходно изследваните пациенти с ЛН с патологично повишени титри на ANA е $0,625 \pm 0,701$, докато нивото на anti-C1q при пациентите с референтни титри на ANA е $0,249 \pm 0,219$. Не се установи статистически значима разлика между нивата на anti-C1q при пациентите с повишени ANA и тези с референтни титри на ANA (Mann-Whitney, $p=0,078$). При изследване на тази зависимост сред изследваните в динамика проби на пациентите с ЛН, установихме, че нивата на anti-C1q при пациентите с патологично повишени титри на ANA ($0,683 \pm 0,626$) са значимо по-високи от нивата на anti-C1q при пациентите с референтни титри на ANA ($0,412 \pm 0,421$) (Mann-Whitney, $p=0,0012$), както е показано на Фигура 16 А и В.



Фигура 16. Нормализирани нива на anti-C1q при пациентите с ЛН в зависимост от наличието или липсата на патологично повишени титри на ANA. **А.** Сред първоначално изследваните пациенти с ЛН. **В.** Сред всички, изследвани в динамика на проучването проби от пациенти с ЛН се установяват статистически значимо по-високи нива на anti-C1q при пациентите, които са с патологично повишени титри на ANA ($p=0,0012$).



Фигура 17. Корелационна зависимост на нивата на anti-C1q от титрите на ANA (Spearman, $r=0,26$; $p<0,0001$). Представен е и линеен регресионен модел (в синьо) на зависимостта между нивата на anti-C1q и титрите на ANA, както и границите при 95% CI (с пунктир). **А.** При линеен мащаб на титрите на ANA. **В.** При логаритмичен мащаб (\log_2) на титрите на ANA.

Установихме статистически значима слаба позитивна корелационна зависимост между титрите на ANA и нормализираните нива на anti-C1q (Spearman, $r=0,26$; $p<0,0001$), като приложението на линеен регресионен анализ също показва статистически значима зависимост на нивата на anti-C1q от титрите на ANA (Linear regression, $p=0,0044$), както е показано на Фигура 17 А и В.

1.5.3. Автоантитела срещу C1q и автоантитела срещу двойноверижна ДНК (anti-dsDNA).

Сред пациентите с ЛН, изходно включени в проучването, anti-dsDNA са изследвани при 76 (78,4%) и в общо 242 (80,4%) от всички изследвани проби. Патологично повишени нива на anti-dsDNA (≥ 20 U/mL) установихме при 31 (40,8%) от първоначално изследваните за anti-dsDNA и anti-C1q пациенти с ЛН и при 131 (54,1%) от всички изследвани в динамика за anti-dsDNA и anti-C1q проби от пациенти с ЛН.

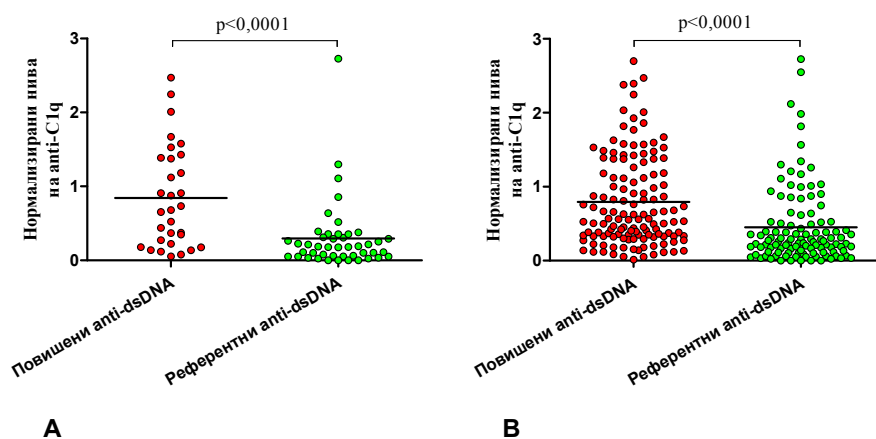
Сред всички изследвани в динамика проби от пациенти с ЛН, тези с повишени нива на anti-C1q и повишени нива на anti-dsDNA са 41 (73,2% от всички проби с повишени нива на anti-C1q, изследвани за anti-dsDNA), а пробите с повишени anti-C1q и референтни нива на anti-dsDNA са 15 (26,8% от всички проби с повишени anti-C1q, изследвани за anti-dsDNA), докато пробите с референтни нива на anti-C1q и повишени нива на anti-dsDNA са 90 (48,4% от всички проби с референтни нива на anti-C1q, изследвани за anti-dsDNA), а тези с референтни нива на anti-C1q и референтни нива на anti-dsDNA са 96 (51,6% от всички проби с референтни нива на anti-C1q, изследвани за anti-dsDNA) (Таблица 9).

Таблица 9. Разпределение на всички изследвани в динамика проби от пациентите с ЛН според серологичния статус по отношение на anti-dsDNA и anti-C1q.

Пациенти	Повишени anti-dsDNA	Референтни anti-dsDNA	Общо
Повишени anti-C1q	41	15	56
Референтни anti-C1q	90	96	186
Общо	131	111	242

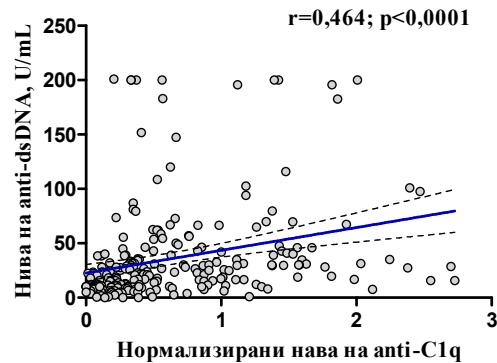
Повишените нива на anti-C1q определят статистически значимо наличието на повишени нива на anti-dsDNA (Fisher's exact test, $p=0,0012$).

Средното нормализирано ниво на anti-C1q при изходно изследваните пациенти с ЛН с патологично повишени нива на anti-dsDNA ($0,845\pm 0,687$) е статистически значимо по-високо от нивото на anti-C1q при пациентите с референтни нива на anti-dsDNA ($0,296\pm 0,462$) (Mann-Whitney, $p<0,0001$). При изследване на тази зависимост сред всички изследвани в динамика проби от пациентите с ЛН, също установихме, че нивото на anti-C1q при пациентите с патологично повишени нива на anti-dsDNA ($0,794\pm 0,610$) е значимо по-високо от нивото на anti-C1q при пациентите с референтни нива на anti-dsDNA ($0,452\pm 0,528$) (Mann-Whitney, $p<0,0001$), както е показано на Фигура 18 А и В.



Фигура 18. Нива на anti-C1q при пациентите с ЛН в зависимост от нивата на anti-dsDNA. **А.** При изходно включените в проучването пациенти. **В.** При всички изследвани в динамика проби от пациенти с ЛН.

Налице е статистически значима средна по сила корелационна зависимост между нивата на anti-C1q и нивата на anti-dsDNA – с нарастване нивата на anti-C1q се установява значимо нарастване на нивата на anti-dsDNA (Spearman, $r=0,464$; $p<0,0001$), като тази зависимост се потвърди и след прилагане на линеен регресионен анализ на данните (Фигура 19).



Is slope significantly non-zero?	
F	20.54
DFn, DFd	1.000, 240.0
P value	< 0.0001
Deviation from zero?	Significant

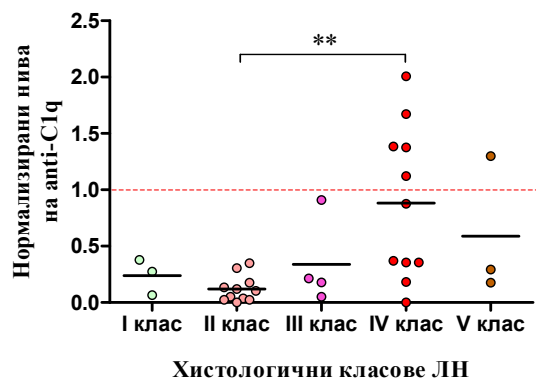
Фигура 19. Корелационна зависимост между нивата на anti-C1q и anti-dsDNA (Spearman, $r=0,464$; $p<0,0001$). Линеен регресионен модел на зависимостта (в синьо) и границите при 95% CI (с пунктир), данните са показани в таблицата под графиката.

1.6. Автоантитела срещу C1q и някои хистологични признаци на ЛН.

Пациентите с ЛН, са диагностицирани с провеждане на пункционна бъбречна биопсия, като хистологична диагноза е налична при 94 (96,9%) от изходно включените в проучването пациенти. Определени са хистологичните класове на ЛН, съгласно критериите на International Society of Nephrology (ISN) и Renal Pathology Society (RPS). Единствено при 2 (2,1%) пациенти е отчетена промяна на хистологичния клас на ЛН за периода на проучването. Отчетени са хистологичните индекси на активност и хроничност, съгласно критериите на National Institutes of Health (NIH). С оглед клинична достоверност на изследваните зависимости, когато са изследвани връзки, касаещи белези на хистологична активност на ЛН, при статистическите анализи са отчитани само случаите, при които времето между вземането на кръвните проби за изследване на anti-C1q и провеждането на пункционната бъбречна биопсия е било до 12 месеца. Това условие е изпълнено при 32 (34,0%) от пациентите, изходно включени в проучването.

1.6.1. Автоантитела срещу C1q и хистологичният клас на ЛН.

При това изследване установихме следното разпределение на данните: в групата с I хистологичен клас ЛН попадат 3 пациенти със средно нормализирано ниво на anti-C1q от $0,239\pm 0,160$; в групата с II клас ЛН попадат 11 пациенти със средно нормализирано ниво на anti-C1q от $0,121\pm 0,117$; в групата с III хистологичен клас ЛН попадат 4 пациенти със средно нормализирано ниво на anti-C1q от $0,339\pm 0,387$. В тези три групи не установихме патологично повишени нива на anti-C1q. В групата с IV хистологичен клас ЛН попадат 11 пациенти, от които 5 (45,5%) са с патологично повишени нива на anti-C1q, а средното нормализирано ниво на anti-C1q в тази група е $0,882\pm 0,673$. В групата с V хистологичен клас ЛН попадат 3 пациенти, от които 1 (33,3%) е с патологично повишено ниво на anti-C1q, а средното ниво на anti-C1q е $0,589\pm 0,618$. На базата на това разпределение установихме, че е налице статистически значима зависимост между хистологичния клас на ЛН и нивата на anti-C1q (One-way ANOVA, $p=0,012$), като е налице статистически значима разлика единствено между нивата на anti-C1q при пациентите с IV и II хистологични класове на ЛН (Bonferroni's multiple comparison test, $p<0,05$, Фигура 20, Таблица 10).



Фигура 20. Нива на anti-C1q в зависимост от хистологичния клас на ЛН. Изследваните пациенти с ЛН са само тези, при които времето между изследването на anti-C1q и пункционната бъбречна биопсия е до 12 месеца. Налице е статистически значима разлика в нивата на anti-C1q между пациентите с IV хистологичен клас, където нивото е по-високо, и пациентите с II хистологичен клас (Множествен сравнителен тест на Bonferroni, $p < 0,05$).

Таблица 10. Множествен сравнителен тест на Bonferroni за изследване разликите в нивата на anti-C1q в отделните хистологични класове на ЛН. Изследваните пациенти с ЛН са само тези, при които времето между изследването на anti-C1q и пункционната бъбречна биопсия е до 12 месеца.

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	p < 0,05	95% CI of diff
I клас с II клас	0,1185	0,3882	He (ns)	-0,8145 до 1,052
I клас с III клас	-0,09952	0,2780	He (ns)	-1,194 до 0,9945
I клас с IV клас	-0,6429	2,106	He (ns)	-1,576 до 0,2901
I клас с V клас	-0,3503	0,9156	He (ns)	-1,520 до 0,8192
II клас с III клас	-0,2180	0,7968	He (ns)	-1,054 до 0,6183
II клас с IV клас	-0,7614	3,810	Да (**)	-1,372 до -0,1506
II клас с V клас	-0,4688	1,536	He (ns)	-1,402 до 0,4642
III клас с IV клас	-0,5434	1,986	He (ns)	-1,380 до 0,2930
III клас с V клас	-0,2508	0,7007	He (ns)	-1,345 до 0,8432
IV клас с V клас	0,2926	0,9585	He (ns)	-0,6404 до 1,226

При изследване връзката между наличието на патологично повишени anti-C1q и наличието на ЛН от IV хистологичен клас (Таблица 11) установихме, че в изследвана група пациенти с ЛН, патологично повишените нива на anti-C1q определят статистически значимо наличието на дифузна ЛН (IV хистологичен клас) (Fisher's exact test, $p=0,002$) с чувствителност от 34,2%, специфичност от 92,9%, позитивна предиктивна стойност от 76,5% и негативна предиктивна стойност от 67,5%. Релативният риск за наличие на IV хистологичен клас ЛН при наличие на позитивни anti-C1q е 2,4.

Таблица 11. Разпределение на хистологично диагностицираните пациенти според наличието или липсата на IV хистологичен клас ЛН и серологичния статус по отношение на anti-C1q.

Пациенти	IV хистологичен клас ЛН	Друг клас ЛН	Общо
Повишени anti-C1q	13	4	17
Референтни anti-C1q	25	52	77
Общо	38	56	94

1.6.2. Автоантитела срещу C1q и основни хистологични лезии за активност и хроничност на ЛН.

В настоящото проучване изследвахме зависимостите между нивата на anti-C1q и хистологични белези на активност (ендокапилярна пролиферация, гломерулна левкоцитна инфилтрация, субендотелни депозити („телени бримки“), фибриноидна некроза и/или кариорексис, клетъчни полулуния и интерстициална инфилтрация) и хистологични белези на хроничност (гломерулна склероза, фиброзни полулуния, тубулна атрофия и интерстициална фиброза), както и връзката между нивата на anti-C1q и хистологичните индекси на активност и хроничност, определени на базата на горепосочените хистологични белези.

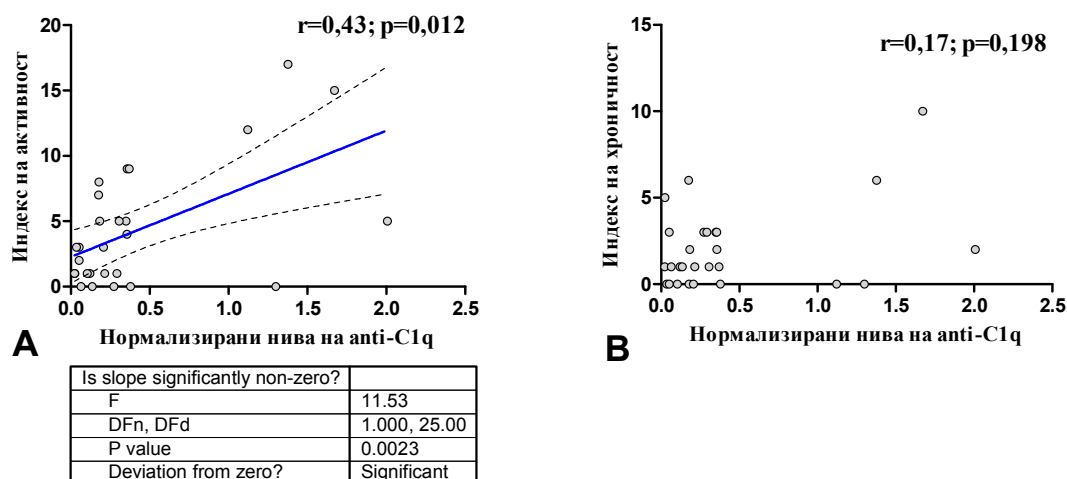
Таблица 12. Сравнителен анализ между нивата на anti-C1q при наличие и липса на хистологични белези за активност и хроничност при пациентите с ЛН. Представени са средните нива ± стандартното отклонение (SD).

Хистологичен признак	Нормализирани нива на anti-C1q при:		p
	наличие на хистологичния признак	липса на хистологичния признак	
Ендокапиларна пролиферация	0,490±0,587	0,374±0,422	0,927
Гломерулна левкоцитна инфилтрация ¹	-	-	-
Субендотелни депозити, формиращи „телени бримки“	0,805±0,764	0,351±0,422	0,249
Фибриноидна некроза и/или кариорексис	0,569±0,593	0,417±0,539	0,309
Клетъчни полулуния	1,271±0,696	0,315±0,373	0,013
Интерстициално възпаление	0,620±0,557	0,358±0,535	0,068
Гломерулна склероза	0,544±0,659	0,385±0,424	0,624
Фиброзни полулуния	1,152±0,748	0,306±0,354	0,011
Тубулна атрофия	0,552±0,609	0,419±0,528	0,513
Интерстициална фиброза	0,632±0,595	0,377±0,520	0,100

¹ В групата с гломерулна левкоцитна инфилтрация попадат само 2 пациенти и данните от статистическия анализ не са достоверни.

На Таблица 12 са показани данните от сравнителния анализ между нивата на anti-C1q в групите с и без съответните хистологични признаци за активност и хроничност на ЛН. При пациентите с клетъчни полулуния са налице статистически значимо по-високи нива на anti-C1q в сравнение с пациентите без клетъчни полулуния (Mann-Whitney, $p=0,013$). При пациентите с фиброзни полулуния са налице значимо по-високи нива на anti-C1q в сравнение с пациентите без клетъчни полулуния (Mann-Whitney, $p=0,011$).

Налице е статистически значима средна по сила позитивна корелационна зависимост между нивата на anti-C1q и хистологичния индекс на активност (Spearman, $r=0,43$; $p=0,012$). Тази връзка се потвърди и при прилагане на линеен регресионен анализ (Фигура 21А).

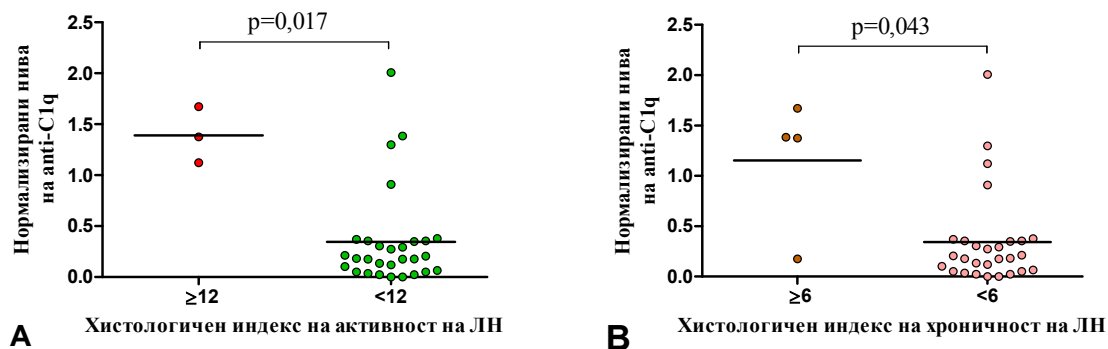


Фигура 21. А. Корелационен (Spearman, $r=0,43$; $p=0,012$) и линеен регресионен анализ (графично в синьо, данните са показани в таблицата под графиката) на връзката между нивата на anti-C1q и хистологичния индекс на активност на ЛН. В. Корелационен анализ на връзката между нивата на anti-C1q и хистологичния индекс на хроничност (Spearman, $r=0,17$; $p=0,198$).

Няма статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-C1q и хистологичния индекс на хроничност на ЛН (Spearman, $r=0,17$; $p=0,198$) (Фигура 21В).

Предвид диапазона от стойности на хистологичния индекс на активност на ЛН (от 0 до 24) установихме, че средното нормализирано ниво на anti-C1q при пациентите с индекс на активност на ЛН ≥ 12 ($1,390 \pm 0,275$) е статистически значимо по-високо от нивото при пациентите с индекс на активност на ЛН < 12 ($0,369 \pm 0,479$) (Mann-Whitney, $p=0,017$) (Фигура 22А). Аналогично, нивото на anti-C1q при

пациентите с индекс на хроничност на ЛН ≥ 6 ($1,152 \pm 0,665$) е статистически значимо по-високо от това при пациентите с индекс на хроничност на ЛН < 6 (Mann-Whitney, $p=0,043$) (Фигура 22B).



Фигура 22. Нормализирани нива на anti-C1q при пациенти с ЛН според хистологичните индекси на активност (A) и на хроничност (B).

1.7. Прогностично значение и динамика на промените в нивата на автоантителата срещу C1q.

При 61 (62,9%) от пациентите с ЛН, е налице проследяване за период от средно $27,0 \pm 17,8$ (от 1,1 до 60) месеца, с между 2 и 11 проби, при които са определяни нивата на anti-C1q и останалите клинично-лабораторни и имунологични параметри на ЛН.

Сред изследваните в динамика общо 301 проби от кръвни плазми на пациентите с ЛН установихме патологично повишени нива на anti-C1q при 68 (22,6%) проби. Изследвайки нивата на anti-C1q при проследените в динамика пациенти (с 2 и повече проби в хода на проучването), установихме, че при първите проби, патологично повишени anti-C1q има при 16 (26,2%) от пациентите, а след среден период на проследяване от 13 месеца, патологично повишени anti-C1q установихме отново при 16 (26,2%) от пациентите, като при 5 от пациентите с първоначално повишени anti-C1q, последните намаляват до референтни стойности, а при 5 пациенти, изходно с референтни нива на anti-C1q се отбелязва повишаване на нивата до патологични стойности. Средното нормализирано ниво на anti-C1q при пациентите, позитивни за anti-C1q в началото, е 1,652 (от 1,108 до 2,727), докато след среден период от 13 месеца е 1,435 (от 1,039 до 2,033), като няма статистически значима разлика между тези нива (Wilcoxon signed rank test, $p=0,110$).

Сред проследяваните с повече от 1 проба пациенти с ЛН, при първото изследване с активна ЛН са били 27 (44,2%), в състояние на частична ремисия на ЛН са били 17 (27,9%) и в състояние на пълна ремисия на ЛН са били 17 (27,9%). При последното изследване с активна ЛН са били 17 (27,9%), в състояние на частична ремисия на ЛН са били 21 (34,4%) и в състояние на пълна ремисия на ЛН са били 23 (37,7%). При първото изследване с категория А на ЛН по BILAG Renal score са били 23 (37,7%), с категория В – 20 (32,8%), с категория С – 6 (9,8%) и с категория D – 12 (19,7%). При последното изследване на пациентите разпределението в категории на ЛН по BILAG Renal score е следното: с категория А – 11 (18,0%), с категория В – 24 (39,3%), с категория С – 7 (11,5%) и с категория D – 19 (31,2%).

1.7.1. Прогностично значение на автоантителата срещу C1q.

При 45 (46,4%) от изходно включените в проучването пациенти с ЛН, при които са провеждани 3 или повече проби за anti-C1q в динамика, изследвахме връзките между нивата на anti-C1q и категорията по BILAG Renal score и нивата на anti-C1q и активността на ЛН, определена като активна, частична ремисия и пълна ремисия на ЛН. Патологично повишени нива на anti-C1q поне в една от пробите установихме при 25 (55,6%) от пациентите с ЛН.

Пациентите с ЛН, при които отчетохме в динамика повишение на нивата на anti-C1q до патологични стойности с последващо повишение на категорията по BILAG Renal score са 12 (26,7%). Това повишение на категорията по BILAG Renal score на ЛН се отчете в рамките на среден период от 5,55 (от 0,1 до 21) месеца след повишаване на нивата на anti-C1q до патологични стойности. Пациентите, при които не се отчете повишение на нивата на anti-C1q до патологични стойности и не се отчете повишение на категорията по BILAG Renal score са 22 (48,9%). Разпределението на пациентите с ЛН според наличието или липсата на повишение на нивата на anti-C1q до патологични стойности и според

наличието или липсата на повишение на категорията на ЛН по BILAG Renal score е показано на Таблица 13.

На базата на това разпределение установихме, че наличието на повишаване на нивата на anti-C1q до патологични стойности определя статистически значимо последващото повишаване на категорията на ЛН по BILAG Renal score в рамките на 5,6±6,5 месеца след повишението на anti-C1q (Fisher's exact test, p=0,0012) с чувствителност от 80,0%, специфичност от 73,3%, позитивна предиктивна стойност от 60,0% и негативна предиктивна стойност от 88,0%. Относителният риск за повишаване категорията на ЛН по BILAG Renal score след повишаване на нивата на anti-C1q до патологични стойности определихме на 5,0.

Таблица 13. Разпределение на пациентите с ЛН, проследявани в динамика с 3 и повече проби, според наличието или липсата на повишение на нивата на anti-C1q до патологични стойности и наличието или липсата на последващо повишение на категорията на ЛН по BILAG Renal score.

Пациенти с ЛН	С повишение на категорията на ЛН по BILAG	Без повишение на категорията на ЛН по BILAG	Общо
С повишаване на anti-C1q до патологични нива	12	8	20
Без повишаване на anti-C1q до патологични нива	3	22	25
Общо	15	30	45

Пациентите, при които отчетохме патологично повишение на нивата на anti-C1q, което да е едновременно или да предхожда повишаване на активността на ЛН, са 15 (33,3%). Пациентите, при които не установихме патологично повишени нива на anti-C1q и не се отчете активиране на ЛН са 15 (33,3%). Разпределението на пациентите с ЛН според наличието или липсата на повишение на нивата на anti-C1q до патологични стойности и според наличието или липсата на активиране на ЛН е показано на Таблица 14.

На базата на това разпределение установихме, че повишаването на нивата на anti-C1q до патологични стойности определя статистически значимо последващото активиране на ЛН в рамките на между 0 и 10 месеца след повишението на anti-C1q (Fisher's exact test, p=0,0337) с чувствителност от 75,0%, специфичност от 60,0%, позитивна предиктивна стойност от 60,0% и негативна предиктивна стойност от 75,0%. Относителният риск за активиране на ЛН след повишаване на нивата на anti-C1q до патологични стойности определихме на 2,4.

Таблица 14. Разпределение на пациентите с ЛН, проследявани в динамика с 3 и повече проби, според наличието или липсата на повишение на нивата на anti-C1q до патологични стойности и наличието или липсата на активиране на ЛН.

Пациенти с ЛН	Активирани на ЛН	Без активиране на ЛН	Общо
С повишаване на anti-C1q до патологични нива	15	10	25
Без повишаване на anti-C1q до патологични нива	5	15	20
Общо	20	25	45

1.7.2. Динамика на автоантителата срещу C1q във връзка с някои лабораторни и имунологични показатели при пациентите с ЛН.

Средното нормализирано ниво на anti-C1q при пациенти с ЛН в началото на периода на проследяване е 0,618±0,703 (от 0,000 до 2,727) докато в края на среден период от 13 месеца на проследяването и лечение е 0,634±0,557 (от 0,000 до 2,033), като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, p=0,311).

С оглед динамичното проследяване на нивата на anti-C1q във връзка с основните клинично-лабораторни и имунологични показатели при пациентите с ЛН определихме промяната на нивата на anti-C1q като процент ($\Delta N\%$) спрямо изходното ниво при първото изследване, по долупосочената формула, където: N_1 е нормализираното ниво на anti-C1q при първата проба на пациента в началото на проучването; N_x е нормализираното ниво на anti-C1q в крайното изследване (след среден период от 13 месеца на проследяване и лечение):

$$\Delta N = \frac{N_x - N_1}{N_1} \times 100\%.$$

1.7.2.1. Динамика на автоантителата срещу С1q и протеинурията.

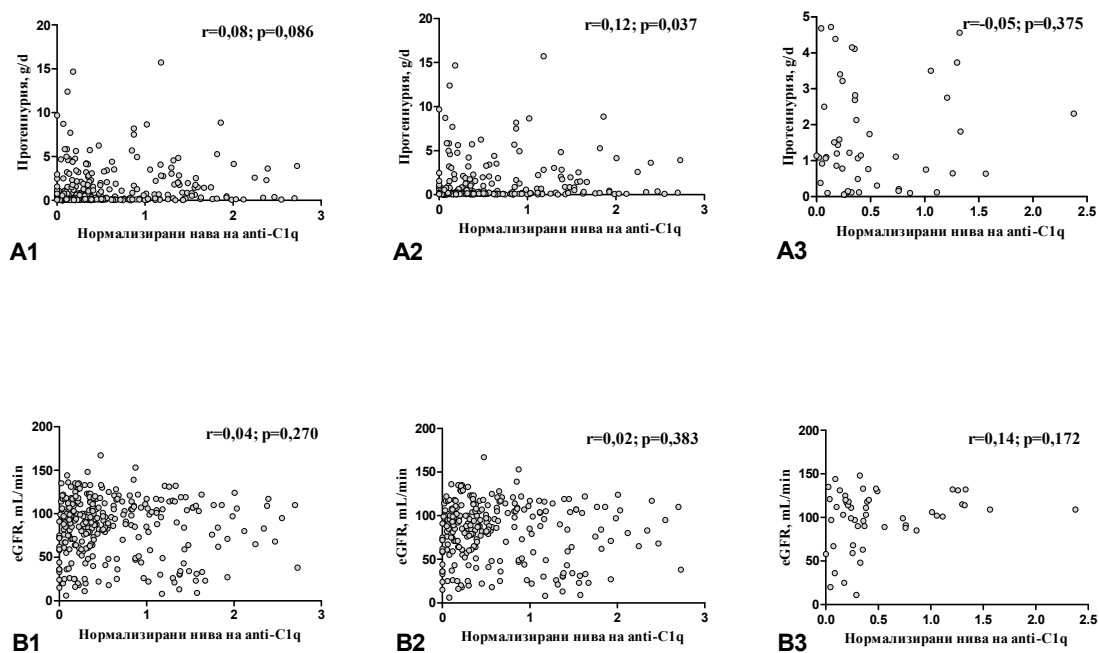
Динамиката на протеинурията за този период показва средно начално ниво от $1,79 \pm 3,07$ (от 0,02 до 15,72) g/d и средно ниво в края от $1,39 \pm 2,34$ (от 0,01 до 12,39) g/d, като разликата отново не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,059$).

Аналогично на горепосоченото, определихме и промяната на протеинурията (ΔPU) спрямо изходната протеинурия (PU_1 – протеинурията при първото изследване (g/d); PU_x – протеинурия при последното изследване (g/d)):

$$\Delta PU = \frac{PU_x - PU_1}{PU_1} \times 100\%.$$

Налице е статистически значима корелационна зависимост между промяната на нивата на anti-C1q и промяната на протеинурията (Spearman, $r=0,31$; $p=0,018$).

Не установихме статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-C1q и протеинурията при изследваните в динамика проби от пациентите с ЛН (Spearman, $r=0,08$; $p=0,086$, Фигура 23A1). Сред всички проби от пациентите с ЛН, които някога са имали екстраренални прояви на СЛЕ, се установи слаба позитивна статистически значима корелация между нормализираните нива на Anti-C1q и протеинурията (Spearman, $r=0,12$; $p=0,037$, Фигура 23A2). При пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ не се установи статистически значима корелация между нивата на anti-C1q и протеинурията (Spearman, $r=-0,05$; $p=0,375$, Фигура 23A3).



Фигура 23. Корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C1q и протеинурията и anti-C1q и изчислената скорост на гломерулна филтрация (eGFR) при всички изследвани в динамика проби от пациенти с ЛН (A1 и B1); при пробите, изследвани в динамика от пациенти с ЛН с екстраренални прояви на СЛЕ (A2 и B2) и при изследваните проби от пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ (A3 и B3). Статистически значима слаба корелация се установи единствено между anti-C1q и протеинурията при пациенти с ЛН и екстраренални прояви на СЛЕ (A2) (Spearman, $r=0,12$; $p=0,037$).

1.7.2.2. Динамика на автоантителата срещу С1q и бъбречната функция.

Динамиката на eGFR (mL/min) за периода на проследяване и лечение на пациентите с ЛН показва средно начално ниво от $91,3 \pm 31,1$ (от 18,0 до 136,0) mL/min и средно ниво в края от $94,0 \pm 29,9$ (от 25,0 до 153,0) mL/min, като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,153$).

Аналогично на горепосоченото, определихме и промяната на eGFR (ΔGFR) спрямо изходната GFR ($\text{GFR}_1 - \text{GFR}$ при първото изследване (mL/min); $\text{GFR}_x - \text{GFR}$ при изследването след среден период на проследяване от 13 месеца (mL/min)):

$$\Delta\text{GFR} = \frac{\text{GFR}_x - \text{GFR}_1}{\text{GFR}_1} \times 100\%.$$

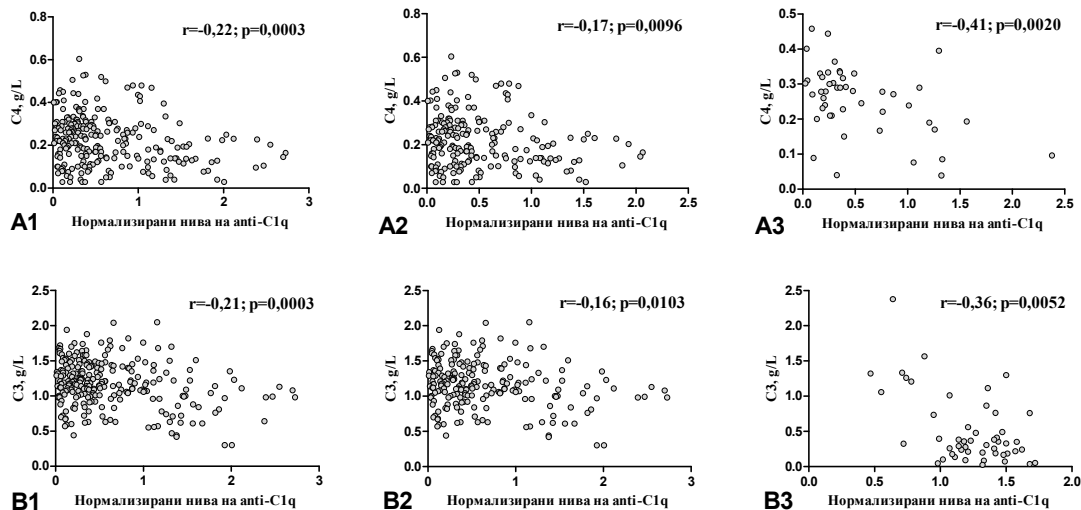
Не се установи статистически значима корелационна зависимост между промяната на нормализираните нива на anti-C1q спрямо изходните ($\Delta\text{N}\%$) и промяната на eGFR спрямо изходната за среден период от 13 месеца при пациентите с ЛН (Spearman, $r=-0,10$; $p=0,246$).

Не се установи статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-C1q и eGFR при изследваните в динамика проби от пациентите с ЛН (Spearman, $r=0,04$; $p=0,270$, Фигура 23B1). Сред всички проби от пациентите с ЛН, които някога са имали екстраренални прояви на СЛЕ не се установи корелация между нормализираните нива на Anti-C1q и eGFR (Spearman, $r=0,02$; $p=0,383$, Фигура 23B2). При пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ не се установи статистически значима корелация между нивата на anti-C1q и eGFR (Spearman, $r=0,14$; $p=0,172$, Фигура 23B3).

1.7.2.3. Динамика на автоантителата срещу C1q и компонентите на комплемента C4 и C3.

Динамиката на плазмената концентрация на C4 (g/L) за периода на проследяване и лечение на пациентите с ЛН показва средно начално ниво от $0,22 \pm 0,12$ (от 0,03 до 0,53) g/L и средно ниво в края от $0,24 \pm 0,12$ (от 0,04 до 0,60) g/L, като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,090$). Динамиката на плазмената концентрация на C3 (g/L) за този период показва средно начално ниво от $1,15 \pm 0,36$ (от 0,44 до 1,88) g/L и средно ниво в края от $1,20 \pm 0,25$ (от 0,55 до 1,74) g/L, като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,288$).

Налице са статистически значими отрицателни корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C1q при всички пациенти с ЛН и, съответно, плазмената концентрация на C4 (Spearman, $r=-0,22$; $p=0,0003$) и плазмената концентрация на C3 (Spearman, $r=-0,21$; $p=0,0003$) (Фигура 24 A1 и B1). При изследване на аналогичните зависимости между anti-C1q и нивата на C4 и C3 при пациентите с ЛН с екстраренални прояви на СЛЕ (Фигура 24 A2 и B2) и при пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ (Фигура 24 A3 и B3), установихме отново статистически значими отрицателни корелационни зависимости.



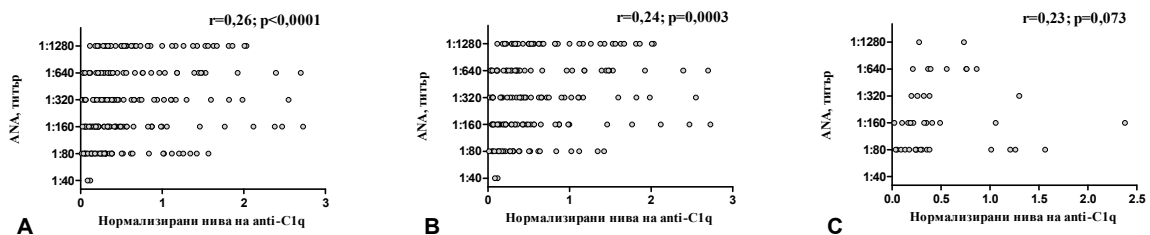
Фигура 24. Корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C1q, изследвани в динамика във всички проби от пациенти с ЛН и плазмените концентрации на C4 и C3 в тези проби. **A1** и **B1** При всички пациенти с ЛН; **A2** и **B2** При пациентите с ЛН с екстраренални прояви на СЛЕ; **A3** и **B3** При пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ. (Spearman).

1.7.2.4. Динамика на автоантителата срещу C1q и антинуклеарните автоантитела (ANA).

Динамиката на титъра на ANA за периода на проследяване и лечение на пациентите с ЛН показва

средно начално ниво (median) от 1:640 (от 1:40 до 1:1280) и средно ниво в края (median) от 1:320 (от 1:80 до 1:1280), като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,078$).

Налице е статистически значима слаба позитивна корелационна зависимост между нормализираното ниво на anti-C1q и титъра на ANA при изследване на всички проби, проведени в динамика на пациентите с ЛН (Spearman, $r=0,26$; $p<0,0001$), при които са изследвани едновременно ANA и anti-C1q (220 проби) (Фигура 25А). Същата зависимост установихме сред пробите от пациентите с ЛН и екстраренални прояви на СЛЕ (178 проби) (Фигура 25В) (Spearman, $r=0,24$; $p=0,0003$). При изследване само на пробите от пациенти с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ (42 проби), не се установи статистически значима корелационна зависимост (Spearman, $r=0,23$; $p=0,073$) (Фигура 25С).

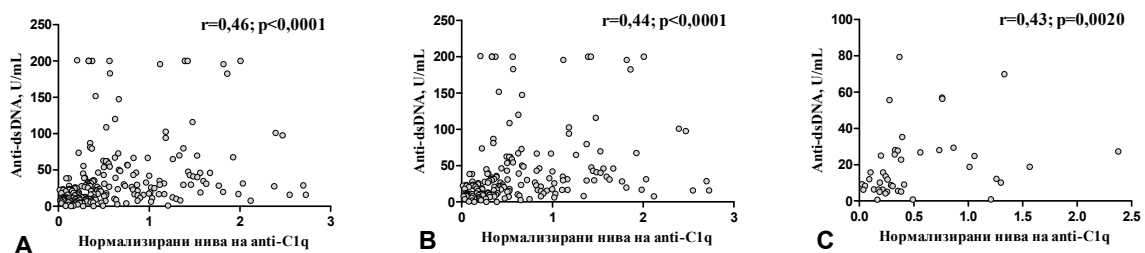


Фигура 25. Корелационна зависимост между нормализираните нива на anti-C1q и титъра на ANA (показан в логаритмичен мащаб): **А.** при всички проведени в динамика проби от пациентите с ЛН, при които са изследвани едновременно ANA и anti-C1q (Spearman, $r=0,26$; $p<0,0001$); **В.** при пациентите с ЛН и екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=0,24$; $p=0,0003$); **С.** при пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=0,23$; $p=0,073$).

1.7.2.5. Динамика на автоантителата срещу C1q и автоантителата срещу двойноверижна ДНК (anti-dsDNA).

Динамиката на концентрацията на anti-dsDNA (U/mL) за периода на проследяване и лечение на пациентите с ЛН показва средно начално ниво от $32,6\pm 37,0$ (от 5,6 до 195,8) U/mL и средно ниво в края от $33,2\pm 43,8$ (от 0,1 до 183, 0) U/mL, като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,132$).

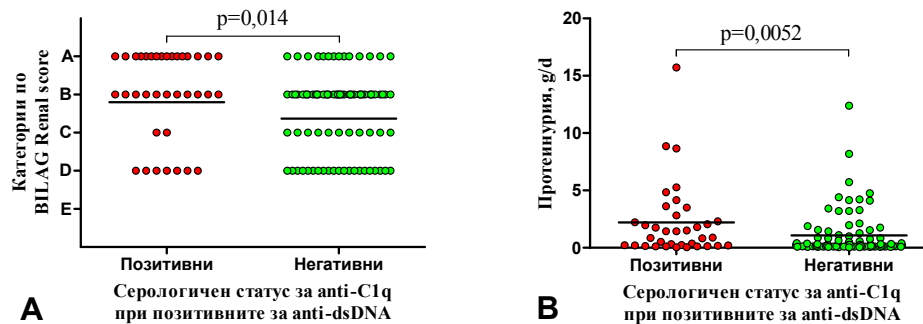
Налице е статистически значима умерена позитивна корелационна зависимост между нормализираното ниво на anti-C1q и нивото на anti-dsDNA при изследване на всички проби от пациентите с ЛН в динамика (Spearman, $r=0,45$; $p<0,0001$) (Фигура 26А). Същите зависимости установихме сред пробите от пациентите с ЛН и екстраренални прояви на СЛЕ (Фигура 26В) (Spearman, $r=0,44$; $p<0,0001$) и сред пробите от пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=0,43$; $p=0,0020$) (Фигура 26С).



Фигура 26. Корелационна зависимост между нормализираните нива на anti-C1q и нивата на anti-dsDNA: **А.** при всички проведени в динамика проби при пациентите с ЛН, при които са изследвани едновременно anti-dsDNA и anti-C1q (Spearman, $r=0,45$; $p<0,0001$); **В.** при пациентите с ЛН и екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=0,44$; $p<0,0001$); **С.** при пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=0,43$; $p=0,0020$).

При пациентите, изследвани в динамика, позитивни едновременно за anti-dsDNA и anti-C1q, средният ранг (категория на ЛН) на BILAG Renal score е статистически значимо по-висок от този при

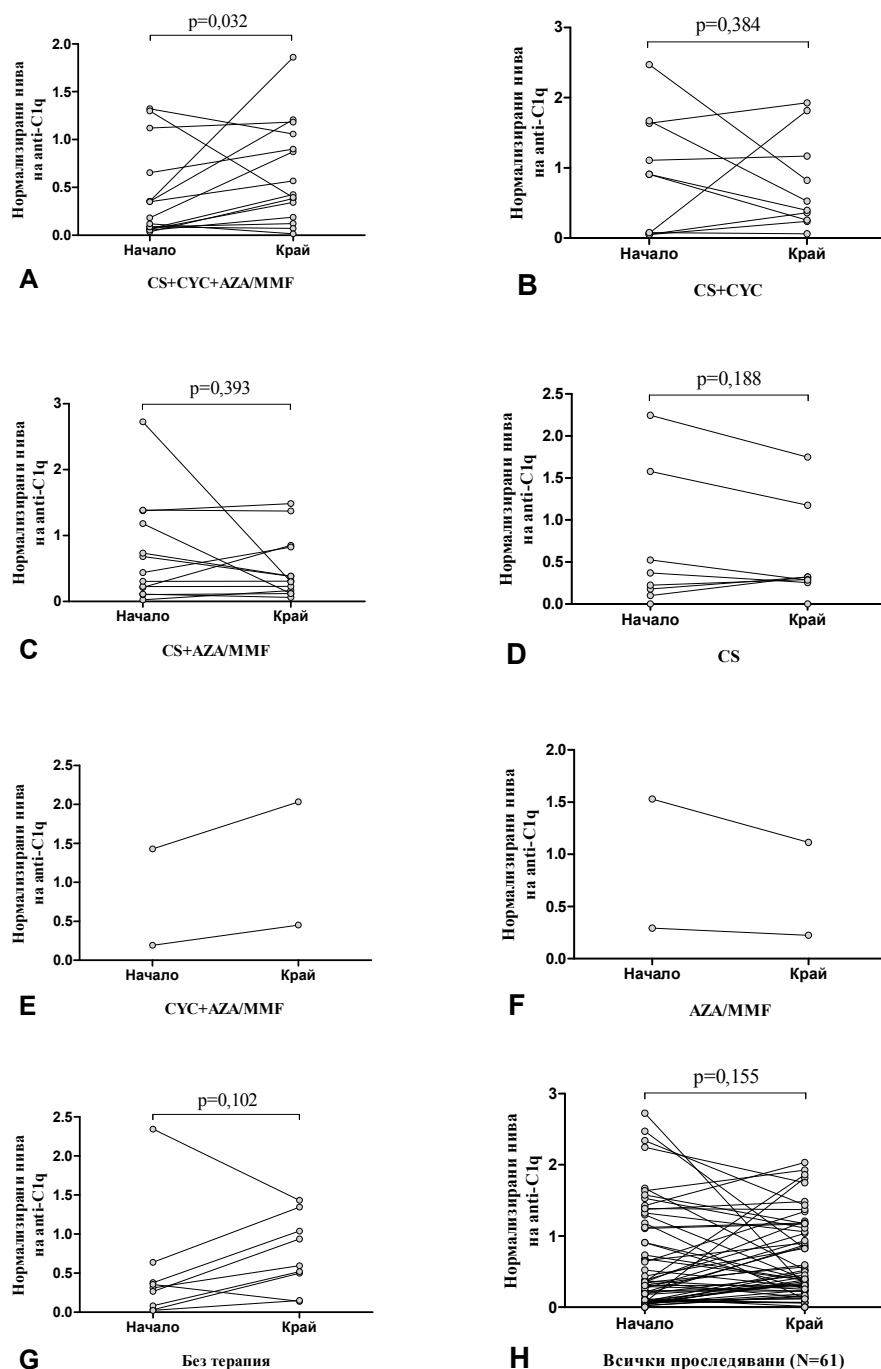
пациентите позитивни за anti-dsDNA и негативни за anti-C1q (Mann-Whitney, $p=0,014$) (Фигура 27А). При пациентите, изследвани в динамика, позитивни едновременно за anti-dsDNA и anti-C1q, средното ниво на протеинурията ($2,21\pm 3,21$ g/d) е статистически значимо по-високо от това при пациентите позитивни за anti-dsDNA и негативни за anti-C1q ($1,08\pm 1,96$ g/d) (Mann-Whitney, $p=0,0052$) (Фигура 27В).



Фигура 27. А. Сравнителен анализ между категориите (ранговете) по BILAG Renal score при пациентите с ЛН, изследвани в динамика, позитивни за anti-dsDNA. При позитивните едновременно за anti-dsDNA и anti-C1q, средната категория на ЛН е статистически значимо по-висока от тази при пациентите позитивни за anti-dsDNA и негативни за anti-C1q (Mann-Whitney, $p=0,014$). В. Протеинурия при пациентите, позитивни за anti-dsDNA в зависимост от статуса за anti-C1q (Mann-Whitney, $p=0,0052$).

1.8. Автоантитела срещу C1q и някои аспекти на лечението при пациентите с ЛН.

За период на проследяване средно от 13 (от 6 до 25) месеца, според вида на провежданото имунопатогенетично лечение при пациентите с ЛН ($N=61$) се обособиха осем групи: 15 пациенти, при които е провеждано лечение с CS (за период от 3 до 24 месеца) + CYC (за период от 0,2 до 7 месеца) + AZA или MMF (AZA/MMF) (за период от 2 до 24 месеца); 10 пациенти, при които е провеждано лечение с CS (за период от 1 до 15 месеца) + CYC (за период от 0,1 до 8 месеца); 13 пациенти, при които е провеждано лечение с CS (за период от 3 до 13 месеца) + AZA/MMF (за период от 1 до 10 месеца); 8 пациенти, при които е провеждано лечение само с CS (за период от 2 до 14 месеца); 2 пациенти, при единия от които е проведено лечение с CYC за 0,6 месеца и с AZA за 7 месеца, а при другия – с CYC за 0,3 месеца и с AZA за 4 месеца; 2 пациенти, при които е проведено лечение само с CYC, съответно за 10 и за 0,2 месеца; 2 пациенти, при които е проведено само лечение с AZA при единия пациент за 3 месеца и с MMF при другия – за 7 месеца; 9 пациенти, при които не е провеждано имунопатогенетично лечение (Фигура 28 А, В, С, D, E, F, G). При анализ на нормализираните нива на anti-C1q в началото и в края на периода на проследяване и лечение, при пациентите от първата група (Фигура 28А) медианата на нивата на anti-C1q в началото е 0,182, а медианата в края 0,424, като след прилагане на непараметричен рангов тест на Wilcoxon установихме статистически значима разлика между медианите – тази в началото е по-ниска от тази в края ($p=0,032$). За групата пациенти на лечение с CS+CYC (Фигура 28В), въпреки високата медиана на нивата на anti-C1q в началото, в сравнение с тази в края, не се установи статистически значима разлика ($p=0,384$). При пациентите на лечение с CS+AZA/MMF (Фигура 28С) също се отбелязва намаление на медианата на нивата на anti-C1q след периода на лечение, но разликата също не е статистически значима ($p=0,393$). При пациентите на лечение само с CS е налице незначимо повишение на медианата на нивата на anti-C1q (Фигура 28D) след периода на лечение ($p=0,188$). При пациентите на лечение с CYC+AZA/MMF (Фигура 28Е) е налице повишаване на нивата на anti-C1q, но поради това, че са само двама, не е възможна статистическа оценка на достоверността на тенденцията. Същото е в сила и за двамата пациенти на лечение само с AZA/MMF, където отбелязахме спадане на нивата на anti-C1q (Фигура 28F). При пациентите без имунопатогенетична терапия (Фигура 28G) се отбелязва повишаване на медианата на нивата на anti-C1q в края на периода на проследяване, но това повишаване не е статистически значимо ($p=0,102$). При цялата проследявана група от пациенти с ЛН (Фигура 28H) се отбелязва статистически незначимо повишение на медианата на нормализираните нива на anti-C1q в края на периода на проследяване и лечение ($p=0,155$).



Фигура 28. Нормализирани нива на anti-C1q при пациентите с ЛН в началото и в края на периода на проследяване (средно 13 месеца), през който при пациентите е провеждано имунопатогенетично лечение според индивидуални показания с: **A)** CS+CYC+AZA/MMF (медиана в началото 0,182; медиана в края 0,424; $p=0,032$); **B)** CS+CYC (медиана в началото 0,909; медиана в края 0,462; $p=0,384$); **C)** CS+AZA/MMF (медиана в началото 0,438; медиана в края 0,308; $p=0,393$); **D)** CS (медиана в началото 0,297; медиана в края 0,305; $p=0,188$); **E)** CYC+AZA/MMF (при 2 пациенти с повишаване на нивата на anti-C1q в края); **F)** AZA/MMF (при 2 пациенти с намаляване на нивата на anti-C1q в края); **G)** При пациентите без имунопатогенетична терапия, поради липса на показания за такава (медиана в началото 0,312; медиана в края 0,596; $p=0,102$); **H)** При всички проследявани пациенти ($N=61$) с или без терапия (медиана в началото 0,312; медиана в края 0,394; $p=0,155$). Установи се статистически значима разлика между медианите на нивата на anti-C1q в началото и в края (по-висока) на периода на проследяване само при пациентите, лекувани с CS+CYC+AZA/MMF (A) (Wilcoxon signed rank test).

2. АВТОАНТИТЕЛА СРЕЩУ C1g КОМПОНЕНТА НА КОМПЛЕМЕНТА.

Автоантитела срещу C1g (anti-C1g) са изследвани при 74 (76,3% от първоначално включените в проучването) пациенти, като в динамика са изследвани общо 266 проби на пациентите с ЛН. Anti-C1g са изследвани и при 61 (84,7% от изходните 72) здрави доброволци (контроли), без автоимунни и инфекциозни възпалителни заболявания, със запазена бъбречна, чернодробна и хемопоеична функции. При изследваните за anti-C1g в контролната група здрави доброволци се установиха плазмени нива на anti-C1g $0,195 \pm 0,067$ единици оптична плътност при дължина на вълната от 450 nm (OD 450 nm) на оптичния анализатор.

Определихме граничната стойност (cut-off), над която нивата на anti-C1g при изследваните пациенти с ЛН приехме за патологично повишени, а именно:

$$\text{Cut-off} = 0,195 + 2 \times 0,067 = 0,329.$$

Проведохме нормализиране на стойностите на нивата на anti-C1g в групите пациенти с ЛН, представяйки нивата на anti-C1g като съотношение на получените стойности за оптичната плътност към нивото на cut-off за лабораторията. По този начин, за гранична стойност се приема 1,00, над която нормализираните нива на anti-C1g се приемат за повишени, а под която – за референтни.

Установихме патологично повишени титри на anti-C1g при 7 (9,5%) от изходно изследваните пациенти с ЛН. Сред изследваните общо 266 проби от кръвни плазми на пациентите с ЛН в динамика установихме патологично повишени нива на anti-C1g при 34 (12,8%) от пробите.

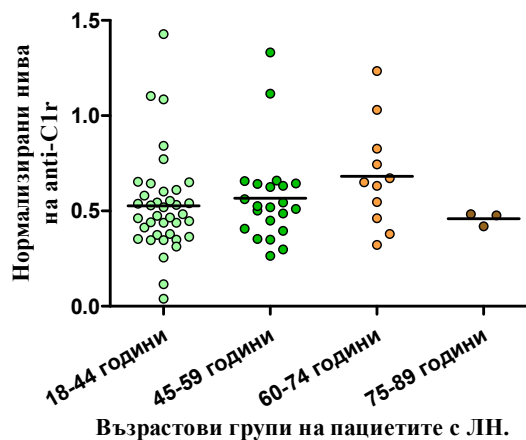
2.1. Автоантитела срещу C1g и пола на пациентите с ЛН.

При мъжете с ЛН се установиха патологично повишени нива на anti-C1g при 3 (20,0%), докато при жените с ЛН – при 4 (6,8%). Не се установи статистически значимо влияние на пола на пациентите с ЛН върху наличието на патологично повишени нива на anti-C1g (Fisher's exact test, $p=0,143$). При мъжете с ЛН средното ниво на anti-C1g е $0,665 \pm 0,312$, а при жените с ЛН – $0,532 \pm 0,233$. Не се установи статистически значима разлика в нивата на anti-C1g при двата пола на пациентите с ЛН (Mann-Whitney, $p=0,190$).

2.2. Автоантитела срещу C1g и възрастта на пациентите с ЛН.

Във възрастовата група от 18 до 44 години позитивни за anti-C1g са 3 (4,1%) пациенти; във възрастовата група от 45 до 59 години позитивни за anti-C1g са 2 (2,7%) пациенти; във възрастовата група от 60 до 74 години позитивни за anti-C1g са 2 (2,7%) пациенти; във възрастовата група от 75 до 89 години няма позитивни за anti-C1g.

Във възрастните групи по СЗО, средните нормализирани нива на anti-C1g са както следва: в групата от 18 до 44 години: $0,527 \pm 0,258$; в групата от 45 до 59 години: $0,567 \pm 0,246$; в групата от 60 до 74 години: $0,682 \pm 0,272$ и в групата от 75 до 89 години: $0,460 \pm 0,035$. Данните за възрастовото разпределение на пациентите с ЛН и нормализираните нива на anti-C1g са представени на Фигура 29.



Фигура 29. Средни нива на anti-C1g в различните възрастови групи по СЗО при пациентите с ЛН.

Не се установи статистически значима зависимост на влиянието на възрастта като фактор върху нивата на anti-C1g (One-way ANOVA, $p=0,305$). Не се установи статистически значима разлика в

нормализираните нива на anti-C1g между различните възрастови групи пациенти с ЛН (Bonferroni's multiple comparison test, $p > 0,05$ между всички групи).

Не се установи статистически значима корелационна зависимост между възрастта на изходно изследваните пациенти с ЛН и нивата на anti-C1g (Spearman, $r = 0,103$, $p = 0,191$).

2.3. Автоантитела срещу C1g и давността на ЛН.

Средната давност на ЛН при проучваните пациенти е $10,30 \pm 9,51$ години (от 0,02 до 41,00 години). При съпоставяне на нормализираните нива на anti-C1g при пациенти с давност на ЛН по-малка от 10,3 години и тези при пациентите с давност на ЛН над 10,3 години не се установи статистически значима разлика (Mann-Whitney, $p = 0,353$).

Не се установи значима корелационна зависимост между anti-C1g и давността на ЛН (Spearman, $r = 0,16$, $p = 0,092$).

2.4. Автоантитела срещу C1g и основни клиничко-лабораторни параметри на ЛН.

2.4.1. Автоантитела срещу C1g и протеинурията.

При пациентите, позитивни за anti-C1g, средното ниво на протеинурията е $4,994 \pm 7,109$ g/d, докато при пациентите, негативни за anti-C1g – $1,34 \pm 1,95$ g/d. Въпреки че при позитивните за anti-C1g пациенти нивото на протеинурията е по-високо от това при пациентите, негативни за anti-C1g, тази разлика не е статистически значима (Mann-Whitney, $p = 0,256$).

2.4.2. Автоантитела срещу C1g и уринен седимент.

Липсва статистически значимо влияние на нивата на anti-C1g върху наличието на патологично активен уринен седимент (Fisher's exact test, $p = 0,430$).

Сред всички изследвани в динамика проби от пациенти с ЛН, тези при които не се детектира никакво ниво (налице е нулево ниво) на anti-C1g (в 8 от 266 проби), активен уринен седимент се установи в 1 (12,5%) от тези случаи, а 7 (87,5%) са с неактивен седимент. При пробите с установимо ниво на anti-C1g (258 проби), различно от нула, без значение патологично или референтно, с активен седимент са 127 (49,2%) от случаите, докато с неактивен седимент са 131 (50,8%) от пробите. Това разпределение показва, че наличието на нулево ниво на anti-C1g определя статистически значимо наличието на неактивен уринен седимент при пациентите с ЛН (Fisher's exact test, $p = 0,042$).

При пациентите с патологично активен уринен седимент в началото на проучването, средното нормализирано ниво на anti-C1g е $0,568 \pm 0,313$ (от 0,040 до 1,429), докато при тези без патологично активен седимент сравнително по-ниско – $0,551 \pm 0,181$ (от 0,116 до 1,085), като разликата в нивата на anti-C1g не е статистически значима (Mann-Whitney, $p = 0,325$).

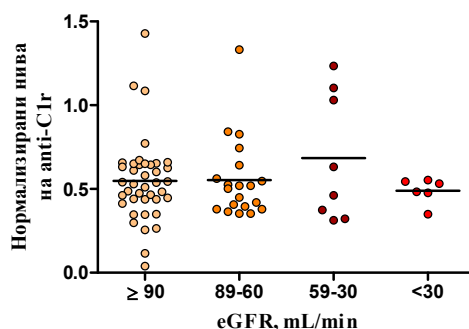
2.4.3. Автоантитела срещу C1g и бъбречна функция.

Сред всички изследвани в динамика проби от пациенти с ЛН, от позитивните за anti-C1g проби 10 (29,4%) са с eGFR < 60 mL/min, а 24 (70,6%) от пробите са с eGFR ≥ 60 mL/min. Сред негативните за anti-C1g проби 36 (15,5%) от пробите са с eGFR < 60 mL/min, а 196 (84,5%) от пробите са с eGFR ≥ 60 mL/min. Това разпределение на пробите в динамика показва, че наличието на патологично повишени нива на anti-C1g статистически значимо определя наличието на декомпенсирана бъбречна функция (eGFR < 60 mL/min) (Fisher's exact test, $p = 0,045$).

При пациентите с eGFR < 60 mL/min се установи средно нормализирано ниво на anti-C1g $0,601 \pm 0,300$ (от 0,313 до 1,234), докато при пациентите с eGFR ≥ 60 mL/min средното ниво на anti-C1g е $0,550 \pm 0,244$ (от 0,040 до 1,429). Въпреки относително по-високите нива в групата с декомпенсирана бъбречна функция, разликата в нивата на anti-C1g не е статистически значима (Mann-Whitney, $p = 1,000$).

Не се установи корелационна зависимост между нивата на anti-C1g и eGFR нито сред първоначално изследваната група от 74 пациенти с ЛН (Spearman, $r = -0,04$, $p = 0,722$), нито сред всички изследвани в динамика 266 проби (Spearman, $r = -0,06$, $p = 0,147$).

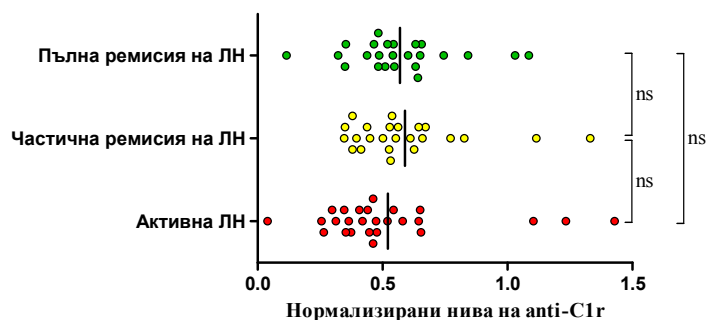
В групата от пациенти с eGFR ≥ 90 mL/min средното нормализирано ниво на anti-C1g е $0,548 \pm 0,250$ (от 0,040 до 1,429); в групата пациенти с eGFR от 89 до 60 mL/min е $0,553 \pm 0,237$ (от 0,353 до 1,331); в групата пациенти с eGFR от 59 до 30 mL/min е $0,684 \pm 0,381$ (от 0,313 до 1,234) и в групата пациенти с eGFR под 30 mL/min е $0,490 \pm 0,076$ (от 0,350 до 0,553) (с eGFR < 15 mL/min са само 2 пациенти, поради което, с оглед коректността на статистическия анализ обединихме групите с eGFR 29-15 и < 15 mL/min в обща група). Не установихме статистически значима разлика между нивата на anti-C1g при отделните групи от пациенти с ЛН, обособени въз основа на eGFR (One-way ANOVA, $p = 0,489$; Bonferroni's multiple comparison test, $p > 0,05$) (Фигура 30).



Фигура 30. Средни нива на anti-C1r в обособените според eGFR групи от пациенти с ЛН, първоначално изследвани в проучването.

2.4.4. Автоантитела срещу C1r и комплексната клинично-лабораторна оценка на активността на ЛН.

В групата с активна ЛН се установиха 3 (11,5%) пациенти, позитивни за anti-C1r, в групата с частична ремисия на ЛН позитивни за anti-C1r са 2 (8,3%) пациенти и в групата с пълна клинично-лабораторна ремисия на ЛН позитивни за anti-C1r са 2 (8,3%) пациенти. Средните нормализирани нива на anti-C1r в трите групи пациенти с ЛН са както следва: в групата с активна ЛН – $0,521 \pm 0,306$ (от 0,040 до 1,429); в групата с частична ремисия на ЛН – $0,590 \pm 0,235$ (от 0,347 до 1,331); в групата с пълна клинично-лабораторна ремисия на ЛН – $0,570 \pm 0,212$ (от 0,116 до 1,085), както е показано на Фигура 31.



Фигура 31. Разпределение на пациентите с ЛН в зависимост от комплексната клинично-лабораторна оценка активността на ЛН и нормализираните нива на anti-C1r. Представени са средните нормализирани нива на anti-C1r в трите групи.

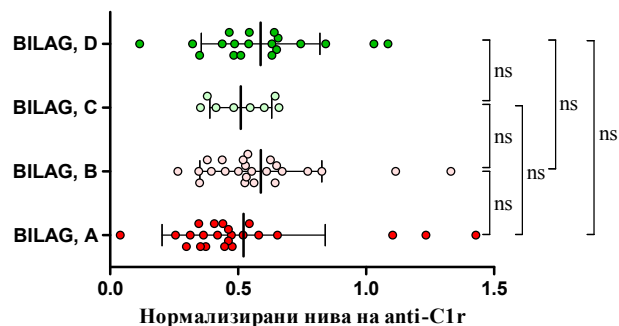
Не се установи статистически значима зависимост и разлика между нивата на anti-C1r в групите пациенти, обособени според активността на ЛН (One-way ANOVA, $p=0,624$; Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$; Post test for linear trend, $p>0,05$).

Сред позитивните за anti-C1r пациенти с ЛН, 3 (42,8%) са с активна ЛН, 2 (28,6%) от пациентите са с частична ремисия на ЛН и 2 (28,6%) от пациентите са в състояние на пълна клинично-лабораторна ремисия на ЛН. Сред пациентите с ЛН с референтни нива на anti-C1r, 23 (34,3%) са с активна ЛН, 22 (32,8%) са с частична ремисия на ЛН и 22 (32,8%) са с пълна клинично-лабораторна ремисия на ЛН. При отчитане на липсата на клинично-лабораторна активност на ЛН (имайки предвид само пациентите в състояние на пълна клинично-лабораторна ремисия на ЛН) и наличието на активност на ЛН (обединявайки групите с активна ЛН и частична ремисия на ЛН), установихме, че няма статистически значимо влияние на наличието на позитивните нива на anti-C1r върху наличието на активност на ЛН (Fisher's exact test, $p=0,592$).

2.4.5. Автоантитела срещу C1r и комплексната оценка на ЛН (категиите) по BILAG Renal score.

При пациентите с ЛН от категория А по BILAG Renal score позитивните за anti-C1r са 3 (13,0%); при пациентите от категория В позитивни за anti-C1r са 2 (8,3%); при пациентите от категория С няма позитивни за anti-C1r и 2 (10,5%) от пациентите от категория D са позитивни за anti-C1r. Средните

нормализирани нива на anti-C1r при различните категории пациенти с ЛН по BILAG Renal score са както следва: при категория А: $0,522 \pm 0,319$ (от 0,040 до 1,429); при категория В: $0,589 \pm 0,238$ (от 0,264 до 1,331); при категория С: $0,510 \pm 0,121$ (от 0,353 до 0,660) и при категория D: $0,588 \pm 0,232$ (от 0,116 до 1,085), както е показано на Фигура 32.



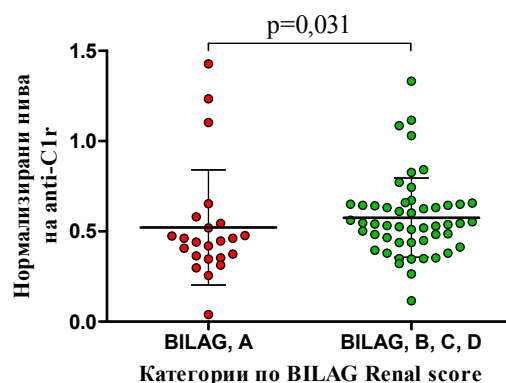
Фигура 32. Разпределение на пациентите с ЛН в зависимост от комплексната клиничко-лабораторна оценка на ЛН по BILAG Renal score. Представени са средните нормализирани нива на anti-C1r в отделните категории.

Липсва значима разлика в нива на anti-C1r в различните категории по BILAG Renal score (One-way ANOVA, $p=0,720$, Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$).

Сред пациентите, позитивни за anti-C1r, с категория А по BILAG Renal score са 3 (42,9%), а пациентите с категории В, С и D са 4 (57,1%), докато при пациентите, негативни за anti-C1r, с категория А са 20 (29,9%), а тези с по-ниска категория – 47 (70,1%). Въз основа на това разпределение установихме, че наличието на позитивни нива на anti-C1r няма статистически значимо влияние върху наличието на категория А по BILAG Renal score (Fisher's exact test, $p=0,670$).

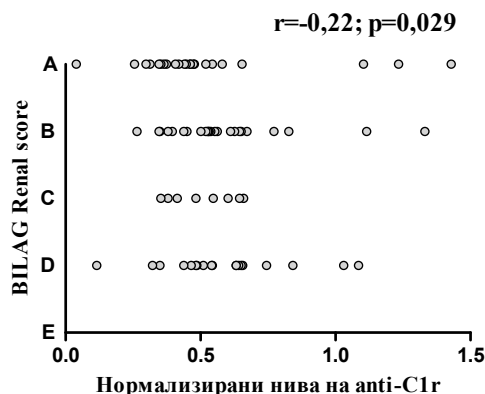
Сред всички изследвани в динамика проби на пациенти с ЛН, които са позитивни за anti-C1r (34 проби), пробите на пациенти от категория А по BILAG Renal score са 7 (20,5%), пробите на пациенти от категория В са 11 (32,4%), пробите на пациенти от категория С са 5 (14,7%), пробите на пациенти от категория D са 11 (32,4%). Сред негативните за anti-C1r, пробите на пациенти от категория А по BILAG Renal score са 45 (19,4%), пробите на пациенти от категория В са 91 (39,2%), пробите на пациенти от категория С са 28 (12,1%), пробите на пациенти от категория D са 68 (29,3%). Отново не се установи статистически значимо влияние на наличието на позитивния за anti-C1r серологичен статус върху наличието на активна ЛН от категория А по BILAG Renal score (Fisher's exact test, $p=0,820$).

Средното нормализирано ниво на anti-C1r при пациентите от категория А ($0,522 \pm 0,319$) е статистически значимо по-ниско от средното нормализирано ниво на anti-C1r при пациентите от останалите категории по BILAG Renal score (В, С и D) ($0,576 \pm 0,220$) (Mann-Whitney, $p=0,031$), както е показано на Фигура 33.



Фигура 33. Нормализирани нива на anti-C1r при пациенти с ЛН с категория А по BILAG Renal score и при пациенти от останалите категории по BILAG Renal score.

При изследване на зависимостта между нормализираните нива на anti-C1r и категорията по BILAG Renal score (след квантифициране на категориите: категория А – 5; категория В – 4; категория С – 3; категория D – 2 и категория Е – 1 (в последната категория Е липсват пациенти)) установихме статистически значима слаба негативна корелационна зависимост между нивата на anti-C1r и категорията по BILAG Renal score (Spearman, $r=-0,22$; $p=0,029$) (Фигура 34).



Фигура 34. Корелационна зависимост между нормализираните нива на anti-C1r и категорията по BILAG Renal score (Spearman, $r=-0,22$; $p=0,029$).

2.5. Автоантитела срещу C1r и някои основни имунологични маркери при ЛН.

2.5.1. Автоантитела срещу C1r и нива на комплемента C4 и C3.

Сред пациентите с ЛН с повишени нива на anti-C1r, плазмени концентрации на C4 са изследвани при 5 (71,4%), като хипокомplementемия C4 се установи при 2 (40,0%) от тези 5 пациенти. Сред пациентите с референтни нива на anti-C1r, плазмени концентрации на C4 са изследвани при 59 (88,1%), като хипокомplementемия C4 се установи при 25 (42,4%) от тези 59 пациенти. Въз основа на това разпределение, не се установи статистически значимо влияние на наличието на позитивни anti-C1r върху наличието на хипокомplementемия C4 (Fisher's exact test, $p=0,649$).

Средната плазмена концентрация на C4 при пациентите с повишени anti-C1r е $0,189\pm 0,068$ g/L и не е статистически значимо различаваща се от плазмената концентрация на C4 при пациентите с референтни нива на anti-C1r, която е $0,229\pm 0,124$ g/L (Mann-Whitney, $p=0,438$). Средното нормализирано ниво на anti-C1r при пациентите с хипокомplementемия C4 е $0,545\pm 0,262$ и не е статистически значимо различаващо се от средното нормализирано ниво на anti-C1r при пациентите без хипокомplementемия C4, което е $0,536\pm 0,221$ (Mann-Whitney, $p=0,620$).

Липсата на зависимост между нормализираните нива на anti-C1r и плазмените концентрации на C4 потвърдихме и с корелационен анализ, като не установихме значима зависимост между двете (Spearman, $r=-0,06$; $p=0,319$).

Сред пациентите с ЛН с повишени нива на anti-C1r, плазмени концентрации на C3 са изследвани при 6 (85,7%), като хипокомplementемия C3 не се установи при нито един от тези пациенти. Сред пациентите с референтни нива на anti-C1r, плазмени концентрации на C3 са изследвани при 63 (94,0%), като хипокомplementемия C3 се установи при 13 (20,6%) от тези 63 пациенти. Въз основа на това разпределение, установихме липса на статистически значимо влияние на наличието на позитивни anti-C1r върху наличието на хипокомplementемия C3 (Fisher's exact test, $p=0,586$).

Плазмената концентрация на C3 при пациентите с повишени anti-C1r е $1,223\pm 0,466$ g/L и не е статистически значимо различаваща се от плазмената концентрация на C3 при пациентите с референтни нива на anti-C1r, която е $1,151\pm 0,381$ g/L (Mann-Whitney, $p=0,898$). Средното нормализирано ниво на anti-C1r при пациентите с хипокомplementемия C3 е $0,459\pm 0,214$ и не е статистически значимо различаващо се от средното нормализирано ниво на anti-C1r при пациентите без хипокомplementемия C3, което е $0,577\pm 0,240$ (Mann-Whitney, $p=0,104$).

Липсата на зависимост между нормализираните нива на anti-C1r и плазмените концентрации на C3 потвърдихме и с корелационен анализ, като не установихме значима зависимост между двете (Spearman, $r=0,16$; $p=0,095$).

2.5.2. Автоантитела срещу C1r и антинуклеарни автоантитела (ANA).

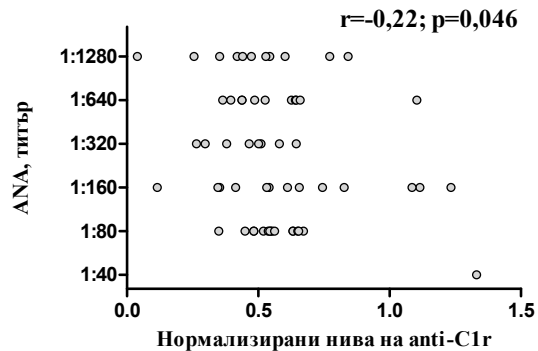
Сред пациентите с ЛН, ANA са изследвани при 59 (79,7%) и в общо 220 (82,7%) от всички

изследвани проби. Патологично повишени титри на ANA (>1:80) установихме при 43 (72,9%) от първоначално изследваните за ANA и anti-C1g пациенти с ЛН и при 176 (80,0%) от всички изследвани в динамика за ANA и anti-C1g проби от пациенти с ЛН.

Сред всички изследвани в динамика по време на проучването пациенти с ЛН, пробите с повишени нива на anti-C1g и повишени титри на ANA са 22 (81,5% от всички проби с повишени нива на anti-C1g, изследвани за ANA), а пробите с повишени anti-C1g и референтни титри на ANA са 5 (18,5% от всички проби с повишени anti-C1g, изследвани за ANA). Пробите с референтни нива на anti-C1g и повишени титри на ANA са 154 (79,8% от всички проби с референтни нива на anti-C1g, изследвани за ANA), а тези с референтни нива на anti-C1g и референтни титри на ANA са 39 (20,2% от всички проби с референтни нива на anti-C1g, изследвани за ANA). Въз основа на това разпределение установихме, че липсва статистически значимо влияние на наличието на повишени нива на anti-C1g върху наличието на повишени титри на ANA (Fisher's exact test, $p=1,000$).

Средното нормализирано ниво на anti-C1g при изходно изследваните пациенти с ЛН с патологично повишени титри на ANA ($0,554\pm 0,252$) е статистически незначимо по-ниско от нивото на anti-C1g при пациентите с референтни титри на ANA ($0,600\pm 0,213$) (Mann-Whitney, $p=0,260$).

Налице е статистически значима слаба негативна корелационна зависимост между нормализираните нива на anti-C1g и титъра на ANA (Spearman, $r=-0,22$; $p=0,046$) (Фигура 35).



Фигура 35. Корелационна зависимост между нормализираните нива на anti-C1g и титъра на ANA (Spearman, $r=-0,22$; $p=0,046$).

2.5.3. Автоантитела срещу C1g и автоантитела срещу двойноверижна ДНК (anti-dsDNA).

Сред пациентите с ЛН, изходно включени в проучването и изследвани за anti-C1g, anti-dsDNA са изследвани при 62 (83,8%) и в общо 224 (84,2%) от всички в динамика изследвани проби. Патологично повишени нива на anti-dsDNA (≥ 20 U/mL) установихме при 24 (38,7%) от първоначално изследваните за anti-dsDNA и anti-C1g пациенти с ЛН и при 121 (54,0%) от всички изследвани за anti-dsDNA и anti-C1g проби в динамика. Пациентите, позитивни за anti-C1g с патологично повишени anti-dsDNA са 2 (28,6% позитивните за anti-C1g пациенти, при които са изследвани и anti-dsDNA), а пациентите, негативни за anti-C1g и позитивни за anti-dsDNA са 22 (39,3% от негативните за anti-C1g, при които са изследвани и anti-dsDNA).

Липсва статистически значимо влияние на наличието на патологично повишени anti-C1g върху наличието на патологично повишени anti-dsDNA (Fisher's exact test, $p=1,000$).

Средното нормализирано ниво на anti-C1g при изходно изследваните пациенти с ЛН с патологично повишени нива на anti-dsDNA ($0,542\pm 0,290$) е статистически незначимо по-ниско от нивото на anti-C1g при пациентите с референтни нива на anti-dsDNA ($0,592\pm 0,248$) (Mann-Whitney, $p=0,418$).

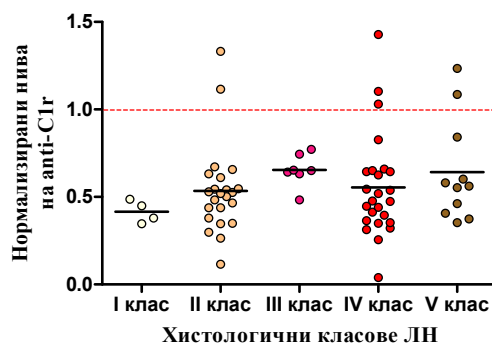
2.6. Автоантитела срещу C1g и някои хистологични признаци на ЛН.

Хистологична диагноза е налична при 71 (95,9%) от изходно включените в проучването пациенти с ЛН, при които са изследвани anti-C1g. Определени са хистологичните класове на ЛН, съгласно критериите на International Society of Nephrology (ISN) и Renal Pathology Society (RPS). Отчетени са хистологичните индекси на активност и хроничност, съгласно критериите на National Institutes of Health (NIH). И тук, с оглед клинична достоверност на изследваните зависимости, когато са изследвани връзки, касаещи белези на хистологична активност на ЛН, при статистическите анализи са отчитани само случаите, при които времето между вземането на кръвните проби за изследване на anti-C1g и провеждането на пункционната бъбречна биопсия е било до 12 месеца. Това условие е изпълнено при 27 (38,0%) от пациентите, изходно включени в проучването.

2.6.1. Автоантитела срещу C1g и хистологичният клас на ЛН.

При пациентите с I и III хистологични класове ЛН не се установиха патологично повишени anti-C1g (Фигура 39). При тези с II хистологичен клас, позитивни за anti-C1g са 2 (8,7%) пациенти; при пациентите с IV клас – 3 (12,0%); при пациентите с V клас – 2 (18,2%). Средните нормализираните нива на anti-C1g са съответно: при пациентите с I хистологичен клас: $0,416 \pm 0,064$; при пациентите с II хистологичен клас: $0,535 \pm 0,257$; при пациентите с III хистологичен клас: $0,654 \pm 0,093$; при пациентите с IV хистологичен клас: $0,554 \pm 0,294$; при пациентите с V хистологичен клас: $0,641 \pm 0,292$ и нормализираното ниво при пациента с VI хистологичен клас е 0,532 (не е показан на Фигура 39).

Не се установи статистически значима разлика между нивата на anti-C1g при различните класове ЛН (One-way ANOVA, $p=0,499$; Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$) (Фигура 36).



Фигура 36. Нива на anti-C1g в зависимост от хистологичния клас на ЛН. Не се установиха статистически значима зависимост между нивата на anti-C1g и класа ЛН, както и разлика между нивата на anti-C1g при различните класове ЛН (One-way ANOVA, $p=0,499$; Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$).

Патологично повишените нива на anti-C1g не определят статистически значимо наличие на дифузна ЛН (IV хистологичен клас) (Fisher's exact test, $p=0,691$).

2.6.2. Автоантитела срещу C1g и основни хистологични лезии за активност и хроничност на ЛН.

В настоящото проучване изследвахме зависимостите между нивата на anti-C1g и хистологични белези на активност (ендокапиларна пролиферация, гломерулна левкоцитна инфилтрация, субендотелни депозити („телени бримки“), фибриноидна некроза и/или кариорексис, клетъчни полулуния и интерстициална инфилтрация) и хистологични белези на хроничност (гломерулна склероза, фиброзни полулуния, тубулна атрофия и интерстициална фиброза), както и връзката между нивата на anti-C1g и индексите на активност и хроничност, определени на базата на горепосочените хистологични белези.

Таблица 15. Сравнителен анализ между нивата на anti-C1g при наличие и липса на хистологични белези за активност и хроничност при пациентите с ЛН. Представени са средните нива \pm стандартното отклонение (SD).

Хистологичен признак	Нормализирани нива на anti-C1g при:		p
	наличие на хистологичния признак	липса на хистологичния признак	
Ендокапиларна пролиферация	$0,540 \pm 0,337$	$0,494 \pm 0,102$	0,698
Гломерулна левкоцитна инфилтрация ¹	-	-	-
Субендотелни депозити, формиращи „телени бримки“	$0,574 \pm 0,488$	$0,518 \pm 0,241$	0,417
Фибриноидна некроза и/или кариорексис	$0,517 \pm 0,134$	$0,535 \pm 0,356$	0,581
Клетъчни полулуния	$0,404 \pm 0,137$	$0,556 \pm 0,310$	0,248
Интерстициално възпаление	$0,556 \pm 0,364$	$0,512 \pm 0,248$	0,744
Гломерулна склероза	$0,475 \pm 0,142$	$0,595 \pm 0,406$	0,884
Фиброзни полулуния	$0,454 \pm 0,157$	$0,545 \pm 0,313$	0,731
Тубулна атрофия	$0,587 \pm 0,287$	$0,494 \pm 0,295$	0,228
Интерстициална фиброза	$0,582 \pm 0,338$	$0,501 \pm 0,269$	0,662

¹ В групата с гломерулна левкоцитна инфилтрация попадат само 2 пациенти и данните от статистическия анализ не са достоверни.

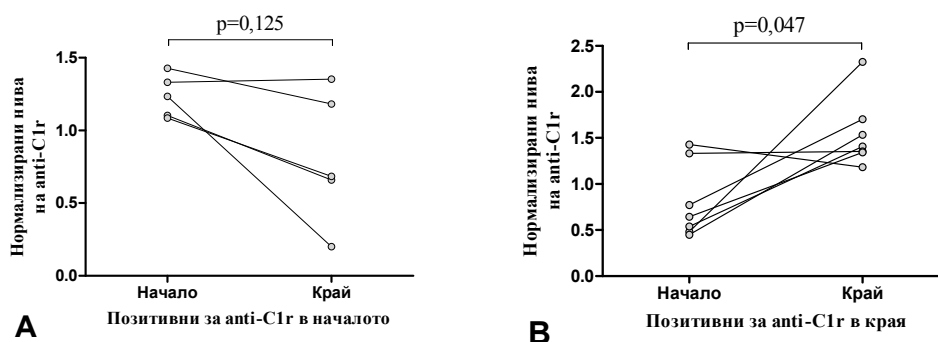
На Таблица 15 са показани данните от сравнителния анализ между нивата на anti-C1g в групите с и без съответните хистологични признаци за активност и хроничност на ЛН. При пациентите с наличие на хистологични признаци на активност нивата на anti-C1g не се различават значимо от нивата при пациентите без хистологични признаци на активност. При пациентите с наличие на хистологични признаци на хроничност нивата на anti-C1g не се различават значимо от нивата при пациентите без хистологични признаци на хроничност.

При изследване връзката между нивата на anti-C1g и хистологичния индекс на активност на ЛН не се установи наличие на статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-C1g и хистологичния индекс на активност на ЛН (Spearman, $r=-0,08$; $p=0,354$). Не се установи и статистически значима корелационна зависимост между нормализираните нива на anti-C1g и хистологичния индекс на хроничност при пациентите с ЛН (Spearman, $r=0,17$; $p=0,200$).

2.7. Прогностично значение и динамика на промените в нивата на автоантителата срещу C1g.

При 52 (70,3%) от пациентите с ЛН, е налице проследяване за период от средно 13 (от 6 до 25) месеца, с между 2 и 11 проби, при които са определяни нивата на anti-C1g и останалите клинично-лабораторни и имунологични параметри на ЛН.

Сред изследваните общо 266 проби от кръвни плазми на пациентите с ЛН установихме патологично повишени нива на anti-C1g при 34 (12,8%) проби. Изследвайки нивата на anti-C1g при проследените в динамика пациенти (с 2 и повече проби в хода на проучването), установихме, че при първите проби, патологично повишени anti-C1g има при 5 (9,6%) от пациентите, докато след среден период на проследяване от 13 месеца, патологично повишени нива на anti-C1g установихме при 7 (13,5%) от пациентите, като при 3 от тези пациенти с първоначално повишени anti-C1g, последните намаляват до референтни стойности, а при 2 от тези пациенти нивата се задържат в патологични граници. От пациентите с патологични anti-C1g на 13 месец от проследяването, при 2 нивата са били патологични от началото, а при 5 нарастват от изходно референтни. Средното нормализирано ниво на anti-C1g при пациентите, позитивни за anti-C1g в началото, е $1,236\pm 0,147$ (от 1,085 до 1,429), докато след среден период от 13 месеца е $0,816\pm 0,459$ (от 0,201 до 1,353), като няма статистически значима разлика между тези две нива (Wilcoxon signed rank test, $p=0,125$) (Фигура 37А). Средното нормализирано ниво на anti-C1g при позитивните в края на периода на проследяване пациенти с ЛН е $1,550\pm 0,379$ (от 1,182 до 2,325), статистически значимо по-високо от средното ниво на anti-C1g на същите тези пациенти в началото на проследяването, когато е било $0,807\pm 0,407$ (от 0,450 до 1,429) (Wilcoxon signed rank test, $p=0,047$) (Фигура 37В).



Фигура 37. Динамика на нивата на anti-C1g при позитивните в началото на периода на проследяване (А) и при позитивните в края на периода на проследяване (В) пациенти с ЛН.

2.7.1. Прогностично значение на автоантителата срещу C1g.

При 42 (56,8%) от изходно включените в проучването пациенти с ЛН, при които са провеждани 3 или повече проби за anti-C1g в динамика, изследвахме връзките между нивата на anti-C1g и категорията по BILAG Renal score и нивата на anti-C1g и активността на ЛН, определена като активна, частична ремисия и пълна ремисия на нефропатията. Повишаване на anti-C1g до патологични нива поне в една от пробите установихме при 19 (45,2%) от пациентите.

Пациентите с ЛН, при които отчетохме в динамика повишение на нивата на anti-C1g до патологични стойности с последващо повишение на категорията по BILAG са 8 (53,3% от всички, при които се установи в динамика повишаване на anti-C1g до патологични стойности). Това повишение на категорията по BILAG Renal score на ЛН се отчете в рамките на среден период от 1,6 (от 0,0 до 7,0) месеца след повишаване на нивата на anti-C1g до патологични стойности. Пациентите, при които не се отчете повишаване на нивата на anti-C1g до патологични стойности и не се отчете повишение на категорията по BILAG Renal score са 22 (81,5% от всички, при които не се отчете повишаване на anti-C1g до патологични нива). Разпределението на пациентите с ЛН според наличието или липсата на повишение на нивата на anti-C1g до патологични стойности и според наличието или липсата на повишение на категорията на ЛН по BILAG Renal score е показано на Таблица 16.

На базата на това разпределение установихме, че наличието на повишение на anti-C1g до патологични нива статистически значимо определя наличието на повишаване на категорията на ЛН по BILAG Renal score в рамките на среден период от $1,6 \pm 2,6$ месеца (от 0,0 до 7,0 месеца) (Fisher's exact test, $p=0,035$) с чувствителност от 61,5%, специфичност от 75,8%, позитивна предиктивна стойност от 53,3% и негативна предиктивна стойност от 81,5%. Относителният риск (RR) за повишаване категорията на ЛН по BILAG Renal score след повишаване на нивата на anti-C1g до патологични стойности определихме на 2,9.

Таблица 16. Разпределение на пациентите с ЛН, проследявани в динамика с 3 и повече проби, според наличието или липсата на повишение на нивата на anti-C1g до патологични стойности и наличието или липсата на последващо повишение на категорията на ЛН по BILAG Renal score.

Пациенти с ЛН	С повишение на категорията на ЛН по BILAG	Без повишение на категорията на ЛН по BILAG	Общо
С повишаване на anti-C1g до патологични нива	8	7	15
Без повишаване на anti-C1g до патологични нива	5	22	27
Общо	13	29	42

Пациентите, при които в динамика anti-C1g нарастват до патологични нива, заедно с последващо активиране на ЛН са 5 (31,2% от всички, при които се установи в динамика повишаване на anti-C1g до патологични стойности). Пациентите, при които не се отчете повишаване на нивата на anti-C1g до патологични стойности и не се отчете активиране на ЛН (преминаване от пълна в частична ремисия или от частична ремисия в активна ЛН) са 22 (84,6% от всички, при които не се отчете повишаване на anti-C1g до патологични нива). Разпределението на пациентите с ЛН според наличието или липсата на повишение на нивата на anti-C1g до патологични стойности и според наличието или липсата на активиране на ЛН е показано на Таблица 17.

Таблица 17. Разпределение на пациентите с ЛН, проследявани в динамика с 3 и повече проби, според наличието или липсата на повишение на нивата на anti-C1g до патологични стойности и наличието или липсата на активиране на ЛН.

Пациенти с ЛН	Активирани на ЛН	Без активиране на ЛН	Общо
С повишаване на anti-C1g до патологични нива	5	11	16
Без повишаване на anti-C1g до патологични нива	4	22	26
Общо	9	33	42

На базата на това разпределение установихме, че липсва статистически значимо повлияване на повишението на anti-C1g до патологични нива върху повишаването на активността на ЛН, отчетено съгласно критериите за активна ЛН, частична ремисия и пълна ремисия на ЛН (Fisher's exact test, $p=0,265$).

2.7.2. Динамика на автоантителата срещу C1g във връзка с някои лабораторни и имунологични показатели при пациентите с ЛН.

Средното нормализирано ниво на anti-C1g при пациенти с ЛН в началото на периода на проследяване е $0,583 \pm 0,259$ (от 0,116 до 1,429) докато в края на среден период от 13 месеца на проследяването и лечение е $0,668 \pm 0,429$ (от 0,000 до 2,325), като разликата не е статистически значима

(Wilcoxon signed rank test, $p=0,229$).

С оглед динамичното проследяване на нивата на anti-C1g във връзка с основните клинично-лабораторни и имунологични показатели при пациентите с ЛН определихме промяната на нивата на anti-C1g като процент ($\Delta N\%$) спрямо изходното ниво при първото изследване, по долупосочената формула (аналогично на изследването за anti-C1q), където: N_1 е нормализираното ниво на anti-C1g при първата проба на пациента в началото на проучването; N_x е нормализираното ниво на anti-C1g в крайното изследване (след среден период от 13 месеца на проследяване и лечение):

$$\Delta N = \frac{N_x - N_1}{N_1} \times 100\%.$$

2.7.2.1. Динамика на автоантителата срещу C1g и протеинурията.

Динамиката на протеинурията при пациентите, изследвани за anti-C1g, за този период показва средно начално ниво от $1,76 \pm 3,27$ (от 0,02 до 15,72) g/d и средно ниво в края от $1,34 \pm 2,47$ (от 0,01 до 12,39) g/d, като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,084$).

Аналогично на горепосоченото, определихме и промяната на протеинурията (ΔPU) спрямо изходната протеинурия (PU_1 – протеинурията при първото изследване (g/d); PU_x – протеинурия при последното изследване (g/d) отново за среден период на проследяване и лечение от 13 месеца:

$$\Delta PU = \frac{PU_x - PU_1}{PU_1} \times 100\%.$$

Липсва статистически значима зависимост между промяната на нивата на anti-C1g ($\Delta N\%$) и промяната на протеинурията ($\Delta PU\%$) (Spearman, $r=-0,03$; $p=0,403$).

Липсва статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-C1g и протеинурията при всички изследваните в динамика проби от пациентите с ЛН (Spearman, $r=-0,03$; $p=0,327$, Фигура 38A1). Сред пробите от пациентите с ЛН, които някога са имали екстраренални прояви на СЛЕ, също липсва статистически значима корелация между нормализираните нива на anti-C1g и протеинурията (Spearman, $r=-0,05$; $p=0,254$, Фигура 38A2). При пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ установихме статистически значима позитивна корелационна зависимост между нивата на anti-C1g и протеинурията (Spearman, $r=0,26$; $p=0,034$, Фигура 38A3).

2.7.2.2. Динамика на автоантителата срещу C1g и бъбречната функция.

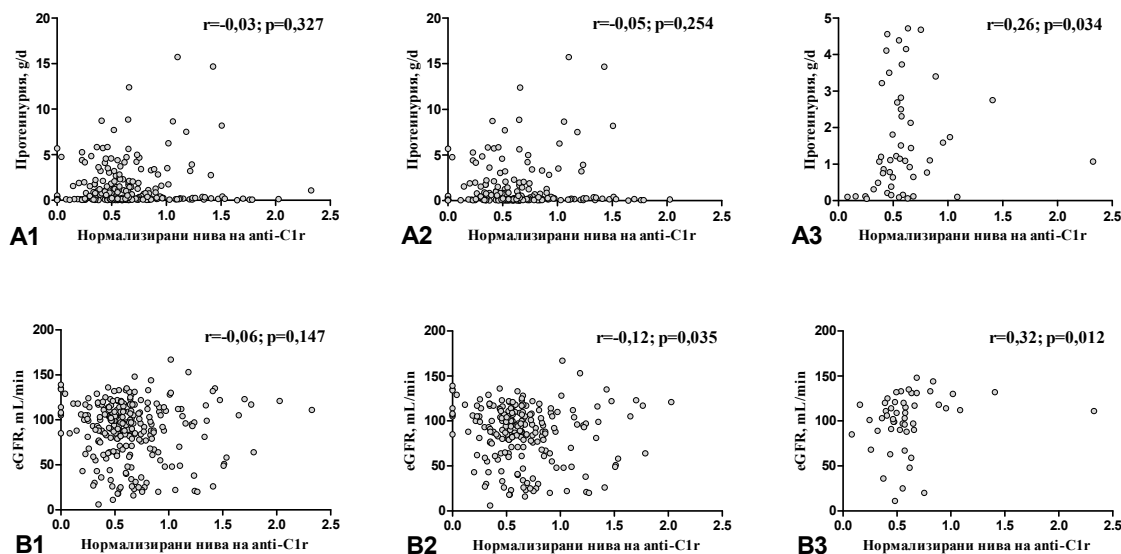
Динамиката на eGFR (mL/min) при изследваните за anti-C1g пациенти с ЛН за периода на проследяване и лечение показва средно начално ниво от $91,3 \pm 31,1$ (от 18,0 до 136,0) mL/min и средно ниво в края от $94,0 \pm 29,9$ (от 25,0 до 153,0) mL/min, като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,153$).

Определихме промяната на eGFR (ΔGFR) спрямо изходната GFR при пациентите, изследвани за anti-C1g (GFR_1 – GFR при първото изследване (mL/min); GFR_x – GFR при изследването след среден период на проследяване от 13 месеца (mL/min)):

$$\Delta GFR = \frac{GFR_x - GFR_1}{GFR_1} \times 100\%.$$

Липсва статистически значима корелационна зависимост между промяната на нормализираното ниво на anti-C1g спрямо изходното ($\Delta N\%$) и промяната на eGFR спрямо изходната ($\Delta eGFR$) за среден период от 13 месеца при пациентите с ЛН (Spearman, $r=-0,11$; $p=0,215$).

Липсва статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-C1g и eGFR при всички изследвани в динамика проби от пациентите с ЛН (Spearman, $r=-0,06$; $p=0,147$, Фигура 38B1). Сред пробите от пациентите с ЛН, които някога са имали екстраренални прояви на СЛЕ, установихме статистически значима отрицателна корелация между нормализираните нива на anti-C1g и eGFR (Spearman, $r=-0,12$; $p=0,035$, Фигура 38B2). При пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ установихме статистически значима позитивна корелация между нивата на anti-C1g и eGFR (Spearman, $r=0,32$; $p=0,012$, Фигура 38B3).



Фигура 38. Корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C1r и протеинурията и anti-C1r и изчислената скорост на гломерулна филтрация (eGFR) при всички изследвани в динамика проби от пациенти с ЛН (A1 и B1); при пробите, изследвани в динамика от пациенти с ЛН с екстраренални прояви на СЛЕ (A2 и B2) и при пробите от пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ (A3 и B3) (Spearman).

2.7.2.3. Динамика на автоантителата срещу C1r и компонентите на комплекта C4 и C3.

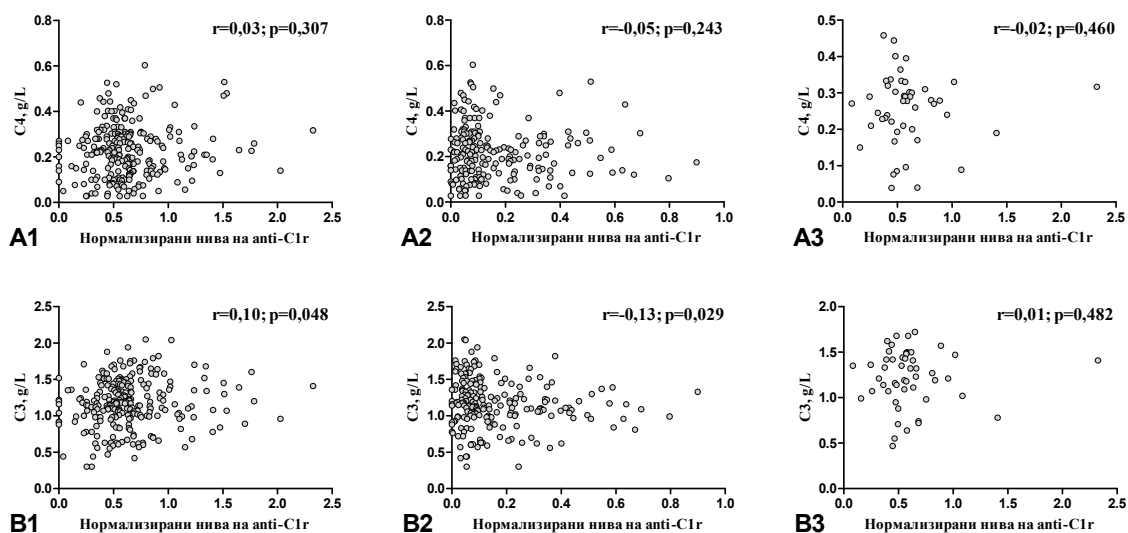
Динамиката на плазмената концентрация на C4 (g/L) за периода на проследяване и лечение на пациентите с ЛН показва средно начално ниво от $0,22 \pm 0,12$ (от 0,03 до 0,53) g/L и средно ниво в края от $0,24 \pm 0,12$ (от 0,04 до 0,60) g/L, като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,090$). Динамиката на плазмената концентрация на C3 (g/L) за този период показва средно начално ниво от $1,15 \pm 0,36$ (от 0,44 до 1,88) g/L и средно ниво в края от $1,20 \pm 0,25$ (от 0,55 до 1,74) g/L, като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,288$).

Определихме промените на C4 и C3 ($\Delta C4$ и $\Delta C3$) спрямо съответните изходни нива на C4 и C3 при изследването в началото (C_1 – съответното ниво на комплекта (C4 и C3) (g/L) в началото; C_x – съответното ниво на комплекта (C4 и C3) (g/L) в края на периода на проследяване):

$$\Delta C = \frac{C_x - C_1}{C_1} \times 100\%.$$

Липсват статистически значими корелационни зависимости между промяната на нормализираните нива на anti-C1r спрямо изходните ($\Delta N\%$) и, съответно, промяната на концентрацията на C4 спрямо изходната ($\Delta C4$) за периода на проследяване (Spearman, $r=-0,01$; $p=0,465$), и промяната на концентрацията на C3 спрямо изходната ($\Delta C3$) за периода на проследяване (Spearman, $r=0,12$; $p=0,207$).

Липсва статистически значима корелационна зависимост между нивото на anti-C1r и плазмената концентрация на C4 (Spearman, $r=0,03$; $p=0,307$, Фигура 39A1), като е налице статистически значима позитивна корелация между нивата на anti-C1r и концентрацията на C3 (Spearman, $r=0,10$; $p=0,048$, Фигура 39B1). Сред пациентите с ЛН с екстраренални прояви на СЛЕ установихме липсва статистически значима корелационна зависимост между anti-C1r и концентрацията на C4 (Spearman, $r=-0,05$; $p=0,243$, Фигура 39A2) и е налице значима отрицателна корелация между нивата на anti-C1r и концентрацията на C3 (Spearman, $r=-0,13$; $p=0,029$, Фигура 39B2). Сред пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ липсват статистически значими корелационни зависимости между нивата на anti-C1r и плазмените концентрации на C4 и C3 (Spearman, $r=-0,02$; $p=0,460$ и Spearman, $r=0,01$; $p=0,482$, Фигура 39 A3 и B3).



Фигура 39. Корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C1g, изследвани в динамика във всички проби от пациенти с ЛН и плазмените концентрации на C4 и C3 в тези проби. (A1 и B1) При всички пациенти с ЛН; (A2 и B2) При пациентите с ЛН с екстраренални прояви на СЛЕ; (A3 и B3) При пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman).

2.7.2.4. Динамика на автоантителата срещу C1g и антинуклеарните автоантитела (ANA).

Динамиката на титъра на ANA за периода на проследяване и лечение на пациентите с ЛН показва средно начално ниво от 1:640 (от 1:40 до 1:1280) и средно ниво в края от 1:320 (от 1:80 до 1:1280), като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,078$).

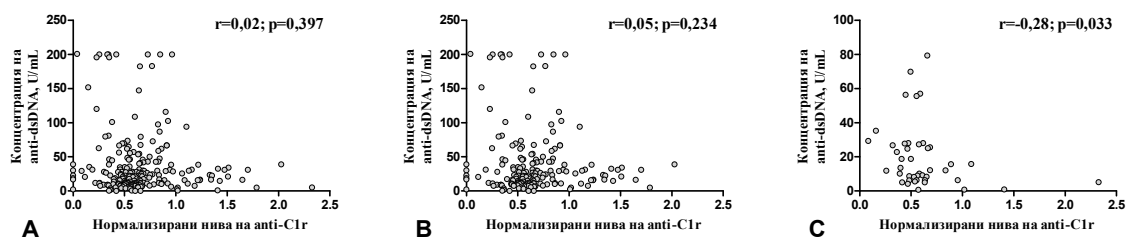
При изследваните в динамика проби от пациентите с ЛН, при които са изследвани едновременно anti-C1g и ANA ($N=220$ проби), не установихме статистически значима корелационна зависимост между нормализираното ниво на anti-C1g и титъра на ANA (Spearman, $r=-0,06$; $p=0,174$). При изследвания сред групите от пациентите с ЛН с екстраренални прояви на СЛЕ и пациенти с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ също не установихме статистически значими корелационни зависимости (съответно, Spearman, $r=-0,06$; $p=0,211$ и Spearman, $r=-0,21$; $p=0,096$).

2.7.2.5. Динамика на автоантителата срещу C1g и автоантителата срещу двойноверижна ДНК (anti-dsDNA).

Динамиката на концентрацията на anti-dsDNA (U/mL) за периода на проследяване и лечение на пациентите с ЛН показва средно начално ниво от $32,6 \pm 37,0$ (от 5,6 до 195,8) U/mL и средно ниво в края от $33,2 \pm 43,8$ (от 0,1 до 183, 0) U/mL, като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,132$).

При изследваните в динамика проби от пациентите с ЛН, при които са изследвани едновременно anti-C1g и anti-dsDNA ($N=224$ проби), не установихме статистически значима корелационна зависимост между нормализираното ниво на anti-C1g и концентрацията на anti-dsDNA (Spearman, $r=0,02$; $p=0,397$, Фигура 40А). При пациентите с ЛН с екстраренални прояви на СЛЕ също не установихме статистически значима корелационна зависимост (Spearman, $r=0,05$; $p=0,234$, Фигура 40В). Единствено при пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ установихме статистически значима отрицателна корелационна зависимост (Spearman, $r=-0,28$; $p=0,033$, Фигура 40С).

При пациентите, изследвани в динамика, позитивни едновременно за anti-dsDNA и anti-C1g, средният ранг (категория на ЛН) на BILAG Renal score е сравнително по-висок от този при пациентите, позитивни за anti-dsDNA и негативни за anti-C1g, макар тази разлика да не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,509$). При пациентите, изследвани в динамика, позитивни едновременно за anti-dsDNA и anti-C1g, средното ниво на протеинурията ($2,92 \pm 4,91$ g/d) е сравнително, но статистически незначимо по-високо от това при пациентите позитивни за anti-dsDNA и негативни за anti-C1g ($1,23 \pm 1,92$ g/d) (Mann-Whitney, $p=0,382$).



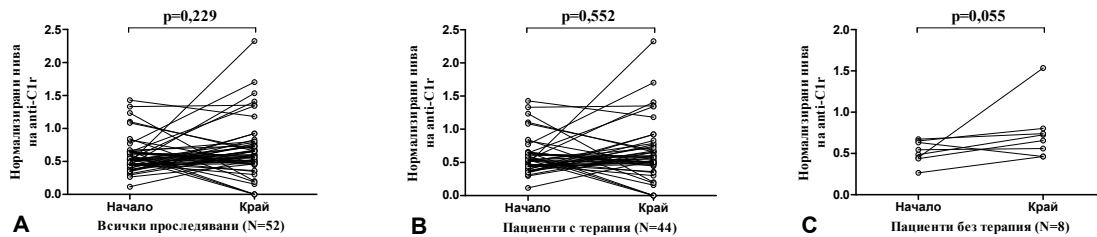
Фигура 40. Корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C1g и концентрациите на anti-dsDNA (U/mL) при: **A.** Всички пациентите с ЛН, изследвани в динамика (Spearman, $r=0,02$; $p=0,397$); **B.** При пациентите с ЛН с екстраренални прояви на СЛЕ, изследвани в динамика (Spearman, $r=0,05$; $p=0,234$); **C.** При пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=-0,28$; $p=0,033$).

2.8. Автоантитела срещу C1g и някои аспекти на лечението при пациентите с ЛН.

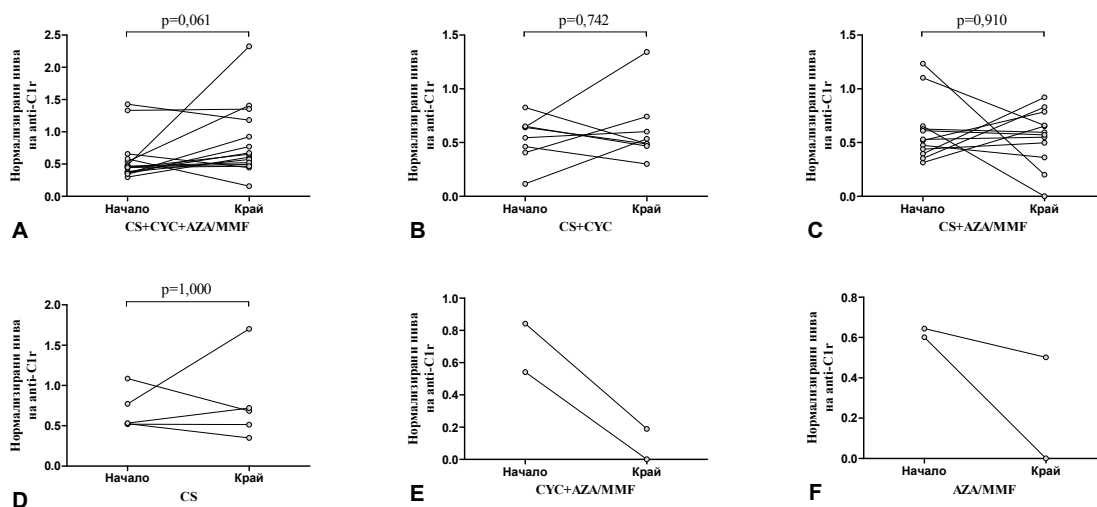
При всички проследявани пациенти в началния момент средното нормализирано ниво на anti-C1g е $0,583 \pm 0,259$ (от 0,116 до 1,429), а в края на периода на проследяване – $0,668 \pm 0,429$ (от 0,000 до 2,325), като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,229$, Фигура 41A). При пациентите с проведена имунопатогенетична терапия в рамките на периода на проследяване, средното нормализирано ниво на anti-C1g в началото е $0,595 \pm 0,275$ (от 0,116 до 1,429), а в края – $0,655 \pm 0,445$ (от 0,000 до 2,325), като и в тази група не установихме статистически значима разлика между началното и крайното ниво (Wilcoxon signed rank test, $p=0,229$, Фигура 41B). В групата пациенти, при които не е провеждана имунопатогенетична терапия, средното нормализирано ниво на anti-C1g в началото е $0,517 \pm 0,137$ (от 0,264 до 0,672), а в края – $0,743 \pm 0,344$ (от 0,462 до 1,535), без да е налице статистически значима разлика между тези нива (Wilcoxon signed rank test, $p=0,055$, Фигура 41C).

С оглед вида на проведеното имунопатогенетично лечение, сред пациентите с ЛН, изследвани за anti-C1g, обособихме 6 групи: 15 (34,1%) пациенти, при които е провеждано комбинирано лечение с CS+CYC+AZA/MMF; 8 (18,2%) пациенти, при които е провеждано комбинирано лечение с CS+CYC; 12 (27,3%) пациенти, при които е провеждано комбинирано лечение с CS+AZA или CS+MMF; 5 (11,4%) пациенти, при които е провеждана монотерапия с CS; 2 (4,5%) пациенти, при които е провеждано комбинирано лечение с CYC и AZA и 2 (4,5%) пациенти, при които е провеждана монотерапия: с AZA при единия и с MMF при другия.

При сравнителен анализ на нивата на anti-C1g в началото и в края на проведеното лечение при различните групи пациенти установихме следното: в групата на терапия с CS+CYC+AZA/MMF средното нормализирано ниво на anti-C1g в началото е $0,572 \pm 0,342$ (от 0,298 до 1,429), а в края – $0,837 \pm 0,140$ (от 0,158 до 2,325), като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,061$, Фигура 42A); в групата на лечение с CS+CYC средното ниво в началото е $0,537 \pm 0,214$ (от 0,116 до 0,827), а в края – $0,621 \pm 0,318$ (от 0,301 до 1,343), като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,742$, Фигура 42B); в групата на лечение с CS+AZA/MMF средното ниво в началото е $0,604 \pm 0,286$ (от 0,313 до 1,234), а в края – $0,552 \pm 0,263$ (от 0,000 до 0,921), като в тази група средното ниво на anti-C1g намалява, но разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,910$, Фигура 42C); в групата на монотерапия с CS средното ниво в началото е $0,687 \pm 0,247$ (от 0,520 до 1,085), а в края – $0,794 \pm 0,529$ (от 0,350 до 1,702), като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=1,000$, Фигура 42D); в групите на лечение с CYC+AZA и AZA/MMF попадат по 2 пациенти, като от Фигура 42E и 42F се вижда намаляване на нивата и при четиримата пациенти, като поради малкия брой на пациентите статистическият анализ в тези две групи не е коректен.



Фигура 41. Крайни и начални нива на anti-C1r при: **A.** Всички проследявани пациенти (N=52); **B.** Пациентите, при които е провеждана имунопатогенетична терапия (N=44) и **C.** Пациентите, при които не е провеждана имунопатогенетична терапия през периода на проследяване (Wilcoxon signed rank test).



Фигура 42. Нормализирани нива на anti-C1r в началото и в края на периода на проследяване при пациенти, при които е провеждана терапия с: **A.** CS+CYC+AZA/MMF – средното ниво на anti-C1r се повишава в края, но разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,061$); **B.** CS+CYC – средното ниво на anti-C1r се повишава в края, но разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,742$); **C.** CS+AZA/MMF – средното ниво на anti-C1r намалява в края, но разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,910$); **D.** CS – средното ниво на anti-C1r се повишава в края, но разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=1,000$). **E.** CYC+AZA – двама пациенти, при които нивата на anti-C1r намаляват в края; **F.** MMF при един пациент и AZA при един пациент, като нивата на anti-C1r намаляват в края.

3. АВТОАНТИТЕЛА СРЕЩУ C1s КОМПОНЕНТА НА КОМПЛЕМЕНТА.

Автоантитела срещу C1s (anti-C1s) са изследвани при 74 (76,3% от първоначално включените в проучването) пациенти, като в динамика са изследвани общо 266 проби на пациентите с ЛН. Anti-C1s са изследвани и при 60 (83,3% от изходните 72) здрави доброволци (контроли), без автоимунни и инфекциозни възпалителни заболявания, със запазена бъбречна, чернодробна и хемопоестична функции. При изследваните за anti-C1s в контролната група здрави доброволци се установиха плазмени нива на anti-C1s $0,091 \pm 0,069$ единици оптична плътност при дължина на вълната от 450 nm (OD 450 nm) на оптичния анализатор.

Определихме граничната стойност (cut-off), над която нивата на anti-C1s при изследваните пациенти с ЛН приехме за патологично повишени, а именно:

$$\text{Cut-off} = 0,091 + 2 \times 0,069 = 0,229.$$

Проведохме нормализиране на стойностите на нивата на anti-C1s в групите пациенти с ЛН, представяйки нивата на anti-C1s като съотношение на получените стойности за оптичната плътност към нивото на cut-off за лабораторията. По този начин, за гранична стойност се приема 1,00, над която нормализираните нива на anti-C1s се приемат за повишени, а под която – за референтни.

Установихме патологично повишени титри на anti-C1s при 6 (8,1%) от изходно изследваните пациенти с ЛН. Сред изследваните общо 266 проби от кръвни плазми на пациентите с ЛН в динамика установихме патологично повишени нива на anti-C1s при 63 (23,7%) от пробите.

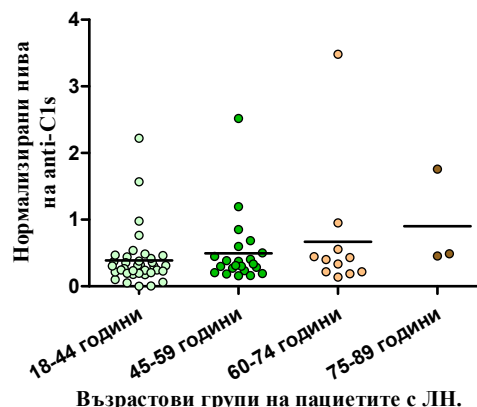
3.1. Автоантитела срещу C1s и пола на пациентите с ЛН.

При мъжете с ЛН патологично повишени нива на anti-C1s установихме при 1 (6,7%), докато при жените с ЛН – при 5 (8,5%). Не се установи статистически значимо влияние на пола на пациентите с ЛН върху наличието на патологично повишени нива на anti-C1s (Fisher's exact test, $p=0,649$). При мъжете с ЛН средното нормализирано ниво на anti-C1s е $0,365 \pm 0,410$, а при жените с ЛН – $0,512 \pm 0,600$. Не се установи статистически значима разлика в нивата на anti-C1s при двата пола на пациентите с ЛН (Mann-Whitney, $p=0,113$).

3.2. Автоантитела срещу C1s и възрастта на пациентите с ЛН.

Във възрастовата група от 18 до 44 години позитивни за anti-C1s са 2 (5,3%) пациенти; във възрастовата група от 45 до 59 години позитивни за anti-C1s са 2 (9,1%) пациенти; във възрастовата група от 60 до 74 години позитивен за anti-C1s е 1 (9,1%) пациент; във възрастовата група от 75 до 89 години позитивен за anti-C1s е също 1 (33,3%).

Средните нива на anti-C1s са както следва: в групата от 18 до 44 години: $0,387 \pm 0,413$; в групата от 45 до 59 години: $0,496 \pm 0,516$; в групата от 60 до 74 години: $0,670 \pm 0,959$ и в групата от 75 до 89 години: $0,901 \pm 0,744$. Данните за възрастовото разпределение на пациентите с ЛН и нормализираните нива на anti-C1s са представени на Фигура 43.



Фигура 43. Средни нива на anti-C1s в различните възрастови групи по СЗО при пациентите с ЛН.

Въпреки постепенното нарастване на средните нормализирани нива на anti-C1s с възрастта (Фигура 43), не установихме статистически значима зависимост на влиянието на възрастта като фактор

върху нивата на anti-C1s (One-way ANOVA, $p=0,273$; Post test for linear trend, $p=0,102$). Не се установи статистически значима разлика в нормализираните нива на anti-C1s между различните възрастови групи пациенти с ЛН (Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$).

Не се установи статистически значима корелационна зависимост между възрастта на изходно изследваните пациенти с ЛН и нивата на anti-C1s (Spearman, $r=0,162$; $p=0,084$).

3.3. Автоантитела срещу C1s и давността на ЛН.

Средната давност на ЛН при изследваната група пациенти е 10,3 години. При съпоставяне на нормализираните нива на anti-C1s при пациенти с давност на ЛН по-малка от 10,3 години ($0,431\pm 0,389$) и тези при пациентите с давност на ЛН над 10,3 години ($0,545\pm 0,733$) не установихме статистически значима разлика (Mann-Whitney, $p=0,617$).

Не установихме статистически значима корелационна зависимост между anti-C1s и давността на ЛН (Spearman, $r=-0,06$, $p=0,303$).

3.4. Автоантитела срещу C1s и основни клиничко-лабораторни параметри на ЛН.

3.4.1. Автоантитела срещу C1s и протеинурията.

При пациентите, позитивни за anti-C1s, средното ниво на протеинурията е $3,09\pm 6,25$ g/d, докато при пациентите, негативни за anti-C1s – $1,57\pm 2,53$ g/d. Въпреки че при позитивните за anti-C1s пациенти нивото на протеинурията е по-високо от това при пациентите, негативни за anti-C1s, тази разлика не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,600$).

3.4.2. Автоантитела срещу C1s и уринен седимент.

Липсва влияние на патологично повишените нива на anti-C1s върху наличието на патологично активен уринен седимент (Fisher's exact test, $p=1,000$).

При пациентите с патологично активен уринен седимент, средното нормализирано ниво на anti-C1s е $0,508\pm 0,643$ (от 0,052 до 3,480), докато при тези без патологично активен седимент това ниво е сравнително по-ниско – $0,456\pm 0,487$ (от 0,000 до 2,520), като разликата в нивата на anti-C1s не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,677$).

3.4.3. Автоантитела срещу C1s и бъбречна функция.

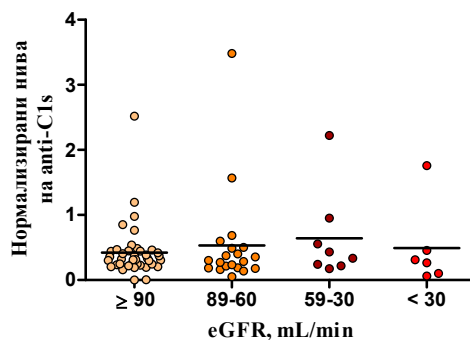
При пациентите с $eGFR < 60$ mL/min се установи средно нормализирано ниво на anti-C1s $0,577\pm 0,645$ (от 0,061 до 2,223), докато при пациентите с $eGFR \geq 60$ mL/min средното ниво на anti-C1s е $0,460\pm 0,551$ (от 0,000 до 3,480). Въпреки относително по-високото ниво в групата с декомпенсирана бъбречна функция, разликата между нивата на anti-C1s в двете групи пациенти не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,783$).

Липсва корелационна зависимост между нивата на anti-C1s и $eGFR$ (Spearman, $r=-0,05$, $p=0,328$).

В групата от пациенти с $eGFR \geq 90$ mL/min с позитивни anti-C1s са 2 (5,0%) пациенти, а средното нормализирано ниво на anti-C1s е $0,423\pm 0,413$ (от 0,000 до 2,520); в групата пациенти с $eGFR$ от 89 до 60 mL/min с позитивни anti-C1s са 2 (10,0%) пациенти, а средното нормализирано ниво на anti-C1s е $0,533\pm 0,765$ (от 0,052 до 3,480); в групата пациенти с $eGFR$ от 59 до 30 mL/min с позитивни anti-C1s е 1 (12,5%) пациент, а средното нормализирано ниво на anti-C1s е $0,641\pm 0,687$ (от 0,175 до 2,223) и в групата пациенти с $eGFR$ под 30 mL/min с позитивни anti-C1s е 1 (16,7%) пациент, а средното нормализирано ниво на anti-C1s е $0,492\pm 0,638$ (от 0,061 до 1,760) (с $eGFR < 15$ mL/min са само 2 пациенти, поради което, с оглед коректността на статистическия анализ обединихме групите с $eGFR$ 29-15 и < 15 mL/min в обща група).

Липсва статистически значима разлика между нивата на anti-C1s при отделните групи от пациенти с ЛН, обособени въз основа на $eGFR$, като липсва статистически значима зависимост между тези нива и $eGFR$ (One-way ANOVA, $p=0,755$; Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$; Post test for linear trend, $p=0,693$) (Фигура 44).

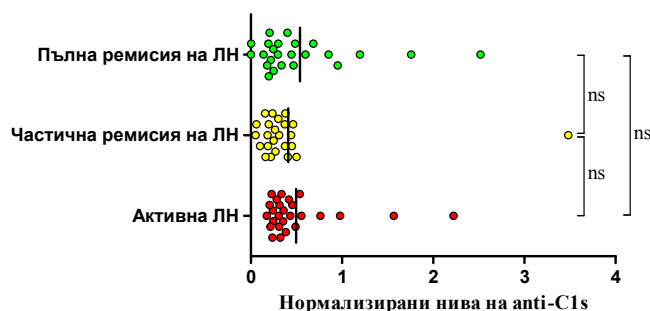
Липсва статистически значимо влияние на позитивния серологичен статус за anti-C1s върху наличието на декомпенсирана бъбречна функция при първоначално изследваната група пациенти с ЛН (Fisher's exact test, $p=0,317$).



Фигура 44. Средни нива на anti-C1s в обособените според eGFR групи от пациенти с ЛН, първоначално изследвани в проучването.

3.4.4. Автоантитела срещу C1s и комплексната клиничко-лабораторна оценка на активността на ЛН.

В групата с активна ЛН 2 (7,7%) пациенти са позитивни за anti-C1s, в групата с частична ремисия на ЛН позитивен за anti-C1s е 1 (4,2%) пациент и в групата с пълна клиничко-лабораторна ремисия на ЛН позитивни за anti-C1s са 3 (12,5%) пациенти. Средните нормализирани нива на anti-C1s в трите групи пациенти с ЛН са както следва: в групата с активна ЛН – $0,497 \pm 0,458$ (от 0,175 до 2,223); в групата с частична ремисия на ЛН – $0,409 \pm 0,667$ (от 0,052 до 3,480); в групата с пълна клиничко-лабораторна ремисия на ЛН – $0,539 \pm 0,583$ (от 0,000 до 2,520), както е показано на Фигура 45.



Фигура 45. Разпределение на пациентите с ЛН в зависимост от комплексната клиничко-лабораторна оценка на активността на ЛН и нормализираните нива на anti-C1s. Представени са средните нормализирани нива на anti-C1s в трите групи.

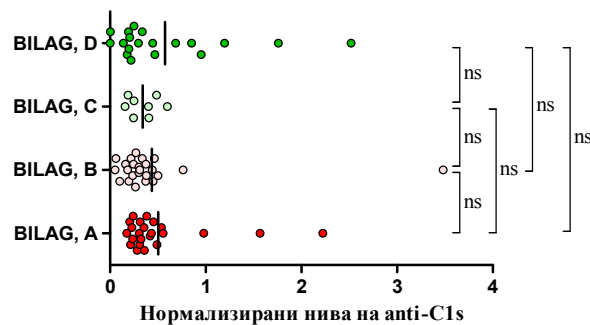
Липсва статистически значима разлика между нивата на anti-C1s при отделните групи от пациенти с ЛН, обособени въз основа на комплексната оценка на активността на ЛН, като липсва статистически значима зависимост между тези нива и активността на ЛН (One-way ANOVA, $p=0,727$; Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$; Post test for linear trend, $p=0,800$).

Сред позитивните за anti-C1s пациенти с ЛН, 2 (33,3%) са с активна ЛН, 1 (16,7%) от пациентите са с частична ремисия на ЛН и 3 (50,0%) от пациентите са в състояние на пълна клиничко-лабораторна ремисия на ЛН. Сред пациентите с ЛН с референтни нива на anti-C1s, 24 (35,3%) са с активна ЛН, 23 (33,8%) са с частична ремисия на ЛН и 21 (30,9%) са с пълна клиничко-лабораторна ремисия на ЛН. При отчитане на липсата на клиничко-лабораторна активност на ЛН (имайки предвид само пациентите в състояние на пълна клиничко-лабораторна ремисия на ЛН) и наличието на активност на ЛН (обединявайки групите с активна ЛН и частична ремисия на ЛН), установихме, че няма статистически значимо влияние на наличието на позитивните нива на anti-C1s върху наличието на активност на ЛН (Fisher's exact test, $p=0,382$).

3.4.5. Автоантитела срещу C1s и комплексната оценка на ЛН (категиите) по BILAG Renal score.

При пациентите с ЛН от категория А по BILAG Renal score позитивните за anti-C1s са 3 (8,7%); при пациентите от категория В позитивен за anti-C1s е 1 (4,2%); при пациентите от категория С няма

позитивни за anti-C1s и при пациентите от категория D позитивни за anti-C1s са 3 (15,8%). Средните нормализирани нива на anti-C1s при пациентите с различни категории по BILAG Renal score на ЛН са както следва: при категория A: $0,504 \pm 0,481$ (от 0,175 до 2,223); при категория B: $0,436 \pm 0,667$ (от 0,052 до 3,480); при категория C: $0,341 \pm 0,156$ (от 0,157 до 0,598) и при категория D: $0,573 \pm 0,651$ (от 0,000 до 2,520), както е показано на Фигура 46.



Фигура 46. Разпределение на пациентите с ЛН в зависимост от комплексната клинично-лабораторна оценка активността на ЛН по BILAG Renal score и нормализираните нива на anti-C1s. Представени са средните нормализирани нива на anti-C1s в отделните категории.

Въпреки известното намаляване на средните нормализирани нива на anti-C1s с намаляване на активността на ЛН по BILAG Renal score, не установихме статистически значима разлика между нивата на anti-C1s при отделните групи от пациенти с ЛН, като също така липсва и статистически значима зависимост между тези нива и категорията на ЛН по BILAG Renal score (One-way ANOVA, $p=0,766$; Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$; Post test for linear trend, $p=0,845$).

Сред пациентите, позитивни за anti-C1s, с категория A по BILAG Renal score са 2 (33,3%), а пациентите с категории B и D са 4 (66,7%), като няма пациенти с категория C, докато при пациентите, негативни за anti-C1s, с категория A са 21 (30,9%), а тези с по-ниска категория (B, C и D) – 47 (69,1%). Въз основа на това разпределение установихме, че наличието на позитивни нива на anti-C1s няма статистически значимо влияние върху наличието на ЛН с категория A по BILAG Renal score (Fisher's exact test, $p=1,000$).

Средното нормализирано ниво на anti-C1s при пациентите от категория A по BILAG Renal score е $0,504 \pm 0,481$ (от 0,175 до 2,223), а средното нормализирано ниво на anti-C1s при всички останали пациенти с ЛН (от категории B, C и D) е $0,472 \pm 0,607$ (от 0,000 до 3,480), като разлика в нивата не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,209$).

При изследване на зависимостта между нормализираните нива на anti-C1s и категорията по BILAG Renal score (след квантифициране на категориите: категория A – 5; категория B – 4; категория C – 3; категория D – 2 и категория E – 1 (в последната категория E липсват пациенти)) установихме липса на значима корелационна зависимост между нивата на anti-C1s и категорията по BILAG Renal score (Spearman, $r=0,09$; $p=0,217$).

3.5. Автоантитела срещу C1s и някои основни имунологични маркери при ЛН.

3.5.1. Автоантитела срещу C1s и нива на комплемента C4 и C3.

Сред пациентите с ЛН с повишени нива на anti-C1s, плазмени концентрации на C4 са изследвани при 5 (83,3%), като хипокомplementемия C4 се установи при 2 (40,0%). Сред пациентите с референтни нива на anti-C1s, плазмени концентрации на C4 са изследвани при 59 (86,8%), като хипокомplementемия C4 се установи при 25 (42,4%). Въз основа на това разпределение, не установихме статистически значимо влияние на наличието на позитивни anti-C1s върху наличието на хипокомplementемия C4 (Fisher's exact test, $p=1,000$).

Средната плазмена концентрация на C4 при пациентите с повишени anti-C1s е $0,204 \pm 0,108$ g/L, която е сравнително по-ниска от тази при пациентите с референтни нива на anti-C1s – $0,228 \pm 0,122$, но разликата не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,680$). Средното нормализирано ниво на anti-C1s при пациентите с хипокомplementемия C4 е $0,538 \pm 0,661$, което е сравнително по-високо, но неразличаващо се значимо от средното нормализирано ниво на anti-C1s при пациентите без хипокомplementемия C4 – $0,415 \pm 0,452$ (Mann-Whitney, $p=0,120$).

Липсата на статистически значима зависимост между нормализираните нива на anti-C1s и плазмените концентрации на C4 потвърдихме и с корелационен анализ (Spearman, $r=-0,16$; $p=0,102$).

Сред пациентите с ЛН с повишени нива на anti-C1s, плазмени концентрации на C3 са изследвани при 6 (100,0%), като хипокомplementемия C3 се установи само при 1 (16,7%). Сред пациентите с референтни нива на anti-C1s, плазмени концентрации на C3 са изследвани при 63 (92,6%), като хипокомplementемия C3 се установи при 12 (19,0%). Въз основа на това разпределение, установихме липса на статистически значимо влияние на наличието на позитивни anti-C1s върху наличието на хипокомplementемия C3 (Fisher's exact test, $p=1,000$).

Средната плазмената концентрация на C3 при пациентите с повишени anti-C1s е $0,985\pm 0,224$ g/L, която е сравнително по-ниска от тази при пациентите с референтни нива на anti-C1s – $1,151\pm 0,381$ g/L, но разликата не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,198$). Средното нормализирано ниво на anti-C1s при пациентите с хипокомplementемия C3 е $0,414\pm 0,367$, което е сравнително по-ниско, но без да се различава статистически значимо от средното ниво на anti-C1s при пациентите без хипокомplementемия C3 – $0,510\pm 0,628$ (Mann-Whitney, $p=0,104$).

Липсата на значима зависимост между нивата на anti-C1s и плазмените концентрации на C3 потвърдихме и с корелационен анализ (Spearman, $r=-0,17$; $p=0,079$).

3.5.2. Автоантитела срещу C1s и антинуклеарни автоантитела (ANA).

Сред пациентите с ЛН, изходно включени в проучването, които са изследвани за anti-C1s, ANA са изследвани при 59 (79,7%) и в общо 220 (82,7%) от всички в динамика изследвани проби. Патологично повишени титри на ANA ($>1:80$) установихме при 43 (72,9%) от първоначално изследваните за ANA и anti-C1s пациенти с ЛН и при 176 (80,0%) от всички изследвани за ANA и anti-C1s проби от пациенти с ЛН в динамика.

Сред всички изследвани в динамика по време на проучването пациенти с ЛН, пробите с повишени нива на anti-C1s и повишени титри на ANA са 46 (88,5% от всички проби с повишени нива на anti-C1s, изследвани за ANA), а пробите с повишени anti-C1s и референтни титри на ANA са 6 (11,5% от всички проби с повишени anti-C1s, изследвани за ANA). Пробите с референтни нива на anti-C1s и повишени титри на ANA са 130 (77,4% от всички проби с референтни нива на anti-C1s, изследвани за ANA), а тези с референтни нива на anti-C1s и референтни титри на ANA са 38 (22,6% от всички проби с референтни нива на anti-C1s, изследвани за ANA). Въз основа на това разпределение установихме, че липсва статистически значимо влияние на наличието на повишени нива на anti-C1s върху наличието на повишени титри на ANA (Fisher's exact test, $p=0,111$).

Средното нормализирано ниво на anti-C1s при изходно изследваните пациенти с ЛН с патологично повишени титри на ANA ($0,541\pm 0,691$) е сравнително по-високо, но не различаващо се значимо от нивото на anti-C1s при пациентите с референтни титри на ANA ($0,488\pm 0,420$) (Mann-Whitney, $p=0,727$).

Липсва значима корелационна зависимост между нормализираните нива на anti-C1s и титъра на ANA (Spearman, $r=0,01$; $p=0,481$).

3.5.3. Автоантитела срещу C1s и автоантитела срещу двойноверижна ДНК (anti-dsDNA).

Сред пациентите с ЛН, изходно включени в нашето проучване и изследвани за anti-C1s, anti-dsDNA са изследвани при 62 (83,8%) и в общо 224 (84,2%) от всички в динамика изследвани проби. Патологично повишени нива на anti-dsDNA (≥ 20 U/mL) установихме при 24 (38,7%) от първоначално изследваните за anti-dsDNA и anti-C1s пациенти с ЛН и при 121 (54,0%) от всички изследвани за anti-dsDNA и anti-C1s проби в динамика.

Позитивните за anti-C1s с повишени концентрации на anti-dsDNA проби от пациенти с ЛН, изследвани в динамика, са 36 (66,7% от всички случаи, които са позитивни за anti-C1s, при които са изследвани и anti-dsDNA), а негативните за anti-C1s, които са с повишени концентрации на anti-dsDNA са 85 (50,0% от всички негативни за anti-C1s, при които са изследвани anti-dsDNA). Въз основа на това разпределение установихме наличие на статистически значимо повлияване на наличието на позитивни нива на anti-C1s върху наличието на патологично повишени концентрации на anti-dsDNA сред всички, изследвани за anti-C1s и anti-dsDNA проби от пациенти с ЛН в динамика (Fisher's exact test, $p=0,041$).

Средното нормализирано ниво на anti-C1s при изходно изследваните пациенти с ЛН с патологично повишени концентрации на anti-dsDNA ($0,586\pm 0,794$) не е статистически значимо различаващо се от нивото на anti-C1s при пациентите с референтни концентрации на anti-dsDNA ($0,471\pm 0,471$) (Mann-Whitney, $p=0,578$). При пациентите с повишени anti-C1s средната концентрация на anti-dsDNA ($68,55\pm 75,82$ U/mL) е статистически значимо не различаваща се от средната концентрация на anti-dsDNA при пациентите с референтни нива на anti-C1s ($31,24\pm 45,64$ U/mL) (Mann-Whitney, $p=0,425$).

Липсата на значима връзка на нивата на anti-C1s с концентрациите на anti-dsDNA потвърдихме и с корелационен анализ, който показва липсваща корелационна зависимост между двете (Spearman, $r=-0,02$; $p=0,432$).

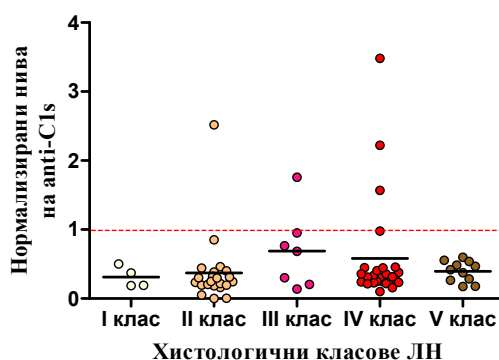
3.6. Автоантитела срещу C1s и някои хистологични признаци на ЛН.

Хистологична диагноза е налична при 71 (95,9%) от включените в проучването пациенти, при които са изследвани anti-C1s. Определени са хистологичните класове на ЛН, съгласно критериите на International Society of Nephrology (ISN) и Renal Pathology Society (RPS). Отчетени са хистологичните индекси на активност и хроничност, съгласно критериите на National Institutes of Health (NIH). С оглед клинична достоверност на изследваните зависимости, когато са изследвани връзки, касаещи белези на хистологична активност на ЛН, при статистическите анализи са отчитани само случаите, при които времето между вземането на кръвните проби за изследване на anti-C1s и провеждането на пункционната бъбречна биопсия е било до 12 месеца. Това условие е изпълнено при 27 (38,0%) от пациентите, включени в проучването.

3.6.1. Автоантитела срещу C1s и хистологичният клас на ЛН.

При пациентите с I, V и VI хистологични класове ЛН не се установиха патологично повишени anti-C1s (Фигура 47). При тези с II хистологичен клас позитивен за anti-C1s е 1 (4,3%) пациент; при пациентите с III хистологичен клас – 1 (14,3%); при пациентите с IV клас – 3 (12,3%). Пациентът с VI хистологичен клас на ЛН е с референтно ниво на anti-C1s, а при 1 пациент с патологично повишено ниво на anti-C1s не е провеждано хистологично уточняване. Средните нормализираните нива на anti-C1s са съответно: при пациентите с I хистологичен клас: $0,313 \pm 0,152$; при пациентите с II хистологичен клас: $0,373 \pm 0,500$; при пациентите с III хистологичен клас: $0,687 \pm 0,564$; при пациентите с IV хистологичен клас: $0,581 \pm 0,766$; при пациентите с V хистологичен клас: $0,395 \pm 0,150$ и нормализираното ниво при пациента с VI хистологичен клас е 0,061.

Не установихме статистически значима разлика между нивата на anti-C1s при отделните хистологични класове ЛН, въпреки че най-високите нива са при III и IV хистологичен клас, където са и 2/3 от позитивните за anti-C1s пациенти с ЛН, като също така липсва и статистически значима зависимост между тези нива и поредността на отделните хистологични класове ЛН (One-way ANOVA, $p=0,560$; Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$; Post test for linear trend, $p=0,597$).



Фигура 47. Нива на anti-C1s в зависимост от хистологичния клас на ЛН. Не се установиха статистически значима зависимост между нивата на anti-C1s и класа ЛН, както и разлика между нивата на anti-C1s при различните класове ЛН (One-way ANOVA, $p=0,560$; Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$; Post test for linear trend, $p=0,597$).

Сред пациентите, позитивни за anti-C1s, такива с IV клас ЛН са 3 (60,0% от позитивните за anti-C1s с хистологична диагноза (5 пациенти)). При пациентите, негативни за anti-C1s, такива с IV клас ЛН са 22 (33,3% от негативните за anti-C1s с хистологична диагноза (66 пациенти)). При изследване връзката между наличието на патологично повишени anti-C1s и наличието на ЛН от IV хистологичен клас установихме, че патологично повишените нива на anti-C1s не определят статистически значимо наличие на дифузна ЛН (IV хистологичен клас) (Fisher's exact test, $p=0,337$).

3.6.2. Автоантитела срещу C1s и основни хистологични лезии за активност и хроничност на ЛН.

В настоящото проучване изследвахме зависимостите между нивата на anti-C1s и хистологични белези на активност (ендокапилярна пролиферация, гломерулна левкоцитна инфилтрация, субендотелни депозити („телени бримки“), фибриноидна некроза и/или кариорексис, клетъчни полулуния и

интерстициална инфилтрация) и хистологични белези на хроничност (гломерулна склероза, фиброзни полулуния, тубулна атрофия и интерстициална фиброза), както и връзката между нивата на anti-C1s и хистологичните индекси на активност и хроничност, определени на базата на горепосочените хистологични белези.

Таблица 18. Сравнителен анализ между нивата на anti-C1s при наличие и липса на хистологични белези за активност и хроничност при пациентите с ЛН. Представени са средните нива \pm стандартното отклонение (SD).

Хистологичен признак	Нормализирани нива на anti-C1s при:		p
	наличие на хистологичния признак	липса на хистологичния признак	
Ендокапилярна пролиферация	0,381 \pm 0,306	0,393 \pm 0,129	0,194
Гломерулна левкоцитна инфилтрация ¹	-	-	-
Субендотелни депозити, формиращи „телени бримки“	0,541 \pm 0,576	0,348 \pm 0,138	0,975
Фибриноидна некроза и/или кариорексис	0,474 \pm 0,413	0,331 \pm 0,116	0,616
Клетъчни полулуния	0,524 \pm 0,584	0,352 \pm 0,137	0,640
Интерстициално възпаление	0,307 \pm 0,070	0,429 \pm 0,330	0,303
Гломерулна склероза	0,334 \pm 0,146	0,447 \pm 0,369	0,407
Фиброзни полулуния	0,307 \pm 0,103	0,401 \pm 0,293	0,473
Тубулна атрофия	0,334 \pm 0,179	0,414 \pm 0,312	0,280
Интерстициална фиброза	0,333 \pm 0,172	0,410 \pm 0,308	0,396

¹ В групата с гломерулна левкоцитна инфилтрация попадат само 2 пациенти и данните от статистическия анализ не са достоверни.

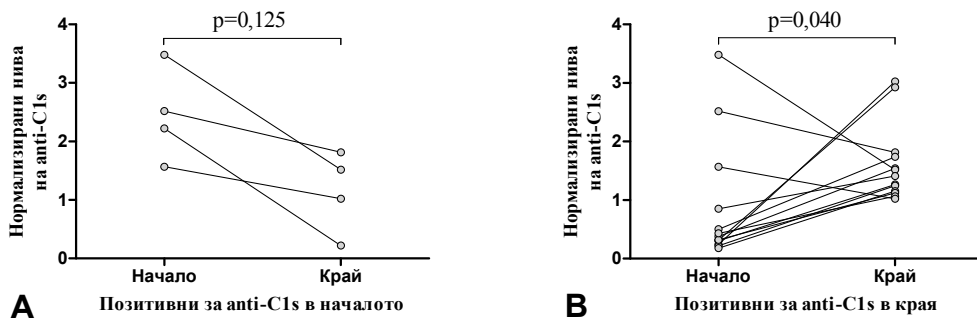
На Таблица 18 са показани данните от сравнителния анализ между нивата на anti-C1s в групите с и без съответните хистологични признаци за активност и хроничност на ЛН. При пациентите с наличие на хистологични признаци на активност нивата на anti-C1s не се различава статистически значимо от нивата при пациентите без хистологични признаци за активност. При пациентите с хистологични признаци на хроничност нивата на anti-C1s не се различават статистически значимо от нивата при пациентите без хистологични признаци на хроничност.

Не се установи наличие на значима корелационна зависимост между нивата на anti-C1s и хистологичния индекс на активност на ЛН (Spearman, $r=-0,12$; $p=0,280$). Не се установи и значима корелационна зависимост между нивата на anti-C1s и хистологичния индекс на хроничност при пациентите с ЛН (Spearman, $r=-0,28$; $p=0,079$).

3.7. Прогностично значение и динамика на промените в нивата на автоантителата срещу C1s.

При 52 (70,3%) от пациентите с ЛН, е налице проследяване за период от средно 13 (от 6 до 25) месеца, с между 2 и 11 проби, при които са определяни нивата на anti-C1s и останалите клинично-лабораторни и имунологични параметри на ЛН.

Сред изследваните в динамика общо 266 проби от кръвни плазми на пациентите с ЛН установихме патологично повишени нива на anti-C1s при 63 (23,7%). Изследвайки нивата на anti-C1s при проследените в динамика пациенти (с 2 и повече проби в хода на проучването), установихме, че при първите проби, патологично повишени anti-C1s има при 4 (7,7%) от пациентите, докато след среден период на проследяване от 13 месеца, патологично повишени нива на anti-C1s установихме при 13 (25,0%) от пациентите. При 1 от пациентите с първоначално повишени anti-C1s, последните намаляват до референтни стойности, а при 3 от тези пациенти нивата се задържат в патологични граници. От пациентите с патологични anti-C1s на 13 месец от проследяването, при 3 нивата са били патологични от началото, а при 10 нарастват от изходно референтни. Средното нормализирано ниво на anti-C1s при пациентите, позитивни за anti-C1s в началото, е 2,448 \pm 0,795 (от 1,568 до 3,480), докато след среден период от 13 месеца е 1,145 \pm 0,697 (от 0,223 до 1,817), като няма статистически значима разлика между тези две нива (Wilcoxon signed rank test, $p=0,125$) (Фигура 48А). Средното нормализирано ниво на anti-C1s при позитивните в края на периода на проследяване пациенти с ЛН е 1,604 \pm 0,658 (от 1,022 до 3,026), статистически значимо по-високо от средното ниво на anti-C1s на същите тези пациенти в началото на проследяването, когато е било 0,870 \pm 1,033 (от 0,179 до 3,480) (Wilcoxon signed rank test, $p=0,040$) (Фигура 48В).



Фигура 48. Динамика на нивата на anti-C1s при позитивните в началото на периода на проследяване (А) и при позитивните в края на периода на проследяване (В) пациенти с ЛН.

3.7.1. Прогностично значение на автоантителата срещу C1s.

При 42 (56,8%) от изходно включените в проучването пациенти с ЛН, при които са провеждани 3 или повече проби за anti-C1s в динамика, изследвахме връзките между нивата на anti-C1s и категорията по BILAG Renal score и нивата на anti-C1s и активността на ЛН, определена като активна, частична ремисия и пълна ремисия на ЛН. Патологични нива на anti-C1s поне в една от пробите установихме при 23 (54,8%) от пациентите.

Пациентите с ЛН, при които отчетохме в динамика повишение на нивата на anti-C1s до патологични стойности с последващо повишение на категорията по BILAG са 10 (45,5% от всички, при които се установи повишаване на anti-C1s до патологични стойности в динамика). Това повишение на категорията по BILAG Renal score на ЛН се отчете в рамките на среден период от 5,0 (от 0,0 до 18,0) месеца след повишаване на нивата на anti-C1s до патологични стойности. Пациентите, при които не се отчете повишаване на нивата на anti-C1s до патологични стойности и не се отчете повишение на категорията по BILAG Renal score са 19 (95,0% от всички, при които не се отчете повишаване на anti-C1s до патологични нива). Разпределението на пациентите с ЛН според наличието или липсата на повишение на нивата на anti-C1s до патологични стойности и според наличието или липсата на повишение на категорията на ЛН по BILAG Renal score е показано на Таблица 19.

На базата на това разпределение установихме, че наличието на повишение на anti-C1s до патологични нива статистически значимо определя наличието на последващо повишаване на категорията на ЛН по BILAG Renal score в рамките на среден период от $5,0 \pm 6,1$ месеца (от 0,0 до 18,0 месеца) (Fisher's exact test, $p=0,0042$) с чувствителност от 90,9%, специфичност от 61,3%, позитивна предиктивна стойност от 45,5% и негативна предиктивна стойност от 95,0%. Относителният риск (RR) за повишаване категорията на ЛН по BILAG Renal score след повишаване на нивата на anti-C1s до патологични стойности определихме на 9,1.

Таблица 19. Разпределение на пациентите с ЛН, проследявани в динамика с 3 и повече проби по време на проучването, според наличието или липсата на повишение на нивата на anti-C1s до патологични стойности и наличието или липсата на последващо повишение на категорията на ЛН по BILAG Renal score.

Пациенти с ЛН	С повишение на категорията на ЛН по BILAG	Без повишение на категорията на ЛН по BILAG	Общо
С повишаване на anti-C1s до патологични нива	10	12	22
Без повишаване на anti-C1s до патологични нива	1	19	20
Общо	11	31	42

Пациентите, при които в динамика anti-C1s нарастват до патологични нива, заедно с последващо активиране на ЛН са 12 (54,5% от всички, при които се установи в динамика повишаване на anti-C1s до патологични стойности). Пациентите, при които не се отчете повишаване на нивата на anti-C1s до патологични стойности и не се отчете активиране на ЛН (преминаване от пълна в частична ремисия или от частична ремисия в активна ЛН) са 16 (84,2% от всички, при които не се отчете повишаване на anti-C1s до патологични нива). Разпределението на пациентите с ЛН според наличието или липсата на

повишение на нивата на anti-C1s до патологични стойности и според наличието или липсата на активиране на ЛН е показано на Таблица 20.

Таблица 20. *Разпределение на пациентите с ЛН, проследявани в динамика с 3 и повече проби по време на проучването, според наличието или липсата на повишение на нивата на anti-C1s до патологични стойности и наличието или липсата на активиране на ЛН.*

Пациенти с ЛН	Активирани на ЛН	Без активирани на ЛН	Общо
С повишаване на anti-C1s до патологични нива	12	11	23
Без повишаване на anti-C1s до патологични нива	3	16	19
Общо	15	27	42

На базата на това разпределение установихме, че повишението на anti-C1s до патологични нива статистически значимо определя последващо повишаване на активността на ЛН (съгласно критериите за активна ЛН, частична ремисия и пълна ремисия) в рамките на среден период от 1,3±2,2 (от 0,0 до 6,0) месеца (Fisher's exact test, p=0,023) с чувствителност от 80,0%, специфичност от 59,3%, позитивна предиктивна стойност от 52,2% и негативна предиктивна стойност от 84,2%. Относителният риск (RR) за активиране на ЛН след повишаване на нивата на anti-C1s до патологични стойности определихме на 3,3.

3.7.2. Динамика на автоантителата срещу C1s във връзка с някои лабораторни и имунологични показатели при пациентите с ЛН.

Средното нормализирано ниво на anti-C1s при пациенти с ЛН в началото на периода на проследяване е 0,507±0,629 (от 0,000 до 3,480) докато в края на среден период от 13 месеца на проследяването и лечение е 0,697±0,646 (от 0,000 до 3,026), като разликата е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, p=0,021).

С оглед динамичното проследяване на нивата на anti-C1s във връзка с основните клинично-лабораторни и имунологични показатели при пациентите с ЛН определихме промяната на нивата на anti-C1s като процент ($\Delta N\%$) спрямо изходното ниво при първото изследване, по долупосочената формула (аналогично на изследването за anti-C1q и anti-C1r), където: N_1 е нормализираното ниво на anti-C1s при първата проба на пациента в началото на проучването; N_x е нормализираното ниво на anti-C1s в крайното изследване (след среден период от 13 месеца на проследяване и лечение):

$$\Delta N = \frac{N_x - N_1}{N_1} \times 100\%.$$

3.7.2.1. Динамика на автоантителата срещу C1s и протеинурията.

Динамиката на протеинурията за този период показва средно начално ниво от 1,76±3,27 (от 0,02 до 15,72) g/d и средно ниво в края от 1,34±2,47 (от 0,01 до 12,39) g/d, като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, p=0,084).

Определихме и промяната на протеинурията (ΔPU) спрямо изходната протеинурия (PU_1 – протеинурията при първото изследване (g/d); PU_x – протеинурия при последното изследване (g/d) отново за среден период на проследяване и лечение от 13 месеца:

$$\Delta PU = \frac{PU_x - PU_1}{PU_1} \times 100\%.$$

Липсва статистически значима корелационна зависимост между промяната на нивата на anti-C1s ($\Delta N\%$) и промяната на протеинурията ($\Delta PU\%$) (Spearman, $r=0,19$; $p=0,088$).

Липсва статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-C1s и протеинурията при всички изследваните в динамика проби от пациентите с ЛН (Spearman, $r=0,05$; $p=0,225$, Фигура 49A1). Сред всички проби от пациентите с ЛН, които някога са имали екстраренални прояви на СЛЕ, също липсва статистически значима корелация между нормализираните нива на anti-C1s и протеинурията (Spearman, $r=0,07$; $p=0,161$, Фигура 49A2). При пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ също няма статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-C1s и протеинурията (Spearman, $r=-0,23$; $p=0,051$, Фигура 49A3).

3.7.2.2. Динамика на автоантителата срещу C1s и бъбречната функция.

Динамиката на eGFR (mL/min) за периода на проследяване и лечение на пациентите с ЛН показва

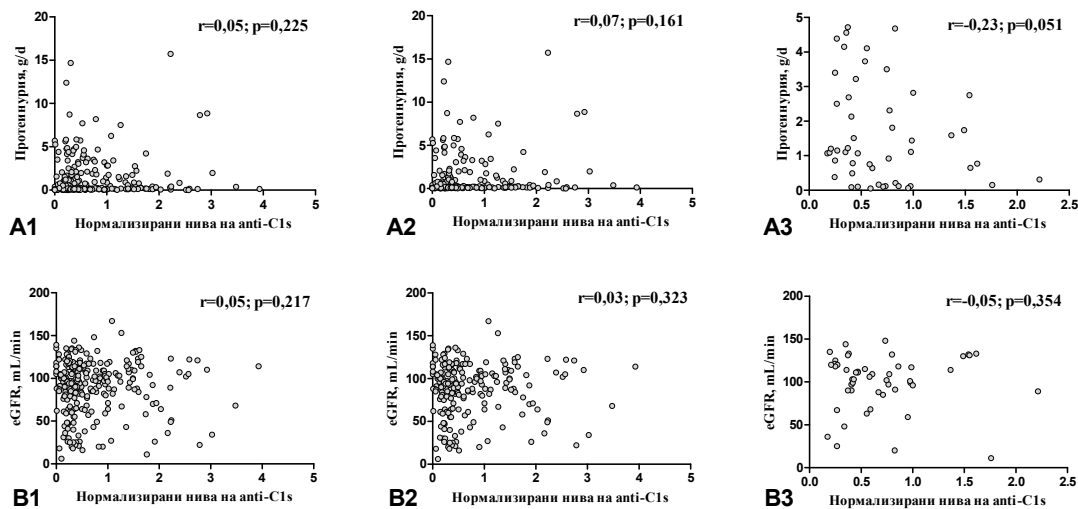
средно начално ниво от $91,3 \pm 31,1$ (от 18,0 до 136,0) mL/min и средно ниво в края от $94,0 \pm 29,9$ (от 25,0 до 153,0) mL/min, като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,153$).

Аналогично на горепосоченото, определихме промяната на eGFR (ΔGFR) спрямо изходната GFR при пациентите, изследвани за anti-C1s ($GFR_1 - GFR$ при първото изследване (mL/min); $GFR_x - GFR$ при изследването след среден период на проследяване от 13 месеца (mL/min)):

$$\Delta GFR = \frac{GFR_x - GFR_1}{GFR_1} \times 100\%.$$

Не установихме статистически значима корелационна зависимост между промяната на нормализираното ниво на anti-C1s спрямо изходното ($\Delta N\%$) и промяната на eGFR спрямо изходната ($\Delta eGFR$) за среден период от 13 месеца при пациентите с ЛН (Spearman, $r=0,01$; $p=0,477$).

Липсват статистически значими корелационни зависимости между нивата на anti-C1s и eGFR при всички изследвани в динамика проби от пациентите с ЛН (Spearman, $r=0,05$; $p=0,217$, Фигура 49B1); при пациентите с ЛН, които някога са имали екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=0,03$; $p=0,323$, Фигура 49B2), както и при пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=-0,05$; $p=0,354$, Фигура 49B3).



Фигура 49. Корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C1s и протеинурията и anti-C1s и изчислената скорост на гломерулна филтрация (eGFR) при всички изследвани в динамика проби от пациенти с ЛН (A1 и B1); при пробите, изследвани в динамика от пациенти с ЛН с екстраренални прояви на СЛЕ (A2 и B2) и при всички изследвани проби от пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ (A3 и B3).

3.7.2.3. Динамика на автоантителата срещу C1s и компонентите на комплемента C4 и C3.

Динамиката на плазмената концентрация на C4 (g/L) за периода на проследяване и лечение на пациентите с ЛН показва средно начално ниво от $0,22 \pm 0,12$ (от 0,03 до 0,53) g/L и средно ниво в края от $0,24 \pm 0,12$ (от 0,04 до 0,60) g/L, като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,090$). Динамиката на плазмената концентрация на C3 (g/L) за този период показва средно начално ниво от $1,15 \pm 0,36$ (от 0,44 до 1,88) g/L и средно ниво в края от $1,20 \pm 0,25$ (от 0,55 до 1,74) g/L, като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,288$).

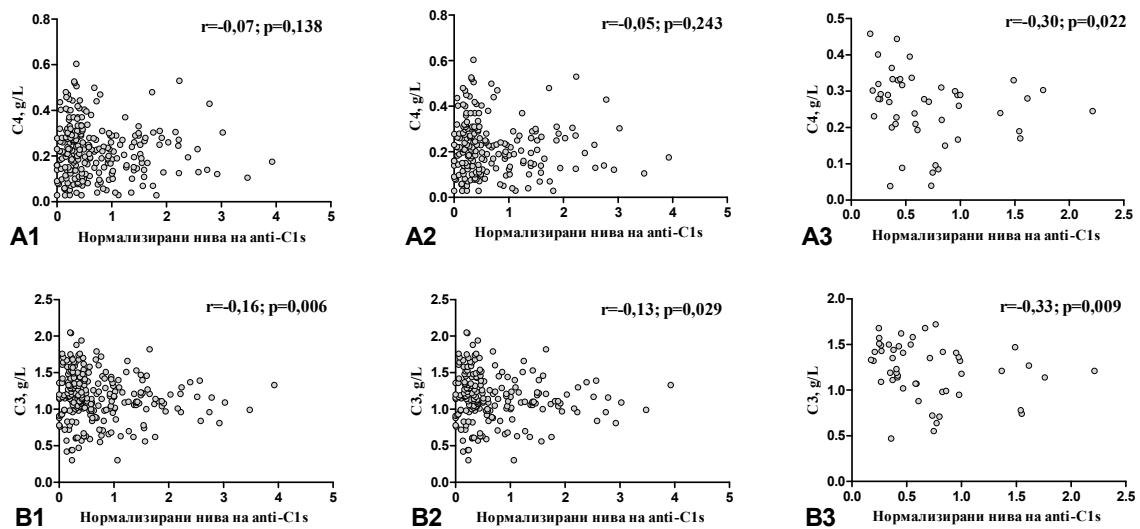
Аналогично, определихме и промените на C4 и C3 ($\Delta C4$ и $\Delta C3$) спрямо съответните изходни нива на C4 и C3 при изследването в началото (C_1 – съответното ниво на комплемента (C4 и C3) (g/L) в началото; C_x – съответното ниво на комплемента (C4 и C3) (g/L) в края на периода на проследяване):

$$\Delta C = \frac{C_x - C_1}{C_1} \times 100\%.$$

Установихме наличие на статистически значима отрицателна корелационна зависимост между промяната на нормализираните нива на anti-C1s спрямо изходните ($\Delta N\%$) и промяната на концентрацията на C4 спрямо изходната ($\Delta C4$) за периода на проследяване (Spearman, $r=-0,32$; $p=0,022$) и

липса на статистически значима корелационна зависимост между промяната на нормализираните нива на anti-C1s спрямо изходните ($\Delta N\%$) и промяната на концентрацията на C3 спрямо изходната ($\Delta C3$) за същия период на проследяване (Spearman, $r=-0,09$; $p=0,281$).

При изследване на зависимостите между нивата на anti-C1s и плазмените концентрации на C4 и C3 установихме, че сред всички пациенти с ЛН и сред пациентите с ЛН и екстраренални прояви на СЛЕ липсва статистически значима корелационна зависимост между нивото на anti-C1s и плазмената концентрация на C4 (Spearman, съответно: $r=-0,07$; $p=0,138$ и $r=-0,05$; $p=0,243$) (Фигура 50 A1 и A2), като е налице статистически значима отрицателна корелация между нивата на anti-C1s и концентрацията на C4 само сред пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=-0,30$; $p=0,022$, Фигура 50A3). Установихме статистически значими отрицателни корелационни зависимости между нивата на anti-C1s и концентрациите на C3 сред всички пациентите с ЛН, сред тези с ЛН и екстраренални прояви на СЛЕ и сред пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, съответно: $r=-0,16$; $p=0,006$, $r=-0,13$; $p=0,029$ и $r=-0,33$; $p=0,009$) (Фигура 50 B1, B2 и B3).

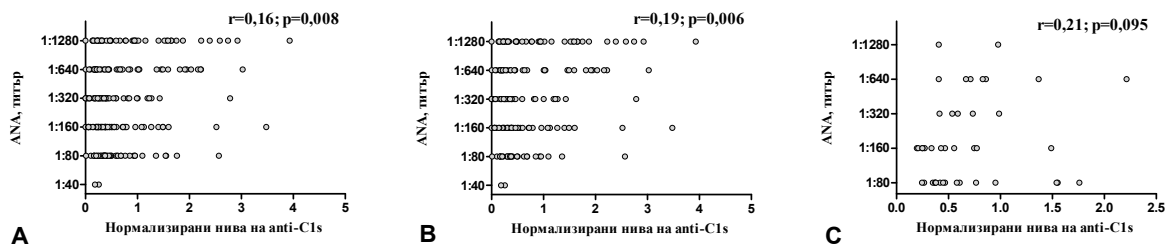


Фигура 50. Корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C1s, изследвани в динамика от пациентите с ЛН и плазмените концентрации на C4 (A) и C3 (B) в тези проби. (A1 и B1) При всички пациенти с ЛН; (A2 и B2) При пациентите с ЛН с екстраренални прояви на СЛЕ; (A3 и B3) При пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ. (Spearman).

3.7.2.4. Динамика на автоантителата срещу C1s и антинуклеарните автоантитела (ANA).

Динамиката на титъра на ANA за периода на проследяване и лечение на пациентите с ЛН показва средно начално ниво (median) от 1:640 (от 1:40 до 1:1280) и средно ниво в края (median) от 1:320 (от 1:80 до 1:1280), като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,078$).

Проучвайки зависимостите между нивото на anti-C1s и титъра на ANA сред всички пациенти с ЛН, изследвани в динамика (при които са изследвани едновременно anti-C1s и ANA, $N=220$ проби), установихме, че е налице статистически значима позитивна корелационна зависимост между нормализираното ниво на anti-C1s и титъра на ANA (Spearman, $r=0,16$; $p=0,008$) (Фигура 51A). При изследвания сред групите от пациентите с ЛН с екстраренални прояви на СЛЕ също установихме статистически значима позитивна корелация (Spearman, $r=0,19$; $p=0,006$) (Фигура 51B), докато при пациенти с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ не установихме статистически значима корелационна зависимост (Spearman, $r=0,21$; $p=0,095$) (Фигура 51C).

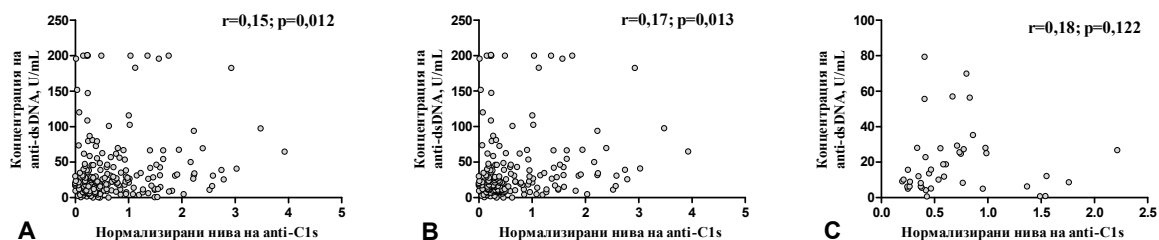


Фигура 51. Корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C1s и титрите на ANA): **A.** При всички проведени в динамика проби от пациентите с ЛН (Spearman, $r=0,16$; $p=0,008$); **B.** При пациентите с ЛН и екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=0,19$; $p=0,006$); **C.** При пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=0,21$; $p=0,095$).

3.7.2.5. Динамика на автоантителата срещу C1s и автоантителата срещу двойноверижна ДНК (anti-dsDNA).

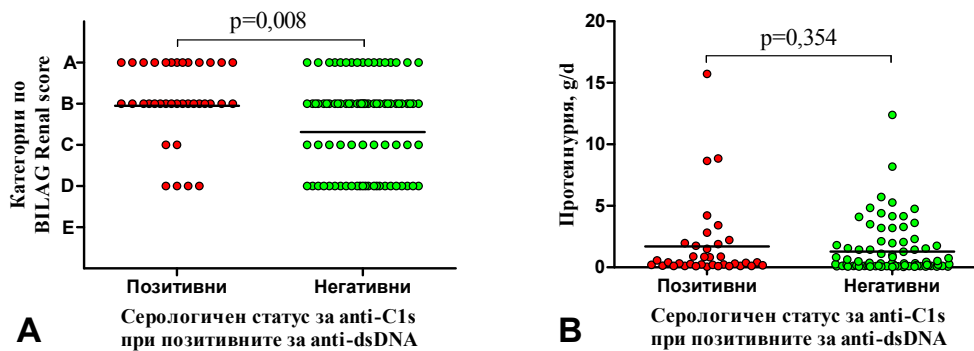
Динамиката на концентрацията на anti-dsDNA (U/mL) за периода на проследяване и лечение на пациентите с ЛН показва средно начално ниво от $32,6 \pm 37,0$ (от 5,6 до 195,8) U/mL и средно ниво в края от $33,2 \pm 43,8$ (от 0,1 до 183, 0) U/mL, като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,132$).

Проучвайки зависимостите между нивото на anti-C1s и концентрацията на anti-dsDNA (U/mL) сред всички пациенти с ЛН, изследвани в динамика (при които са изследвани едновременно anti-C1s и anti-dsDNA, $N=224$ проби), установихме наличие на статистически значима позитивна корелационна зависимост между нормализираното ниво на anti-C1s и концентрацията на anti-dsDNA (Spearman, $r=0,15$; $p=0,012$, Фигура 52A). При пациентите с ЛН с екстраренални прояви на СЛЕ също установихме статистически значима позитивна корелационна зависимост (Spearman, $r=0,17$; $p=0,013$, Фигура 52B). Единствено при пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ липсва на статистически значима корелационна зависимост (Spearman, $r=0,18$; $p=0,122$, Фигура 52C).



Фигура 52. Корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C1s и концентрациите на anti-dsDNA (U/mL) при: **A.** Всички пациентите с ЛН, изследвани в динамика (Spearman, $r=0,15$; $p=0,012$) и **B.** При пациентите с ЛН с екстраренални прояви на СЛЕ, изследвани в динамика (Spearman, $r=0,17$; $p=0,013$). **C.** При пациенти с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=0,18$; $p=0,122$).

При пациентите, изследвани в динамика, позитивни едновременно за anti-dsDNA и anti-C1s, средният ранг (категория на ЛН) на BILAG Renal score е статистически значимо по-висок от този при пациентите, позитивни за anti-dsDNA и негативни за anti-C1s (Mann-Whitney, $p=0,008$) (Фигура 53A). При пациентите, изследвани в динамика, позитивни едновременно за anti-dsDNA и anti-C1s, средното ниво на протеинурията ($1,70 \pm 3,19$ g/d) е сравнително, но статистически незначимо по-високо от това при пациентите, позитивни за anti-dsDNA и негативни за anti-C1s ($1,29 \pm 2,06$ g/d) (Mann-Whitney, $p=0,354$) (Фигура 53B).



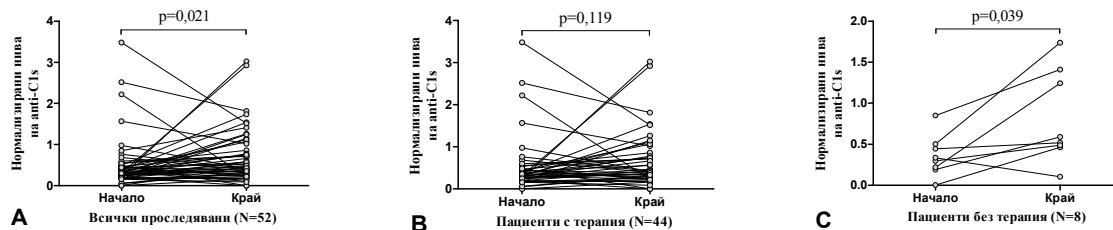
Фигура 53. А. Сравнителен анализ между категориите (ранговете) по BILAG Renal score при пациентите с ЛН, изследвани в динамика, позитивни за anti-dsDNA. (Mann-Whitney, $p=0,008$). **В.** Сравнителен анализ между средните нива на протеинурията при пациентите, позитивни едновременно за anti-dsDNA и anti-C1s и позитивни за anti-dsDNA и негативни за anti-C1s (Mann-Whitney, $p=0,354$).

5.3.8. Автоантитела срещу C1s и някои аспекти на лечението при пациентите с ЛН.

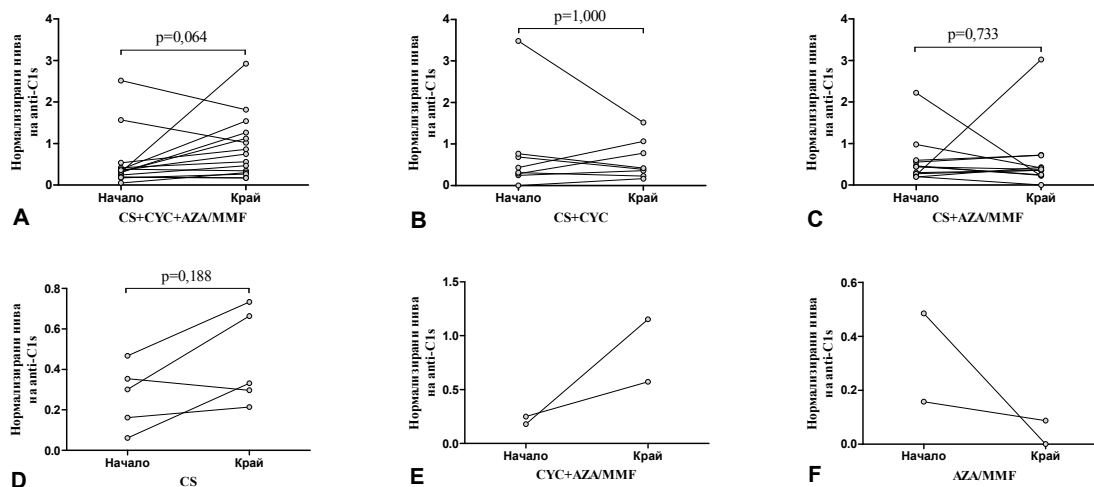
При всички проследявани пациенти в началния момент средното нормализирано ниво на anti-C1s е $0,507 \pm 0,629$ (от 0,000 до 3,480), а в края на периода на проследяване – $0,697 \pm 0,646$ (от 0,000 до 3,026), като разликата е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,021$) (Фигура 54А). При пациентите с проведена имунопатогенетична терапия в рамките на периода на проследяване, средното нормализирано ниво на anti-C1s в началото е $0,534 \pm 0,673$ (от 0,000 до 3,480), а в края – $0,674 \pm 0,663$ (от 0,000 до 3,026), като в тази група не установихме статистически значима разлика между началното и крайното ниво (Wilcoxon signed rank test, $p=0,119$) (Фигура 54В). В групата пациенти, при които не е провеждана имунопатогенетична терапия, средното нормализирано ниво на anti-C1s в началото е $0,356 \pm 0,253$ (от 0,004 до 0,852), а в края – $0,820 \pm 0,569$ (от 0,105 до 1,738), като е налице статистически значима разлика между тези нива (Wilcoxon signed rank test, $p=0,039$) (Фигура 54С).

С оглед вида на проведеното имунопатогенетично лечение, сред пациентите, при които е провеждано такова, обособихме основно 6 групи: 15 (34,1%) пациенти, при които е провеждано комбинирано лечение с CS+CYC+AZA/MMF; 8 (18,2%) пациенти, при които е провеждано комбинирано лечение с CS+CYC; 12 (27,3%) пациенти, при които е провеждано комбинирано лечение с CS+AZA или CS+MMF; 5 (11,4%) пациенти, при които е провеждана монотерапия с CS; 2 (4,5%) пациенти, при които е провеждано комбинирано лечение с CYC и AZA и 2 (4,5%) пациенти, при които е провеждана монотерапия: с AZA при единия и с MMF при другия.

При сравнителен анализ на нивата на anti-C1s в началото и в края на проведеното лечение при различните групи пациенти установихме следното: в групата на терапия с CS+CYC+AZA/MMF средното нормализирано ниво на anti-C1s в началото е $0,531 \pm 0,651$ (от 0,052 до 2,520), а в края – $0,906 \pm 0,756$ (от 0,170 до 2,926), като в тази група нивото се увеличава, но разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,064$) (Фигура 55А); в групата на лечение с CS+CYC средното ниво в началото е $0,775 \pm 1,120$ (от 0,000 до 3,480), а в края – $0,615 \pm 0,471$ (от 0,166 до 1,520), като в тази група средното ниво намалява, но разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=1,000$, Фигура 55В); в групата на лечение с CS+AZA/MMF средното ниво в началото е $0,577 \pm 0,563$ (от 0,197 до 2,223), а в края – $0,592 \pm 0,792$ (от 0,000 до 3,026), като в тази група средното ниво се увеличава, но разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,733$) (Фигура 55С); в групата на монотерапия с CS средното ниво в началото е $0,269 \pm 0,160$ (от 0,061 до 0,467), а в края – $0,448 \pm 0,234$ (от 0,214 до 0,733), като средното ниво в групата се увеличава, но разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,188$) (Фигура 55Д); в групите на лечение с CYC+AZA и AZA/MMF попадат по 2 пациенти, като от Фигура 55 Е и F се вижда увеличаване на нивата на anti-C1s в групата на терапия с CYC+AZA и намаляване на нивата в групата на терапия с AZA/MMF, но поради малкия брой на пациентите статистическият анализ в тези две групи не е коректен.



Фигура 54. Крайни и начални нива на anti-C1s при: **A.** Всички проследявани пациенти (N=52); **B.** Пациентите, при които е провеждана имунопатогенетична терапия (N=44) и **C.** Пациентите, при които не е провеждана имунопатогенетична терапия през периода на проследяване (N=8) (Wilcoxon signed rank test).



Фигура 55. Нормализирани нива на anti-C1s в началото и в края на период на проследяване при пациенти, при които е провеждана терапия с: **A.** CS+CYC+AZA/MMF – средното ниво на anti-C1s се повишава в края, но разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,064$); **B.** CS+CYC – средното ниво на anti-C1s намалява в края, но разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=1,000$); **C.** CS+AZA/MMF – средното ниво на anti-C1s леко нараства в края, но разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,733$); **D.** CS – средното ниво на anti-C1s се повишава в края, но разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,188$). **E.** CYC+AZA – двама пациенти, при които нивата на anti-C1s нарастват в края; **F.** MMF при един пациент и AZA при един пациент, като нивата на anti-C1s намаляват в края.

4. АВТОАНТИТЕЛА СРЕЩУ С4 КОМПОНЕНТА НА КОМПЛЕМЕНТА.

Автоантитела срещу С4 (anti-C4) са изследвани при 74 (76,3% от първоначално включените в проучването) пациенти, като в динамика са изследвани общо 266 проби на пациентите с ЛН. Anti-C4 са изследвани и при 72 здрави доброволци (контроли), без автоимунни и инфекциозни възпалителни заболявания, със запазена бъбречна, чернодробна и хемопоетична функции. При изследваните за anti-C4 в контролната група здрави доброволци се установиха плазмени нива на anti-C4 $0,091 \pm 0,070$ единици оптична плътност при дължина на вълната от 450 nm (OD 450 nm) на оптичния анализатор.

Определихме граничната стойност (cut-off), над която нивата на anti-C4 при изследваните пациенти с ЛН приехме за патологично повишени, а именно:

$$\text{Cut-off} = 0,091 + 2 \times 0,070 = 0,231.$$

Проведохме нормализиране на стойностите на нивата на anti-C4 в групите пациенти с ЛН, представяйки нормализираните нива на anti-C4 като съотношение на получените стойности за оптичната плътност към нивото на cut-off за лабораторията. По този начин, за гранична стойност се приема 1,00, над която нормализираните нива на anti-C4 се приемат за повишени, а под която – за референтни.

Установихме патологично повишени титри на anti-C4 при 23 (31,1%) от изходно изследваните пациенти с ЛН. Сред изследваните в динамика общо 266 проби от кръвни плазми на пациентите с ЛН установихме патологично повишени нива на anti-C4 при 56 (21,1%) от пробите.

4.1. Автоантитела срещу С4 и пола на пациентите с ЛН.

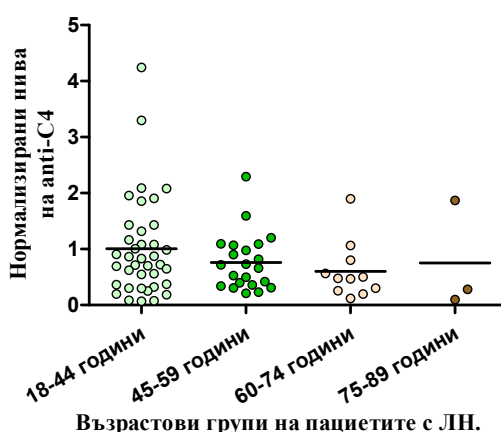
При мъжете с ЛН се установиха патологично повишени нива на anti-C4 при 3 (20,0%), докато при жените с ЛН – при 20 (33,9%). Липсва статистически значимо влияние на пола на пациентите с ЛН върху наличието на патологично повишени нива на anti-C4 (Fisher's exact test, $p=0,365$).

При мъжете с ЛН средното нормализирано ниво на anti-C4 ($0,757 \pm 0,858$) не се различава статистически значимо от това при жените с ЛН ($0,889 \pm 0,718$) (Mann-Whitney, $p=0,162$).

4.2. Автоантитела срещу С4 и възрастта на пациентите с ЛН.

Във възрастовата група от 18 до 44 години позитивни за anti-C4 са 14 (36,8%) пациенти; във възрастовата група от 45 до 59 години позитивни за anti-C4 са 6 (27,3%) пациенти; във възрастовата група от 60 до 74 години позитивни за anti-C4 са 2 (18,2%) пациенти; във възрастовата група от 75 до 89 години позитивни за anti-C4 са 1 (33,3%).

Във възрастовите групи по СЗО, средните нормализирани нива на anti-C4 са както следва: в групата от 18 до 44 години: $1,004 \pm 0,883$; в групата от 45 до 59 години: $0,762 \pm 0,504$; в групата от 60 до 74 години: $0,604 \pm 0,508$ и в групата от 75 до 89 години: $0,750 \pm 0,974$. Данните за възрастовото разпределение на пациентите с ЛН и нормализираните нива на anti-C4 са представени на Фигура 56.



Фигура 56. Средни нива на anti-C4 в различните възрастови групи по СЗО при пациентите с ЛН.

Липсва статистически значима зависимост на влиянието на възрастта като фактор върху нивата на anti-C4 (One-way ANOVA, $p=0,371$; Post test for linear trend, $p=0,503$). Не установихме статистически значима разлика в нормализираните нива на anti-C4 между различните възрастови групи пациенти с ЛН (Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$).

Не се установи статистически значима корелационна зависимост между възрастта на изходно изследваните пациенти с ЛН и нивата на anti-C4 (Spearman, $r=-0,18$; $p=0,064$).

4.3. Автоантитела срещу C4 и давността на ЛН.

Средната давност на ЛН при изследваната група пациенти е 10,3 години. При съпоставяне на нормализираните нива на anti-C4 при пациенти с давност на ЛН по-малка от 10,3 години ($0,925\pm 0,849$) и тези при пациентите с давност на ЛН над 10,3 години ($0,784\pm 0,594$) не установихме статистически значима разлика (Mann-Whitney, $p=0,617$).

Не установихме статистически значима корелационна зависимост между anti-C4 и давността на ЛН (Spearman, $r=-0,08$, $p=0,250$).

4.4. Автоантитела срещу C4 и основни клиничко-лабораторни параметри на ЛН.

4.4.1. Автоантитела срещу C4 и протеинурията.

При пациентите, позитивни за anti-C4, средното ниво на протеинурията е $2,51\pm 4,43$ g/d, докато при пациентите, негативни за anti-C4 – $1,32\pm 1,92$ g/d. Въпреки че при позитивните за anti-C4 пациенти нивото на протеинурията е сравнително по-високо от това при пациентите, негативни за anti-C4, тази разлика не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,744$).

4.4.2. Автоантитела срещу C4 и уринен седимент.

Сред изследваните в динамика лабораторни проби от пациенти с ЛН, които са позитивни за anti-C4, патологично активен уринен седимент се установи при 36 (64,3%) от пробите, докато пробите, негативни за anti-C4, без активен седимент са 118 (56,2%). Това разпределение показва, че съществува статистически значимо влияние на позитивния серологичен статус за anti-C4 върху наличието на патологично активен уринен седимент (Fisher's exact test, $p=0,007$).

При пациентите с патологично активен уринен седимент, средното нормализирано ниво на anti-C4 е $0,924\pm 0,794$ (от 0,078 до 4,242), докато при тези без патологично активен седимент това ниво е сравнително по-ниско – $0,801\pm 0,697$ (от 0,069 до 3,299), като разликата в нивата на anti-C4 не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,355$). При пробите от пациенти с ЛН, изследвани в динамика, които са с патологично активен уринен седимент, се установи средно нормализирано ниво на anti-C4 $0,771\pm 0,616$ (от 0,000 до 4,242), а при пробите от пациентите без активен уринен седимент това ниво е сравнително по-ниско: $0,593\pm 0,502$ (от 0,000 до 3,299), като разликата е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,007$).

4.4.3. Автоантитела срещу C4 и бъбречна функция.

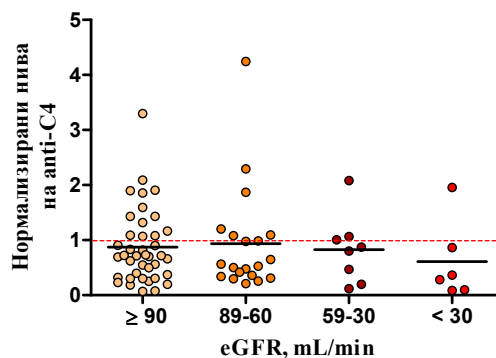
При пациентите с eGFR ≥ 60 mL/min се установи средно нормализирано ниво на anti-C4 $0,733\pm 0,647$ (от 0,087 до 2,082), докато при пациентите с eGFR ≥ 60 mL/min средното ниво на anti-C4 е сравнително по-високо – $0,893\pm 0,767$ (от 0,069 до 4,242). Въпреки относително по-високото ниво в групата с компенсирана бъбречна функция, разликата между нивата на anti-C4 в двете групи пациенти не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,377$).

Липсва корелационна зависимост между нивата на anti-C4 и eGFR (Spearman, $r=0,02$, $p=0,895$).

В групата от пациенти с eGFR ≥ 90 mL/min с позитивни anti-C4 са 13 (32,5%) пациенти, а средното нормализирано ниво на anti-C4 е $0,872\pm 0,667$ (от 0,069 до 3,299); в групата пациенти с eGFR от 89 до 60 mL/min с позитивни anti-C4 са 6 (30,0%) пациенти, а средното нормализирано ниво на anti-C4 е $0,933\pm 0,954$ (от 0,212 до 4,242); в групата пациенти с eGFR от 59 до 30 mL/min с позитивни anti-C4 са 3 (37,5%) пациенти, а средното нормализирано ниво на anti-C4 е $0,826\pm 0,620$ (от 0,117 до 2,082) и в групата пациенти с eGFR под 30 mL/min с позитивни anti-C4 е 1 (16,7%) пациент, а средното нормализирано ниво на anti-C4 е $0,609\pm 0,719$ (от 0,087 до 1,957) (с eGFR < 15 mL/min са само 2 пациенти, поради което, с оглед коректността на статистическия анализ обединихме групите с eGFR 29-15 и < 15 mL/min в обща група).

Липсва статистически значима разлика между нивата на anti-C4 при отделните групи от пациенти с ЛН, обособени въз основа на eGFR, като липсва статистически значима зависимост между тези нива и бъбречната функция (One-way ANOVA, $p=0,831$; Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$; Post test for linear trend, $p=0,392$) (Фигура 57).

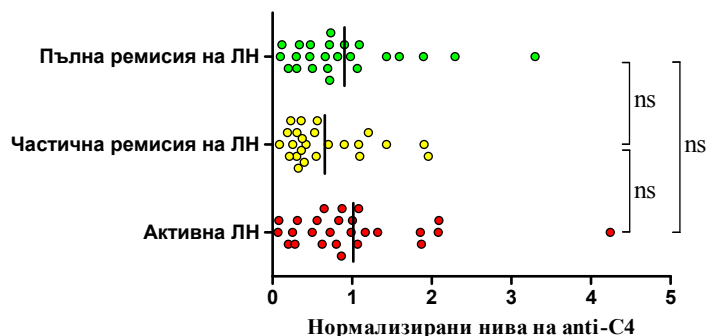
Липсва статистически значимо влияние на позитивния серологичен статус за anti-C4 върху наличието на декомпенсирана бъбречна функция при изследваната група пациенти с ЛН (Fisher's exact test, $p=1,000$).



Фигура 57. Средни нива на anti-C4 в обособените според eGFR групи от пациенти с ЛН, първоначално изследвани в проучването.

4.4.4. Автоантитела срещу C4 и комплексната клиничко-лабораторна оценка на активността на ЛН.

В групата с активна ЛН 10 (38,5%) пациенти са позитивни за anti-C4, в групата с частична ремисия на ЛН позитивни за anti-C4 са 6 (25,0%) пациенти и в групата с пълна клиничко-лабораторна ремисия на ЛН позитивни за anti-C4 са 7 (29,2%) пациенти. Средните нормализирани нива на anti-C4 в трите групи пациенти с ЛН са както следва: в групата с активна ЛН – $1,015 \pm 0,879$ (от 0,069 до 4,242); в групата с частична ремисия на ЛН – $0,656 \pm 0,529$ (от 0,087 до 1,957); в групата с пълна клиничко-лабораторна ремисия на ЛН – $0,904 \pm 0,753$ (от 0,100 до 3,299), както е показано на Фигура 58.



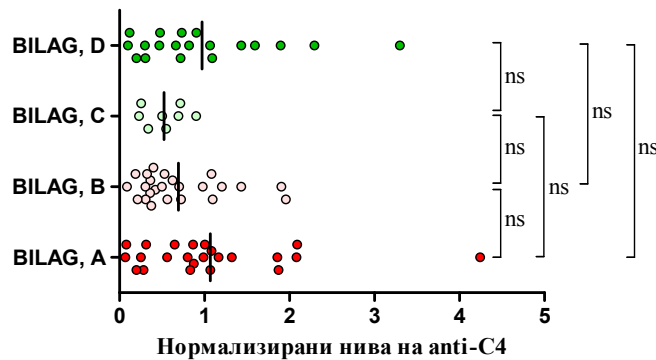
Фигура 58. Разпределение на пациентите с ЛН в зависимост от комплексната клиничко-лабораторна оценка на активността на ЛН и нормализираните нива на anti-C4. Представени са средните нормализирани нива на anti-C4 в трите групи.

Не установихме статистически значима разлика между нивата на anti-C4 при отделните групи от пациенти с ЛН, обособени въз основа на комплексната оценка на активността на ЛН, като липсва статистически значима зависимост между тези нива и активността на ЛН (One-way ANOVA, $p=0,224$; Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$; Post test for linear trend, $p=0,598$).

Сред позитивните за anti-C4 пациенти с ЛН, 10 (43,5%) са с активна ЛН, 6 (26,1%) от пациентите са с частична ремисия на ЛН и 7 (30,4%) от пациентите са в състояние на пълна клиничко-лабораторна ремисия на ЛН. Сред пациентите с ЛН с референтни нива на anti-C4, 16 (31,4%) са с активна ЛН, 18 (35,3%) са с частична ремисия на ЛН и 17 (33,3%) са с пълна клиничко-лабораторна ремисия на ЛН. При отчитане на липсата на клиничко-лабораторна активност на ЛН (имайки предвид само пациентите в състояние на пълна клиничко-лабораторна ремисия на ЛН) и наличието на активност на ЛН (обединявайки групите с активна ЛН и частична ремисия на ЛН), установихме, че няма статистически значимо влияние на наличието на позитивните нива на anti-C4 върху наличието на активност на ЛН (Fisher's exact test, $p=1,000$).

4.4.5. Автоантитела срещу C4 и комплексната оценка на ЛН (категиорите) по BILAG Renal score.

При пациентите с ЛН от категория А по BILAG Renal score позитивните за anti-C4 са 10 (43,5%); при пациентите от категория В позитивни за anti-C4 са 6 (25,0%); при пациентите от категория С няма позитивни за anti-C4 и при пациентите от категория D позитивни за anti-C4 са 7 (36,8%). Средните нормализирани нива на anti-C4 при пациентите с различни категории по BILAG Renal score на ЛН са както следва: при категория А: $1,067 \pm 0,923$ (от 0,069 до 4,242); при категория В: $0,693 \pm 0,516$ (от 0,087 до 1,957); при категория С: $0,523 \pm 0,239$ (от 0,229 до 0,900) и при категория D: $0,972 \pm 0,829$ (от 0,100 до 3,299), както е показано на Фигура 59.

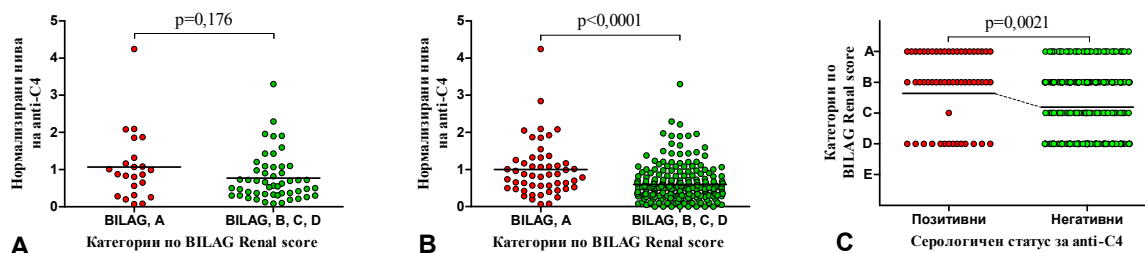


Фигура 59. Разпределение на пациентите с ЛН в зависимост от комплексната клиничко-лабораторна оценка на активността на ЛН по BILAG Renal score и нормализираните нива на anti-C4. Представени са средните нормализирани нива на anti-C4 в отделните категории.

Въпреки известното намаляване на средните нормализирани нива на anti-C4 с намаляване на активността на ЛН по BILAG Renal score (в категориите от А до С), липсва статистически значима разлика между нивата на anti-C4 при отделните групи от пациенти с ЛН, като също така липсва и статистически значима зависимост между тези нива и категорията по BILAG Renal score (One-way ANOVA, $p=0,167$; Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$; Post test for linear trend, $p=0,543$).

Сред всички изследвани в динамика проби от пациентите с ЛН, които са позитивни за anti-C4, пробите на пациенти от категория А по BILAG Renal score са 21 (37,5%), пробите на пациенти от категория В са 20 (35,7%), 1 (1,8%) е пробата от пациент с категория С, пробите на пациенти от категория D са 14 (25,0%). Сред негативните за anti-C4, пробите на пациенти от категория А по BILAG Renal score са 31 (14,8%), пробите на пациенти от категория В са 82 (39,0%), пробите на пациенти от категория С са 32 (15,2%), пробите на пациенти от категория D са 65 (31,0%). Въз основа на това разпределение установихме, че позитивният за anti-C4 серологичен статус при пациентите с ЛН определя статистически значимо наличието на категория А по BILAG Renal score при изследваната група пациенти (Fisher's exact test, $p=0,0005$) с чувствителност от 40,4%, специфичност от 83,6%, позитивна предиктивна стойност от 37,5% и негативна предиктивна стойност от 85,2%. Релативният риск за наличие на ЛН от категория А по BILAG е 2,5.

Средното нормализирано ниво на anti-C4 при пациентите от категория А по BILAG Renal score е $1,067 \pm 0,923$ (от 0,069 до 4,242), а средното нормализирано ниво на anti-C4 при всички останали пациенти с ЛН (от категории В, С и D) е $0,770 \pm 0,637$ (от 0,087 до 3,299). Макар нивото на anti-C4 при пациентите от категория А да е сравнително по-високо от това при останалите пациенти (Фигура 60А), тази разлика не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,176$). При сравнителен анализ на средните нормализирани нива на anti-C4 между всички изследвани в динамика проби от пациенти с категория А по BILAG Renal score ($0,997 \pm 0,746$ (от 0,069 до 4,242)) и тези с категории В, С и D ($0,602 \pm 0,484$ (от 0,000 до 3,299)) установихме статистически значимо по-високо ниво на anti-C4 в пробите от пациенти с категория А на ЛН (Mann-Whitney, $p<0,0001$) (Фигура 60В). При сравнителен рангов анализ между пациентите позитивни за anti-C4 и пациентите негативни за anti-C4 (сред всички изследвани в динамика проби) установихме статистически по-висока средна и геометрична средна на ранговете (категиорите по BILAG Renal score) при пациентите, позитивни за anti-C4 в сравнение със средната и геометричната средна на ранговете при пациентите, негативни за anti-C4 (Mann-Whitney, $p=0,0021$) (Фигура 60С).



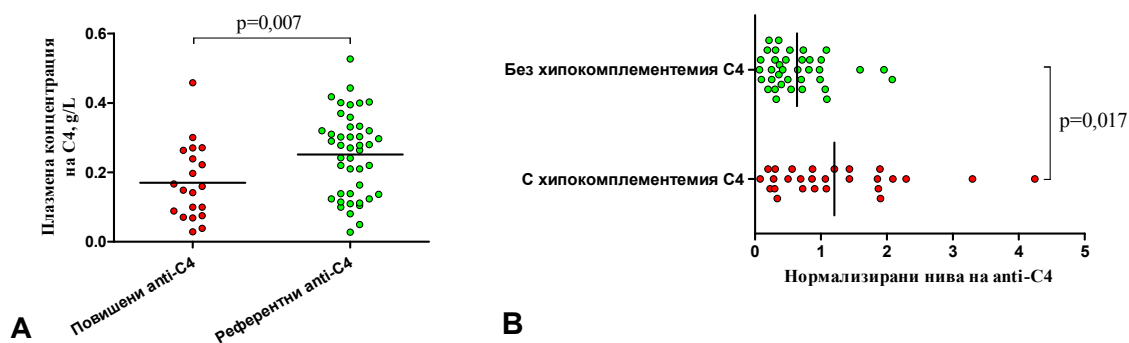
Фигура 60. Средни нормализирани нива на anti-C4 при пациенти с ЛН с категория А на ЛН по BILAG Renal score и при пациенти от останалите категории: **А.** при първоначално включените в проучването пациенти (Mann-Whitney, $p=0,176$); **В.** при всички изследвани в динамика проби от пациентите с ЛН (Mann-Whitney, $p<0,0001$). **С.** Категории на ЛН по BILAG Renal score (средна и геометрична средна на ранговете) при пациентите, позитивни за anti-C4 в сравнение с категорията при пациентите, негативни за anti-C4 (Mann-Whitney, $p=0,0021$).

4.5. Автоантитела срещу C4 и някои основни имунологични маркери при ЛН.

4.5.1. Автоантитела срещу C4 и нива на компонента C4 и C3.

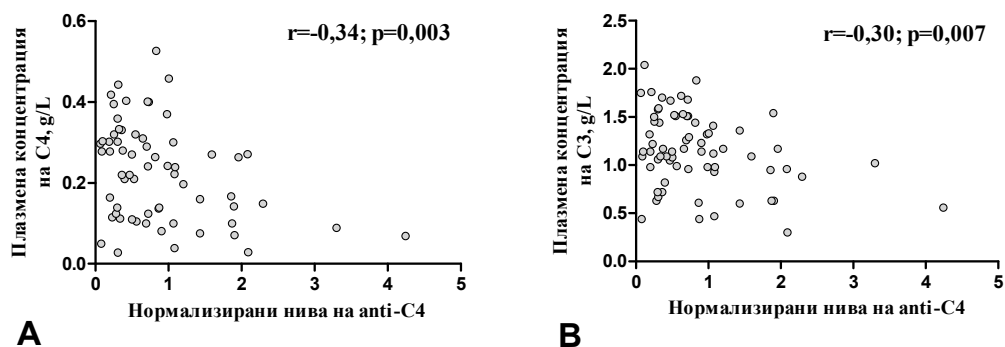
Сред пациентите с ЛН с повишени нива на anti-C4, плазмени концентрации на C4 са изследвани при 20 (86,9%), като хипокомplementемия C4 установихме при 13 (65,0%) от тези 20 пациенти. Сред пациентите с референтни нива на anti-C4, плазмени концентрации на C4 са изследвани при 44 (86,3%), като хипокомplementемия C4 установихме при 14 (31,8%) от тези 44 пациенти. Въз основа на това разпределение установихме статистически значимо влияние на наличието на позитивни anti-C4 върху наличието на хипокомplementемия C4 (Fisher's exact test, $p=0,016$).

Средната плазмена концентрация на C4 при пациентите с повишени anti-C4 е $0,171\pm 0,108$ g/L, която е статистически значимо по-ниска от тази при пациентите с референтни нива на anti-C4 – $0,252\pm 0,118$ g/L (Mann-Whitney, $p=0,007$), както е показано на Фигура 61А. Средното нормализирано ниво на anti-C4 при пациентите с хипокомplementемия C4 е $1,205\pm 0,995$, което е статистически значимо по-високо от средното нормализирано ниво на anti-C4 при пациентите без хипокомplementемия C4 – $0,637\pm 0,483$ (Mann-Whitney, $p=0,017$), както е показано на Фигура 61В.



Фигура 61. **А.** Плазмени концентрации на C4 при пациентите с ЛН в зависимост от серологичния статус по отношение на anti-C4 (Mann-Whitney, $p=0,007$). **В.** Нормализирани плазмени нива на anti-C4 при пациенти с ЛН в зависимост от наличието на хипокомplementемия C4 (Mann-Whitney, $p=0,017$).

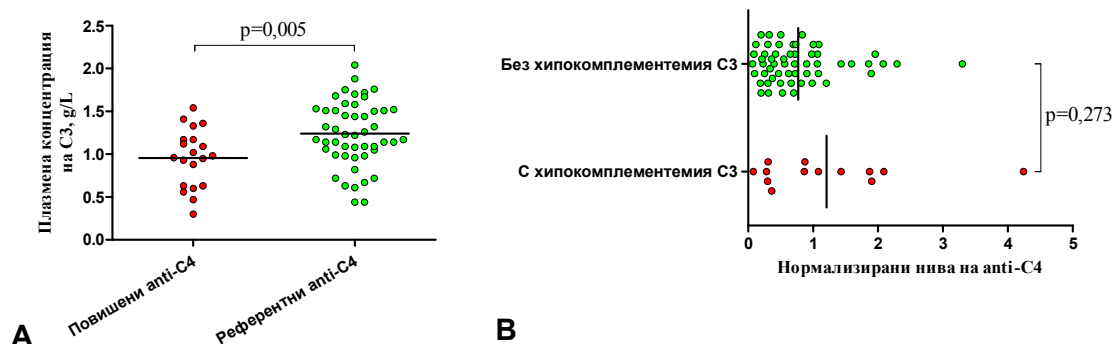
Налице е статистически значима отрицателна корелационна зависимост между нормализираните нива на anti-C4 и плазмените концентрации на C4 (Spearman, $r=-0,34$; $p=0,003$) (Фигура 62А).



Фигура 62. *А.* Корелационна зависимост между нормализираното ниво на anti-C4 и плазмената концентрация на C4 (g/L) (Spearman, $r=-0,34$; $p=0,003$). *Б.* Корелационна зависимост между нормализираното ниво на anti-C4 и плазмената концентрация на C3 (g/L) (Spearman, $r=-0,30$; $p=0,007$).

Сред пациентите с ЛН с повишени нива на anti-C4, плазмени концентрации на C3 са изследвани при 20 (87,0%), като хипокомplementемия C3 се установи при 6 (30,0%) от тези 20 пациенти. Сред пациентите с референтни нива на anti-C4, плазмени концентрации на C3 са изследвани при 49 (96,1%), като хипокомplementемия C3 се установи при 7 (14,3%) от тези 49 пациенти. Въз основа на това разпределение, установихме липса на статистически значимо влияние на наличието на позитивни anti-C4 върху наличието на хипокомplementемия C3 (Fisher's exact test, $p=0,176$).

Средната плазмената концентрация на C3 при пациентите с повишени anti-C4 е $0,955 \pm 0,337$ g/L, която е статистически значимо по-ниска от тази при пациентите с референтни нива на anti-C4 – $1,240 \pm 0,377$ g/L (Mann-Whitney, $p=0,005$), както е показано на Фигура 63А. Средното нормализирано ниво на anti-C4 при пациентите с хипокомplementемия C3 е $1,207 \pm 1,144$, което е сравнително по-високо, но без да се различава статистически значимо от средното ниво на anti-C4 при пациентите без хипокомplementемия C3 – $0,771 \pm 0,637$ (Mann-Whitney, $p=0,273$), както е показано на Фигура 63В.



Фигура 63. *А.* Плазмени концентрации на C3 при пациентите с ЛН в зависимост от серологичния статус по отношение на anti-C4 (Mann-Whitney, $p=0,005$). *Б.* Нормализирани плазмени нива на anti-C4 при пациенти с ЛН в зависимост от наличието на хипокомplementемия C3 (Mann-Whitney, $p=0,273$).

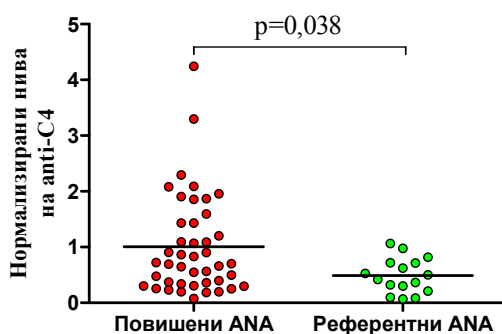
Налице е статистически значима отрицателна слаба по сила зависимост между нормализираните нива на anti-C4 и плазмените концентрации на C3 (Spearman, $r=-0,30$; $p=0,007$) (Фигура 62В).

4.5.2. Автоантитела срещу C4 и антинуклеарни автоантитела (ANA).

Сред първоначално включените в проучването пациенти с ЛН, позитивните за anti-C4 с патологично повишени ANA са 16 (94,1% от пациентите, позитивни за anti-C4, при които са изследвани ANA), а негативните за anti-C4, с референтни титри на ANA са 15 (35,7% от пациентите, негативни за anti-C4, при които са изследвани ANA). Въз основа на това разпределение установихме статистически

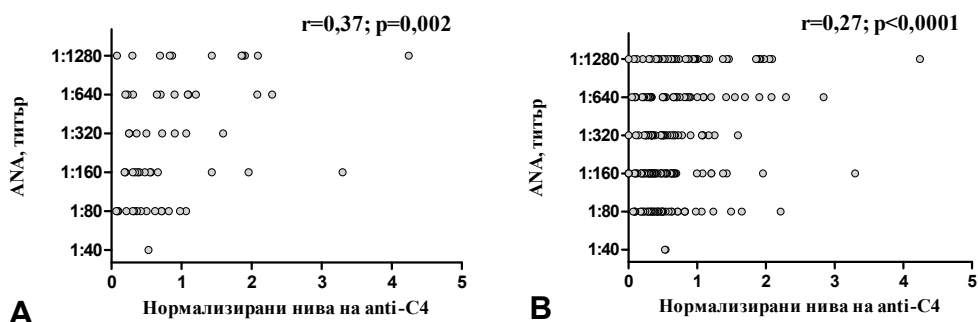
значимо влияние на наличието на повишени anti-C4 върху наличието на патологично повишени титри на ANA (Fisher's exact test, $p=0,024$).

Средното нормализирано ниво на anti-C4 при изходно изследваните пациенти с ЛН с патологично повишени титри на ANA е $1,007\pm 0,885$ – статистически значимо по-високо от нивото на anti-C4 при пациентите с референтни титри на ANA, което е $0,489\pm 0,311$ (Mann-Whitney, $p=0,038$) (Фигура 64).



Фигура 64. Нормализирани нива на anti-C4 при пациентите с патологично повишени титри на ANA и при тези с референтни титри на ANA (Mann-Whitney, $p=0,038$).

Налице е статистически значима позитивна корелационна зависимост между нормализираното ниво на anti-C4 и титъра на ANA сред първоначално включените в проучването пациенти (Spearman, $r=0,37$; $p=0,002$) (Фигура 65A) и на статистически значима позитивна корелационна зависимост между нормализираното ниво на anti-C4 и титъра на ANA сред всички изследвани в динамика проби от пациенти с ЛН (Spearman, $r=0,27$; $p<0,0001$) (Фигура 65B).



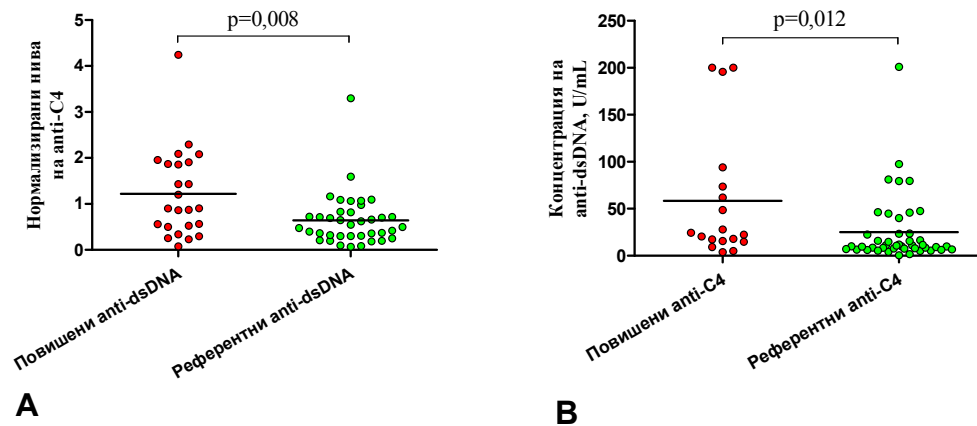
Фигура 65. Корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C4 и титрите на ANA: **A.** при изходно включените в проучването пациенти с ЛН . (Spearman, $r=0,37$; $p=0,002$) и **B.** при всички изследвани в динамика проби от пациенти с ЛН (Spearman, $r=0,27$; $p<0,0001$).

4.5.3. Автоантитела срещу C4 и автоантитела срещу двойноверижна ДНК (anti-dsDNA).

Пациентите, позитивни за anti-C4 с патологично повишени концентрации на anti-dsDNA са 11 (61,1% от позитивните за anti-C4 пациенти, при които са изследвани anti-dsDNA), а пациентите, негативни за anti-C4 с референтни концентрации на anti-dsDNA са 31 (70,5% от негативните за anti-C4, при които са изследвани и anti-dsDNA). Въз основа на това установихме статистически значимо влияние на наличието на патологично повишени нива на anti-C4 върху наличието на патологично повишени концентрации на anti-dsDNA (Fisher's exact test, $p=0,043$).

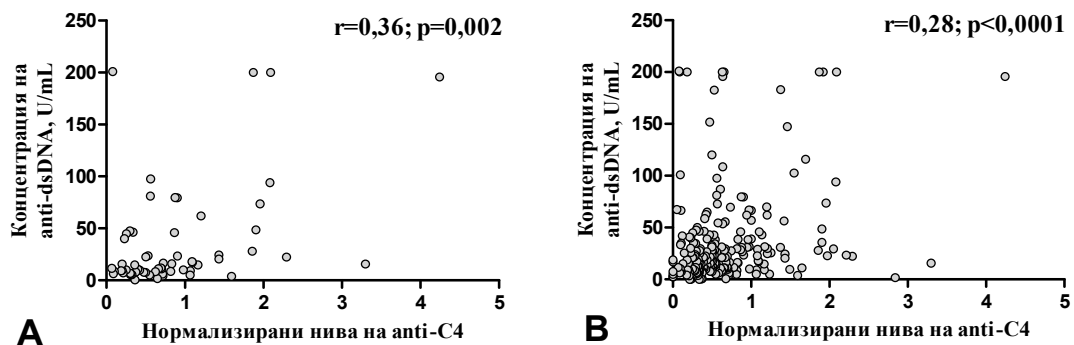
Средното нормализирано ниво на anti-C4 при изходно изследваните пациенти с ЛН с патологично повишени концентрации на anti-dsDNA ($1,219\pm 0,953$) е статистически значимо по-високо от средното ниво на anti-C4 при пациентите с референтни концентрации на anti-dsDNA ($0,644\pm 0,568$) (Mann-Whitney, $p=0,008$) (Фигура 66A). При пациентите с патологично повишени нива на anti-C4 средната концентрация на anti-dsDNA ($58,54\pm 68,89$ U/mL) е статистически значимо по-висока от средната концентрация на anti-

dsDNA ($25,16 \pm 36,07$ U/mL) при пациентите с референтни нива на anti-C4 (Mann-Whitney, $p=0,012$) (Фигура 66B).



Фигура 66. А. Нормализирани нива на anti-C4 при пациенти с повишени и при такива с референтни концентрации на anti-dsDNA (Mann-Whitney, $p=0,008$). В. Концентрации на anti-dsDNA при пациенти с патологично повишени и с референтни нива на anti-C4 (Mann-Whitney, $p=0,012$).

Налице е позитивна статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-C4 и концентрациите на anti-dsDNA при пациентите с ЛН първоначално включени в проучването (Spearman, $r=0,36$; $p=0,002$), а така също и при всички проследени в динамика проби от пациенти с ЛН (Spearman, $r=0,28$; $p<0,0001$) (Фигура 67 А и В).



Фигура 67. А. Корелационна зависимост между нормализираното ниво на anti-C4 и концентрацията на anti-dsDNA (U/mL) при изходно включените в проучването пациенти с ЛН (Spearman, $r=0,36$; $p=0,002$). В. Корелационна зависимост между нормализираното ниво на anti-C4 и концентрацията на anti-dsDNA (U/mL) при всички проби от пациенти с ЛН, проследени в динамика (Spearman, $r=0,28$; $p<0,0001$).

4.6. Автоантитела срещу C4 и някои хистологични признаци на ЛН.

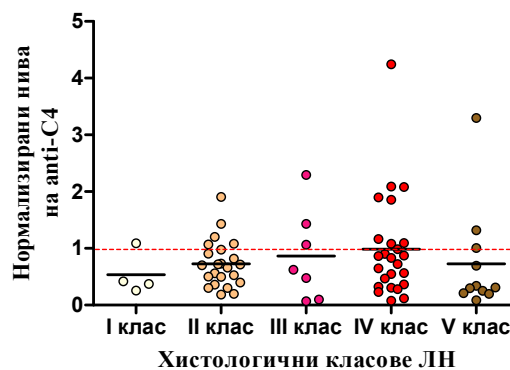
Пациентите с ЛН, са диагностицирани с провеждане на пункционна бъбречна биопсия, като хистологична диагноза е налична при 71 (95,9%) от включените в проучването пациенти, при които са изследвани anti-C4. Определени са хистологичните класове на ЛН, съгласно критериите на International Society of Nephrology (ISN) и Renal Pathology Society (RPS). Отчетени са хистологичните индекси на активност и хроничност, съгласно критериите на National Institutes of Health (NIH). С оглед клинична достоверност на изследваните зависимости, когато са изследвани връзки, касаещи белези на хистологична активност на ЛН, при статистическите анализи са отчитани само случаите, при които времето между вземането на кръвните проби за изследване на anti-C4 и провеждането на пункционната

бъбречна биопсия е било до 12 месеца. Това условие е изпълнено при 27 (38,0%) от пациентите с ЛН, включени в проучването.

4.6.1. Автоантитела срещу С4 и хистологичният клас на ЛН.

При пациентите с I хистологичен клас ЛН позитивен за anti-C4 е 1 (25,0%) пациент; при тези с II хистологичен клас ЛН позитивни са 5 (21,7%) пациенти; при тези с III хистологичен клас ЛН позитивни са 3 (42,9%) пациенти; при тези с IV хистологичен клас ЛН позитивни са 8 (32,0%) пациенти; при тези с V хистологичен клас ЛН позитивни са 3 (27,3%) пациенти; пациентът с VI хистологичен клас ЛН е позитивен; при останалите 3 пациенти, при които не е провеждано хистологично уточняване на ЛН 2 са позитивни и 1 е с референтно ниво на anti-C4. Средните нормализирани нива на anti-C4 са съответно (Фигура 68): при пациентите с I хистологичен клас: $0,535 \pm 0,377$; при пациентите с II хистологичен клас: $0,729 \pm 0,416$; при пациентите с III хистологичен клас: $0,866 \pm 0,799$; при пациентите с IV хистологичен клас: $0,985 \pm 0,901$; при пациентите с V хистологичен клас: $0,726 \pm 0,934$ и нормализираното ниво при пациента с VI хистологичен клас е 1,957 (не е отразен на Фигура 68).

Липсва статистически значима разлика между нивата на anti-C4 при отделните хистологични класове ЛН, като също така липсва и статистически значима зависимост между тези нива и хистологичния клас ЛН (One-way ANOVA, $p=0,675$; Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$; Post test for linear trend, $p=0,476$).



Фигура 68. Средни нива на anti-C4 в зависимост от хистологичния клас на ЛН.

Сред пациентите, позитивни за anti-C4, такива с IV клас ЛН са 8 (38,1% от позитивните за anti-C4 с хистологична диагноза (21 пациенти)). При пациентите, негативни за anti-C4, такива с I, II, III, V или VI клас ЛН са 33 (66,0% от негативните за anti-C4 с хистологична диагноза (50 пациенти)). При изследване връзката между наличието на патологично повишени anti-C4 и наличието на ЛН от IV хистологичен клас установихме, че патологично повишените нива на anti-C4 не определят статистически значимо наличие на дифузна ЛН (IV хистологичен клас) (Fisher's exact test, $p=0,789$).

4.6.2. Автоантитела срещу С4 и основни хистологични лезии за активност и хроничност на ЛН.

В настоящото проучване изследвахме зависимостите между нивата на anti-C4 и хистологични белези на активност (ендокапилярна пролиферация, гломерулна левкоцитна инфилтрация, субендотелни депозити („телени бримки“), фибриноидна некроза и/или кариорексис, клетъчни полулуния и интерстициална инфилтрация) и хистологични белези на хроничност (гломерулна склероза, фиброзни полулуния, тубулна атрофия и интерстициална фиброза), както и връзката между нивата на anti-C4 и хистологичните индекси на активност и хроничност, определени на базата на горепосочените хистологични белези.

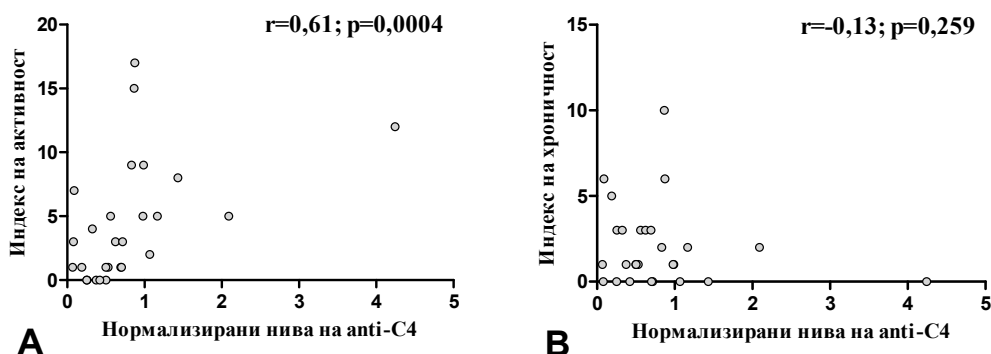
Таблица 21. Сравнителен анализ между нивата на anti-C4 при наличие и липса на хистологични белези за активност и хроничност при пациентите с ЛН. Представени са средните нива \pm стандартното отклонение (SD).

Хистологичен признак	Нормализирани нива на anti-C4 при:		p
	наличие на хистологичния признак	липса на хистологичния признак	
Ендокапилярна пролиферация	0,941 \pm 0,910	0,369 \pm 0,197	0,025
Гломерулна левкоцитна инфилтрация ¹	-	-	-
Субендотелни депозити, формиращи „телени бримки“ ²	1,872 \pm 1,409	0,547 \pm 0,350	0,0025
Фибриноидна некроза и/или кариорексис	1,098 \pm 1,163	0,613 \pm 0,500	0,114
Клетъчни полулуния	1,632 \pm 1,626	0,602 \pm 0,363	0,126
Интерстициално възпаление	0,756 \pm 0,429	0,814 \pm 1,000	0,328
Гломерулна склероза	0,599 \pm 0,500	1,035 \pm 1,082	0,124
Фиброзни полулуния	0,922 \pm 0,728	0,763 \pm 0,857	0,435
Тубулна атрофия	0,500 \pm 0,277	0,965 \pm 0,988	0,183
Интерстициална фиброза	0,705 \pm 0,328	0,836 \pm 0,991	0,488

¹ В групата с гломерулна левкоцитна инфилтрация попадат само 2 пациенти и данните от статистическия анализ не са достоверни.

На Таблица 21 са показани данните от сравнителния анализ между нивата на anti-C4 в групите с и без съответните хистологични признаци за активност и хроничност на ЛН. При пациентите с наличие на хистологични признаци за активност на ЛН, като ендокапилярна пролиферация и субендотелни депозити, формиращи телени бримки, нивата на anti-C4 при наличие на тези признаци са статистически значимо по-високи от нивата при липса на признаците (Mann-Whitney, съответно $p=0,025$ и $p=0,0025$). При наличие на фибриноидна некроза и клетъчни полулуния нивата на anti-C4 са сравнително по-високи в сравнение с нивата при отсъствие на тези белези за активност, но разликите не са статистически значими. Нивата на anti-C4 не се различават статистически значимо при пациентите с наличие и при тези с липса на хистологични белези за хроничност. При двамата пациенти с наличие на гломерулна левкоцитна инфилтрация нормализираните нива на anti-C4 са съответно 4,242 и 1,433 (позитивни за anti-C4).

Налице е статистически значима положителна корелационна зависимост между нивата на anti-C4 и хистологичния индекс на активност (Spearman, $r=0,61$; $p=0,0004$) (Фигура 69А). Липсва значима корелационна зависимост между нивата на anti-C4 и хистологичния индекс на хроничност (Spearman, $r=-0,13$; $p=0,259$) (Фигура 69В).



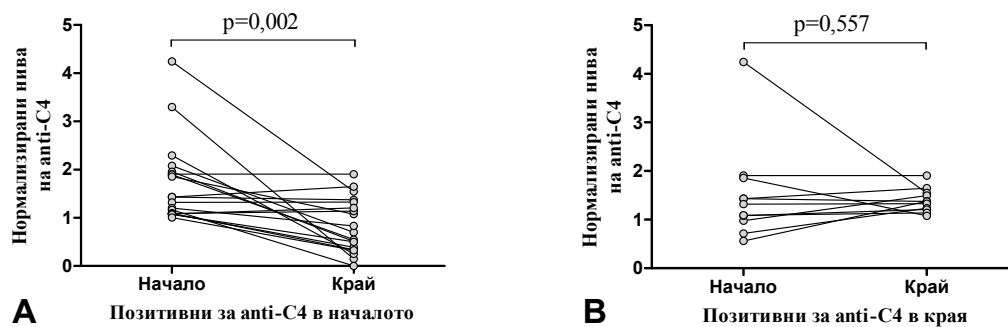
Фигура 69. А. Корелационна зависимост между нивата на anti-C4 и хистологичния индекс на активност при пациентите с ЛН (Spearman, $r=0,61$; $p=0,0004$). В. Корелационна зависимост между нивата на anti-C4 и хистологичния индекс на хроничност при пациентите с ЛН (Spearman, $r=-0,13$; $p=0,259$).

4.7. Прогностично значение и динамика на промените в нивата на автоантителата срещу C4.

При 52 (70,3%) от пациентите с ЛН, е налице проследяване за период от средно 13 (от 6 до 25) месеца, с между 2 и 11 проби, при които са определяни нивата на anti-C4 и останалите клинично-лабораторни и имунологични параметри на ЛН.

Сред изследваните в динамика общо 266 проби от кръвни плазми на пациентите с ЛН установихме

патологично повишени нива на anti-C4 при 56 (21,1%) от пробите. Изследвайки нивата на anti-C4 при проследените в динамика пациенти (с 2 и повече проби в хода на проучването при 52 пациенти с ЛН), установихме, че при първите проби, патологично повишени anti-C4 има при 19 (36,5%) от пациентите, докато след среден период на проследяване от 13 месеца, патологично повишени нива на anti-C4 са налице при 11 (21,2%) от пациентите. При 11 (57,9%) от пациентите с първоначално повишени нива на anti-C4, последните намаляват до референтни стойности, а при 8 (42,1%) от тези пациенти нивата се задържат в патологични граници. От пациентите с патологични anti-C4 на 13 месец от проследяването, при 8 (72,7%) нивата са били патологични от началото, а при 3 (27,3%) нарастват от изходно референтни. Средното нормализирано ниво на anti-C4 при пациентите, позитивни за anti-C4 в началото, е $1,711 \pm 0,846$ (от 1,004 до 4,242), докато след среден период от 13 месеца е $0,830 \pm 0,561$ (от 0,000 до 1,905), като е налице статистически значима разлика между тези две нива (Wilcoxon signed rank test, $p=0,002$) (Фигура 70А). Средното нормализирано ниво на anti-C4 при позитивните в края на периода на проследяване пациенти с ЛН е $1,394 \pm 0,243$ (от 1,078 до 1,905), статистически незначимо по-ниско от средното ниво на anti-C4 на същите тези пациенти в началото на проследяването, когато то е било $1,510 \pm 0,999$ (от 0,558 до 4,242) (Wilcoxon signed rank test, $p=0,557$) (Фигура 70В).



Фигура 70. Динамика на нивата на anti-C4 при позитивните в началото на периода на проследяване (А) и при позитивните в края на периода на проследяване (В) пациенти с ЛН.

4.7.1. Прогностично значение на автоантителата срещу C4.

При 42 (56,8%) от изходно включените в проучването пациенти с ЛН, при които са провеждани 3 или повече проби за anti-C4 в динамика, изследвахме връзките между нивата на anti-C4 и категорията по BILAG Renal score и нивата на anti-C4 и активността на ЛН, определена като активна, частична ремисия и пълна ремисия на ЛН. Повишаване на anti-C4 до патологични нива поне в една от пробите установихме при 25 (59,5%) от пациентите.

Пациентите с ЛН, при които отчетохме в динамика повишение на нивата на anti-C4 до патологични стойности с последващо повишение на категорията по BILAG са 13 (68,4% от всички, при които се установи повишаване на anti-C4 до патологични стойности в динамика). Това повишение на категорията по BILAG Renal score на ЛН се отчете в рамките на среден период от 3,4 (от 0,0 до 13,0) месеца след повишаване на нивата на anti-C4 до патологични стойности. Пациентите, при които не се отчете повишаване на нивата на anti-C4 до патологични стойности и не се отчете повишение на категорията по BILAG Renal score са 18 (78,3% от всички, при които не се отчете повишаване на anti-C4 до патологични нива). Разпределението на пациентите с ЛН според наличието или липсата на повишение на нивата на anti-C4 до патологични стойности и според наличието или липсата на повишение на категорията на ЛН по BILAG Renal score е показано на Таблица 22.

На базата на това разпределение установихме, че наличието на повишение на anti-C4 до патологични нива в динамика статистически значимо определя наличието на последващо повишаване на категорията на ЛН по BILAG Renal score в рамките на среден период от $3,4 \pm 5,0$ месеца (от 0,0 до 13,0 месеца) (Fisher's exact test, $p=0,0044$) с чувствителност от 72,2%, специфичност от 75,0%, позитивна предиктивна стойност от 68,4% и негативна предиктивна стойност от 78,3%. Относителният риск (RR) за повишаване категорията на ЛН по BILAG Renal score след повишаване на нивата на anti-C4 до патологични стойности определихме на 3,1.

Таблица 22. *Разпределение на пациентите с ЛН, проследявани в динамика с 3 и повече проби по време на проучването, според наличието или липсата на повишение на нивата на anti-C4 до патологични стойности и наличието или липсата на последващо повишение на категорията на ЛН по BILAG Renal score.*

Пациенти с ЛН	С повишение на категорията на ЛН по BILAG	Без повишение на категорията на ЛН по BILAG	Общо
С повишаване на anti-C4 до патологични нива	13	6	19
Без повишаване на anti-C4 до патологични нива	5	18	23
Общо	18	24	42

Пациентите, при които в динамика anti-C4 нарастват до патологични нива, заедно с последващо активиране на ЛН са 13 (72,2% от всички, при които се установи в динамика повишаване на anti-C4 до патологични стойности). Пациентите, при които не се отчете повишаване на нивата на anti-C4 до патологични стойности и не се отчете активиране на ЛН (преминаване от пълна в частична ремисия или от частична ремисия в активна ЛН) са 14 (58,3% от всички, при които не се отчете повишаване на anti-C4 до патологични нива). Разпределението на пациентите с ЛН според наличието или липсата на повишение на нивата на anti-C4 до патологични стойности и според наличието или липсата на активиране на ЛН е показано на Таблица 23.

Таблица 23. *Разпределение на пациентите с ЛН, проследявани в динамика с 3 и повече проби по време на проучването, според наличието или липсата на повишение на нивата на anti-C4 до патологични стойности и наличието или липсата на активиране на ЛН.*

Пациенти с ЛН	Активирани на ЛН	Без активирани на ЛН	Общо
С повишаване на anti-C4 до патологични нива	13	5	18
Без повишаване на anti-C4 до патологични нива	10	14	24
Общо	23	19	42

Въз основа на това разпределение установихме, че повишението на anti-C4 до патологични нива статистически значимо определя последващо повишаване на активността на ЛН (съгласно критериите за активна ЛН, частична ремисия и пълна ремисия) в рамките на среден период от $5,1 \pm 5,9$ (от 0,0 до 18,0) месеца (Fisher's exact test, $p=0,048$) с чувствителност от 56,5%, специфичност от 73,7%, позитивна предиктивна стойност от 72,2% и негативна предиктивна стойност от 58,3%. Относителният риск (RR) за активиране на ЛН след повишаване на нивата на anti-C4 до патологични стойности определихме на 1,7.

4.7.2. Динамика на автоантителата срещу C4 във връзка с някои лабораторни и имунологични показатели при пациентите с ЛН.

С оглед динамичното проследяване на нивата на anti-C4 във връзка с основните клиничко-лабораторни и имунологични показатели при пациентите с ЛН определихме промяната на нивата на anti-C4 като процент ($\Delta N\%$) спрямо изходното ниво при първото изследване, по долупосочената формула (аналогично на изследването за anti-C1q, anti-C1g и anti-C1s), където: N_1 е нормализираното ниво на anti-C4 при първата проба на пациента в началото на проучването; N_x е нормализираното ниво на anti-C4 в крайното изследване (след среден период от 13 месеца на проследяване и лечение):

$$\Delta N = \frac{N_x - N_1}{N_1} \times 100\%.$$

4.7.2.1. Динамика на автоантителата срещу C4 и протеинурията.

Динамиката на протеинурията за този период показва средно начално ниво от $1,76 \pm 3,27$ (от 0,02 до 15,72) g/d и средно ниво в края от $1,34 \pm 2,47$ (от 0,01 до 12,39) g/d, като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,084$).

Определихме промяната на протеинурията (ΔPU) спрямо изходната протеинурия (PU_1 – протеинурията при първото изследване (g/d); PU_x – протеинурия при последното изследване (g/d) отново за среден период на проследяване и лечение от 13 месеца:

$$\Delta PU = \frac{PU_x - PU_1}{PU_1} \times 100\%.$$

Липсва статистически значима зависимост между промяната на нивата на anti-C4 ($\Delta N\%$) и промяната на протеинурията ($\Delta PU\%$) (Spearman, $r=0,05$; $p=0,359$).

Липсват статистически значими корелационни зависимости между нивата на anti-C4 и протеинурията при всички изследваните в динамика проби от пациентите с ЛН (Spearman, $r=-0,04$; $p=0,256$, Фигура 71A1), при пробите от пациентите с ЛН, които някога са имали екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=0,01$; $p=0,449$, Фигура 71A2) и при пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=-0,19$; $p=0,093$, Фигура 71A3).

4.7.2.2. Динамика на автоантителата срещу C4 и бъбречната функция.

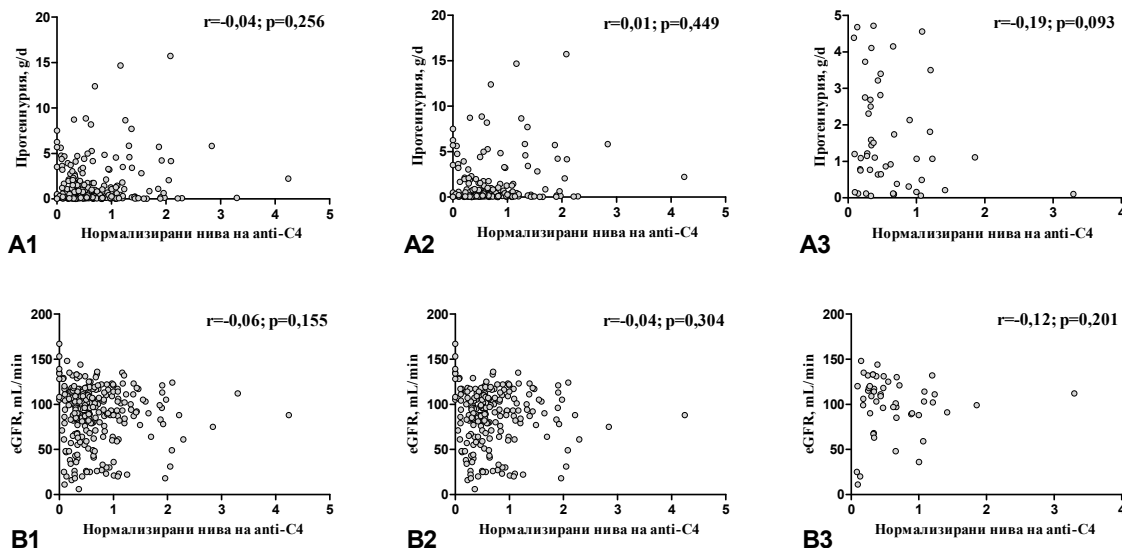
Динамиката на eGFR (mL/min) за периода на проследяване и лечение на пациентите с ЛН показва средно начално ниво от $91,3 \pm 31,1$ (от 18,0 до 136,0) mL/min и средно ниво в края от $94,0 \pm 29,9$ (от 25,0 до 153,0) mL/min, като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,153$).

Определихме промяната на eGFR (ΔGFR) спрямо изходната GFR при пациентите, изследвани за anti-C4 ($GFR_1 - GFR$ при първото изследване (mL/min); $GFR_x - GFR$ при изследването след среден период на проследяване от 13 месеца (mL/min)):

$$\Delta GFR = \frac{GFR_x - GFR_1}{GFR_1} \times 100\%.$$

Налице е статистически значима отрицателна корелационна зависимост между промяната на нормализираното ниво на anti-C4 спрямо изходното ($\Delta N\%$) и промяната на eGFR спрямо изходната ($\Delta eGFR$) за среден период от 13 месеца при пациентите с ЛН (Spearman, $r=-0,25$; $p=0,038$).

Липсват статистически значими корелационни зависимости между нивата на anti-C4 и eGFR при всички изследвани в динамика проби от пациентите с ЛН (Spearman, $r=-0,06$; $p=0,155$, Фигура 71B1), при пробите от пациентите с ЛН, които някога са имали екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=-0,04$; $p=0,304$, Фигура 71B2) и при пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=-0,12$; $p=0,201$, Фигура 71B3).



Фигура 71. Корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C4 и протеинурията и anti-C4 и изчислената скорост на гломерулна филтрация (eGFR) при всички изследвани в динамика проби от пациенти с ЛН (A1 и B1); при пробите, изследвани в динамика от пациенти с ЛН с екстраренални прояви на СЛЕ (A2 и B2) и при всички изследвани проби от пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ (A3 и B3). (Spearman).

4.7.2.3. Динамика на автоантителата срещу C4 и компонентите на комплемента C4 и C3.

Динамиката на плазмената концентрация на C4 (g/L) за периода на проследяване и лечение на пациентите с ЛН показва средно начално ниво от $0,22 \pm 0,12$ (от 0,03 до 0,53) g/L и средно ниво в края от $0,24 \pm 0,12$ (от 0,04 до 0,60) g/L, като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test,

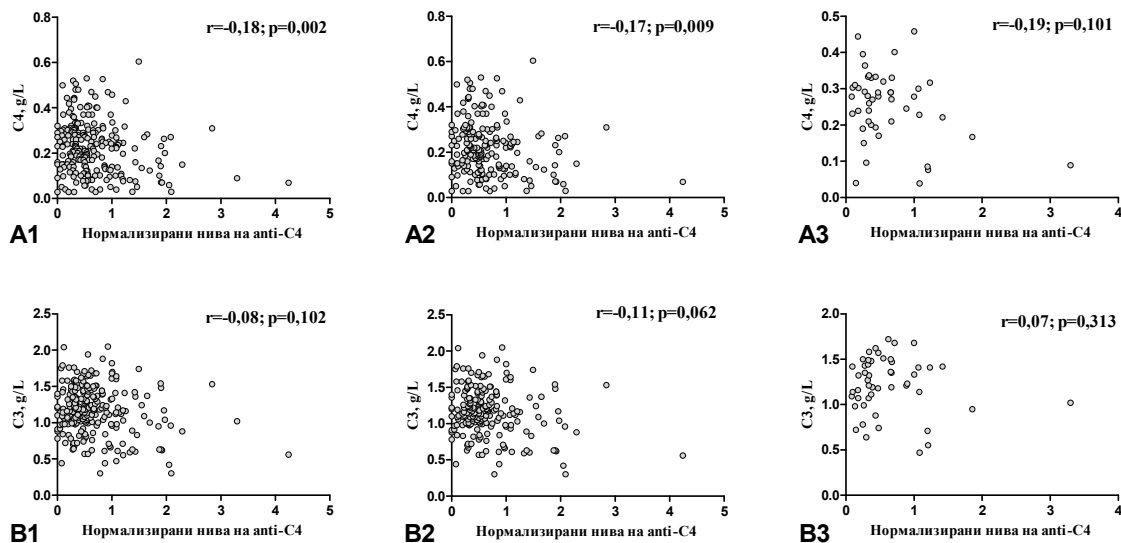
$p=0,090$). Динамиката на плазмената концентрация на C3 (g/L) за този период показва средно начално ниво от $1,15 \pm 0,36$ (от 0,44 до 1,88) g/L и средно ниво в края от $1,20 \pm 0,25$ (от 0,55 до 1,74) g/L, като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,288$).

Определихме и промените на C4 и C3 ($\Delta C4$ и $\Delta C3$) спрямо съответните изходни нива на C4 и C3 при изследването в началото (C_1 – съответното ниво на комплемента (C4 и C3) (g/L) в началото; C_x – съответното ниво на комплемента (C4 и C3) (g/L) в края на периода на проследяване):

$$\Delta C = \frac{C_x - C_1}{C_1} \times 100\%.$$

Установихме, статистически значима позитивна корелационна зависимост между промяната на нормализираните нива на anti-C4 спрямо изходните ($\Delta N\%$) и промяната на концентрацията на C4 спрямо изходната ($\Delta C4$) за периода на проследяване (Spearman, $r=0,34$; $p=0,015$), а също така и статистически значима позитивна корелационна зависимост между промяната на нормализираните нива на anti-C4 спрямо изходните ($\Delta N\%$) и промяната на концентрацията на C3 спрямо изходната ($\Delta C3$) за същия период на проследяване (Spearman, $r=0,28$; $p=0,029$).

Сред всички пациенти с ЛН, изследвани в динамика и сред пациентите с ЛН и екстраренални прояви на СЛЕ съществува статистически значима отрицателна корелационна зависимост между нивото на anti-C4 и плазмената концентрация на C4 (Spearman, съответно: $r=-0,18$; $p=0,002$ и $r=-0,17$; $p=0,009$) (Фигура 72 A1 и A2), като липсва статистически значима корелация между нивата на anti-C4 и концентрацията на C4 само сред пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=-0,19$; $p=0,101$, Фигура 72A3). Липсват значими корелационни зависимости между нивата на anti-C4 и концентрациите на C3 сред всички пациентите с ЛН, сред тези с ЛН и екстраренални прояви на СЛЕ и сред пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, съответно: $r=-0,08$, $p=0,102$; $r=-0,11$, $p=0,062$; $r=0,07$; $p=0,313$) (Фигура 72 B1, B2 и B3).



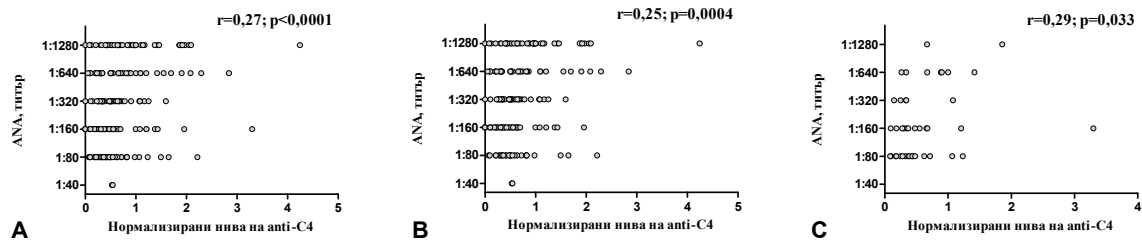
Фигура 72. Корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C4, изследвани в динамика при пациентите с ЛН и плазмените концентрации на C4 и C3 в тези проби. (A1 и B1) При всички пациенти с ЛН; (A2 и B2) При пациентите с ЛН с екстраренални прояви на СЛЕ; (A3 и B3) При пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman).

4.7.2.4. Динамика на автоантителата срещу C4 и антинуклеарните автоантитела (ANA).

Динамиката на титъра на ANA за периода на проследяване и лечение на пациентите с ЛН показва средно начално ниво от 1:640 (от 1:40 до 1:1280) и средно ниво в края от 1:320 (от 1:80 до 1:1280), като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,078$).

Налице са статистически значими позитивни корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C4 и титрите на ANA при всички проби от пациенти с ЛН, изследвани в динамика (Spearman, $r=0,27$; $p<0,0001$), при пациентите с ЛН с екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, съответно: $r=0,25$; $p=0,0004$) и при пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=0,29$; $p=0,033$).

(Фигура 73 А, В и С).

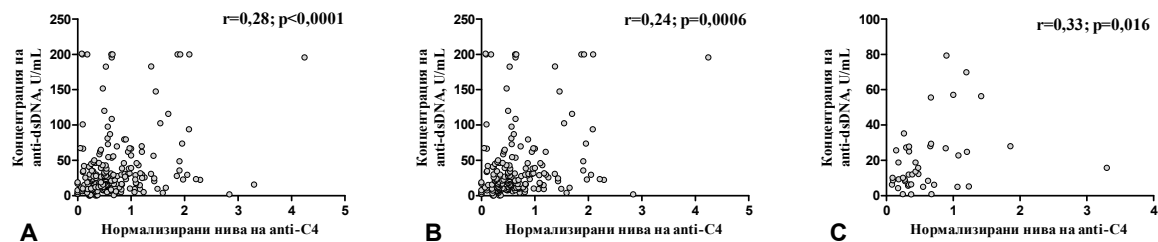


Фигура 73. Корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C4 и титрите на ANA: **А.** При всички проведени в динамика проби от пациентите с ЛН (Spearman, $r=0,27$; $p<0,0001$); **В.** При пациентите с ЛН и екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=0,25$; $p=0,0004$); **С.** При пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=0,29$; $p=0,033$).

4.7.2.5. Динамика на автоантителата срещу C4 и автоантителата срещу двойноверижна ДНК (anti-dsDNA).

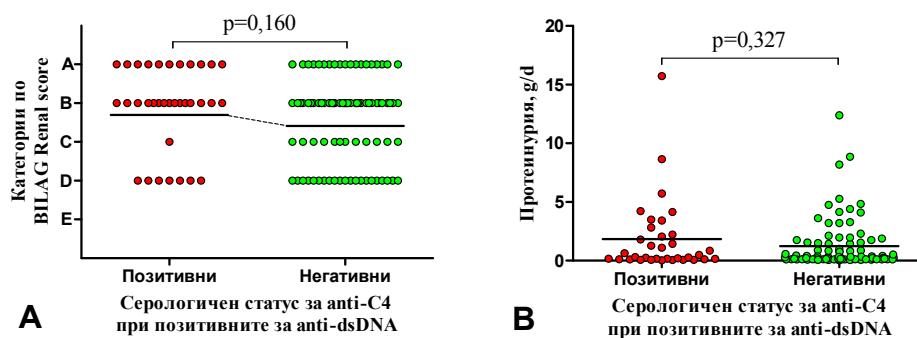
Динамиката на концентрацията на anti-dsDNA (U/mL) за периода на проследяване и лечение на пациентите с ЛН показва средно начално ниво от $32,6\pm 37,0$ (от 5,6 до 195,8) U/mL и средно ниво в края от $33,2\pm 43,8$ (от 0,1 до 183, 0) U/mL, като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,132$).

Налице са статистически значими позитивни корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C4 и концентрациите на anti-dsDNA при всички, изследвани в динамика проби от пациенти с ЛН (Spearman, $r=0,28$; $p<0,0001$), при пациентите с ЛН с екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=0,24$; $p=0,0006$) и при пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ Spearman, $r=0,33$; $p=0,016$) (Фигура 74 А, В и С).



Фигура 74. Корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C4 и концентрациите на anti-dsDNA (U/mL) при: **А.** всички пациентите с ЛН, изследвани в динамика (Spearman, $r=0,28$; $p<0,0001$); **В.** пациентите с ЛН с екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=0,24$; $p=0,0006$); **С.** пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=0,33$; $p=0,016$).

При позитивните едновременно за anti-dsDNA и anti-C4 пациенти с ЛН средната и геометричната средна на ранговете (категориите по BILAG Renal score) са сравнително по-високи от средната и геометричната средна при пациентите, които са позитивни за anti-dsDNA и негативни за anti-C4 (Фигура 75А), макар и тази разлика да не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,160$). Налице е сравнително по-висока протеинурия при пациентите едновременно позитивни за anti-dsDNA и anti-C4 ($1,84\pm 3,14$ g/d) в сравнение с протеинурията при пациентите, позитивни за anti-dsDNA, но негативни за anti-C4 ($1,25\pm 2,11$ g/d), въпреки че разликата не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,327$) (Фигура 75В).



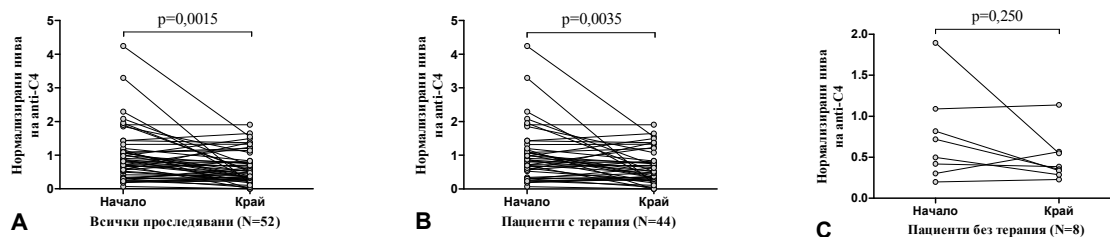
Фигура 75. А. Сравнителен анализ между категориите на ЛН по BILAG Renal score при позитивните едновременно за anti-dsDNA и anti-C4 пациенти с ЛН и тези, позитивни за anti-dsDNA и негативни за anti-C4 (Mann-Whitney, $p=0,160$). **В.** Сравнителен анализ между средните нива на протеинурия при пациентите, позитивни едновременно за anti-dsDNA и anti-C4, и тези, позитивни за anti-dsDNA и негативни за anti-C4. (Mann-Whitney, $p=0,327$).

4.8. Автоантитела срещу C4 и някои аспекти на лечението при пациентите с ЛН.

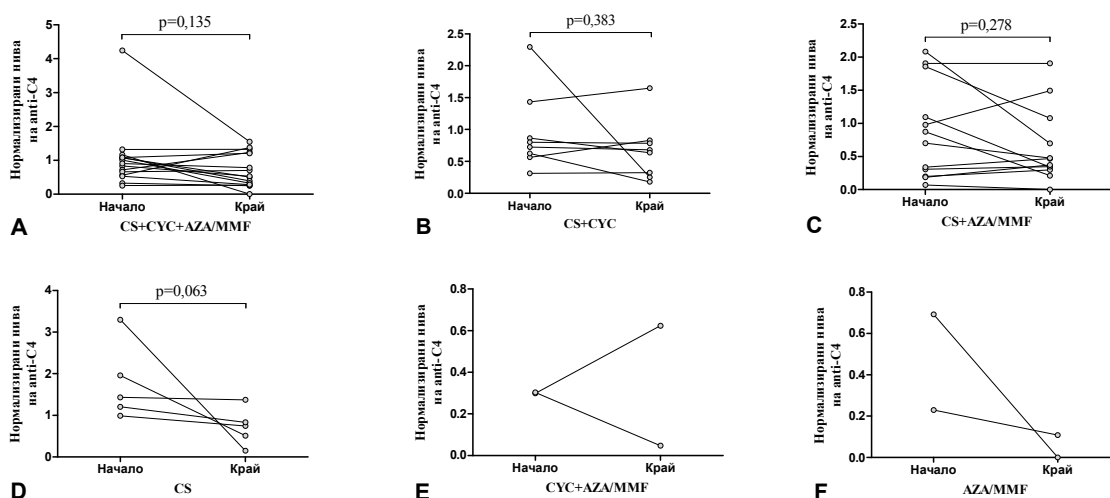
При всички проследявани пациенти, в началния момент средното нормализирано ниво на anti-C4 е $0,967 \pm 0,789$ (от 0,069 до 4,242), а в края на периода на проследяване – $0,615 \pm 0,471$ (от 0,000 до 1,905), като разликата е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,0015$) (Фигура 76А). При пациентите с проведена имунопатогенетична терапия в рамките на периода на проследяване, средното нормализирано ниво на anti-C4 в началото е $1,008 \pm 0,823$ (от 0,069 до 4,242), а в края – $0,639 \pm 0,495$ (от 0,000 до 1,905), като в тази група разликата също е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,0035$) (Фигура 76В). В групата пациенти, при които не е провеждана имунопатогенетична терапия, средното нормализирано ниво на anti-C4 в началото е $0,743 \pm 0,549$ (от 0,199 до 1,896), а в края – $0,481 \pm 0,291$ (от 0,229 до 1,139), като в тази група липсва статистически значима разлика между началното и крайното ниво (Wilcoxon signed rank test, $p=0,250$) (Фигура 76С).

С оглед вида на проведеното имунопатогенетично лечение, сред пациентите, при които е провеждано такова, обособихме основно 6 групи: 15 (34,1%) пациенти, при което е провеждано комбинирано лечение с CS+CYC+AZA/MMF; 8 (18,2%) пациенти, при които е провеждано комбинирано лечение с CS+CYC; 12 (27,3%) пациенти, при които е провеждано комбинирано лечение с CS+AZA или CS+MMF; 5 (11,4%) пациенти, при които е провеждана монотерапия с CS; 2 (4,5%) пациенти, при които е провеждано комбинирано лечение с CYC и AZA и 2 (4,5%) пациенти, при които е провеждана монотерапия: с AZA при единия и с MMF при другия.

При сравнителен анализ на нивата на anti-C4 в началото и в края на проведеното лечение при различните групи пациенти установихме следното: в групата на терапия с CS+CYC+AZA/MMF средното нормализирано ниво на anti-C4 в началото е $1,049 \pm 0,937$ (от 0,251 до 4,242), а в края – $0,715 \pm 0,499$ (от 0,000 до 1,550), като в тази група нивото спада, но статистически незначимо (Wilcoxon signed rank test, $p=0,135$) (Фигура 87А); в групата на лечение с CS+CYC средното ниво в началото е $0,952 \pm 0,631$ (от 0,312 до 2,294), а в края – $0,667 \pm 0,469$ (от 0,178 до 1,649), като в тази група средното ниво също намалява, но статистически незначимо (Wilcoxon signed rank test, $p=0,383$) (Фигура 87В); в групата на лечение с CS+AZA/MMF средното ниво в началото е $0,883 \pm 0,724$ (от 0,069 до 2,082), а в края – $0,640 \pm 0,567$ (от 0,000 до 1,905), като в тази група средното ниво също намалява, но статистически незначимо (Wilcoxon signed rank test, $p=0,278$) (Фигура 87С); в групата на монотерапия с CS средното ниво в началото е $1,776 \pm 0,925$ (от 0,987 до 3,299), а в края – $0,721 \pm 0,450$ (от 0,147 до 1,372), като средното ниво в тази група също намалява, но статистически незначимо (Wilcoxon signed rank test, $p=0,063$) (Фигура 87Д); в групите на лечение с CYC+AZA и AZA/MMF попадат по 2 пациенти, като от Фигура 87Е и F се вижда увеличаване на средното ниво на anti-C4 в групата на терапия с CYC+AZA и намаляване на средното ниво в групата на терапия с AZA/MMF, но поради малкия брой на пациентите статистическият анализ в тези две групи не е коректен.



Фигура 76. Крайни и начални нива на anti-C4 при: **A.** всички проследявани пациенти ($N=52$) ($p=0,0015$); **B.** пациентите, при които е провеждана имунопатогенетична терапия ($N=44$) ($p=0,0035$) и **C.** пациентите, при които не е провеждана имунопатогенетична терапия през периода на проследяване ($N=8$) ($p=0,250$) (Wilcoxon signed rank test).



Фигура 77. Нормализирани нива на anti-C4 в началото и в края на периода на проследяване при пациенти, при които е провеждана терапия с: **A.** CS+CYC+AZA/MMF – средното ниво на anti-C4 намалява статистически незначимо в края (Wilcoxon signed rank test, $p=0,135$); **B.** CS+CYC – средното ниво на anti-C4 намалява статистически незначимо в края (Wilcoxon signed rank test, $p=0,383$); **C.** CS+AZA/MMF – средното ниво на anti-C4 намалява статистически незначимо в края (Wilcoxon signed rank test, $p=0,278$); **D.** CS – средното ниво на anti-C4 намалява статистически незначимо в края (Wilcoxon signed rank test, $p=0,063$). **E.** CYC+AZA – двама пациенти, при единия нивото нараства, а при другия намалява, като средното ниво като цяло леко нараства в края; **F.** MMF при един пациент и AZA при един пациент, като нивата на anti-C4 намаляват в края.

5. АВТОАНТИТЕЛА СРЕЩУ С3 КОМПОНЕНТА НА КОМПЛЕМЕНТА.

Автоантитела срещу С3 (anti-C3) са изследвани при 74 (76,3% от първоначално включените в проучването) пациенти, като в динамика са изследвани общо 266 проби на пациентите с ЛН. Anti-C3 са изследвани и при 72 здрави доброволци (контроли), без автоимунни и инфекциозни възпалителни заболявания, със запазена бъбречна, чернодробна и хемопоетична функции. При изследваните за anti-C3 в контролната група здрави доброволци се установиха плазмени нива на anti-C3 $0,053 \pm 0,040$ единици оптична плътност при дължина на вълната от 450 nm (OD 450 nm) на оптичния анализатор.

Определихме граничната стойност (cut-off), над която нивата на anti-C3 при изследваните пациенти с ЛН приехме за патологично повишени, а именно:

$$\text{Cut-off} = 0,053 + 2 \times 0,040 = 0,133.$$

Проведохме нормализиране на стойностите на нивата на anti-C3 в групите пациенти с ЛН, представяйки нормализираните нива на anti-C3 като съотношение на получените стойности за оптичната плътност към нивото на cut-off за лабораторията. По този начин, за гранична стойност се приема 1,00, над която нормализираните нива на anti-C3 се приемат за повишени, а под която – за референтни.

Установихме патологично повишени титри на anti-C3 при 19 (25,7%) от изходно изследваните пациенти с ЛН. Сред изследваните общо 266 проби от кръвни плазми на пациентите с ЛН в динамика установихме патологично повишени нива на anti-C3 при 84 (31,6%) от пробите.

5.1. Автоантитела срещу С3 и пола на пациентите с ЛН.

При мъжете с ЛН установихме патологично повишени нива на anti-C3 при 4 (26,7%), докато при жените с ЛН – при 15 (25,4%). Не установихме статистически значимо влияние на пола на пациентите с ЛН върху наличието на патологично повишени нива на anti-C3 (Fisher's exact test, $p=1,000$).

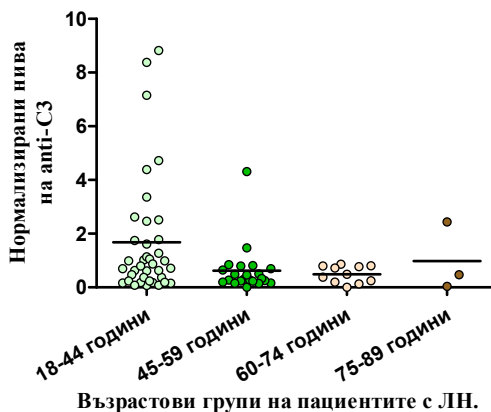
При анализ на нормализираните нива на anti-C3 установихме, че при мъжете с ЛН средното нормализирано ниво на anti-C3 е $1,236 \pm 2,080$, а при жените с ЛН – $1,139 \pm 1,693$. Не установихме статистически значима разлика в нивата на anti-C3 при двата пола на пациентите с ЛН (Mann-Whitney, $p=0,984$).

5.2. Автоантитела срещу С3 и възрастта на пациентите с ЛН.

Средната възраст на изследваната група пациенти с ЛН е 45,36 години. При пациентите на възраст $\leq 45,3$ години средното нормализирано ниво на anti-C3 ($1,583 \pm 2,175$) е статистически значимо по-високо от нивото при пациентите на възраст над 45,3 години ($0,630 \pm 0,811$) (Mann-Whitney, $p=0,036$).

Във възрастовата група от 18 до 44 години позитивни за anti-C3 са 16 (42,1%) пациенти; във възрастовата група от 45 до 59 години позитивни за anti-C3 са 2 (9,1%) пациенти; във възрастовата група от 60 до 74 години няма позитивни за anti-C3 (0,0%) пациенти; във възрастовата група от 75 до 89 позитивен за anti-C3 е 1 (33,3%) пациент.

Във възрастните групи по С30 средните нормализирани нива на anti-C3 са както следва: в групата от 18 до 44 години: $1,678 \pm 2,233$; в групата от 45 до 59 години: $0,619 \pm 0,890$; в групата от 60 до 74 години: $0,492 \pm 0,315$ и в групата от 75 до 89 години: $0,983 \pm 1,278$. Данните за възрастовото разпределение на пациентите с ЛН и нормализираните нива на anti-C3 са представени на Фигура 78.



Фигура 78. Средни нива на anti-C3 в различните възрастови групи по С30 при пациентите с ЛН.

Въпреки постепенното намаляване на средните нормализирани нива на anti-C3 с възрастта (Фигура 78) (изключвайки възрастовата група от 75-89 години), не установихме статистически значимо влияние на възрастта като фактор върху нивата на anti-C3, както и значима разлика между нормализираните нива на anti-C3 при различните възрастови групи пациенти с ЛН (One-way ANOVA, $p=0,070$; Post test for linear trend, $p=0,484$; Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$).

Въпреки това, обаче, установихме статистически значима отрицателна слаба корелационна зависимост между възрастта на изходно изследваните пациенти с ЛН и нивата на anti-C3 (Spearman, $r=-0,28$; $p=0,014$), като тази връзка се потвърди и при изследване на зависимостта сред всички изследвани в динамика проби от пациенти с ЛН (Spearman, $r=-0,24$; $p<0,0001$), т. е. с нарастване на възрастта намалява нивото на anti-C3.

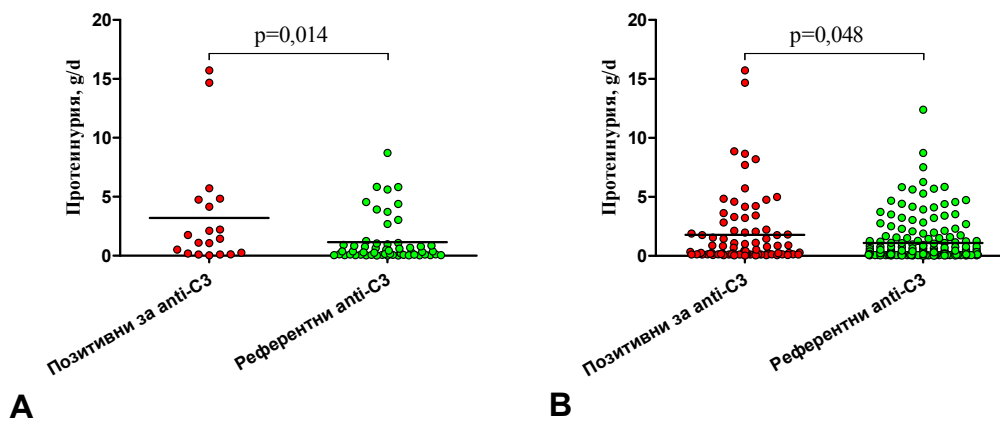
5.3. Автоантитела срещу C3 и давността на ЛН.

Не установихме статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-C3 и давността на ЛН (Spearman, $r=0,02$, $p=0,879$).

5.4. Автоантитела срещу C3 и основни клиничко-лабораторни параметри на ЛН.

5.4.1. Автоантитела срещу C3 и протеинурията.

При пациентите, позитивни за anti-C3, средното ниво на протеинурията ($3,21\pm 4,60$ g/d) е статистически значимо по-високо от нивото при пациентите, негативни за anti-C3 ($1,16\pm 1,92$ g/d) (Mann-Whitney, $p=0,014$) (Фигура 79А). Сред всички изследвани в динамика кръвни и уринни проби от пациентите с ЛН, средното ниво на протеинурията при пробите от пациентите, позитивни за anti-C3 ($1,78\pm 2,98$ g/d) е статистически значимо по-високо от нивото при пробите, негативните за anti-C3 ($1,09\pm 1,82$ g/d) (Mann-Whitney, $p=0,048$) (Фигура 79В).



Фигура 79. А. Нива на протеинурията според серологичния статус за anti-C3 при пациентите с ЛН, изходно включени в проучването (Mann-Whitney, $p=0,014$). В. Нива на протеинурията според серологичния статус за anti-C3 при всички проби от пациентите с ЛН, динамично проследени в хода на проучването (Mann-Whitney, $p=0,048$).

5.4.2. Автоантитела срещу C3 и уринен седимент.

Сред изследваните в динамика лабораторни проби от пациентите с ЛН, които са позитивни за anti-C3, патологично активен уринен седимент се установи при 55 (65,5%) от пробите, докато пробите, негативни за anti-C3, без активен седимент са 109 (59,9%). Това разпределение показва, че съществува статистически значимо влияние на позитивния серологичен статус за anti-C3 върху наличието на патологично активен уринен седимент (Fisher's exact test, $p=0,0001$).

Сред пробите от пациенти с ЛН, изследвани в динамика, които са с патологично активен уринен седимент, се установи средно нормализирано ниво на anti-C3 от $1,743\pm 2,532$ (от 0,000 до 16,420), а при пробите от пациентите без активен уринен седимент това ниво е статистически значимо по-ниско: $0,904\pm 1,407$ (от 0,000 до 10,790) (Mann-Whitney, $p=0,0021$).

5.4.3. Автоантитела срещу C3 и бъбречна функция.

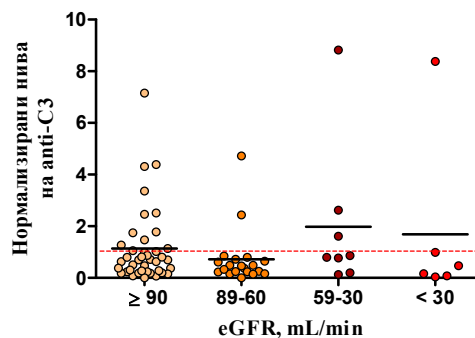
При пациентите с eGFR <60 mL/min се установи средно нормализирано ниво на anti-C4 $1,852\pm 2,944$ (от 0,038 до 8,820), докато при пациентите с eGFR ≥ 60 mL/min средното ниво на anti-C3 е

сравнително, но статистически незначимо по-ниско – $0,997 \pm 1,340$ (от 0,008 до 7,150) (Mann-Whitney, $p=0,741$).

Не установихме корелационна зависимост между нивата на anti-C3 и eGFR (Spearman, $r=0,09$, $p=0,219$).

В групата от пациенти с $eGFR \geq 90$ mL/min с позитивни anti-C3 са 13 (32,5%) пациенти, а средното нормализирано ниво на anti-C3 е $1,136 \pm 1,449$ (от 0,008 до 7,150); в групата пациенти с eGFR от 89 до 60 mL/min с позитивни anti-C3 са 2 (10,0%) пациенти, а средното нормализирано ниво на anti-C3 е $0,719 \pm 1,072$ (от 0,008 до 4,722); в групата пациенти с eGFR от 59 до 30 mL/min с позитивни anti-C3 са 3 (37,5%) пациенти, а средното нормализирано ниво на anti-C3 е $1,977 \pm 2,880$ (от 0,128 до 8,820) и в групата пациенти с eGFR под 30 mL/min с позитивни anti-C3 е 1 (16,7%) пациент, а средното нормализирано ниво на anti-C3 е $1,685 \pm 3,297$ (от 0,038 до 8,376) (с $eGFR < 15$ mL/min са само 2 пациенти, поради което, с оглед коректността на статистическия анализ обединихме групите с eGFR 29-15 и < 15 mL/min в обща група).

Не установихме статистически значима разлика между нивата на anti-C3 при отделните групи от пациенти с ЛН, обособени въз основа на eGFR, като липсва статистически значима зависимост между тези нива и поредността на отделните групи (One-way ANOVA, $p=0,324$; Bonferroni's multiple comparison test, $p > 0,05$; Post test for linear trend, $p=0,234$) (Фигура 80). Липсата на горепосочените зависимости се потвърди и при изследването на всички проби, проведени в динамика, разпределени в групите според eGFR (One-way ANOVA, $p=0,153$; Bonferroni's multiple comparison test, $p > 0,05$; Post test for linear trend, $p=0,150$).



Фигура 80. Средни нива на anti-C3 в обособените според eGFR групи от пациенти с ЛН, първоначално изследвани в проучването.

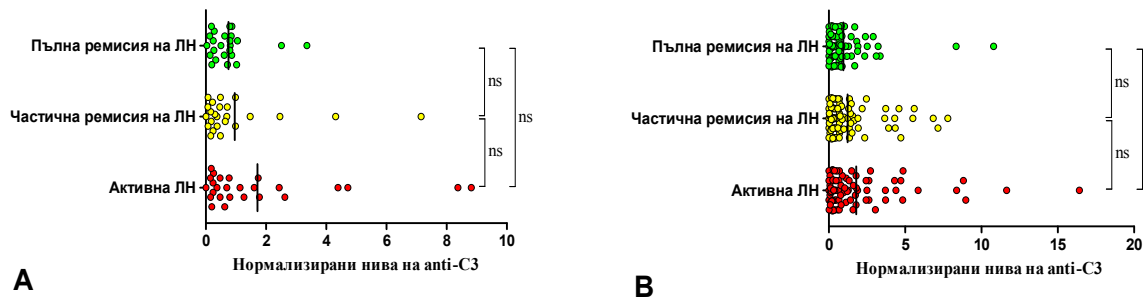
Липсва статистически значимо влияние на позитивния серологичен статус за anti-C3 върху наличието на декомпенсирана бъбречна функция при изследваната група пациенти с ЛН (Fisher's exact test, $p=0,746$).

5.4.4. Автоантитела срещу C3 и комплексната клинично-лабораторна оценка на активността на ЛН.

В групата с активна ЛН 11 (42,3%) пациенти са позитивни за anti-C3, в групата с частична ремисия на ЛН позитивни за anti-C3 са 4 (16,7%) пациенти и в групата с пълна клинично-лабораторна ремисия на ЛН позитивни за anti-C3 са 4 (16,7%) пациенти. Средните нормализирани нива на anti-C3 в трите групи пациенти с ЛН са както следва: в групата с активна ЛН – $1,714 \pm 2,372$ (от 0,008 до 8,820); в групата с частична ремисия на ЛН – $0,964 \pm 1,620$ (от 0,008 до 7,150); в групата с пълна клинично-лабораторна ремисия на ЛН – $0,752 \pm 0,752$ (от 0,038 до 3,361), както е показано на Фигура 81А.

Не установихме статистически значима разлика между нивата на anti-C3 при отделните групи от пациенти с ЛН, обособени въз основа на комплексната оценка на активността на ЛН, като липсва статистически значима зависимост между тези нива и поредността на отделните групи (One-way ANOVA, $p=0,125$; Bonferroni's multiple comparison test, $p > 0,05$; Post test for linear trend, $p=0,054$).

При анализ на всички проби от пациенти с ЛН, изследвани в динамика, установихме статистически значима разлика между нивата на anti-C3 в групите с активна ЛН и пълна ремисия на ЛН и статистически значимо нарастване на средното ниво на anti-C3 с нарастване на активността на ЛН (One-way ANOVA, $p=0,023$; Bonferroni's multiple comparison test, $p < 0,05$ между групите с активна ЛН и пълна ремисия на ЛН; Post test for linear trend, $p=0,007$) (Фигура 81В и Таблица 24).



Фигура 81. А. Разпределение на пациентите с ЛН, изходно включени в проучването, в зависимост от комплексната клиничко-лабораторна оценка на активността на ЛН и нормализираните нива на anti-C3. В. Разпределение на всички проби от пациентите с ЛН, изследвани в динамика, в зависимост от комплексната оценка на активността на ЛН и нормализираните нива на anti-C3. Налице е статистически значима разлика между нивата на anti-C3 в групата с активна ЛН и групата с пълна ремисия на ЛН (One-way ANOVA, $p=0,023$; Bonferroni's multiple comparison test, $(*)p<0,05$ между групите с активна ЛН и пълна ремисия на ЛН; Post test for linear trend, $p=0,007$).

Таблица 24. Множествен сравнителен тест на Bonferroni за изследване разликите в нивата на anti-C3 в групите от пациенти с активна ЛН, частична ремисия на ЛН и с пълна ремисия на ЛН. Изследвани са всички проби в динамика от пациентите с ЛН.

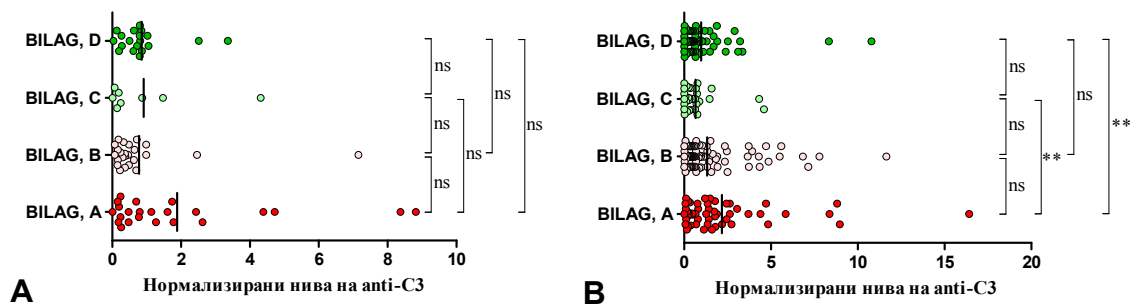
Bonferroni's multiple comparison test	Mean Diff.	t	$p<0,05$	95% CI of diff.
Активна ЛН с Частична ремисия на ЛН	0,5662	1,823	Не (ns)	-0,1822 до 1,314
Активна ЛН с Пълна ремисия на ЛН	0,8484	2,732	Да (*)	0,1000 до 1,597
Частична ремисия на ЛН с Пълна ремисия на ЛН	0,2822	0,9359	Не (ns)	-0,4443 до 1,009

При анализ на всички изследвани 266 проби установихме, че от всички позитивни за anti-C3, 35 (41,7%) от пробите са при пациенти в състояние на активна ЛН, 28 (33,3%) от пробите са при пациенти с частична клиничко-лабораторна ремисия на ЛН и 21 (25,0%) от пробите са при пациенти в състояние на пълна клиничко-лабораторна ремисия на ЛН. Сред пробите с референтни нива на anti-C3 47 (25,8%) от пробите са при пациенти с активна ЛН, 64 (35,2%) от пробите са при пациенти с частична ремисия на ЛН и 71 (39,0%) от пробите са при пациенти с пълна ремисия на ЛН. При отчитане на липсата на клиничко-лабораторна активност на ЛН (имайки предвид само състоянията на пълна клиничко-лабораторна ремисия на ЛН) и наличието на активност на ЛН (обединявайки групите с активна ЛН и частична ремисия на ЛН), установихме наличието на статистически значимо влияние на наличието на позитивни anti-C3 върху наличието на активност на ЛН (Fisher's exact test, $p=0,027$).

5.4.5. Автоантитела срещу C3 и комплексната оценка на ЛН (категиорите) по BILAG Renal score.

При пациентите с ЛН от категория А по BILAG Renal score позитивните за anti-C3 са 11 (47,8%); при пациентите от категория В позитивни за anti-C3 са 2 (8,3%); при пациентите от категория С позитивни за anti-C3 са 2 (25,0%) и при пациентите от категория D позитивни за anti-C3 са 4 (21,1%). Средните нормализирани нива на anti-C3 при пациентите с различни категории по BILAG Renal score на ЛН са както следва: при категория А: $1,887\pm 2,473$ (от 0,008 до 8,820); при категория В: $0,781\pm 1,443$ (от 0,075 до 7,150); при категория С: $0,915\pm 1,463$ (от 0,008 до 4,316) и при категория D: $0,856\pm 0,805$ (от 0,038 до 3,361), както е показано на Фигура 82.

Въпреки наличието на най-високо средно нормализирано ниво на anti-C3 при пациентите с категория А на ЛН по BILAG Renal score, не установихме статистически значима разлика между нивата на anti-C3 при отделните групи от пациенти с ЛН, както и статистически значима зависимост между тези нива и категориите по BILAG Renal score (One-way ANOVA, $p=0,123$; Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$; Post test for linear trend, $p=0,096$) (Фигура 82А). При анализ на нормализираните нива на anti-C3 при всички изследвани в динамика проби от пациентите с ЛН установихме наличие на сигнификантна разлика между нивата на anti-C3 при категории А и С, а така също и при категории А и D на ЛН по BILAG Renal score, като също така установихме и наличие на статистически значима линейна зависимост между нивата на anti-C3 и категориите на ЛН по BILAG Renal score (One-way ANOVA, $p=0,0023$; Bonferroni's multiple comparison test, $p<0,05$ между категории А-С и А-D; Post test for linear trend, $p=0,0003$) (Фигура 82В и Таблица 25).



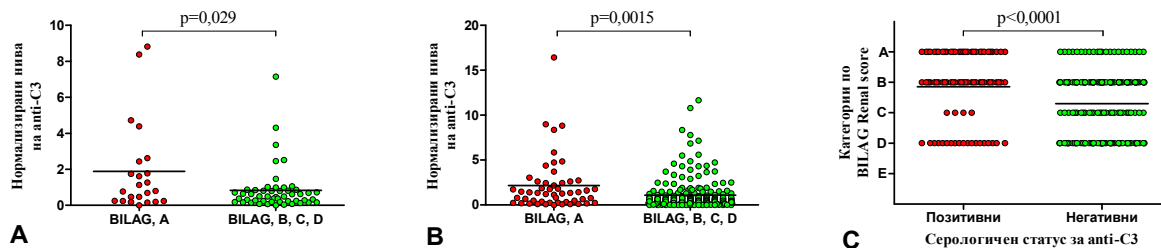
Фигура 82. *А.* Разпределение на пациентите с ЛН в зависимост от комплексната оценка на активността на ЛН по BILAG Renal score и нормализираните нива на anti-C3. Представени са средните нормализирани нива на anti-C3 в отделните категории. *В.* Разпределение на всички изследвани в динамика проби от пациенти с ЛН в зависимост от комплексната оценка на активността на ЛН по BILAG Renal score и нормализираните нива на anti-C3. (One-way ANOVA, $p=0,0023$; Bonferroni's multiple comparison test, $p<0,05$ между категории A-C и A-D; Post test for linear trend, $p=0,0003$).

Таблица 25. Множествен сравнителен тест на Bonferroni за изследване разликите в нивата на anti-C3 в групите от пациенти с различни категории на ЛН по BILAG Renal score. Изследвани са всички проби в динамика от пациентите с ЛН.

Bonferroni's multiple comparison test	Mean Diff.	t	$p<0,05$	95% CI of diff.
BILAG, A в сравнение с BILAG, B	0,8401	2,438	Не (ns)	-0,07577 до 1,756
BILAG, A в сравнение с BILAG, C	1,513	3,361	Да (**)	0,3162 до 2,709
BILAG, A в сравнение с BILAG, D	1,185	3,282	Да (**)	0,2250 до 2,145
BILAG, B в сравнение с BILAG, C	0,6724	1,661	Не (ns)	-0,4040 до 1,749
BILAG, B в сравнение с BILAG, D	0,3448	1,138	Не (ns)	-0,4608 до 1,150
BILAG, C в сравнение с BILAG, D	-0,3277	0,7818	Не (ns)	-1,442 до 0,7864

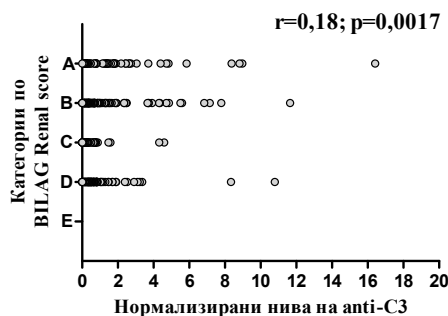
Сред всички изследвани в динамика проби от пациентите с ЛН, които са позитивни за anti-C3, пробите на пациенти от категория А по BILAG Renal score са 30 (35,7%), пробите на пациенти от категории В, С и D са 54 (64,3%). Сред негативните за anti-C3, пробите на пациенти от категория А по BILAG Renal score са 22 (12,1%), пробите на пациенти от категории В, С и D са 160 (87,9%). Въз основа на това разпределение потвърдихме същата тенденция, както и при изходно включените в проучването пациенти: налице е статистически значимо влияние на наличието на позитивния за anti-C3 серологичен статус върху наличието на активна ЛН от категория А по BILAG Renal score при изследваната група пациенти в динамика (Fisher's exact test, $p<0,0001$) с чувствителност от 57,7%, специфичност от 74,8%, позитивна предиктивна стойност от 35,7% и негативна предиктивна стойност от 87,9%, като относителният риск за наличие на категория А по BILAG Renal score сред динамично изследваните проби от пациенти с ЛН при наличие на патологично повишено ниво на anti-C3 е 3,0.

Средното нормализирано ниво на anti-C3 при пациентите от категория А по BILAG Renal score ($1,887\pm 2,473$) е статистически значимо по-високо от средното нормализирано ниво на anti-C3 при всички останали пациенти с ЛН (от категории В, С и D) ($0,830\pm 1,222$) (Mann-Whitney, $p=0,029$) (Фигура 83А). При сравнителен анализ на средното нормализирано ниво на anti-C3 при всички изследвани в динамика проби от пациенти с категория А по BILAG Renal score на ЛН ($2,169\pm 2,972$) с нивото на anti-C3 при пациентите с категории В, С и D ($1,098\pm 1,725$), също установихме статистически значимо по-високо ниво на anti-C3 в пробите от пациенти с категория А на ЛН (Mann-Whitney, $p=0,0015$) (Фигура 83В). При сравнителен рангов анализ между пациентите позитивни за anti-C3 и пациентите негативните за anti-C3 (сред всички изследвани в динамика проби) установихме статистически значимо по-висока средна и геометрична средна на ранговете (категиите по BILAG Renal score) при пациентите, позитивни за anti-C3 в сравнение със средната и геометричната средна на ранговете при пациентите, негативни за anti-C3 (Mann-Whitney, $p<0,0001$) (Фигура 83С).



Фигура 83. *А. Нормализирани нива на anti-C3 при първоначално включените в проучването пациенти с категория А на ЛН по BILAG Renal score и при пациенти от другите категории (В, С и D) (Mann-Whitney, $p=0,029$). В. Нормализирани нива на anti-C3 при всички изследвани в динамика проби от пациенти с категория А на ЛН и при пробите от пациенти от другите категории (В, С и D) (Mann-Whitney, $p=0,0015$). С. Категории на BILAG Renal score при пациентите с ЛН, в зависимост от серостатуса за anti-C3 (Mann-Whitney, $p<0,0001$).*

При изследване на зависимостта между нормализираните нива на anti-C3 и категорията на ЛН по BILAG Renal score сред всички изследвани в динамика проби (след квантифициране на категориите: категория А – 5; категория В – 4; категория С – 3; категория D – 2 и категория Е – 1 (в последната категория Е липсват пациенти) установихме статистически значима позитивна корелация между нивата на anti-C3 и категорията по BILAG Renal score (Spearman, $r=0,18$; $p=0,0017$) (Фигура 84).



Фигура 84. *Корелационна зависимост между нормализираните нива на anti-C3 и категориите на ЛН по BILAG Renal score (Spearman, $r=0,18$; $p=0,0017$).*

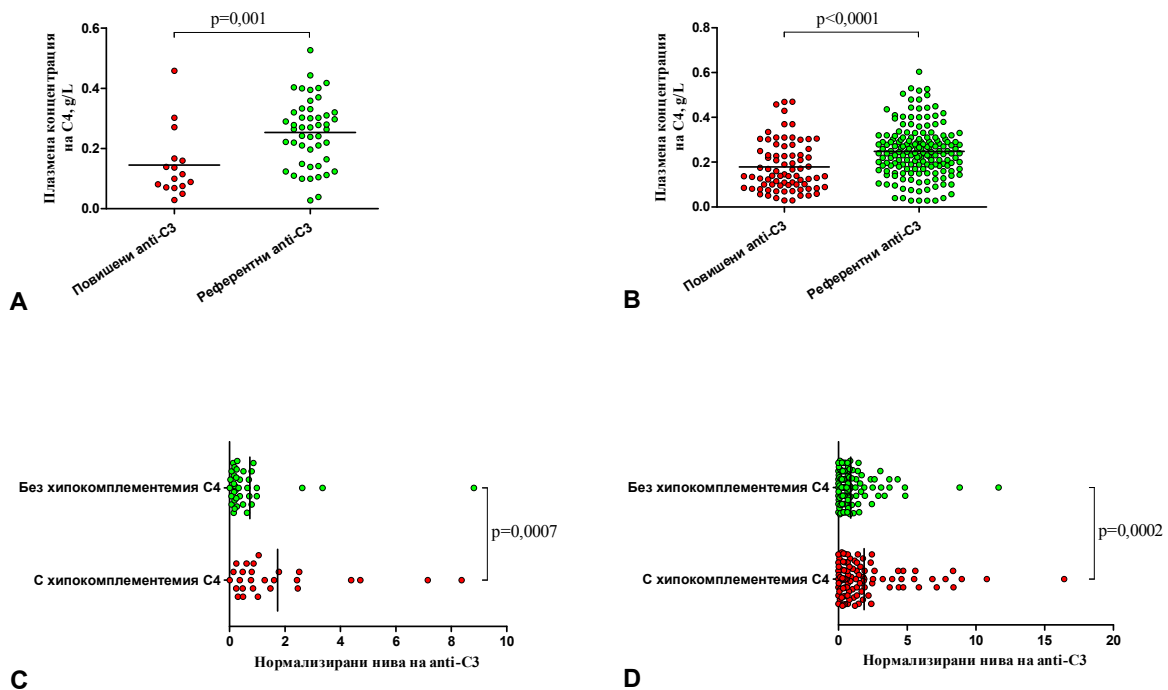
5.5. Автоантитела срещу C3 и някои основни имунологични маркери при ЛН.

5.5.1. Автоантитела срещу C3 и нива на комплемента C4 и C3.

Сред пациентите с ЛН с повишени нива на anti-C3, плазмени концентрации на C4 са изследвани при 16 (84,2%) пациенти, като хипокомplementемия C4 установихме при 13 (81,3%) от тези 16 пациенти. Сред пациентите с референтни нива на anti-C3, плазмени концентрации на C4 са изследвани при 48 (87,3%), като хипокомplementемия C4 установихме при 14 (29,2%) от тези 48 пациенти. Въз основа на това разпределение установихме, че наличието на позитивни anti-C3 статистически значимо определя наличието на хипокомplementемия C4 (Fisher's exact test, $p=0,0004$).

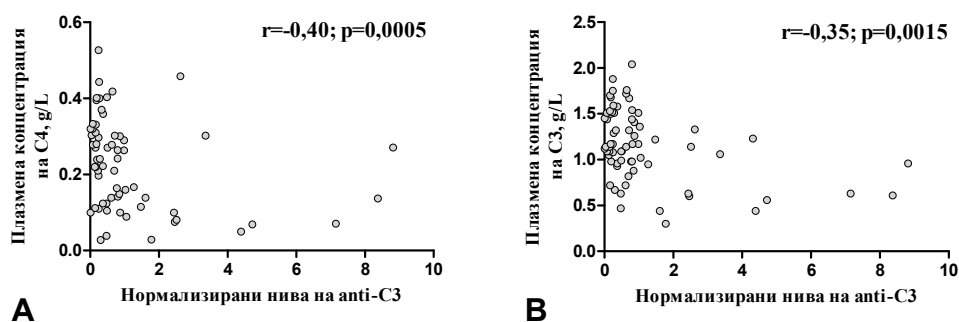
Средната плазмена концентрация на C4 при пациентите с повишени anti-C3 ($0,145\pm 0,112$ g/L) е статистически значимо по-ниска от тази при пациентите с референтни нива на anti-C3 ($0,253\pm 0,111$ g/L) (Mann-Whitney, $p=0,001$), както е показано на Фигура 85А. Тази зависимост потвърдихме и при изследване на всички проведени в динамика проби от пациентите с ЛН, при което установихме, че средната плазмена концентрация на C4 при пробите с повишени anti-C3 ($0,179\pm 0,110$ g/L) е статистически значимо по-ниска от средната плазмена концентрация на C4 при пробите с референтни нива на anti-C3 ($0,248\pm 0,113$ g/L) (Mann-Whitney, $p<0,0001$) (Фигура 85В). Средното нормализирано ниво на anti-C3 при пациентите с хипокомplementемия C4 ($1,738\pm 2,108$) е статистически значимо по-високо от средното нормализирано ниво на anti-C3 при пациентите без хипокомplementемия C4 ($0,737\pm 1,520$) (Mann-Whitney, $p=0,0007$), както е показано на Фигура 85С. Същата зависимост установихме и при изследване на всички проведени в динамика проби от пациентите с ЛН. Средното нормализирано ниво на anti-C3 при пробите с хипокомplementемия C4 ($1,871\pm 2,655$) е статистически значимо по-високо от

средното ниво на anti-C3 при пробите без хипокомplementемия C4 ($0,891 \pm 1,486$) (Mann-Whitney, $p=0,0002$) (Фигура 85D).



Фигура 85. **A.** Плазмени концентрации на C4 при изходно включените в проучването пациенти с ЛН в зависимост от серологичния статус по отношение на anti-C3 (Mann-Whitney, $p=0,001$). **B.** Плазмени концентрации на C4 при всички изследвани в динамика проби от пациенти с ЛН в зависимост от серологичния статус по отношение на anti-C3 (Mann-Whitney, $p < 0,0001$). **C.** Нормализирани плазмени нива на anti-C3 при пациенти с ЛН в зависимост от наличието на хипокомplementемия C4 (Mann-Whitney, $p=0,0007$). **D.** Нормализирани плазмени нива на anti-C3 при изследваните в динамика проби от пациенти с ЛН в зависимост от наличието на хипокомplementемия C4 (Mann-Whitney, $p=0,0002$).

Налице е статистически значима отрицателна корелация между нормализираните нива на anti-C3 и плазмените концентрации на C4 (Spearman, $r=-0,40$; $p=0,0005$) (Фигура 86A).

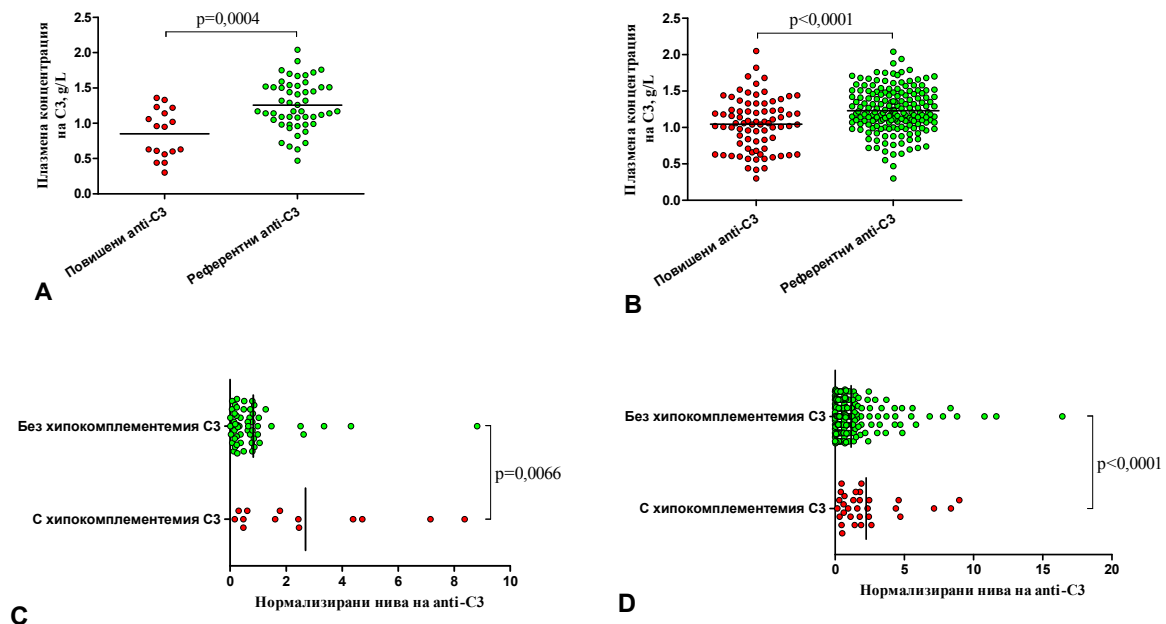


Фигура 86. **A.** Корелационна зависимост между нормализираното ниво на anti-C3 и плазмената концентрация на C4 (g/L) (Spearman, $r=-0,40$; $p=0,0005$). **B.** Корелационна зависимост между нормализираното ниво на anti-C3 и плазмената концентрация на C3 (g/L) (Spearman, $r=-0,35$; $p=0,0015$).

Сред пациентите с ЛН с повишени нива на anti-C3, плазмени концентрации на C3 са изследвани при 17 (89,5%), като хипокомplementемия C3 се установи при 8 (47,1%) от тези 17 пациенти. Сред

пациентите с референтни нива на anti-C3, плазмени концентрации на C3 са изследвани при 52 (94,5%), като хипокомplementемия C3 се установи при 5 (9,6%) от тези 52 пациенти. Въз основа на това разпределение, установихме, че наличието на патологично повишени anti-C3 статистически значимо определя наличието на хипокомplementемия C3 (Fisher's exact test, $p=0,0018$).

Средната плазмената концентрация на C3 при пациентите с повишени anti-C3 ($0,852\pm 0,344$ g/L) е статистически значимо по-ниска от тази при пациентите с референтни нива на anti-C3 ($1,257\pm 0,347$ g/L) (Mann-Whitney, $p=0,0004$) (Фигура 87А). Тази зависимост потвърдихме и сред всички изследвани в динамика проби от пациентите с ЛН, като средната плазмена концентрация на C3 при пробите с повишени anti-C3 ($1,045\pm 0,356$ g/L) е статистически значимо по-ниска от средната плазмена концентрация на C3 при пробите с референтни нива на anti-C3 ($1,231\pm 0,298$ g/L) (Mann-Whitney, $p<0,0001$) (Фигура 87В). Средното нормализирано ниво на anti-C3 при пациентите с хипокомplementемия C3 ($2,689\pm 2,701$) е статистически значимо по-високо от средното ниво на anti-C3 при пациентите без хипокомplementемия C3 ($0,831\pm 1,355$) (Mann-Whitney, $p=0,0066$) (Фигура 87С). Същата зависимост между нивата на anti-C3 при наличие или липсата на хипокомplementемия C3 установихме и при изследване на всички проведени в динамика проби от пациентите с ЛН. Средното нормализирано ниво на anti-C3 при пробите с хипокомplementемия C3 ($2,250\pm 2,322$) е статистически значимо по-високо от средното ниво на anti-C3 при пробите без хипокомplementемия C3 ($1,164\pm 2,027$) (Mann-Whitney, $p<0,0001$) (Фигура 87D).



Фигура 87. А. Плазмени концентрации на C3 при изходно включените в проучването пациенти с ЛН в зависимост от серологичния статус по отношение на anti-C3 (Mann-Whitney, $p=0,0004$). В. Плазмени концентрации на C3 при всички изследвани в динамика проби от пациенти с ЛН в зависимост от серологичния статус по отношение на anti-C3 (Mann-Whitney, $p<0,0001$). С. Нормализирани нива на anti-C3 при пациентите с ЛН в зависимост от наличието на хипокомplementемия C3 (Mann-Whitney, $p=0,0066$). D. Нормализирани нива на anti-C3 при пробите от пациенти с ЛН, изследвани в динамика в зависимост от наличието на хипокомplementемия C3 (Mann-Whitney, $p<0,0001$).

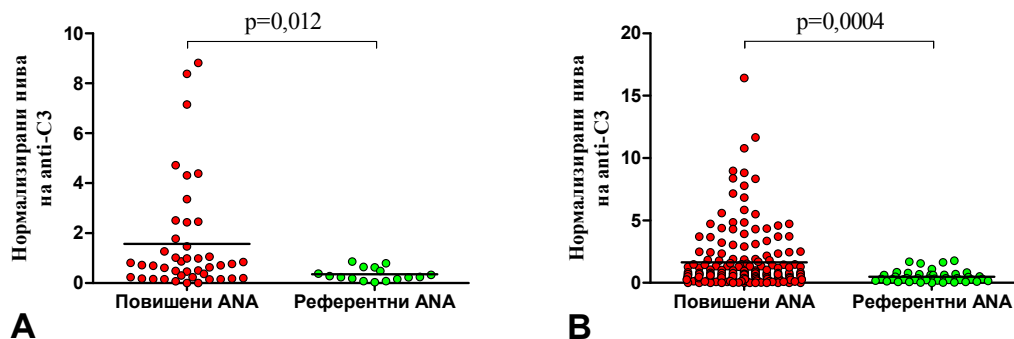
Зависимостта на хипокомplementемията за C3 от плазмените нива на anti-C3 потвърдихме и с корелационен анализ – наличие е статистически значима отрицателна умерена по сила зависимост между нормализираните нива на anti-C3 и плазмените концентрации на C3 (Spearman, $r=-0,35$; $p=0,0015$) (Фигура 86В).

5.5.2. Автоантитела срещу C3 и антинуклеарни автоантитела (ANA).

Сред първоначално включените в проучването пациенти с ЛН, позитивните за anti-C3 с патологично повишени ANA са 15 (100,0% от пациентите, позитивни за anti-C3, при които са изследвани ANA), а негативните за anti-C3, с референтни титри на ANA са 16 (36,4% от пациентите, негативни за

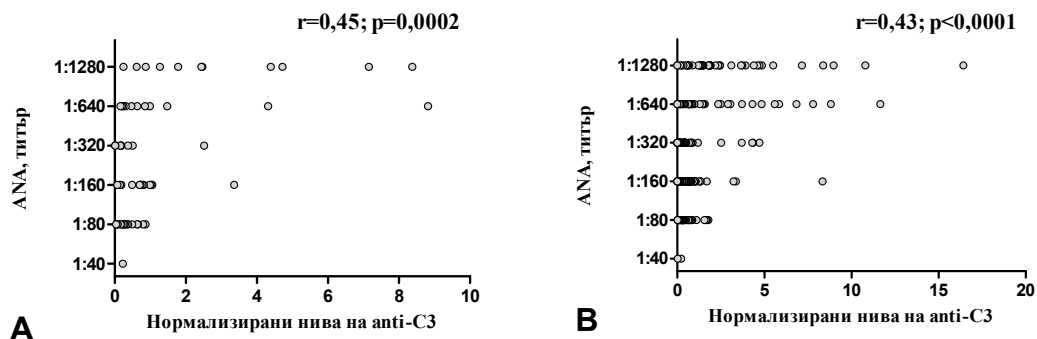
anti-C3, при които са изследвани ANA). Въз основа на това разпределение установихме, че патологично повишените нива на anti-C3 статистически значимо определят наличието на патологично повишени титри на ANA (Fisher's exact test, $p=0,006$). Тази тенденция установихме и сред всички изследвани в динамика по време на проучването проби от пациенти с ЛН, като пробите с повишени нива на anti-C3 и повишени титри на ANA са 67 (93,1% от всички проби с повишени нива на anti-C3, изследвани за ANA), а пробите с негативни anti-C3 и референтни титри на ANA са 39 (26,4% от всички негативни проби за anti-C3, изследвани за ANA). Въз основа на това разпределение установихме, че патологично повишените нива на anti-C3 статистически значимо определят наличието на повишени титри на ANA (Fisher's exact test, $p=0,0005$).

Средното нормализирано ниво на anti-C3 при изходно изследваните пациенти с ЛН с патологично повишени титри на ANA ($1,574\pm 2,181$) е статистически значимо по-високо от нивото на anti-C3 при пациентите с референтни титри на ANA ($0,354\pm 0,259$) (Mann-Whitney, $p=0,012$) (Фигура 88А). Средното нормализирано ниво на anti-C3 сред всички изследвани в динамика проби от пациентите с ЛН с патологично повишени титри на ANA ($1,643\pm 2,431$) е статистически значимо по-високо от нивото на anti-C3 при пробите от пациенти с референтни титри на ANA ($0,485\pm 0,458$) (Mann-Whitney, $p=0,0004$) (Фигура 88В).



Фигура 88. А. Нормализирани нива на anti-C3 при изходно включените в проучването пациенти с ЛН в зависимост от статуса на ANA (Mann-Whitney, $p=0,012$). В. Нормализирани нива на anti-C3 при всички изследвани в динамика проби от пациентите с ЛН в зависимост от статуса на ANA (Mann-Whitney, $p=0,0004$).

Установихме наличие на статистически значими позитивни корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C3 и титрите на ANA сред първоначално включените в проучването пациенти с ЛН (Spearman, $r=0,45$; $p=0,0002$) (Фигура 89А) и сред всички изследвани в динамика проби от пациентите с ЛН (Spearman, $r=0,43$; $p<0,0001$) (Фигура 89В).

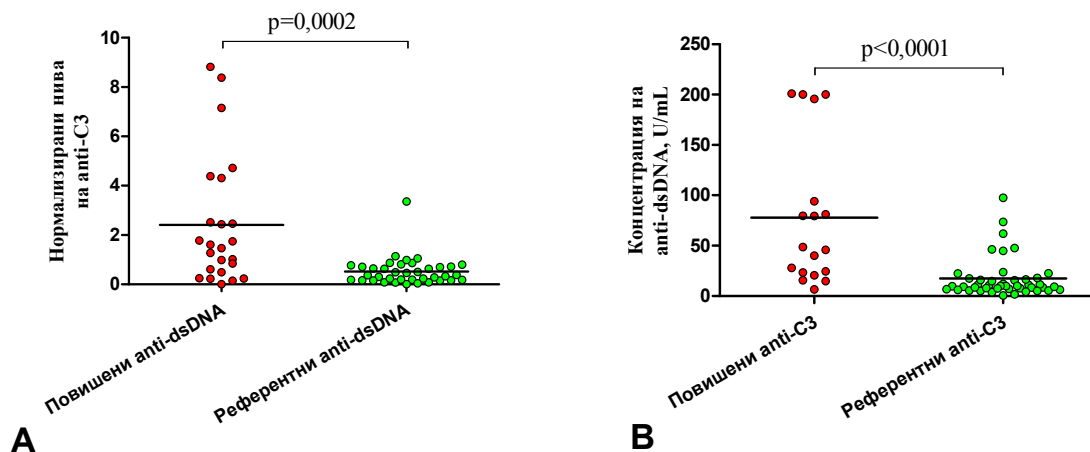


Фигура 89. А. Корелационна зависимост между нормализираните нива на anti-C3 и титрите на ANA при изходно включените в проучването пациенти с ЛН (Spearman, $r=0,45$; $p=0,0002$). В. Корелационна зависимост между нормализираните нива на anti-C3 и титрите на ANA при всички проследени в динамика проби от пациентите с ЛН (Spearman, $r=0,43$; $p<0,0001$).

5.5.3. Автоантитела срещу C3 и автоантитела срещу двойноверижна ДНК (anti-dsDNA).

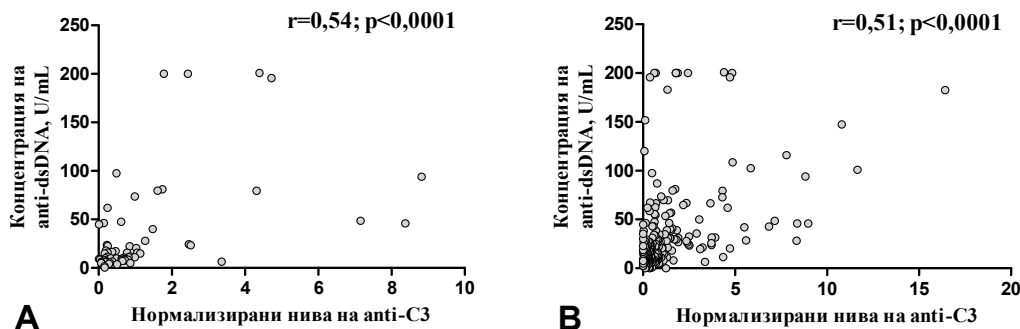
Пациентите, позитивни за anti-C3 с патологично повишени концентрации на anti-dsDNA са 15 (83,3% от позитивните за anti-C3 пациенти, при които са изследвани anti-dsDNA), а пациентите, негативни за anti-C3 с референтни концентрации на anti-dsDNA, са 35 (79,5% от негативните за anti-C3, при които са изследвани и anti-dsDNA). Въз основа на това разпределение установихме, че наличието на патологично повишени anti-C3 статистически значимо определя наличието на патологично повишени концентрации на anti-dsDNA (Fisher's exact test, $p < 0,0001$). При изследване на тази зависимост сред всички проследени в динамика проби от пациентите с ЛН установихме, че позитивните за anti-C3 с патологично повишени концентрации на anti-dsDNA проби са 66 (86,8% от всички случаи, които са позитивни за anti-C3, при които са изследвани и anti-dsDNA), а негативните за anti-C3, които са с референтни концентрации на anti-dsDNA са 93 (62,8% от всички негативни за anti-C3, при които са изследвани и anti-dsDNA). Въз основа на това разпределение потвърдихме статистически значимото влияние на наличието на повишени нива на anti-C3 върху наличието на патологично повишени концентрации на anti-dsDNA (Fisher's exact test, $p < 0,0001$).

Средното нормализирано ниво на anti-C3 при изходно изследваните пациенти с ЛН с патологично повишени концентрации на anti-dsDNA ($2,412 \pm 2,588$) е статистически значимо по-високо от средното ниво на anti-C3 при пациентите с референтни концентрации на anti-dsDNA ($0,525 \pm 0,569$) (Mann-Whitney, $p = 0,0002$) (Фигура 90А). При пациентите с патологично повишени нива на anti-C3, средната концентрация на anti-dsDNA ($77,76 \pm 71,52$ U/mL) е статистически значимо по-висока от средната концентрация на anti-dsDNA при пациентите с референтни нива на anti-C3 ($17,30 \pm 19,90$ U/mL) (Mann-Whitney, $p < 0,0001$) (Фигура 90В).



Фигура 90. А. Нормализирани нива на anti-C3 при пациентите с ЛН в зависимост от статуса по отношение на anti-dsDNA (Mann-Whitney, $p = 0,0002$). В. Концентрации на anti-dsDNA при пациентите с ЛН в зависимост от статуса по отношение на anti-C3 (Mann-Whitney, $p < 0,0001$).

Връзката между нивата на anti-C3 и концентрациите на anti-dsDNA потвърдихме и с корелационен анализ, който показва наличие на статистически значими позитивни корелационни зависимости между двете при пациентите с ЛН, първоначално включени в проучването (Spearman, $r = 0,54$; $p < 0,0001$) (Фигура 91А), и при всички проследени в динамика проби от пациенти с ЛН (Spearman, $r = 0,51$; $p < 0,0001$) (Фигура 91В).



Фигура 91. **А.** Корелационна зависимост между нормализираното ниво на anti-C3 и концентрацията на anti-dsDNA (U/mL) при изходно включените в проучването пациенти с ЛН (Spearman, $r=0,54$; $p<0,0001$). **В.** Корелационна зависимост между нормализираното ниво на anti-C3 и концентрацията на anti-dsDNA (U/mL) при всички проби от пациенти с ЛН, проследени в динамика (Spearman, $r=0,51$; $p<0,0001$).

5.6. Автоантитела срещу C3 и някои хистологични признаци на ЛН.

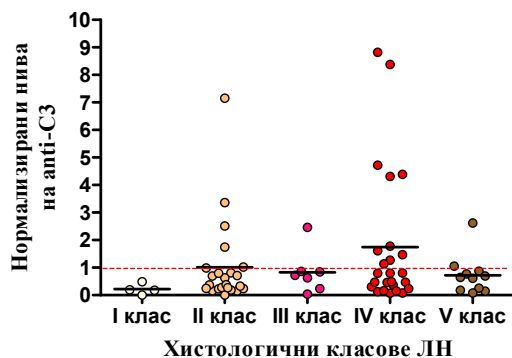
Пациентите с ЛН са диагностицирани с провеждане на пункционна бъбречна биопсия, като хистологична диагноза е налична при 71 (95,9%) от включените в проучването пациенти, при които са изследвани anti-C3. Определени са хистологичните класове на ЛН, съгласно критериите на International Society of Nephrology (ISN) и Renal Pathology Society (RPS). Отчетени са хистологичните индекси на активност и хроничност, съгласно критериите на National Institutes of Health (NIH). С оглед клинична достоверност на изследваните зависимости, когато са изследвани връзки, касаещи белези на хистологична активност на ЛН, при статистическите анализи са отчетени само случаите, при които времето между вземането на кръвните проби за изследване на anti-C3 и провеждането на пункционната бъбречна биопсия е било до 12 месеца. Това условие е изпълнено при 27 (38,0%) от пациентите с ЛН, включени в проучването.

5.6.1. Автоантитела срещу C3 и хистологичният клас на ЛН.

При пациентите с I хистологичен клас ЛН няма позитивни за anti-C3 (0,0%); при тези с II хистологичен клас ЛН позитивни са 5 (21,7%) пациенти; при тези с III хистологичен клас ЛН позитивен е 1 (14,3%) пациенти; при тези с IV хистологичен клас ЛН позитивни са 10 (40,0%) пациенти; при тези с V хистологичен клас ЛН позитивни са 2 (18,2%) пациенти; пациентът с VI хистологичен клас ЛН е с референтно ниво на anti-C3 (0,985); при останалите 3 пациенти, при които не е провеждано хистологично уточняване на ЛН 2 са с референтни нива на anti-C3 и 1 е позитивен за anti-C3 (2,436). Средните нормализирани нива на anti-C3 са съответно: при пациентите с I хистологичен клас: $0,218\pm 0,200$; при пациентите с II хистологичен клас: $1,012\pm 1,563$; при пациентите с III хистологичен клас: $0,830\pm 0,786$; при пациентите с IV хистологичен клас: $1,748\pm 2,465$; при пациентите с V хистологичен клас: $0,722\pm 0,710$ (Фигура 92).

Липсва статистически значима разлика между нивата на anti-C3 при отделните хистологични класове ЛН, като също така липсва и статистически значима зависимост между тези нива и хистологичния клас на ЛН (One-way ANOVA, $p=0,314$; Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$; Post test for linear trend, $p=0,421$).

Сред пациентите, позитивни за anti-C3, такива с IV клас ЛН са 10 (55,6% от позитивните за anti-C3 с хистологична диагноза). При пациентите, негативни за anti-C3, такива с I, II, III, V или VI клас ЛН са 38 (71,7% от негативните за anti-C3 с хистологична диагноза). При изследване връзката между наличието на патологично повишени anti-C3 и наличието на ЛН от IV хистологичен клас установихме, че патологично повишените нива на anti-C3 определят статистически значимо наличие на дифузна ЛН (IV хистологичен клас) (Fisher's exact test, $p=0,048$) с чувствителност от 40,0%, специфичност от 82,6%, позитивна предиктивна стойност от 55,6% и негативна предиктивна стойност от 71,7%. Относителният риск за наличие на ЛН от IV хистологичен клас при наличие на позитивни anti-C3 е 2,0.



Фигура 92. Нива на anti-C3 в зависимост от хистологичния клас на ЛН.

5.6.2. Автоантитела срещу C3 и основни хистологични лезии за активност и хроничност на ЛН.

В настоящото проучване изследвахме зависимостите между нивата на anti-C3 и хистологични белези на активност (ендокапилярна пролиферация, гломерулна левкоцитна инфилтрация, субендотелни депозити („телени бримки“), фибриноидна некроза и/или кариорексис, клетъчни полулуния и интерстициална инфилтрация) и хистологични белези на хроничност (гломерулна склероза, фиброзни полулуния, тубулна атрофия и интерстициална фиброза), както и връзката между нивата на anti-C3 и хистологичните индекси на активност и хроничност, определени на базата на горепосочените хистологични белези.

Таблица 26. Сравнителен анализ между нивата на anti-C3 при наличие и липса на хистологични белези за активност и хроничност при пациентите с ЛН. Представени са средните нива \pm стандартното отклонение (SD).

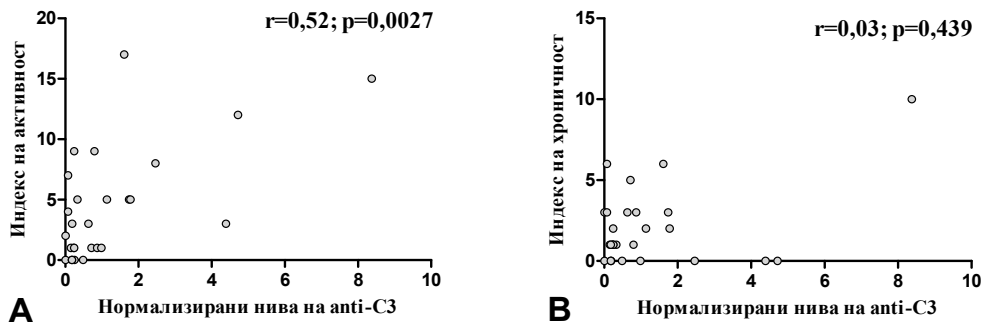
Хистологичен признак	Нормализирани нива на anti-C3 при:		p
	наличие на хистологичния признак	липса на хистологичния признак	
Ендокапилярна пролиферация	1,541 \pm 2,094	0,293 \pm 0,297	0,049
Гломерулна левкоцитна инфилтрация ¹	-	-	-
Субендотелни депозити, формиращи „телени бримки“	2,009 \pm 1,565	1,037 \pm 1,930	0,023
Фибриноидна некроза и/или кариорексис	1,918 \pm 2,697	0,805 \pm 1,079	0,451
Клетъчни полулуния	3,313 \pm 3,292	0,741 \pm 1,014	0,061
Интерстициално възпаление	2,124 \pm 2,544	0,684 \pm 1,134	0,029
Гломерулна склероза	1,136 \pm 2,097	1,319 \pm 1,654	0,558
Фиброзни полулуния	2,543 \pm 3,330	0,916 \pm 1,323	0,170
Тубулна атрофия	1,433 \pm 2,516	1,090 \pm 1,461	0,880
Интерстициална фиброза	1,695 \pm 2,570	0,978 \pm 1,455	0,227

¹ В групата с гломерулна левкоцитна инфилтрация попадат само 2 пациенти и данните от статистическия анализ не са достоверни.

На Таблица 26 са показани данните от сравнителния анализ между нивата на anti-C3 в групите с и без съответните хистологични признаци за активност и хроничност на ЛН. При пациентите с наличие на хистологични признаци за активност на ЛН, като ендокапилярна пролиферация, субендотелни депозити, формиращи телени бримки и интерстициално възпаление, нивата на anti-C3 при наличие на тези признаци са статистически значимо по-високи от нивата при пациентите с липса на признаците (Mann-Whitney, съответно $p=0,049$, $p=0,023$ и $p=0,029$). При наличие на фибриноидна некроза и клетъчни полулуния нивата на anti-C3 са сравнително по-високи от нивата при отсъствие на тези белези за активност, но разликите не са статистически значими. При пациентите с наличие на хистологични признаци за хроничност на ЛН нивата на anti-C3 не се различават значимо от нивата при пациентите с липса на признаците на хроничност. При двамата пациенти с наличие на гломерулна левкоцитна инфилтрация нормализираните нива на anti-C3 са съответно 4,722 и 2,466 (позитивни за anti-C3).

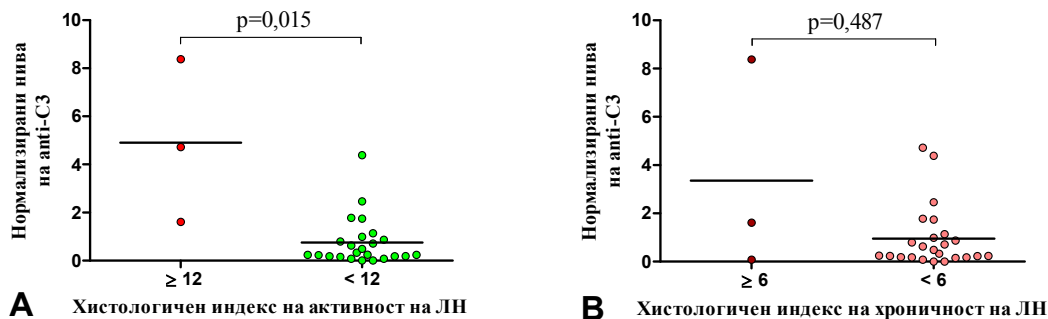
Налице е статистически значима позитивна корелация между нивата на anti-C3 и хистологичния индекс на активност на ЛН (Spearman, $r=0,52$; $p=0,0027$) (Фигура 93А). Липсва значима корелация между нивата на anti-C3 и хистологичния индекс на хроничност при пациентите с ЛН (Spearman, $r=0,03$;

p=0,439) (Фигура 93В).



Фигура 93. А. Корелационен зависимост на връзката между нормализираните нива на anti-C3 и хистологичния индекс на активност при пациентите с ЛН (Spearman, $r=0,52$; $p=0,0027$). В. Корелационна зависимост на връзката между нормализираните нива на anti-C3 и хистологичния индекс на хроничност при пациентите с ЛН (Spearman, $r=0,03$; $p=0,439$).

Установихме, че средното нормализирано ниво на anti-C3 при пациентите с хистологичен индекс на активност на ЛН ≥ 12 ($4,902 \pm 3,387$), е статистически значимо по-високо от това при пациентите с хистологичен индекс на активност под 12 ($0,757 \pm 1,003$) (Mann-Whitney, $p=0,015$) (Фигура 94А). Средното нормализирано ниво на anti-C3 при пациентите с хистологичен индекс на хроничност на ЛН ≥ 6 ($3,353 \pm 4,417$) е сравнително, но статистически незначимо, по-високо от това при пациентите с индекс на хроничност на ЛН < 6 ($0,950 \pm 1,276$) (Mann-Whitney, $p=0,487$) (Фигура 94В).



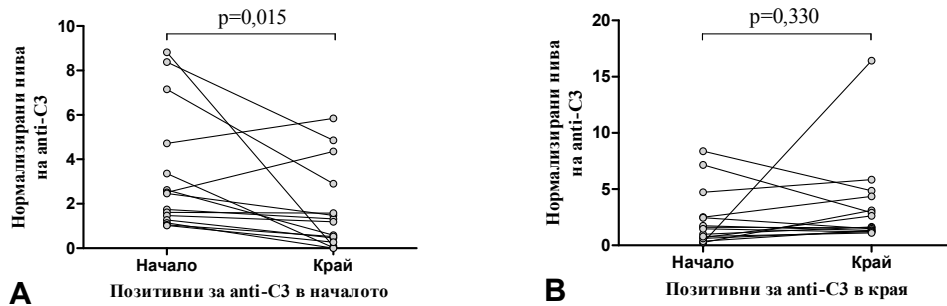
Фигура 94. А. Нормализирани нива на anti-C3 при пациенти с ЛН според хистологичния индекс на активност (Mann-Whitney, $p=0,015$). В. Нормализирани нива на anti-C3 при пациенти с ЛН според хистологичния индекс на хроничност (Mann-Whitney, $p=0,487$).

5.7. Прогностично значение и динамика на промените в нивата на автоантителата срещу С3.

При 52 (70,3%) от пациентите с ЛН, е налице проследяване за период от средно 13 (от 6 до 25) месеца, с между 2 и 11 проби, при които са определяни нивата на anti-C3 и останалите клинично-лабораторни и имунологични параметри на ЛН.

Сред изследваните в динамика общо 266 проби от кръвни плазми на пациентите с ЛН установихме патологично повишени нива на anti-C3 при 84 (31,6%) от пробите. Изследвайки нивата на anti-C3 при проследените в динамика пациенти (с 2 и повече проби в хода на проучването при 52 пациенти с ЛН), установихме, че при първите проби, патологично повишени anti-C3 има при 15 (28,8%) от пациентите, като след среден период на проследяване от 13 месеца, патологично повишени нива на anti-C3 са налице също при 15 (28,8%) от пациентите. При 7 (46,7%) от пациентите с първоначално повишени нива на anti-C3, последните намаляват до референтни стойности, а при 8 (53,3%) от тези пациенти нивата се задържат в патологични граници. Сред пациентите с патологични anti-C3 на 13 месец от проследяването, при 8 (53,3%) нивата са били патологични от началото, а при 7 (46,7%) нарастват от изходно референтни.

Средното нормализирано ниво на anti-C3 при пациентите, позитивни за anti-C3 в началото, е $3,289 \pm 2,706$ (от 1,023 до 8,820), докато след среден период от 13 месеца е $1,699 \pm 1,902$ (от 0,000 до 5,850), като е налице статистически значима разлика между тези две нива (Wilcoxon signed rank test, $p=0,015$) (Фигура 95А). Средното нормализирано ниво на anti-C3 при позитивните в края на периода на проследяване пациенти с ЛН е $3,401 \pm 3,900$ (от 1,105 до 16,420), статистически незначимо по-високо от средното ниво на anti-C3 на същите тези пациенти в началото на проследяването, когато то е било $2,269 \pm 2,526$ (от 0,241 до 8,376) (Wilcoxon signed rank test, $p=0,330$) (Фигура 95В).



Фигура 95. Динамика на нивата на anti-C3 при: А. позитивните в началото на периода на проследяване и В. позитивните в края на периода на проследяване пациенти с ЛН.

5.7.1. Прогностично значение на автоантителата срещу С3.

При 42 (56,8%) от изходно включените в проучването пациенти с ЛН, при които са провеждани 3 или повече проби за anti-C3 в динамика, изследвахме връзките между нивата на anti-C3 и категорията по BILAG Renal score и нивата на anti-C3 и активността на ЛН, определена като активна, частична ремисия и пълна ремисия на ЛН. Патологични нива на anti-C3 поне в една от пробите установихме при 24 (57,1%) от пациентите.

Пациентите с ЛН, при които отчетохме в динамика повишение на нивата на anti-C3 до патологични стойности с последващо повишение на категорията на ЛН по BILAG са 15 (68,2% от всички, при които се установи повишаване на anti-C3 до патологични нива в динамика). Това повишение на категорията по BILAG Renal score се отчете в рамките на среден период от 4,3 (от 0,0 до 21,0) месеца след повишаване на нивата на anti-C3 до патологични стойности. Пациентите, при които не се отчете повишаване на нивата на anti-C3 до патологични стойности и не се отчете повишение на категорията на ЛН по BILAG Renal score са 15 (75,0% от всички, при които не се отчете повишаване на anti-C3 до патологични нива в динамика). Разпределението на пациентите с ЛН според наличието или липсата на повишение на нивата на anti-C3 до патологични стойности и според наличието или липсата на повишение на категорията на ЛН по BILAG Renal score е показано на Таблица 27.

На базата на това разпределение установихме, че наличието на повишение на anti-C3 до патологични нива в динамика статистически значимо определя наличието на последващо повишаване на категорията на ЛН по BILAG Renal score в рамките на среден период от $4,3 \pm 5,6$ месеца (от 0,0 до 21,0 месеца) (Fisher's exact test, $p=0,0068$) с чувствителност от 75,0%, специфичност от 68,2%, позитивна предиктивна стойност от 68,2% и негативна предиктивна стойност от 75,0%. Относителният риск (RR) за повишаване категорията на ЛН по BILAG Renal score след повишаване на нивата на anti-C3 до патологични стойности определихме на 2,7.

Таблица 27. Разпределение на пациентите с ЛН, проследявани в динамика с 3 и повече проби по време на проучването, според наличието или липсата на повишение на нивата на anti-C3 до патологични стойности и наличието или липсата на последващо повишение на категорията на ЛН по BILAG Renal score.

Пациенти с ЛН	С повишение на категорията на ЛН по BILAG	Без повишение на категорията на ЛН по BILAG	Общо
С повишаване на anti-C3 до патологични нива	15	7	22
Без повишаване на anti-C3 до патологични нива	5	15	20
Общо	20	22	42

Пациентите, при които в динамика anti-C3 нарастват до патологични нива, заедно с последващо активиране на ЛН са 16 (69,6% от всички, при които се установи в динамика повишаване на anti-C3 до патологични стойности). Пациентите, при които не се отчете повишаване на нивата на anti-C3 до патологични стойности и не се отчете активиране на ЛН (преминаване от пълна в частична ремисия или от частична ремисия в активна ЛН) са 13 (68,4% от всички, при които не се отчете повишаване на anti-C3 до патологични нива). Разпределението на пациентите с ЛН според наличието или липсата на повишение на нивата на anti-C3 до патологични стойности и според наличието или липсата на активиране на ЛН е показано на Таблица 28.

Таблица 28. Разпределение на пациентите с ЛН, проследявани в динамика с 3 и повече проби по време на проучването, според наличието или липсата на повишение на нивата на anti-C3 до патологични стойности и наличието или липсата на активиране на ЛН.

Пациенти с ЛН	Активирани на ЛН	Без активиране на ЛН	Общо
С повишаване на anti-C3 до патологични нива	16	7	23
Без повишаване на anti-C3 до патологични нива	6	13	19
Общо	22	20	42

Въз основа на това разпределение установихме, че повишението на anti-C3 до патологични нива статистически значимо определя последващо повишаване на активността на ЛН (съгласно критериите за активна ЛН, частична ремисия и пълна ремисия) в рамките на среден период от $1,7 \pm 3,3$ (от 0,0 до 11,0) месеца (Fisher's exact test, $p=0,029$) с чувствителност от 72,7%, специфичност от 65,0%, позитивна предиктивна стойност от 69,6% и негативна предиктивна стойност от 68,4%. Относителният риск (RR) за активиране на ЛН след повишаване на нивата на anti-C3 до патологични стойности определихме на 2,2.

5.7.2. Динамика на автоантителата срещу С3 във връзка с някои лабораторни и имунологични показатели при пациентите с ЛН.

Средното нормализирано ниво на anti-C3 при пациенти с ЛН в началото на периода на проследяване е $1,281 \pm 1,932$ (от 0,008 до 8,820), докато в края на среден период от 13 месеца на проследяването и лечение е $1,237 \pm 2,482$ (от 0,000 до 16,420), като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,405$).

С оглед динамичното проследяване на нивата на anti-C3 във връзка с основните клинично-лабораторни и имунологични показатели при пациентите с ЛН определихме промяната на нивата на anti-C3 като процент ($\Delta N\%$) спрямо изходното ниво при първото изследване, по долупосочената формула, където: N_1 е нормализираното ниво на anti-C3 при първата проба на пациента в началото на проучването; N_x е нормализираното ниво на anti-C3 в крайното изследване (след среден период от 13 месеца на проследяване и лечение):

$$\Delta N = \frac{N_x - N_1}{N_1} \times 100\%.$$

5.7.2.1. Динамика на автоантителата срещу С3 и протеинурията.

Динамиката на протеинурията за този период показва средно начално ниво от $1,76 \pm 3,27$ (от 0,02 до 15,72) g/d и средно ниво в края от $1,34 \pm 2,47$ (от 0,01 до 12,39) g/d, като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,084$).

Аналогично на горепосоченото, определихме и промяната на протеинурията (ΔPU) спрямо изходната протеинурия (PU_1 – протеинурията при първото изследване (g/d); PU_x – протеинурия при последното изследване (g/d)), отново за среден период на проследяване и лечение от 13 месеца:

$$\Delta PU = \frac{PU_x - PU_1}{PU_1} \times 100\%.$$

Липсва статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-C3 и протеинурията при всички изследваните в динамика проби от пациентите с ЛН (Spearman, $r=0,04$; $p=0,235$, Фигура 96A1). Сред пробите от пациентите с ЛН, които някога са имали екстраренални прояви на СЛЕ, установихме статистически значима позитивна корелация между нормализираните нива на anti-C3 и протеинурията (Spearman, $r=0,13$; $p=0,031$, Фигура 96A2). При пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ липсва значима корелационна зависимост между нивата на anti-C3 и протеинурията

(Spearman, $r=-0,15$; $p=0,144$, Фигура 96A3).

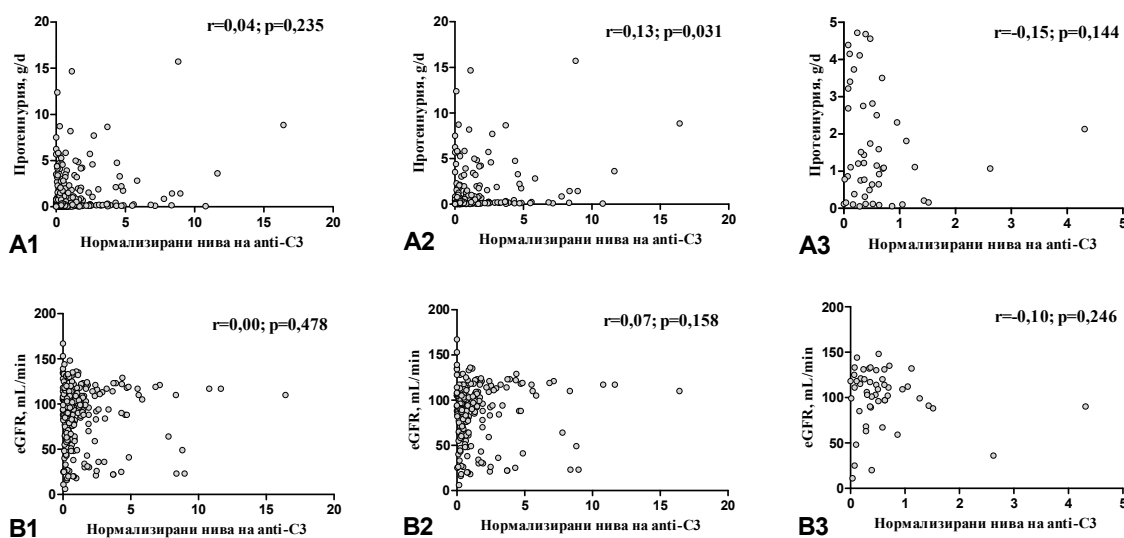
5.7.2.2. Динамика на автоантителата срещу С3 и бъбречната функция.

Динамиката на eGFR (mL/min) за периода на проследяване и лечение на пациентите с ЛН показва средно начално ниво от $91,3 \pm 31,1$ (от 18,0 до 136,0) mL/min и средно ниво в края от $94,0 \pm 29,9$ (от 25,0 до 153,0) mL/min, като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,153$).

Определихме промяната на eGFR (ΔGFR) спрямо изходната GFR при пациентите, изследвани за anti-C3 ($GFR_1 - GFR$ при първото изследване (mL/min); $GFR_x - GFR$ при изследването след среден период на проследяване от 13 месеца (mL/min)):

$$\Delta GFR = \frac{GFR_x - GFR_1}{GFR_1} \times 100\%.$$

Липсват статистически значими корелационни зависимости между нивата на anti-C3 и eGFR при всички изследвани в динамика проби от пациентите с ЛН (Spearman, $r=0,00$; $p=0,478$, Фигура 96B1), при пробите от пациентите с ЛН, които някога са имали екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=0,07$; $p=0,158$, Фигура 96B2), като и при пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=-0,10$; $p=0,246$, Фигура 96B3).



Фигура 96. Корелационен анализ на зависимостите между нормализираните нива на anti-C3 и протеинурията, и anti-C3 и изчислената скорост на гломерулна филтрация (eGFR): при всички изследвани в динамика проби от пациенти с ЛН (A1 и B1); при пробите, изследвани в динамика от пациенти с ЛН с екстраренални прояви на СЛЕ (A2 и B2) и при всички изследвани проби от пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ (A3 и B3). Липсва статистически значима корелационна зависимост между нормализираните нива на anti-C3 и протеинурията и между anti-C3 и eGFR при различните групи пациенти с ЛН (Spearman).

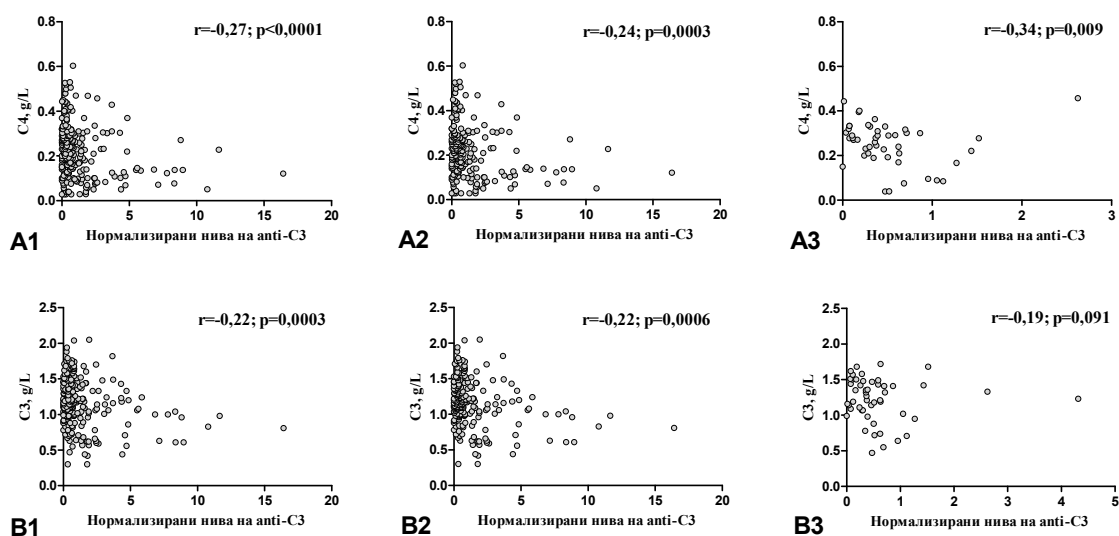
5.7.2.3. Динамика на автоантителата срещу С3 и компонентите на комплемента С4 и С3.

Динамиката на плазмената концентрация на С4 (g/L) за периода на проследяване и лечение на пациентите с ЛН показва средно начално ниво от $0,22 \pm 0,12$ (от 0,03 до 0,53) g/L и средно ниво в края от $0,24 \pm 0,12$ (от 0,04 до 0,60) g/L, като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,090$). Динамиката на плазмената концентрация на С3 (g/L) за този период показва средно начално ниво от $1,15 \pm 0,36$ (от 0,44 до 1,88) g/L и средно ниво в края от $1,20 \pm 0,25$ (от 0,55 до 1,74) g/L, като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,288$).

Определихме промените на С4 и С3 ($\Delta C4$ и $\Delta C3$) спрямо съответните изходни нива на С4 и С3 при изследването в началото (C_1 – съответното ниво на комплемента (С4 и С3) (g/L) в началото; C_x – съответното ниво на комплемента (С4 и С3) (g/L) в края на периода на проследяване):

$$\Delta C = \frac{C_x - C_1}{C_1} \times 100\%.$$

При изследване на зависимостите между нивата на anti-C3 и плазмените концентрации на C4 установихме, че сред всички динамично изследвани пациенти с ЛН, сред динамично изследваните пациенти с ЛН и екстраренални прояви на СЛЕ и сред динамично изследваните пациенти с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ съществуват статистически значими отрицателни корелационни зависимости (Spearman, съответно: $r=-0,27$, $p<0,0001$; $r=-0,24$, $p=0,0003$ и $r=-0,34$, $p=0,009$) (Фигура 97 А1, А2 и А3). Установихме наличие на статистически значими отрицателни корелационни зависимости между нивата на anti-C3 и концентрациите на C3 сред всички пациенти с ЛН, изследвани в динамика, както и сред динамично изследваните с ЛН и екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, съответно: $r=-0,22$, $p=0,0003$; $r=-0,22$, $p=0,0006$) (Фигура 97 В1 и В2). Сред динамично изследваните пациенти с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ не установихме статистически значима корелация (Spearman, $r=-0,19$; $p=0,091$) (Фигура 97В3).

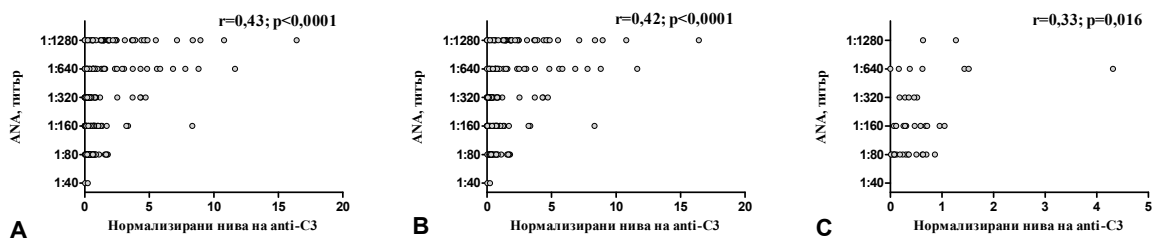


Фигура 97. Корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C3, изследвани в динамика при пациентите с ЛН и плазмените концентрации на C4 и C3 в тези проби. (A1 и B1) При всички пациенти с ЛН; (A2 и B2) При пациентите с ЛН с екстраренални прояви на СЛЕ; (A3 и B3) При пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ. (Spearman).

5.7.2.4. Динамика на автоантителата срещу C3 и антинуклеарните автоантитела (ANA).

Динамиката на титъра на ANA за периода на проследяване и лечение на пациентите с ЛН показва средно начално ниво (median) от 1:640 (от 1:40 до 1:1280) и средно ниво в края (median) от 1:320 (от 1:80 до 1:1280), като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,078$).

Проучвайки зависимостите между нивата на anti-C3 и титрите на ANA сред всички пациенти с ЛН, изследвани в динамика (при които са изследвани едновременно anti-C3 и ANA), установихме, че е налице статистически значима позитивна корелация между нормализираното ниво на anti-C3 и титъра на ANA (Spearman, $r=0,43$; $p<0,0001$) (Фигура 98А). При изследвания сред групите от пациентите с ЛН с екстраренални прояви на СЛЕ и при пациенти с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ също установихме статистически значими позитивни корелационни зависимости (Spearman, съответно: $r=0,42$; $p<0,0001$ и $r=0,33$; $p=0,016$) (Фигура 98 В и С).

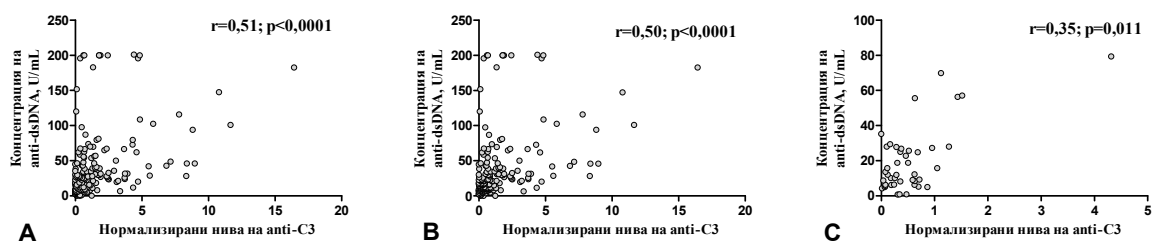


Фигура 98. Корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C3 и титрите на ANA: **A.** При всички проведени в динамика проби от пациентите с ЛН (Spearman, $r=0,43$; $p<0,0001$); **B.** При пациентите с ЛН и екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=0,42$; $p<0,0001$); **C.** При пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=0,33$; $p=0,016$).

5.7.2.5. Динамика на автоантителата срещу C3 и автоантителата срещу двойноверижна ДНК (anti-dsDNA).

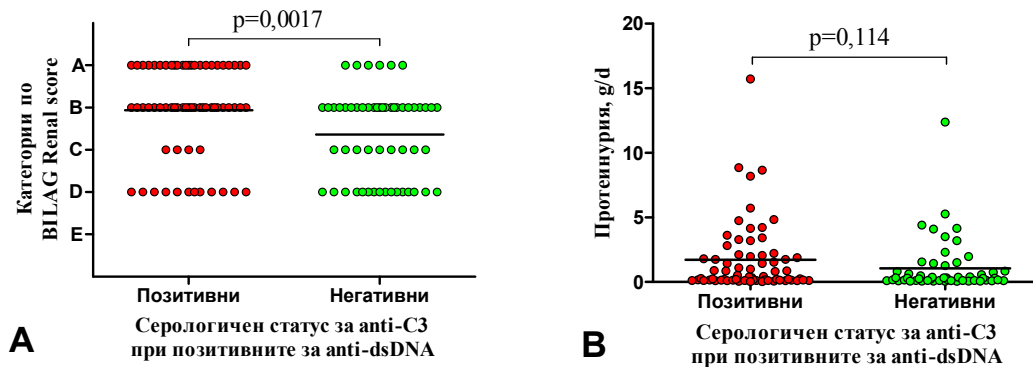
Динамиката на концентрацията на anti-dsDNA (U/mL) за периода на проследяване и лечение на пациентите с ЛН показва средно начално ниво от $32,6\pm 37,0$ (от 5,6 до 195,8) U/mL и средно ниво в края от $33,2\pm 43,8$ (от 0,1 до 183, 0) U/mL, като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,132$).

Проучвайки зависимостите между нивото на anti-C3 и концентрацията на anti-dsDNA (U/mL) сред всички пациенти с ЛН, изследвани в динамика (при които са изследвани едновременно anti-C3 и anti-dsDNA), установихме наличие на статистически значима позитивна корелация между нормализираното ниво на anti-C3 и концентрацията на anti-dsDNA (Spearman, $r=0,51$; $p<0,0001$, Фигура 99A). Тази зависимост се потвърди и сред пациентите с ЛН с и без екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, съответно: $r=0,50$, $p<0,0001$ и $r=0,35$, $p=0,011$) (Фигура 99 B и C).



Фигура 99. Корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C3 и концентрациите на anti-dsDNA (U/mL) при: **A.** Всички пациентите с ЛН, изследвани в динамика (Spearman, $r=0,51$; $p<0,0001$); **B.** При пациентите с ЛН с екстраренални прояви на СЛЕ, изследвани в динамика (Spearman, $r=0,50$; $p<0,0001$); **C.** При пациенти с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ, изследвани в динамика (Spearman, $r=0,35$; $p=0,011$).

При сравнителен анализ сред всички изследвани в динамика проби от пациенти, позитивни за anti-dsDNA (N=121), установихме, че при позитивните едновременно за anti-dsDNA и anti-C3 пациенти с ЛН средната и геометричната средна на ранговете (категиите по BILAG Renal score) са статистически значимо по-високи от средната и геометричната средна при пациентите, които са позитивни за anti-dsDNA и негативни за anti-C3 (Mann-Whitney, $p=0,0017$) (Фигура 100A). Установихме сравнително по-висока протеинурия при пациентите едновременно позитивни за anti-dsDNA и anti-C3 ($1,72\pm 2,73$ g/d) в сравнение с протеинурията при пациентите, позитивни за anti-dsDNA, но негативни за anti-C3 ($1,05\pm 2,01$ g/d), въпреки че разликата не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,114$) (Фигура 100B).

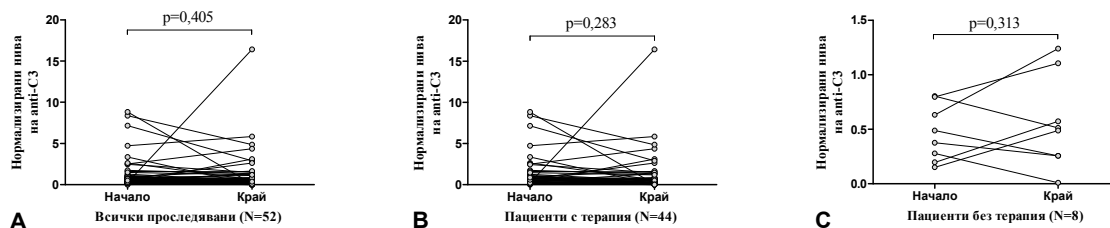


Фигура 100. А. Сравнителен анализ между категориите на ЛН по BILAG Renal score (ранговете) при позитивните едновременно за anti-dsDNA и anti-C3 и при позитивните за anti-dsDNA и негативни за anti-C3 пациенти с ЛН (Mann-Whitney, $p=0,0017$). В. Сравнителен анализ между средните нива на протеинурия при пациентите, позитивни едновременно за anti-dsDNA и anti-C3, и тези, позитивни за anti-dsDNA и негативни за anti-C3 (Mann-Whitney, $p=0,114$).

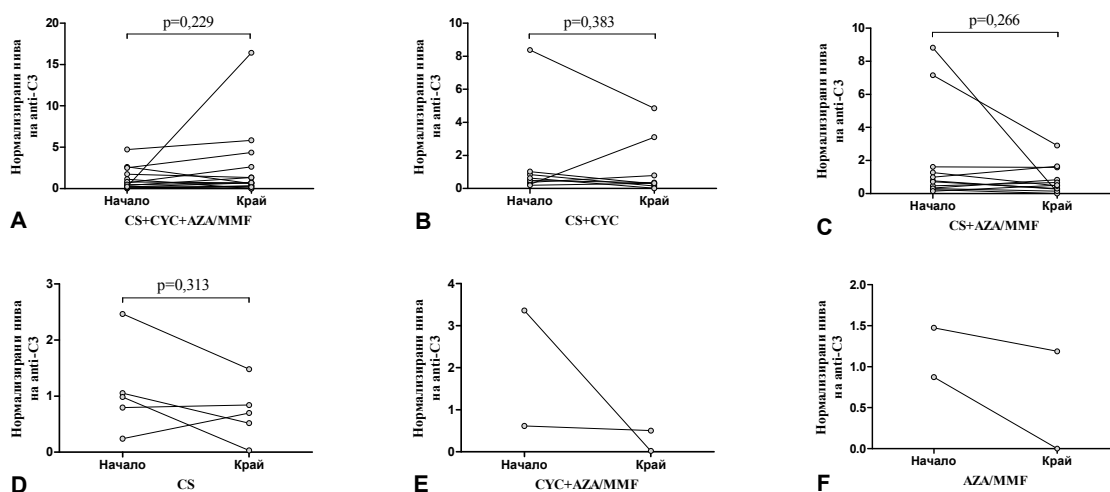
5.8. Автоантитела срещу C3 и някои аспекти на лечението при пациентите с ЛН.

При всички проследявани пациенти ($N=52$), в началния момент средното нормализирано ниво на anti-C3 е $1,281 \pm 1,932$ (от 0,008 до 8,820), а в края на периода на проследяване – $1,237 \pm 2,482$ (от 0,000 до 16,420), като макар средното ниво да намалява разликата в началото и в края е статистически незначима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,405$) (Фигура 101А). При пациентите с проведена имунопатогенетична терапия в рамките на периода на проследяване ($N=44$), средното нормализирано ниво на anti-C3 в началото е $1,429 \pm 2,067$ (от 0,008 до 8,820), а в края – $1,362 \pm 2,679$ (от 0,000 до 16,420), като в тази група отново установихме статистически незначимо намаление на нивото на anti-C3 в края на периода на проследяване и лечение (Wilcoxon signed rank test, $p=0,283$) (Фигура 101В). В групата пациенти, при които не е провеждана имунопатогенетична терапия ($N=8$), средното нормализирано ниво на anti-C3 в началото е $0,465 \pm 0,259$ (от 0,150 до 0,805), а в края – $0,555 \pm 0,424$ (от 0,008 до 1,241), като в тази група средното ниво на anti-C3 статистически незначимо нараства в края на периода на проследяване (Wilcoxon signed rank test, $p=0,313$) (Фигура 101С).

С оглед вида на проведеното имунопатогенетично лечение, сред пациентите, при които е провеждано такава, обособихме основно 6 групи: 15 (34,1%) пациенти, при което е провеждано комбинирано лечение с CS+CYC+AZA/MMF; 8 (18,2%) пациенти, при които е провеждано комбинирано лечение с CS+CYC; 12 (27,3%) пациенти, при които е провеждано комбинирано лечение с CS+AZA или CS+MMF; 5 (11,4%) пациенти, при които е провеждана монотерапия с CS; 2 (4,5%) пациенти, при които е провеждано комбинирано лечение с CYC и AZA и 2 (4,5%) пациенти, при които е провеждана монотерапия: с AZA при единия и с MMF при другия. При сравнителен анализ на нивата на anti-C3 в началото и в края на проведеното лечение при различните групи пациенти установихме следното: в групата на терапия с CS+CYC+AZA/MMF средното нормализирано ниво на anti-C3 в началото е $1,067 \pm 1,321$ (от 0,008 до 4,722), а в края – $2,359 \pm 4,241$ (от 0,000 до 16,420), като в тази група нивото се увеличава, но статистически незначимо (Wilcoxon signed rank test, $p=0,229$) (Фигура 102А); в групата на лечение с CS+CYC средното ниво в началото е $1,523 \pm 2,783$ (от 0,196 до 8,376), а в края – $1,232 \pm 1,774$ (от 0,015 до 4,857), като в тази група средното ниво намалява, но статистически незначимо (Wilcoxon signed rank test, $p=0,383$) (Фигура 102В); в групата на лечение с CS+AZA/MMF средното ниво в началото е $1,900 \pm 2,898$ (от 0,143 до 8,820), а в края – $0,782 \pm 0,857$ (от 0,000 до 2,902), в тази група средното ниво също намалява, но статистически незначимо (Wilcoxon signed rank test, $p=0,266$) (Фигура 102С); в групата на монотерапия с CS средното ниво в началото е $1,108 \pm 0,823$ (от 0,241 до 2,466), а в края – $0,714 \pm 0,527$ (от 0,030 до 1,481), като средното ниво в тази група също намалява, но статистически незначимо (Wilcoxon signed rank test, $p=0,313$) (Фигура 102Д); в групите на лечение с CYC+AZA и AZA/MMF попадат по 2 пациенти, като от Фигура 102 Е и F се вижда намаляване на нивата на anti-C3 в групата на терапия с CYC+AZA и намаляване на нивата в групата на терапия с AZA/MMF, но поради малкия брой на пациентите статистическият сравнителен анализ в тези две групи не е коректен.



Фигура 101. Крайни и начални нива на anti-C3 при: **A.** всички проследявани пациенти ($N=52$) ($p=0,405$); **B.** пациентите, при които е провеждана имунопатогенетична терапия ($N=44$) ($p=0,283$) и **C.** пациентите, при които не е провеждана имунопатогенетична терапия през периода на проследяване ($N=8$) ($p=0,313$) (Wilcoxon signed rank test).



Фигура 102. Нормализирани нива на anti-C3 в началото и в края на период на проследяване при пациенти, при които е провеждана терапия с: **A.** CS+CYC+AZA/MMF (Wilcoxon signed rank test, $p=0,229$); **B.** CS+CYC (Wilcoxon signed rank test, $p=0,383$); **C.** CS+AZA/MMF (Wilcoxon signed rank test, $p=0,266$); **D.** CS (Wilcoxon signed rank test, $p=0,313$). **E.** CYC+AZA – и при двамата пациенти нивата на anti-C3 намаляват в края; **F.** MMF при един пациент и AZA при един пациент, като нивата на anti-C3 намаляват в края.

6. ЗНАЧЕНИЕ НА КОМБИНАЦИИ ОТ АВТОАНТИТЕЛА СРЕЩУ РАЗЛИЧНИТЕ КОМПОНЕНТИ НА КОМПЛЕМЕНТА ЗА ОЦЕНКА НА ЛУПУСНАТА НЕФРОПАТИЯ.

В рамките на лонгитудинално проучване в динамика на изследваните пациенти с ЛН (N=266 проби) установихме следните корелационни зависимости между нормализираните нива на антикомплементните автоантитела (Таблица 29).

Таблица 29. Корелационни зависимости между нормализираните нива на различните изследвани антикомплементни автоантитела при всички изследвани в динамика пациенти с ЛН.

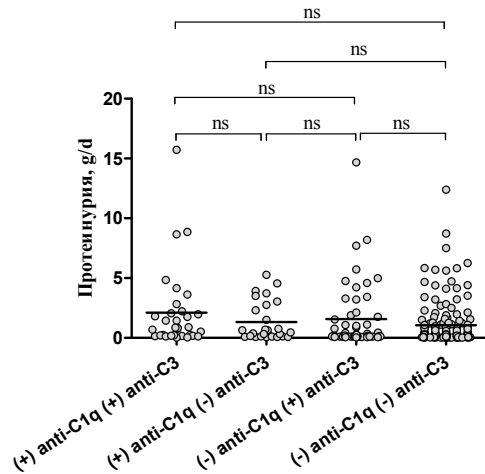
Корелационна зависимост на:	Spearman (one-tailed)	
	R ²	p (значение)
Anti-C1q c Anti-C1r	0,0121	0,037 (*)
Anti-C1q c Anti-C1s	0,0961	<0,0001 (***)
Anti-C1q c Anti-C4	0,000009	0,481 (ns)
Anti-C1q c Anti-C3	0,0900	<0,0001 (***)
Anti-C1r c Anti-C1s	0,0576	<0,0001 (***)
Anti-C1r c Anti-C4	0,0064	0,111 (ns)
Anti-C1r c Anti-C3	0,0676	<0,0001 (***)
Anti-C1s c Anti-C4	0,0169	0,015 (*)
Anti-C1s c Anti-C3	0,0625	<0,0001 (***)
Anti-C4 c Anti-C3	0,1764	<0,0001 (***)

Налице са статистически значими корелационни зависимости между anti-C1q и anti-C1r, anti-C1q и anti-C1s, anti-C1q и anti-C3, anti-C1r и anti-C1s, anti-C1r и anti-C3, anti-C1s и anti-C4, anti-C1s и anti-C3 и anti-C4 и anti-C3, докато между anti-C1q и anti-C4 и между anti-C1r и anti-C4 не установихме статистически значими корелационни зависимости.

Изследвахме значението на комбинирания серологичен статус между anti-C1q и другите антикомплементни автоантитела върху някои основни параметри при пациентите с ЛН: протеинурия, концентрация на anti-dsDNA, наличието на активно заболяване, налагащо задължително провеждане на имунопатогенетично лечение (категория А по BILAG Renal score на ЛН) и наличие на дифузна ЛН (IV хистологичен клас).

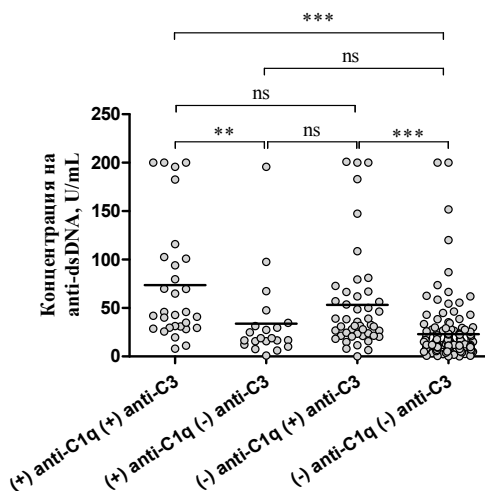
6.1. Комбинацията от автоантитела срещу C1q и C3 и някои аспекти на ЛН.

Изследвахме влиянието на комбинацията от позитивния и негативния статус за anti-C1q и anti-C3 върху протеинурията при пациентите с ЛН. Не установихме статистически значима разлика между нивата на протеинурията при пациентите с ЛН в различните групи, обособени според наличието или липсата на патологично повишени anti-C1q и anti-C3 (One-way ANOVA, $p=0,086$; Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$) (Фигура 103). Въз основа на това установихме липса на статистически значимо влияние на серологичния статус на anti-C1q и серологичния статус на anti-C3 върху протеинурията (Two-ways ANOVA, съответно $F=1,34$, $p=0,249$ и $F=3,53$, $p=0,062$). Ефектът на серологичния статус за anti-C1q върху протеинурията не се различава при различните серологични статуси за anti-C3 (Two-ways ANOVA, $F=0,12$, $p=0,729$).



Фигура 103. Средни нива на протеинурията (g/d) при пациентите с ЛН в зависимост от двойния серологичен статус за anti-C1q и anti-C3. Липсва статистически значима разлика между нивата в различните групи пациенти (One-way ANOVA, $p=0,086$; Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$).

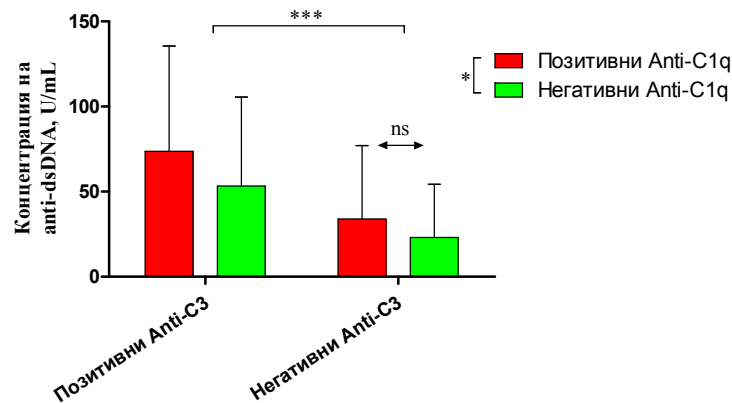
Изследвахме влиянието на комбинацията от позитивния и негативния статус за anti-C1q и anti-C3 върху концентрацията на anti-dsDNA при пациентите с ЛН. При пациентите, позитивни едновременно за anti-C1q и anti-C3, средната концентрация на anti-dsDNA е статистически значимо по-висока от тази при пациентите едновременно негативни за anti-C1q и anti-C3. Концентрацията на anti-dsDNA е статистически значимо по-висока при пациентите позитивни едновременно за anti-C1q и anti-C3 от тази при пациентите позитивни за anti-C1q и негативни за anti-C3. Концентрацията на anti-dsDNA е статистически значимо по-висока при пациентите негативни за anti-C1q и позитивни за anti-C3 от тази при пациентите негативни за anti-C1q и негативни за anti-C3 (One-way ANOVA, $p<0,0001$; Bonferroni's multiple comparison test) (Фигура 104 и Таблица 30). Въз основа на това определихме влияние на серологичния статус на anti-C1q и на серологичния статус на anti-C3 върху концентрацията на anti-dsDNA, като по-силно влияние за наличие на повишена концентрация на anti-dsDNA има позитивния серологичен статус за anti-C3 (Two-ways ANOVA, съответно: $F=4,94$, $p=0,027$ и $F=24,78$, $p<0,0001$), докато ефектът на anti-C1q върху концентрацията на anti-dsDNA при различните серологични статуси за anti-C3 не се различава (Two-ways ANOVA, $F=0,46$, $p=0,497$) (Фигура 105).



Фигура 104. Средни нива на концентрацията на anti-dsDNA (U/mL) при пациентите с ЛН в зависимост от двойния серологичен статус за anti-C1q и anti-C3. (One-way ANOVA, $p<0,0001$; Bonferroni's multiple comparison test, $p<0,05$ между посочените групи).

Таблица 30. Множествен сравнителен анализ на концентрацията на anti-dsDNA при пациентите с ЛН в зависимост от двойния серологичен статус за anti-C1q и anti-C3.

Bonferroni's multiple comparison test	Mean Diff.	t	p<0,05	95% CI of diff
(+) anti-C1q (+) anti-C3 c (+) anti-C1q (-) anti-C3	39,83	3,306	Да (**)	7,756 до 71,90
(+) anti-C1q (+) anti-C3 c (-) anti-C1q (+) anti-C3	20,43	2,056	Не (ns)	-6,020 до 46,88
(+) anti-C1q (+) anti-C3 c (-) anti-C1q (-) anti-C3	50,69	5,898	Да (***)	27,81 до 73,57
(+) anti-C1q (-) anti-C3 c (-) anti-C1q (+) anti-C3	-19,39	1,739	Не (ns)	-49,08 до 10,29
(+) anti-C1q (-) anti-C3 c (-) anti-C1q (-) anti-C3	10,86	1,089	Не (ns)	-15,69 до 37,41
(-) anti-C1q (+) anti-C3 c (-) anti-C1q (-) anti-C3	30,26	4,153	Да (***)	10,86 до 49,65



Фигура 105. Концентрация на anti-dsDNA при пациентите с ЛН в зависимост от комбинираня серологичен статус за anti-C1q и anti-C3. Серологичният статус за anti-C1q статистически значимо повлиява концентрацията на anti-dsDNA (Two-ways ANOVA, $F=4,94$, $p=0,027$ (*)). Серологичният статус за anti-C3 статистически значимо повлиява концентрацията на anti-dsDNA (Two-ways ANOVA, $F=24,78$, $p<0,0001$ (***)). Ефектът на серологичния статус за anti-C1q върху концентрацията на anti-dsDNA не се различава при различните серологични статуси за anti-C3 (Two-ways ANOVA, $F=0,46$, $p=0,497$ (ns)).

Изследвахме връзката между серологичния статус за anti-C1q и anti-C3 и наличието на категория А на ЛН по BILAG Renal score. Сред двойно позитивните за anti-C1q и anti-C3, изследвани в динамика, при 16 (50,0% от всички едновременно позитивни за anti-C1q и anti-C3) е налице категория А, а сред едновременно негативните за anti-C1q и anti-C3, пациентите с категория, различна от А (В, С или D) са 140 (90,3% от всички едновременно негативни за anti-C1q и anti-C3) (Таблица 31). Въз основа на това разпределение установихме, че двойно позитивният статус за anti-C1q и anti-C3 статистически значимо определя наличието на категория А на ЛН по BILAG Renal score (Fisher's exact test, $p<0,0001$) с чувствителност от 51,6%, специфичност от 89,7%, позитивна предиктивна стойност от 50,0%, негативна предиктивна стойност от 90,3%. Релативният риск (RR) за наличие на категория А на ЛН при двойно позитивен серологичен статус за anti-C1q и anti-C3 е 5,2.

Таблица 31. Разпределение на пациентите с ЛН според двойно позитивния и двойно негативния статус за anti-C1q и anti-C3 и наличието на категория А по BILAG Renal score на ЛН.

Пациенти	BILAG, A	BILAG, B, C, D	Общо
Позитивни едновременно за anti-C1q и anti-C3	16	16	32
Негативни едновременно за anti-C1q и anti-C3	15	140	155
Общо	31	156	187

Изследвахме връзката между серологичния статус за anti-C1q и anti-C3 и хистологичния клас ЛН. Сред едновременно позитивните за anti-C1q и anti-C3 пациенти с ЛН, изследвани изходно в проучването, при 6 (100% от всички едновременно позитивни за anti-C1q и anti-C3, които имат хистологична диагноза) е налице IV хистологичен клас ЛН, а сред пациентите едновременно негативни за anti-C1q и anti-C3 при 35 (76,1% от всички едновременно негативни за anti-C1q и anti-C3, които имат хистологична диагноза) е налице хистологичен клас на ЛН, различен от IV (Таблица 32). Въз основа на това разпределение

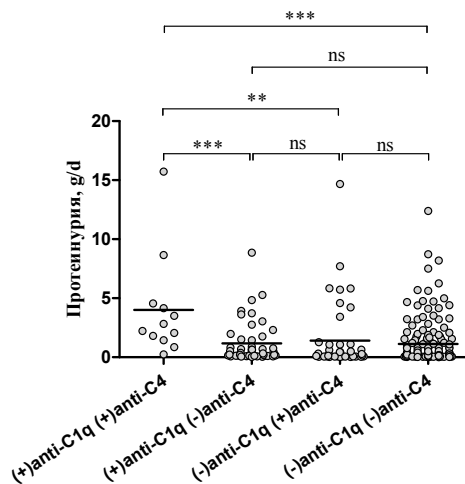
установихме, че позитивният статус едновременно за anti-C1q и anti-C3 статистически значимо определя наличието на ЛН от IV клас (Fisher's exact test, $p=0,0006$) с чувствителност от 35,3%, специфичност от 100%, позитивна предиктивна стойност от 100%, негативна предиктивна стойност от 76,1%. Релативният риск за наличие на дифузна лупусна нефропатия (IV клас) при наличие на двойно позитивни за anti-C1q и anti-C3 пациенти е 4,2.

Таблица 32. Разпределение на пациентите с ЛН според двойно позитивния и двойно негативния статус за anti-C1q и anti-C3 и наличието на IV хистологичен клас на ЛН.

Пациенти	IV хистологичен клас ЛН	Друг хистологичен клас ЛН	Общо
Позитивни едновременно за anti-C1q и anti-C3	6	0	6
Негативни едновременно за anti-C1q и anti-C3	11	35	46
Общо	17	35	52

6.2. Комбинацията от автоантитела срещу C1q и C4 и някои аспекти на ЛН.

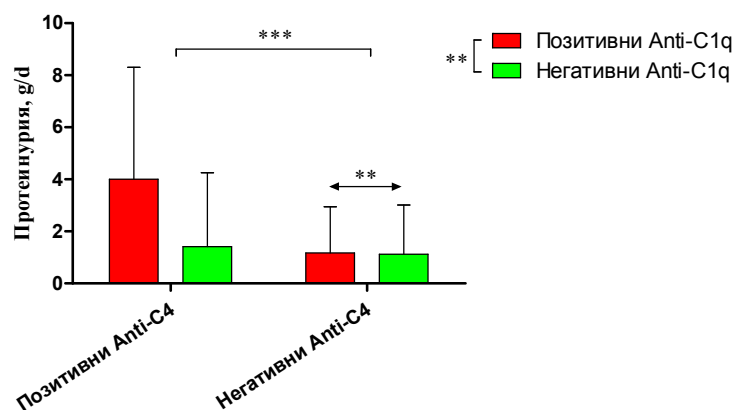
Изследвахме влиянието на комбинацията от позитивния и негативния статус за anti-C1q и anti-C4 върху протеинурията при пациентите с ЛН. Установихме статистически значима разлика между нивата на протеинурията при пациентите с ЛН в различните групи, обособени според наличието или липсата на патологично повишени anti-C1q и anti-C4. Протеинурията при двойно позитивните пациенти за anti-C1q и anti-C4 е значимо по-висока от тази при позитивните за anti-C1q и негативните за anti-C4, значимо по-висока от тази при негативните за anti-C1q и позитивните за anti-C4 и значимо по-висока от тази при двойно негативните за anti-C1q и anti-C4 (One-way ANOVA, $p=0,0003$; Bonferroni's multiple comparison test, $p<0,05$ за посочените групи) (Фигура 118 и Таблица 33). Въз основа на това определихме влиянието на серологичния статус на anti-C1q и серологичния статус на anti-C4 върху протеинурията, като по-силно влияние за наличие на повишена протеинурия има серологичния статус за anti-C4 (Two-ways ANOVA, съответно $F=10,73$, $p=0,0012$ и $F=14,99$, $p=0,0001$). Ефектът на серологичния статус за anti-C1q върху протеинурията се различава при различните серологични статуси за anti-C4 (Two-ways ANOVA, $F=9,94$, $p=0,0018$) (Фигура 107).



Фигура 106. Средни нива на протеинурията (g/d) при пациентите с ЛН в зависимост от двойния серологичен статус за anti-C1q и anti-C4 (One-way ANOVA, $p=0,0003$; Bonferroni's multiple comparison test, $p<0,05$ за посочените групи пациенти).

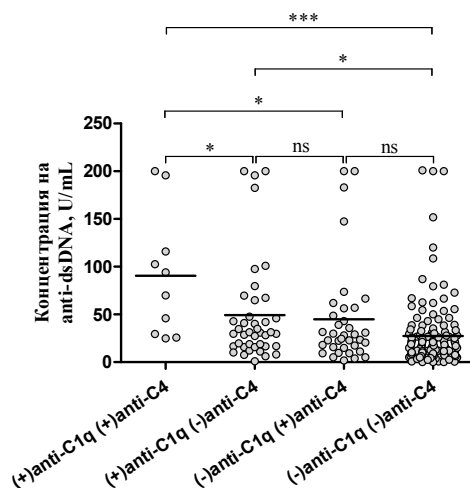
Таблица 33. Множествен сравнителен анализ на протеинурията при пациентите с ЛН в зависимост от двойния серологичен статус за anti-C1q и anti-C4.

Bonferroni's multiple comparison test	Mean Diff.	t	$p<0,05$	95% CI of diff
(+)anti-C1q (+)anti-C4 c (+)anti-C1q (-)anti-C4	2,833	3,974	Да (***)	0,9379 до 4,728
(+)anti-C1q (+)anti-C4 c (-)anti-C1q (+)anti-C4	2,590	3,609	Да (**)	0,6821 до 4,498
(+)anti-C1q (+)anti-C4 c (-)anti-C1q (-)anti-C4	2,882	4,372	Да (***)	1,130 до 4,635
(+)anti-C1q (-)anti-C4 c (-)anti-C1q (+)anti-C4	-0,2428	0,5251	He (ns)	-1,472 до 0,9862
(+)anti-C1q (-)anti-C4 c (-)anti-C1q (-)anti-C4	0,04947	0,1356	He (ns)	-0,9205 до 1,019
(-)anti-C1q (+)anti-C4 c (-)anti-C1q (-)anti-C4	0,2922	0,7805	He (ns)	-0,7031 до 1,288



Фигура 107. Протеинурия при пациентите с ЛН в зависимост от комбинирания серологичен статус за anti-C1q и anti-C4. Серологичният статус за anti-C1q статистически значимо повлиява протеинурията (Two-ways ANOVA, $p=0,0012$ (**)). Серологичният статус за anti-C4 статистически значимо повлиява протеинурията (Two-ways ANOVA, $p=0,0001$ (***)). Ефектът на серологичния статус за anti-C1q върху протеинурията се различава при различните серологични статуси за anti-C4 (Two-ways ANOVA, $p=0,0018$ (**)).

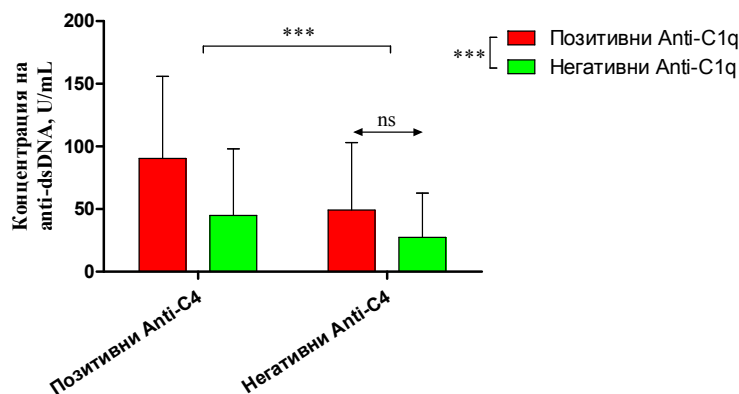
Изследвахме влиянието на комбинацията от позитивния и негативния статус за anti-C1q и anti-C4 върху концентрацията на anti-dsDNA при пациентите с ЛН. При пациентите, позитивни едновременно за anti-C1q и anti-C4, средната концентрация на anti-dsDNA е статистически значимо по-висока от тази при пациентите едновременно негативни за anti-C1q и anti-C4. Концентрацията на anti-dsDNA е статистически значимо по-висока при пациентите позитивни едновременно за anti-C1q и anti-C4 от тази при пациентите позитивни за anti-C1q и негативни за anti-C4. Концентрацията на anti-dsDNA е статистически значимо по-висока при пациентите едновременно позитивни за anti-C1q и за anti-C4 от тази при пациентите негативни за anti-C1q и позитивни за anti-C4. Концентрацията на anti-dsDNA е статистически значимо по-висока при пациентите позитивни за anti-C1q и негативни за anti-C4 от тази при пациентите негативни едновременно за anti-C1q и anti-C4. Няма статистически значима разлика между концентрацията на anti-dsDNA при пациентите позитивни за anti-C1q и негативни за anti-C4 и тази при пациентите негативни за anti-C1q и позитивни за anti-C4. Няма статистически значима разлика между концентрацията на anti-dsDNA при пациентите негативни за anti-C1q и позитивни за anti-C4 и тази при пациентите негативни едновременно за anti-C1q и anti-C4. (One-way ANOVA, $p<0,0001$; Bonferroni's multiple comparison test) (Фигура 108 и Таблица 34). Въз основа на това определихме влияние на серологичния статус на anti-C1q и на серологичния статус на anti-C4 върху концентрацията на anti-dsDNA, като по-силно влияние за наличие на повишена концентрация на anti-dsDNA има позитивния серологичен статус за anti-C1q (Two-ways ANOVA, съответно $F=14,77$, $p=0,0002$ и $F=11,25$, $p=0,0009$). Ефектът на серологичния статус за anti-C1q върху концентрацията на anti-dsDNA не се различава при различните серологични статуси за anti-C4 (Two-ways ANOVA, $F=1,82$, $p=0,179$) (Фигура 109).



Фигура 108. Средни нива на концентрацията на anti-dsDNA (U/mL) при пациентите с ЛН в зависимост от двойния серологичен статус за anti-C1q и anti-C4. (One-way ANOVA, $p < 0,0001$; Bonferroni's multiple comparison test, $p < 0,05$ за посочените групи).

Таблица 34. Сравнителен анализ на концентрацията на anti-dsDNA при пациентите с ЛН в зависимост от двойния серологичен статус за anti-C1q и anti-C4.

Bonferroni's multiple comparison test	Mean Diff.	t	$p < 0,05$	95% CI of diff
(+)anti-C1q (+)anti-C4 c (+)anti-C1q (-)anti-C4	41,15	2,663	Да (*)	0,004033 до 82,30
(+)anti-C1q (+)anti-C4 c (-)anti-C1q (+)anti-C4	45,43	2,900	Да (*)	3,730 до 87,14
(+)anti-C1q (+)anti-C4 c (-)anti-C1q (-)anti-C4	62,98	4,387	Да (***)	24,76 до 101,2
(+)anti-C1q (-)anti-C4 c (-)anti-C1q (+)anti-C4	4,282	0,4278	Не (ns)	-22,37 до 30,93
(+)anti-C1q (-)anti-C4 c (-)anti-C1q (-)anti-C4	21,83	2,798	Да (*)	1,058 до 42,60
(-)anti-C1q (+)anti-C4 c (-)anti-C1q (-)anti-C4	17,54	2,138	Не (ns)	-4,306 до 39,39



Фигура 109. Концентрация на anti-dsDNA при пациентите с ЛН в зависимост от комбинираня серологичен статус за anti-C1q и anti-C4. Серологичният статус за anti-C1q статистически значимо повлиява концентрацията на anti-dsDNA (Two-ways ANOVA, $p = 0,0002$ (***)). Серологичният статус за anti-C4 статистически значимо повлиява концентрацията на anti-dsDNA (Two-ways ANOVA, $p = 0,0009$ (***)). Ефектът на серологичния статус за anti-C1q върху концентрацията на anti-dsDNA не се различава при различните серологични статуси за anti-C4 (Two-ways ANOVA, $p = 0,179$ (ns)).

Изследвахме връзката между серологичния статус за anti-C1q и anti-C4 и наличието на категория А на ЛН по BILAG Renal score. Сред двойно позитивните за anti-C1q и anti-C4, изследвани в динамика, при 9 (75,0% от всички едновременно позитивни за anti-C1q и anti-C4) е налице категория А, а сред едновременно негативните за anti-C1q и anti-C4, пациентите с категория, различна от А (В, С или D) са 146 (89,6% от всички едновременно негативни за anti-C1q и anti-C4) (Таблица 35). Въз основа на това

разпределение установихме, че двойно позитивният статус за anti-C1q и anti-C4 статистически значимо определя наличието на категория А на ЛН по BILAG Renal score (Fisher's exact test, $p < 0,0001$) с чувствителност от 34,6%, специфичност от 98,0%, позитивна предиктивна стойност от 75,0%, негативна предиктивна стойност от 89,6%. Релативният риск (RR) за наличие на категория А на ЛН при двойно позитивен серологичен статус за anti-C1q и anti-C4 е 7,2.

Таблица 35. Разпределение на пациентите с ЛН според двойно позитивния и двойно негативния статус за anti-C1q и anti-C4 и наличието на категория А по BILAG Renal score на ЛН.

Пациенти	BILAG, A	BILAG, B, C, D	Общо
Позитивни едновременно за anti-C1q и anti-C4	9	3	12
Негативни едновременно за anti-C1q и anti-C4	17	146	163
Общо	26	149	175

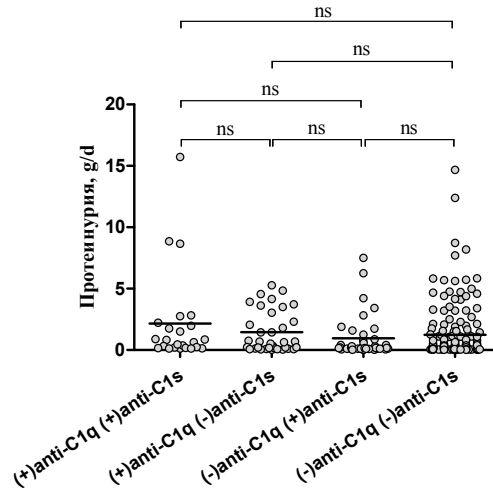
Изследвахме връзката между серологичния статус за anti-C1q и anti-C4 и хистологичния клас ЛН. Сред едновременно позитивните за anti-C1q и anti-C4 пациенти с ЛН, изследвани изходно в проучването, при 4 (100% от всички едновременно позитивни за anti-C1q и anti-C4, които имат хистологична диагноза) е налице IV хистологичен клас ЛН, а сред пациентите едновременно негативни за anti-C1q и anti-C4 при 30 (73,2% от всички едновременно негативни за anti-C1q и anti-C4, които имат хистологична диагноза) е налице хистологичен клас на ЛН, различен от IV (Таблица 36). Въз основа на това разпределение установихме, че позитивният статус едновременно за anti-C1q и anti-C4 статистически значимо определя наличието на ЛН от IV клас (Fisher's exact test, $p = 0,0092$) с чувствителност от 26,7%, специфичност от 100%, позитивна предиктивна стойност от 100%, негативна предиктивна стойност от 73,2%. Релативният риск за наличие на дифузна лупусна нефропатия (IV клас) при наличие на двойно позитивни за anti-C1q и anti-C4 пациенти е 3,7.

Таблица 36. Разпределение на пациентите с ЛН според двойно позитивния и двойно негативния статус за anti-C1q и anti-C4 и наличието на IV хистологичен клас на ЛН.

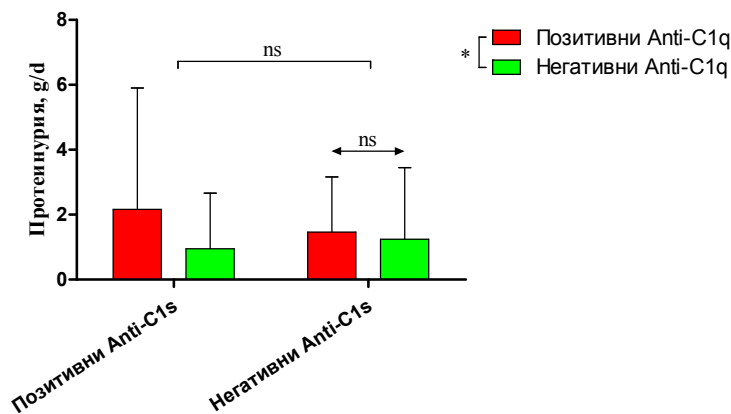
Пациенти	Друг хистологичен клас		Общо
	IV хистологичен клас ЛН	ЛН	
Позитивни едновременно за anti-C1q и anti-C4	4	0	4
Негативни едновременно за anti-C1q и anti-C4	11	30	41
Общо	15	30	45

6.3. Комбинацията от автоантитела срещу C1q и C1s и някои аспекти на ЛН.

Изследвахме влиянието на комбинацията от позитивния и негативния статус за anti-C1q и anti-C1s върху протеинурията при пациентите с ЛН. Установихме липса на статистически значима разлика между нивата на протеинурията при пациентите с ЛН в различните групи, обособени според наличието или липсата на патологично повишени anti-C1q и anti-C1s. (One-way ANOVA, $p = 0,197$; Bonferroni's multiple comparison test, $p > 0,05$) (Фигура 110). Въз основа на това определихме влиянието на серологичния статус на anti-C1q и серологичния статус на anti-C1s върху протеинурията, като влияние за наличие на повишена протеинурия има серологичния статус за anti-C1q (Two-ways ANOVA, съответно $F = 3,91$, $p = 0,049$). Серологичният статус за anti-C1s няма статистически значимо влияние върху протеинурията (Two-ways ANOVA, $F = 0,32$, $p = 0,571$). Ефектът на серологичния статус за anti-C1q върху протеинурията не се различава при различните серологични статуси за anti-C1s (Two-ways ANOVA, $F = 1,87$, $p = 0,172$) (Фигура 111).



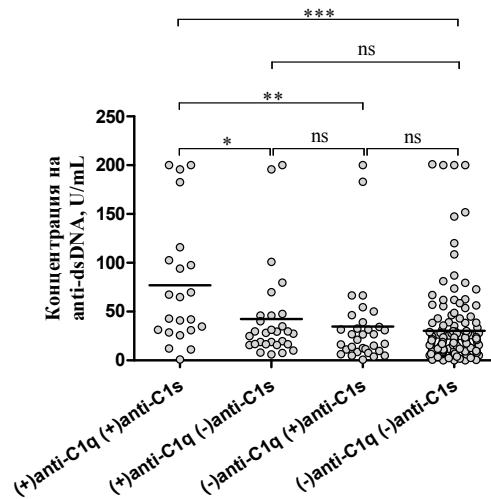
Фигура 110. Средни нива на протеинурията (g/d) при пациентите с ЛН в зависимост от двойния серологичен статус за anti-C1q и anti-C1s (One-way ANOVA, $p=0,197$; Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$).



Фигура 111. Протеинурия при пациентите с ЛН в зависимост от комбинирания серологичен статус за anti-C1q и anti-C1s. Серологичният статус за anti-C1q статистически значимо повлиява протеинурията (Two-ways ANOVA, $F=3,91$, $p=0,049$ (*)). Серологичният статус за anti-C1s не повлиява значимо протеинурията (Two-ways ANOVA, $F=0,32$, $p=0,571$ (ns)). Ефектът на серологичния статус за anti-C1q върху протеинурията не се различава при различните серологични статуси за anti-C1s (Two-ways ANOVA, $F=1,87$, $p=0,172$ (ns)).

Изследвахме влиянието на комбинацията от позитивния и негативния статус за anti-C1q и anti-C1s върху концентрацията на anti-dsDNA при пациентите с ЛН. При пациентите, позитивни едновременно за anti-C1q и anti-C1s, средната концентрация на anti-dsDNA е статистически значимо по-висока от тази при пациентите едновременно негативни за anti-C1q и anti-C1s. Концентрацията на anti-dsDNA е статистически значимо по-висока при пациентите позитивни едновременно за anti-C1q и anti-C1s от тази при пациентите позитивни за anti-C1q и негативни за anti-C1s. Концентрацията на anti-dsDNA е статистически значимо по-висока при пациентите едновременно позитивни за anti-C1q и за anti-C1s от тази при пациентите негативни за anti-C1q и позитивни за anti-C1s. Няма статистически значима разлика между концентрацията на anti-dsDNA при пациентите позитивни за anti-C1q и негативни за anti-C1s и тази при пациентите негативни за anti-C1q и позитивни за anti-C1s. Няма статистически значима разлика между концентрациите на anti-dsDNA при пациентите позитивни за anti-C1q и негативни за anti-C1q и тази при пациентите едновременно негативни за anti-C1q и anti-C1s. Няма статистически значима разлика между концентрацията на anti-dsDNA при пациентите негативни за anti-C1q и позитивни за anti-C1s и тази при пациентите негативни едновременно за anti-C1q и anti-C1s. (One-way ANOVA, $p=0,0001$; Bonferroni's multiple comparison test) (Фигура 112 и Таблица 37). Въз основа на това определихме влияние на серологичния статус на anti-C1q и на серологичния статус на anti-C1s върху концентрацията

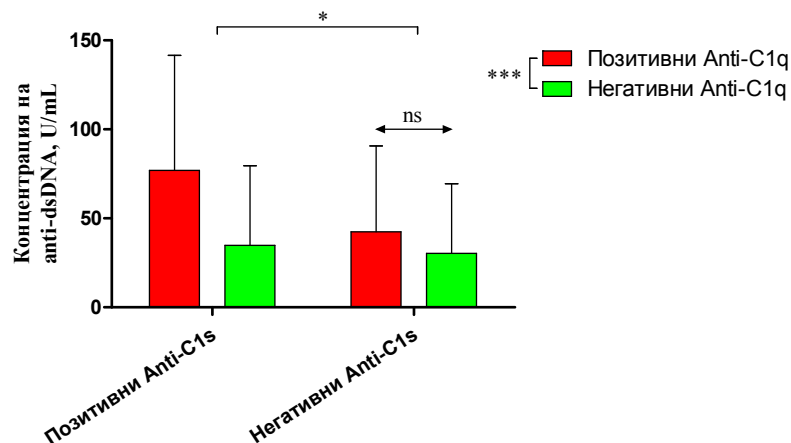
на anti-dsDNA, като по-силно влияние за наличие на повишена концентрация на anti-dsDNA има позитивния серологичен статус за anti-C1q (Two-ways ANOVA, съответно $F=12,81$, $p=0,0004$ и $F=6,56$, $p=0,011$). Ефектът на серологичния статус за anti-C1q върху концентрацията на anti-dsDNA не се различава при различните серологични статуси за anti-C1s (Two-ways ANOVA, $F=3,88$, $p=0,050$) (Фигура 113).



Фигура 112. Средни нива на концентрацията на anti-dsDNA (U/mL) при пациентите с ЛН в зависимост от двойния серологичен статус за anti-C1q и anti-C1s (One-way ANOVA, $p=0,0001$; Bonferroni's multiple comparison test, $p<0,05$ за посочените групи).

Таблица 37. Сравнителен анализ на концентрацията на anti-dsDNA при пациентите с ЛН в зависимост от двойния серологичен статус за anti-C1q и anti-C1s.

Bonferroni's multiple comparison test	Mean Diff.	t	$p<0,05$	95% CI of diff
(+)anti-C1q (+)anti-C1s c (-)anti-C1q (-)anti-C1s	34,42	2,755	Да (*)	1,160 до 67,68
(+)anti-C1q (+)anti-C1s c (+)anti-C1q (-)anti-C1s	42,16	3,445	Да (**)	9,577 до 74,74
(+)anti-C1q (+)anti-C1s c (-)anti-C1q (-)anti-C1s	46,65	4,605	Да (***)	19,68 до 73,61
(+)anti-C1q (-)anti-C1s c (-)anti-C1q (+)anti-C1s	7,738	0,6831	He (ns)	-22,42 до 37,90
(+)anti-C1q (-)anti-C1s c (-)anti-C1q (-)anti-C1s	12,23	1,357	He (ns)	-11,76 до 36,21
(-)anti-C1q (+)anti-C1s c (-)anti-C1q (-)anti-C1s	4,489	0,5189	He (ns)	-18,55 до 27,52



Фигура 113. Концентрация на anti-dsDNA при пациентите с ЛН в зависимост от комбинирания серологичен статус за anti-C1q и anti-C1s. Серологичният статус за anti-C1q статистически значимо повлиява концентрацията на anti-dsDNA (Two-ways ANOVA, $F=12,81$, $p=0,0004$ (***)). Серологичният статус за anti-C1s статистически значимо повлиява концентрацията на anti-dsDNA (Two-ways ANOVA, $F=6,56$, $p=0,011$ (*)). Ефектът на серологичния статус за anti-C1q върху концентрацията на anti-dsDNA не се различава при различните серологични статуси за anti-C1s (Two-ways ANOVA, $F=3,88$, $p=0,050$ (ns)).

Изследвахме връзката между серологичния статус за anti-C1q и anti-C1s и наличието на категория А на ЛН по BILAG Renal score. Сред двойно позитивните за anti-C1q и anti-C1s, изследвани в динамика, при 11 (45,8% от всички едновременно позитивни за anti-C1q и anti-C1s) е налице категория А, а сред едновременно негативните за anti-C1q и anti-C1s, пациентите с категория, различна от А (В, С или D) са 143 (85,1% от всички едновременно негативни за anti-C1q и anti-C1s) (Таблица 38). Въз основа на това разпределение установихме, че двойно позитивният статус за anti-C1q и anti-C1s статистически значимо определя наличието на категория А на ЛН по BILAG Renal score (Fisher's exact test, $p=0,0010$) с чувствителност от 30,6%, специфичност от 91,7%, позитивна предиктивна стойност от 45,8%, негативна предиктивна стойност от 85,1%. Релативният риск (RR) за наличие на категория А на ЛН при двойно позитивен серологичен статус за anti-C1q и anti-C1s е 3,1.

Таблица 38. Разпределение на пациентите с ЛН според двойно позитивния и двойно негативния статус за anti-C1q и anti-C1s и наличието на категория А по BILAG Renal score на ЛН.

Пациенти	BILAG, A	BILAG, B, C, D	Общо
Позитивни едновременно за anti-C1q и anti-C1s	11	13	24
Негативни едновременно за anti-C1q и anti-C1s	25	143	168
Общо	36	156	192

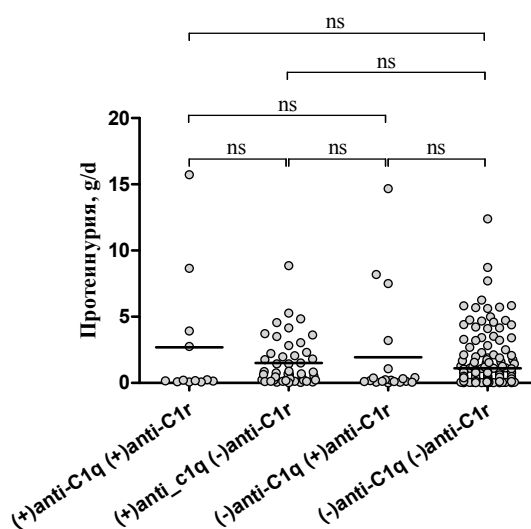
Изследвахме връзката между серологичния статус за anti-C1q и anti-C1s и хистологичния клас ЛН. Сред едновременно позитивните за anti-C1q и anti-C1s пациенти с ЛН, изследвани изходно в проучването, при 3 (100% от всички едновременно позитивни за anti-C1q и anti-C1s, които имат хистологична диагноза) е налице IV хистологичен клас ЛН, а сред пациентите едновременно негативни за anti-C1q и anti-C1s при 41 (73,2% от всички едновременно негативни за anti-C1q и anti-C1s, които имат хистологична диагноза) е налице хистологичен клас на ЛН, различен от IV (Таблица 39). Въз основа на това разпределение установихме, че позитивният статус едновременно за anti-C1q и anti-C1s статистически значимо определя наличието на ЛН от IV клас (Fisher's exact test, $p=0,0251$) с чувствителност от 16,7%, специфичност от 100%, позитивна предиктивна стойност от 100%, негативна предиктивна стойност от 73,2%. Релативният риск за наличие на дифузна лупусна нефропатия (IV клас) при наличие на двойно позитивни за anti-C1q и anti-C1s пациенти е 3,7.

Таблица 39. Разпределение на пациентите с ЛН според двойно позитивния и двойно негативния статус за anti-C1q и anti-C1s и наличието на IV хистологичен клас на ЛН.

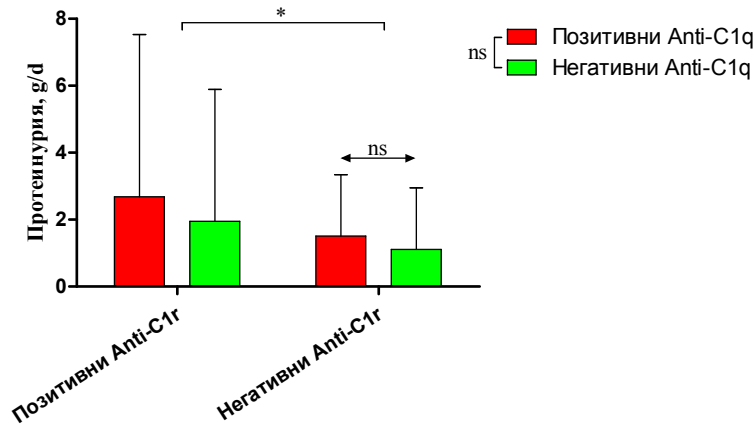
Пациенти	IV хистологичен клас ЛН	Друг хистологичен клас ЛН	Общо
Позитивни едновременно за anti-C1q и anti-C1s	3	0	3
Негативни едновременно за anti-C1q и anti-C1s	15	41	56
Общо	18	41	59

6.4. Комбинацията от автоантитела срещу C1q и C1r и някои аспекти на ЛН.

Изследвахме влиянието на комбинацията от позитивния и негативния статус за anti-C1q и anti-C1r върху протеинурията при пациентите с ЛН. Установихме липса на статистически значима разлика между нивата на протеинурията при пациентите с ЛН в различните групи, обособени според наличието или липсата на патологично повишени anti-C1q и anti-C1r. (One-way ANOVA, $p=0,051$; Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$ между всички групи) (Фигура 114). Въз основа на това определихме влиянието на серологичния статус на anti-C1q и серологичния статус на anti-C1r върху протеинурията, като влияние за наличие на повишена протеинурия има серологичния статус за anti-C1r (Two-ways ANOVA, съответно $F=4,91$, $p=0,028$). Серологичният статус за anti-C1q няма статистически значимо влияние върху протеинурията (Two-ways ANOVA, $F=1,55$, $p=0,214$). Ефектът на серологичния статус за anti-C1q върху протеинурията не се различава при различните серологични статуси за anti-C3 (Two-ways ANOVA, $F=0,13$, $p=0,716$) (Фигура 115).

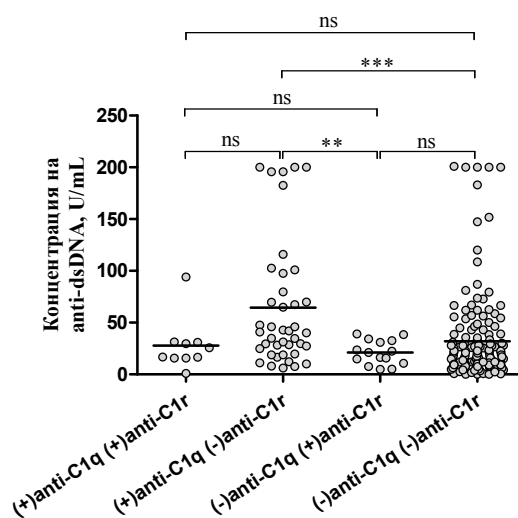


Фигура 114. Средни нива на протеинурията (g/d) при пациентите с ЛН в зависимост от двойния серологичен статус за anti-C1q и anti-C1r. (One-way ANOVA, $p=0,051$; Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$).



Фигура 115. Протеинурия при пациентите с ЛН в зависимост от комбинирания серологичен статус за anti-C1q и anti-C1r. Серологичният статус за anti-C1q не повлиява значимо протеинурията (Two-ways ANOVA, $F=1,55$, $p=0,214$ (ns)). Серологичният статус за anti-C1r повлиява статистически значимо протеинурията (Two-ways ANOVA, $F=4,91$, $p=0,028$ (*)). Ефектът на серологичния статус за anti-C1q върху протеинурията не се различава при различните серологични статуси за anti-C1r (Two-ways ANOVA, $F=0,13$, $p=0,716$ (ns)).

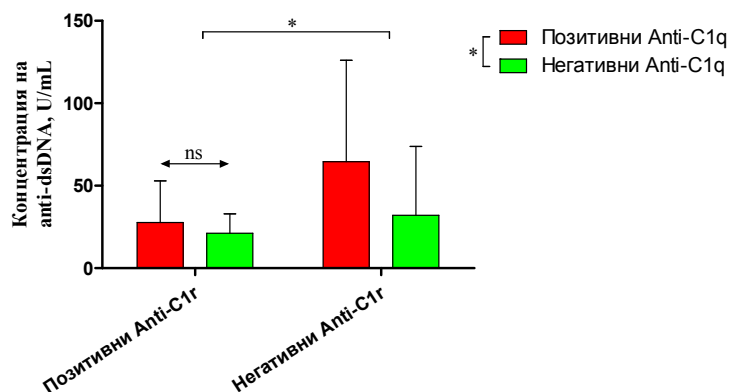
Изследвахме влиянието на комбинацията от позитивния и негативния статус за anti-C1q и anti-C1r върху концентрацията на anti-dsDNA при пациентите с ЛН. При пациентите позитивни за anti-C1q и негативни за anti-C1r средната концентрация на anti-dsDNA е статистически значимо по-висока от тази при пациентите негативни за anti-C1q и позитивни за anti-C1r. Концентрацията на anti-dsDNA е статистически значимо по-висока при пациентите позитивни за anti-C1q и негативни за anti-C1r от тази при пациентите негативни едновременно за anti-C1q и за anti-C1r. Няма статистически значима разлика между концентрациите на anti-dsDNA между останалите групи. (One-way ANOVA, $p=0,0002$; Bonferroni's multiple comparison test) (Фигура 116 и Таблица 40). Въз основа на това определихме влияние на серологичния статус на anti-C1q и на серологичния статус на anti-C1r върху концентрацията на anti-dsDNA, като по-силно влияние за наличие на повишена концентрация на anti-dsDNA има позитивния серологичен статус за anti-C1r (Two-ways ANOVA, съответно $F=3,93$, $p=0,049$ и $F=5,85$, $p=0,016$). Ефектът на серологичния статус за anti-C1q върху концентрацията на anti-dsDNA не се различава при различните серологични статуси за anti-C1r (Two-ways ANOVA, $F=1,74$, $p=0,188$) (Фигура 117).



Фигура 128. Средни нива на концентрацията на anti-dsDNA (U/mL) при пациентите с ЛН в зависимост от двойния серологичен статус за anti-C1q и anti-C1r (One-way ANOVA, $p=0,0002$; Bonferroni's multiple comparison test, $p<0,05$ за посочените групи).

Таблица 40. Сравнителен анализ на концентрацията на anti-dsDNA при пациентите с ЛН в зависимост от двойния серологичен статус за anti-C1q и anti-C1r.

Bonferroni's multiple comparison test	Mean Diff.	t	p<0,05	95% CI of diff
(+anti-C1q (+)anti-C1r c (+)anti-C1q (-)anti-C1r	-36,82	2,355	He (ns)	-78,44 до 4,810
(+anti-C1q (+)anti-C1r c (-)anti-C1q (+)anti-C1r	6,533	0,3610	He (ns)	-41,65 до 54,72
(+anti-C1q (+)anti-C1r c (-)anti-C1q (-)anti-C1r	-4,291	0,2969	He (ns)	-42,78 до 34,19
(+anti-C1q (-)anti-C1r c (-)anti-C1q (+)anti-C1r	43,35	3,241	Да (**)	7,735 до 78,96
(+anti-C1q (-)anti-C1r c (-)anti-C1q (-)anti-C1r	32,52	4,186	Да (***)	11,84 до 53,21
(-)anti-C1q (+)anti-C1r c (-)anti-C1q (-)anti-C1r	-10,82	0,9038	He (ns)	-42,71 до 21,06



Фигура 117. Концентрация на anti-dsDNA при пациентите с ЛН в зависимост от комбинираня серологичен статус за anti-C1q и anti-C1r. Серологичният статус за anti-C1q статистически значимо повлиява концентрацията на anti-dsDNA (Two-ways ANOVA, $F=3,93$, $p=0,049$ (*)). Серологичният статус за anti-C1r статистически значимо повлиява концентрацията на anti-dsDNA (Two-ways ANOVA, $F=5,85$, $p=0,016$ (*)). Ефектът на серологичния статус за anti-C1q върху концентрацията на anti-dsDNA не се различава при различните серологични статуси за anti-C1r (Two-ways ANOVA, $F=1,74$, $p=0,188$ (ns)).

Изследвахме връзката между серологичния статус за anti-C1q и anti-C1r и наличието на категория А на ЛН по BILAG Renal score. Сред двойно позитивните за anti-C1q и anti-C1r, изследвани в динамика, при 5 (41,7% от всички едновременно позитивни за anti-C1q и anti-C1r) е налице категория А, а сред едновременно негативните за anti-C1q и anti-C1r, пациентите с категория, различна от А (В, С или D) са 158 (85,4% от всички едновременно негативни за anti-C1q и anti-C1r) (Таблица 41). Въз основа на това разпределение установихме, че двойно позитивният статус за anti-C1q и anti-C1r статистически значимо определя наличието на категория А на ЛН по BILAG Renal score (Fisher's exact test, $p=0,028$) с чувствителност от 15,6%, специфичност от 95,8%, позитивна предиктивна стойност от 41,7%, негативна предиктивна стойност от 85,4%. Релативният риск (RR) за наличие на категория А на ЛН при двойно позитивен серологичен статус за anti-C1q и anti-C1r е 2,9.

Таблица 41. Разпределение на пациентите с ЛН според двойно позитивния и двойно негативния статус за anti-C1q и anti-C1r и наличието на категория А по BILAG Renal score на ЛН.

Пациенти	BILAG, A	BILAG, B, C, D	Общо
Позитивни едновременно за anti-C1q и anti-C1r	5	7	12
Негативни едновременно за anti-C1q и anti-C1r	27	158	185
Общо	32	165	197

Изследвахме връзката между серологичния статус за anti-C1q и anti-C1r и хистологичния клас ЛН. Сред едновременно позитивните за anti-C1q и anti-C1r пациенти с ЛН, изследвани изходно в проучването, при 1 (50,0% от всички едновременно позитивни за anti-C1q и anti-C1r, които имат хистологична диагноза) е налице IV хистологичен клас ЛН, а сред пациентите едновременно негативни за anti-C1q и anti-C1r при 40 (75,5% от всички едновременно негативни за anti-C1q и anti-C1r, които имат хистологична диагноза) е налице хистологичен клас на ЛН, различен от IV (Таблица 42). Въз основа на

това разпределение установихме, че позитивният статус едновременно за anti-C1q и anti-C1r не определя статистически значимо наличието на ЛН от IV клас (Fisher's exact test, $p=0,4478$).

Таблица 42. Разпределение на пациентите с ЛН според двойно позитивния и двойно негативния статус за anti-C1q и anti-C1r и наличието на IV хистологичен клас на ЛН.

Пациенти	IV хистологичен клас ЛН	Друг хистологичен клас ЛН	Общо
Позитивни едновременно за anti-C1q и anti-C1r	1	1	2
Негативни едновременно за anti-C1q и anti-C1r	13	40	53
Общо	14	41	55

V. ДИСКУСИЯ

Системата на комплемента има основна роля за реализацията както на вродения, така и на придобития имунитет, за развитието на възпаление и за клирънс на имунни комплекси и апоптотични клетки от тъканите, като по този начин поддържа генетичната хомеостаза на организма. Наличието на автоантитела срещу различни компоненти на комплемента има значение за нарушаване на тези основни функции и за развитието на патологичен процес. В настоящото проучване изследвахме наличието, честотата и връзките на автоантитела срещу компоненти на комплемента с основни клинично-лабораторни, имунологични и хистологични маркери за оценка на ЛН, както и диагностичната и прогностичната стойност на тези автоантитела при пациенти от българската популация.

Според мащабни изследвания както сред хора, така и при експериментални животински модели (Botto и съавт., 1998; Siegert и съавт., 1999; Taylor и съавт., 2000), една от основните функции на C1q компонента на класическия път на каскадата на комплемента се изразява в отстраняване на имунни комплекси и апоптотични клетки от тъканите, като нарушаването на тази функция предполага натрупване на автоантигени. Освен това, при дефицити на C1q се установяват нарушения в развитието на негативната селекция на автореактивни В клетки, което наред с горепосоченото предразполага както към възникване, така и към значимо ускоряване на автоимунен отговор (Carrol, 2001; Potlukova, 2008). Това схващане се подкрепя от проучвания върху генетични дефицити на C1q, при които се развива картина на СЛЕ (Pickering и съавт., 2000; Botto и съавт., 2001; Mitchel и съавт., 2002). На свой ред компоненти от системата на комплемента могат да бъдат таргет на придобития имунен отговор, изразяващо се в продукция на автоантитела (Horák и съавт., 2009). Anti-C1q са най-интензивно проучваните до момента в световен мащаб антикомплементни автоантитела и са важен имунологичен маркер за оценка активността на ЛН. Тези автоантитела са насочени основно срещу неоепитопи в CLR на молекулата на C1q, които стават достъпни за имунно взаимодействие когато C1q се свърже със свои лиганди, каквито са имуноглобулиновите молекули от имунните комплекси, отложени в тъканите (Uwatoko и съавт., 1989). Трябва да бъде отбелязано, с оглед комплексната молекулна структура на C1q, че са описани автоантитела с епитопна специфичност към отделните глави (А, В и С), като тези епитопи в GHR също могат да бъдат таргет за anti-C1q (Цачева и съавт., 2007, 2011). Наличието на anti-C1q възпрепятства осъществяването на основните функции на C1q и може да се разглежда като придобит функционален дефицит на C1q. Fliegman оформя хипотезата за патогенетичната роля на anti-C1q в развитието на ЛН. Няколко изследвания установяват, че anti-C1q са необходими, но самостоятелно не са достатъчни за развитие на ЛН. Необходимо е и наличие и на имунни комплекси, отложени в гломерулите при пациенти със СЛЕ (много често съдържащи двойноверижна ДНК и anti-dsDNA), които се разпознават от C1q, а това от своя страна, на базата на конформационни молекулни промени, води до откриване на неоепитопи в CLR на C1q, които се разпознават от anti-C1q с последващо активиране на класическия път на каскадата на комплемента с развитие на тъканно възпаление и картина на ЛН. Тази теория се подкрепя от факта, че нарастването на титъра на anti-C1q и anti-dsDNA е свързано с обостряне на ЛН (Siegert и съавт. 1998; Marto, 2005).

В нашето проучване, в аспект на кроссекционно изследване установихме честота на anti-C1q сред пациентите с ЛН от 18,6% (при 18 от 97 пациенти с ЛН), докато в аспект на лонгитудинално изследване с повече от 3 различни във времето определяния на нивата на anti-C1q при всеки пациент с ЛН, тези автоантитела се позитивират с по-висока честота – при 55,6% от болните (при 25 от 45 пациенти). Това определя anti-C1q като динамична популация автоантитела от автоимунния репертоар на пациентите с ЛН. Установените от нас честоти са сравнително по-ниски до съизмерими с честотите на anti-C1q при пациенти със СЛЕ и ЛН, описвани от други автори – между 56% и 100% (Siegert и съавт., 1993 – при 38 от 68 пациенти; Trendelenburg и съавт., 1999 – при 14 от 14 пациенти; Marto и съавт., 2005 – при 50 от 77 пациенти; Trendelenburg и съавт., 2006 – при 35 от 36 пациенти). При българско изследване на Монова от 2010 г. сред пациенти с активен ЛН се посочва честота на anti-C1q от 79,6% при пациенти с активна ЛН, докато в нашето проучване честотите на anti-C1q при пациентите с активна ЛН и при такива с ЛН с категория А по BILAG Renal score са по-ниски – съответно 38,9% и 41,9%. Тези разлики в честотите биха могли да се дължат на различия в лабораторните методики за определяне на anti-C1q, условията за приемане на cut-off, прилагани в различните проучвания, и комерсиалните китове за ELISA, използвани в повечето описани в литературата изследвания.

Не установихме статистически значими връзки на нивата на anti-C1q с пола и възрастта на пациентите с ЛН, както и с давността на ЛН. Налице са данни от литературата за повишаване нивата на anti-C1q с възрастта, но сред здрави доброволци, най-вероятно като естествен компонент на имунния репертоар (Siegert и съавт. 1993).

Клинично-лабораторен маркер за активност на ЛН е наличието на патологична протеинурия и патологично активен уринен седимент. Установихме, че наличието на патологично повишени anti-C1q сред пациентите с ЛН е свързано с наличие на патологична протеинурия ($p=0,019$), като нещо повече –

нарастването на нивата на anti-C1q е свързано с нарастването на протеинурията ($p=0,048$) и също така е свързано с наличие на патологично активен уринен седимент ($p=0,049$). Установихме и значима връзка между позитивния серологичен статус за anti-C1q и наличието на декомпенсирана бъбречна функция ($eGFR < 60 \text{ mL/min}$), както сред пациентите при кроссекционното изследване ($p=0,031$), така и при лонгитудиналното динамично изследване на пациентите ($p=0,043$). Този факт най-вероятно се дължи отново на патогенетичната роля на anti-C1q с потенциране на имунното възпаление при ЛН и имунологична прогресия на хроничното бъбречно заболяване при изследваните пациенти.

Безспорно се потвърдиха връзките на честотата и плазмените нива на anti-C1q с активността на ЛН, установени вече от редица изследователи (Trendelenburg и съавт., 1999; Siegert и съавт., 1999; Marto и съавт., 2005; Sinico и съавт., 2005; Potlukova и съавт., 2008). В нашето изследване установихме също най-висока честота на anti-C1q при пациентите с активна ЛН от 38,9%, като при пациентите с частична ремисия на ЛН и при тези с пълна ремисия на ЛН честотата на anti-C1q е значимо по-ниска, съответно 6,5% и 6,7%. Нивата на anti-C1q при пациентите с активна ЛН са значимо по-високи от тези при пациентите с частична и пълна ремисия на ЛН ($p=0,002$). Същите зависимости установихме и оценявайки комплексно активността на ЛН чрез BILAG Renal score. Най-висока честота на anti-C1q отново установихме при пациентите с категория А на ЛН (41,9%), като са налице и значимо най-високи серумни нива на anti-C1q при пациентите с категория А на ЛН ($p=0,0005$). Налице е значима корелационна зависимост между нивата на anti-C1q и категорията на ЛН по BILAG Renal score ($r=0,34$, $p=0,003$). Освен това, наличието на патологично повишени anti-C1q значимо определя наличието на категория А на ЛН (т. е., заболяване, налагащо провеждане на имунопатогенетично лечение) ($p<0,0001$) с чувствителност от 43,1% и специфичност от 83,1%. Относителният риск за наличие на категория А на ЛН при наличие на позитивни anti-C1q е 2,6. При комбинирано изследване статуса на anti-C1q и anti-C3 диагностичната стойност за определяне наличието на категория А на ЛН е по-висока – двойно позитивният статус за anti-C1q и anti-C3 определя значимо ($p<0,0001$) категория А на ЛН с чувствителност от 51,6%, специфичност от 89,7% и относителен риск от 5,2. Диагностичната стойност на anti-C1q по отношение на специфичността се повишава и при изследването им заедно с anti-C4. В тези случаи установихме, че двойно позитивният статус за anti-C1q и anti-C4 значимо определя ($p<0,0001$) наличието на категория А на ЛН с чувствителност от 34,6%, но със значително по-висока специфичност от 98,0%, като релативния риск за наличие на категория А на ЛН при едновременно позитивни anti-C1q и anti-C4 е 7,2. При комбинираното изследване на anti-C1q и anti-C1s и anti-C1q и anti-C1r също установихме повишена диагностична стойност в сравнение със самостоятелното изследване на anti-C1q. Установените горепосочени зависимости определят anti-C1q като релевантен диагностичен маркер за комплексната оценка активността на ЛН.

Освен с клинично-лабораторните маркери за активност на ЛН, потвърдихме и връзките на anti-C1q с някои имунологични маркери за активност на ЛН, каквито са хипокомplementемията C4 и C3 и повишените нива на anti-dsDNA (Horák и съавт., 2009). В нашето проучване установихме значими отрицателни корелационни зависимости между нивата на anti-C1q и плазмените нива на C4 ($r=-0,35$, $p=0,004$) и на C3 ($r=-0,36$, $p=0,0024$), както и значима позитивна корелация между нивата на anti-C1q и нивата на anti-dsDNA ($r=0,46$, $p<0,0001$). Сред позитивните за anti-dsDNA пациенти с ЛН, средната категория на ЛН по BILAG Renal score е значимо по-висока при позитивните за anti-C1q пациенти, в сравнение с пациентите позитивни за anti-dsDNA и негативни за anti-C1q ($p=0,014$), което определя anti-C1q като маркер за имунологична активност при пациентите с ЛН. Въпреки че титърът на ANA при пациентите с ЛН няма значими връзки с тежестта и активността на ЛН, в нашето проучване установихме значима позитивна корелация между нивото на anti-C1q и титъра на ANA ($r=0,26$, $p<0,0001$). Всичко това определя anti-C1q като надежден имунологичен маркер за оценка активността на ЛН.

Установихме значими връзки между anti-C1q и хистологичните характеристики на лупусната нефропатия. Както и в проучвания на други изследователи (Монова, 2010), в нашето проучване констатирахме най-висока честота на anti-C1q при пациентите с дифузна ЛН (45,5%), като нивата на anti-C1q при ЛН IV хистологичен клас са значимо по-високи ($p=0,012$) от нивата при пациентите с ЛН от друг хистологичен клас. Наличието на позитивни anti-C1q определя значимо наличието на ЛН от IV хистологичен клас ($p=0,002$) с ниска чувствителност (35,9%), със специфичност от 92,9% и релативен риск 2,0. Установихме, че при изследване едновременно на anti-C1q с други антикомplementни автоантитела диагностичната стойност по отношение наличието на дифузен ЛН се повишава. Двойно позитивният статус за anti-C1q и anti-C3 определя значимо наличието на ЛН IV хистологичен клас с чувствителност 35,5%, но с висока специфичност – 100,0% за изследваната група пациенти, с относителен риск от 4,2. Двойно позитивният статус за anti-C1q и anti-C4 и за anti-C1q и anti-C1s също има по-висока диагностична стойност по отношение определянето наличието на ЛН IV хистологичен клас в сравнение с диагностичната стойност на самостоятелно определения статус за anti-C1q. При пациентите с ЛН и наличие на активни хистологични лезии като ендокапилярна пролиферация; субендотелни депозити, формиращи т. нар. „телени бримки“; фибриноидна некроза и интерстициално

възпаление, нивата на anti-C1q са незначимо, но относително по-високи от нивата при пациентите, при които тези хистологични признаци отсъстват. При пациентите с наличие на клетъчни полулуния, нивата на anti-C1q са значимо по-високи от нивата на anti-C1q при пациентите, при които екстракапилярна пролиферация отсъства ($p=0,013$). Наред с това установихме и значима корелационна зависимост между нивата на anti-C1q и индекса на хистологична активност на ЛН ($r=0,43$, $p=0,012$). Резултатите от нашето изследване, заедно с установените зависимости от други изследователи (Trendelenburg и съавт., 2006; Монова, 2010) безспорно показват връзката на anti-C1q с активните пролиферативни лезии на ЛН. Всичко това определя значението на anti-C1q като маркер за неинвазивна оценка на хистологичната активност на ЛН и повишените нива на anti-C1q при пациентите с ЛН би следвало да се разглеждат като показание за провеждане на активно имунопатогенетично лечение.

При изследване на прогностичната стойност на anti-C1q установихме, че повишаването на нивата на anti-C1q до патологични стойности определя значимо повишаване на категорията на ЛН по BILAG Renal score ($p=0,0012$) след среден период от 5,6 месеца, а също така определя и значимо активиране на ЛН (преминаване от състояние на пълна в частична ремисия или в състояние на активна ЛН или преминаване от състояние на частична ремисия в състояние на активна ЛН) ($p=0,0337$) в рамките от 0 до 10 месеца след повишаването на нивата. Тези резултати са в съгласие с резултатите, получени от други изследователи (Moroni и съавт., 2001). Това определя anti-C1q като надежден прогностичен имунологичен маркер за развитие на тласък на ЛН.

При изследване на динамичните промени на някои показатели за оценка на ЛН с динамичните промени на нивата на anti-C1q установихме корелационни зависимости между промяната на нивата на anti-C1q и промяната на протеинурията ($r=0,31$, $p=0,018$) и между промяната на нивата на anti-C1q и промяната на eGFR ($r=0,27$, $p=0,027$) – колкото по-голяма е промяната в нивата на anti-C1q, толкова по-голяма е промяната в протеинурията и в eGFR при пациентите с ЛН. В аспект на проведеното лонгитудинално изследване с проследяване в динамика на пациентите с ЛН установихме значими динамични отрицателни корелационни зависимости между нивата на anti-C1q и плазмените концентрации на C4 ($r=-0,22$, $p=0,0003$) и нивата на anti-C1q и плазмените концентрации на C3 ($r=-0,21$, $p=0,0003$). Такава динамична позитивна корелационна връзка намерихме и между нивата на anti-C1q и нивата на anti-dsDNA при пациентите с ЛН ($r=0,46$, $p<0,0001$). Това определя значението на anti-C1q като маркер за динамично проследяване и оценка на ЛН.

C1s и C1g компонентите на комплемента са серин-протеази, участващи в състава на C1-комплекса, отговорни за хидролизата на C4 и C2 (основно C1s), като по този начин се формира C3-конвертазата на класическия път на активиране на каскадата на комплемента (C4b2a) (Walport, 2001; Berger и съавт., 2005; Ricklin и съавт., 2010; Merle и съавт., 2015). Генетични дефицити на C1s и C1g са свързани с развитие на картина на СЛЕ (Pickering и съавт., 2000). Други автори описват автоантитела, насочени срещу C1s (anti-C1s) при 7 от 15 пациенти със СЛЕ и ЛН (He и съавт., 1998), които са свързани с повишена протеолитична активност на C1s, която може да бъде причина за редукция в нивата на C4, усилен комплемент-зависима клетъчна лиза и поява на автоантигени, активиращи В клетките с развитие и поддържане на автоимунитет при пациентите със СЛЕ.

В нашето проучване в аспект на кросекционното изследване установихме наличие на anti-C1s при 8,1% от пациентите, като при лонгитудиналното изследване установихме позитивиране на anti-C1s със значително по-висока честота от 54,8% от пациентите, което определя тези автоантитела като динамична популация в автоимунния репертоар на антикомплементните автоантитела при пациентите с ЛН. Установихме статистически незначимо, но относително повишение на нивата на anti-C1s с възрастта на изследваните пациенти ($r=0,162$, $p=0,084$). Липсват и връзки между anti-C1s и пола на пациентите с ЛН и anti-C1s и давността на ЛН. Не установихме значими зависимости между anti-C1s и протеинурията, anti-C1s и бъбречната функция, anti-C1s и комплексно оценената активност на ЛН при изследваните пациенти в нашето проучване. Изследването на нивата на anti-C1s, обаче, би могло да повиши диагностичната стойност за определяне на категория А на ЛН при комбинираното му изследване с anti-C1q. Двойно позитивният статус за anti-C1q и anti-C1s при пациентите с ЛН определя значимо наличието на категория А на нефрита ($p=0,001$) при с много ниска чувствителност (30,6%), но с по-висока специфичност (91,7%) и относителен риск от 3,1. Не установихме и значими зависимости между нивата на anti-C1s и плазмените концентрации на C4 и C3 компонентите на комплемента (съответно, $p=0,680$ и $p=0,198$), въпреки че при повишени нива на anti-C1s плазмените концентрации на C4 и C3 са относително по-ниски от съответните при пациентите с референтни нива на anti-C1s. Не установихме и статистически значими зависимости между нивата на anti-C1s и anti-dsDNA, въпреки че концентрацията на anti-dsDNA е относително по-висока при пациентите с ЛН с патологично повишени anti-C1s ($p=0,425$). Не установихме значими връзки на anti-C1s с хистологичния клас ЛН, както и с хистологичните лезии за активност и хроничност при изследваните пациенти. Тези резултати, предвид относително по-ниската честота на anti-C1s в сравнение с честотата на anti-C1q, биха могли да се дължат на сравнително малкия брой изследвани в нашето проучване пациенти с ЛН. При изследване едновременно на anti-C1q и anti-

C1s диагностичната стойност на последните е налице, като двойно позитивния статус за anti-C1q и anti-C1s определят значимо наличието на ЛН IV хистологичен клас с много ниска чувствителност (16,7%), но с висока специфичност от 100,0% и относителен риск от 3,7 при изследвана група пациенти. Установихме известна самостоятелна прогностична роля на anti-C1s – повишението на anti-C1s до патологични нива значимо определя последващо повишение на категорията на ЛН по BILAG Renal score ($p=0,0042$) след среден период от 5,0 месеца, а също така определя и значимо активиране на ЛН (преминаване от състояние на пълна в частична ремисия или в състояние на активна ЛН или преминаване от състояние на частична ремисия в състояние на активна ЛН) ($p=0,023$) в рамките от 0 до 6 месеца след повишаването на нивата.

Горепосоченото определя anti-C1s по-скоро като допълващ имунологичен маркер при съвместното му изследване заедно с anti-C1q при комплексната оценка на ЛН.

В литературата липсват данни за значението и ролята на anti-C1r. В нашето проучване изследвахме anti-C1r, като не установихме значими връзки с възрастта и пола на пациентите с ЛН, с давността на ЛН, с клиничко-лабораторните и имунологичните маркери за оценка на ЛН, както в аспект на кросекционното изследване, така и в динамика. Не установихме значими зависимости на anti-C1r с хистологичния клас на ЛН, активните и хроничните хистологични лезии и индексите на хистологична активност и хроничност. Не установихме надеждна прогностична роля на anti-C1r. При едновременното изследване на anti-C1q и anti-C1r, последното може да повиши в известна степен диагностичната стойност на anti-C1q при определяне наличието на категория А на ЛН по BILAG Renal score. Двойно позитивният статус за anti-C1q и anti-C1r определя значимо наличието на категория А на ЛН по BILAG Renal score с ниска чувствителност (15,6%), но с по-висока специфичност в сравнение със специфичността на anti-C1q при неговото самостоятелното изследване – 95,8%, като относителния риск за наличие на категория А на ЛН при пациенти позитивни едновременно за anti-C1q и anti-C1r е 2,9. Anti-C1r няма диагностично значение за определяне на хистологичния клас на ЛН нито самостоятелно, нито в комбинация с anti-C1q.

Необходими са, обаче, допълнителни изследвания в по-големи кохортни проучвания за по-прецизна оценка на клиничното значение на anti-C1s и anti-C1r в нефрологичната практика.

В научната литература има оскъдна информация по отношение на автоантителата срещу С4 компонента на комплемента (отнасяни към т. нар. имуноконглутинини), като такива са описани при един пациент със СЛЕ (Ripochе и съавт., 1983). При пациенти със СЛЕ и С3 гломерулосклероза е описано антитяло срещу С3- и С5-конвертазите на класическия път на каскадата на комплемента (съответно - С4b2a и С4b2aBb) – С4-нефритен фактор (С4NeF), което потиска тяхното разграждане, удължават полуживота им, нарушавайки негативната регулация на комплементната каскада (Daha и съавт., 1980; Zhang и съавт., 2017).

В нашето проучване установихме anti-C4 със значима честота в кросекционното проучване при пациентите с ЛН - 31,1%, като при динамичното лонгитудинално изследване установихме позитивиране на anti-C4 при значимо повече пациенти – 59,5%, което определя anti-C4 като динамична популация автоантитела при пациентите с ЛН. Въпреки че с нарастване на възрастта при пациентите с ЛН нивата на anti-C4 намаляват, в нашето изследване не установихме значима корелационна зависимост между възрастта и нивата на anti-C4 ($r=-0,18$, $p=0,064$). Липсват и връзки между anti-C4 и пола на пациентите с ЛН и между anti-C4 и давността на ЛН. Не установихме значими връзки между нивата на anti-C4 и клиничко-лабораторните маркери за оценка на ЛН, като протеинурията и eGFR. При едновременното изследване на anti-C1q и anti-C4 установихме, че при пациентите с ЛН с двойно позитивен статус за anti-C1q и anti-C4 имат значимо по-висока протеинурия в сравнение с протеинурията при останалите пациенти с ЛН ($p=0,0003$). В аспект на лонгитудинално изследване установихме, че патологично повишените нива на anti-C4 определят значимо наличието на патологично активен уринен седимент при изследваните пациенти с ЛН ($p=0,007$), като при пациентите с патологично активен уринен седимент средното ниво на anti-C4 е значимо по-високо от това при пациентите без активен седимент ($p=0,007$). В аспект на лонгитудинално динамично изследване установихме, че позитивният статус за anti-C4 е свързан със значимо по-висока категория на ЛН по BILAG Renal score ($p=0,0021$) и определя значимо наличието на категория А по BILAG Renal score на ЛН ($p=0,0005$) с чувствителност 40,4%, специфичност 83,6% и релативен риск 2,5. При едновременното изследване на anti-C1q и anti-C4 диагностичната стойност на последното по отношение наличието на категория А на ЛН е повишена (описано по-горе в „Дискусия“). Това определя anti-C4 като потенциален маркер за оценка активността на ЛН.

Налице са значими зависимости между anti-C4 и нивата на С4 и С3 компонентите на комплемента. При пациентите с ЛН с повишени anti-C4 плазмената концентрация на С4 е значимо по-ниска от тази при пациентите с референтни нива на С4 ($p=0,007$). При пациентите с повишени anti-C4 плазмената концентрация на С3 е значимо по-ниска от тази при пациентите с референтни нива на anti-C4 ($p=0,005$). Установихме и значими отрицателни корелационни зависимости между anti-C4 и С4 ($r=-0,34$, $p=0,003$) и anti-C4 и С3 ($r=-0,30$, $p=0,007$). Установихме значими позитивни корелационни зависимости между

нивата на anti-C4 и ANA ($r=0,37$, $p=0,002$) и между нивата на anti-C4 и anti-dsDNA ($r=0,36$, $p=0,002$) при пациентите с ЛН. Освен това, при пациентите с ЛН с двойно позитивен статус за anti-C1q и anti-C4 концентрацията на anti-dsDNA е значимо по-висока в сравнение с концентрацията на anti-dsDNA при останалите пациенти с ЛН ($p<0,0001$). Тези факти биха могли да се обяснят с евентуални свойства на anti-C4, наподобяващи C4NeF, т. е. удължаващи полуживота на C3- и C5-конвертазите на класическия път на каскадата на комплемента (съответно, C4b2a и C4b2aBb) с амплификация на терминалния път с формиране на MAC и комплемент-зависимо клетъчно увреждане и възпаление с натрупване на автоантигени в тъканите с поликлонална активация на В клетките и развитие на аутоимунитет и клиника на СЛЕ и ЛН. За категорично заключение и подкрепа на горепосочената теза са необходими допълнителни функционални изследвания на природата на anti-C4 при пациентите с ЛН. Горепосочените данни с голяма вероятност определят anti-C4 като патогенетичен фактор за развитие на имунно възпаление и потенциално надежден имунологичен маркер за оценка активността на ЛН.

При изследване на зависимостите на anti-C4 с хистологични аспекти на ЛН установихме, че позитивният статус за anti-C4 определя наличието на дифузна ЛН ($p=0,789$). Едновременното изследване, обаче, на статуса за anti-C1q и anti-C4 при пациентите с ЛН има значима диагностична стойност. Двойно позитивният статус за anti-C1q и anti-C4 определя значимо наличието на ЛН IV хистологичен клас с чувствителност 26,7%, специфичност 100,0% и релативен риск 3,7. При пациентите с наличие на хистологични признаци за активност на ЛН като фибриноидна некроза и клетъчни полулуния нивата на anti-C4 са относително по-високи в сравнение с нивата на anti-C4 при липса на тези хистологични признаци, без обаче тази разлика да е значима. При наличие на ендокапиллярна пролиферация и субендотелни депозити нивата на anti-C4 са значимо по-високи от нивата на anti-C4 при липса на тези хистологични признаци за активност на ЛН (съответно, $p=0,025$ и $p=0,0025$). Установихме и значима позитивна корелационна зависимост между нивата на anti-C4 и хистологичния индекс на активност ($r=0,61$, $p=0,0004$). Тези резултати определят ролята на anti-C4 като потенциален надежден неинвазивен маркер за оценка на хистологичната активност на ЛН.

При изследване на прогностичната стойност на anti-C4 установихме, че повишаването на нивата на anti-C4 до патологични стойности определя значимо последващо повишаване на категорията на ЛН по BILAG Renal score ($p=0,0044$) след среден период от 3,4 месеца, а също така определя и значимо последващо активиране на ЛН (преминаване от състояние на пълна в частична ремисия или в състояние на активна ЛН или преминаване от състояние на частична ремисия в състояние на активна ЛН) ($p=0,048$) в рамките от 0 до 18 месеца след повишаването на нивата. Това определя anti-C4 като прогностичен имунологичен маркер за развитие на тласък на ЛН.

При изследване на anti-C4 в динамика установихме динамична значима отрицателна слаба корелационна зависимост между нивата на anti-C4 и плазмените концентрации на C4 ($r=-0,18$, $p=0,002$), но не и между нивата на anti-C4 и плазмените концентрации на C3 ($r=-0,08$, $p=0,102$). Налице са, обаче, значими позитивни корелационни зависимости между промяната в нивата на anti-C4 (Δ) и промяната в плазмената концентрация на C4 ($\Delta C4\%$) ($r=0,34$, $p=0,015$) и между промяната на нивата на anti-C4 (Δ) и промяната на плазмената концентрация на C3 ($\Delta C3\%$) ($r=0,28$, $p=0,029$). Установихме значими позитивни динамични корелационни зависимости между anti-C4 и ANA ($r=0,27$, $p<0,0001$) и между anti-C4 и anti-dsDNA ($r=0,28$, $p<0,0001$). Тези факти определят anti-C4 като потенциален динамичен маркер за проследяване имунологичната активност при пациентите с ЛН. Динамичното проследяване на anti-C4 с динамиката на клинично-лабораторните параметри за оценка на лабораторната активност на ЛН, обаче, не показва значими зависимости.

Единствено за anti-C4 установихме значимо намаление на нивата в хода на проведената имунопатогенетична терапия при пациентите с ЛН за среден период на проследяване и лечение от 13 месеца ($p=0,0035$).

Наличието на anti-C3, наричани имуноконглютинини, е описано при пациенти със СЛЕ с честоти между 25 и 32% (Durand и съавт., 1984; Nilsson и съавт., 1992; Kenyon и съавт., 2011). В нашето проучване установяваме наличие на anti-C3 със съизмерими честоти – при 25,7% от пациентите с ЛН в кросекционното изследване, като при динамично проследяване anti-C3 се позитивират при 57,1% от пациентите с ЛН. Anti-C3 са с описана в литературата епитопна специфичност към C3b, iC3b, C3c и C3dg (Nilsson и съавт., 1992). Установено е свойството на anti-C3 да потискат инактивирането на C3b до iC3b от фактор I в присъствието на CR1 (Nilsson и съавт., 1990) и да нарушават клирънса на апоптотични клетки в експериментални миши модели (Kenyon и съавт., 2011). В наше предходно пилотно проучване (Vasilev и съавт., 2015, осъществено съвместно с екип на Roumenina, INSERM, UMRS 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France) са проучени функционално anti-C3, като се показва тяхното значение за дисрегулация на C3-конвертазата на алтернативния път на каскадата на комплемента (C3bBb) с епитопно характеризирание, показващо разпознаване на C3, C3b, iC3b, C3c от проучените anti-C3. Последните при една част от пациентите с ЛН водят до стабилизиране на C3-конвертазата на алтернативния път с удължаване на нейния полуживот и активно разграждане на C3 до C3a и C3b с

амплификация на активността на комплементната каскада чрез алтернативния път на активиране (т. нар. „амплификационна бримка“). Това свойство на anti-C3 е подобно в известна степен на свойството на C3NeF (наличен при пациентите с болест на пълтните отлагания), който е описан в малка част от пациенти със СЛЕ с парциална липодистрофия (Walport и съавт., 1994) и разпознава неопитоп от четвъртичната структура на алтернативната C3-конвертаза (C3bBb), но не и епитопи от нейните отделни компоненти (C3b и Bb) (Dragon-Durey и съавт., 2013). Нито един от включените в нашето изследване пациенти с ЛН не е имал признаци на парциална липодистрофия, а също така е демонстрирана и специфичност на anti-C3 към C3 и C3b, поради което изследваните anti-C3 са различни от C3NeF. Освен това, свързването на anti-C3 с неговите антигени води до нарушаване на свързването на C3b с негативните регулатори на алтернативния път на комплементната каскада – фактор Н и CR1 и затруднено инактивиране на C3b до iC3b и дисбаланс в системата на комплемента.

Установихме, че с нарастване на възрастта на пациентите с ЛН в нашето проучване, нивата на anti-C3 намаляват ($r=-0,28$, $p=0,014$). Липсват връзки на anti-C3 с пола на пациентите и с давността на ЛН. При пациентите с ЛН, позитивни за anti-C3, нивото на протеинурията е значимо по-високо от това при пациентите, негативни за anti-C3 ($p=0,014$). Наличието на anti-C3 определя значимо наличието на патологично активен уринен седимент сред всички изследвани в динамика проби от пациенти с ЛН ($p=0,0001$). Не установихме зависимост между anti-C3 и eGFR. Позитивният статус за anti-C3 значимо определя наличието на категория А по BILAG Renal score при пациентите с ЛН ($p<0,0001$) с чувствителност 57,7%, специфичност 74,8% и релативен риск 3,0. При едновременното изследване на anti-C1q и anti-C3 диагностичната стойност за определянето на категория А на ЛН е по-висока (чувствителност 51,6%, специфичност 89,7). Пациентите с ЛН, позитивни за anti-C3 имат значимо по-висока категория на ЛН по BILG Renal score ($p<0,0001$). Горепосочените данни определят anti-C3 като надежден маркер за оценка на клинично-лабораторната активност на ЛН.

При пациентите с ЛН с повишени нива на anti-C3 плазмените концентрации на C4 и C3 са значимо по-ниски от плазмените концентрации на C4 и C3 при пациентите с референтни нива на anti-C3 (съответно, $p=0,001$ и $p=0,0004$). Съществуват и значими отрицателни корелации между anti-C3 и C4 ($r=-0,40$, $p=0,0005$) и anti-C3 и C3 ($r=-0,35$, $p=0,0015$). Налице са позитивни корелационни връзки между нивата на anti-C3 и титрите на ANA ($r=0,45$, $p=0,0002$), както и между нивата на anti-C3 и концентрациите на anti-dsDNA ($r=0,54$, $p<0,0001$). При позитивните за anti-dsDNA пациенти с ЛН, тези с повишени anti-C3 имат значимо по-висока категория на ЛН по BILAG Renal score в сравнение с категорията при пациентите, позитивни за anti-dsDNA, но негативни за anti-C3 ($p=0,0017$). Горепосочените данни са в съответствие с описаните функционални свойства на anti-C3 и тяхната патогенетична роля в развитието на имунното възпаление при пациентите с ЛН и определят anti-C3 като надежден имунологичен маркер за оценка активността на ЛН.

Най-високо ниво на anti-C3 установихме при пациентите с ЛН IV хистологичен клас. Позитивният статус за anti-C3 значимо определя наличието на ЛН IV хистологичен клас ($p=0,048$) с чувствителност 40,0%, специфичност 82,6% и относителен риск 2,0. Диагностичната стойност на двойно позитивния статус за anti-C1q и anti-C3 е по-висока по отношение на определянето наличието на ЛН IV хистологичен клас, описана е по-горе. При пациентите с ЛН с наличие на активни хистологични признаци нивата на anti-C3 са по-високи в сравнение с нивата при пациентите без наличие на хистологични признаци на активност, като разликата в тези нива е значима при наличие на ендокапилярна пролиферация ($p=0,049$), субендотелни депозити ($p=0,023$) и интерстициално възпаление ($p=0,029$). Установихме и значима позитивна корелационна зависимост между нивата на anti-C3 и индекса на хистологична активност при пациентите с ЛН ($r=0,52$, $p=0,0027$). Всичко това определя anti-C3 като надежден неинвазивен маркер за оценка на хистологичната активност на ЛН.

При изследване на прогностичната стойност на anti-C3 установихме, че повишаването на anti-C3 до патологични нива значимо определя последващо повишаване на категорията на ЛН по BILAG Renal score ($p=0,0068$) след среден период от 4,3 месеца, а също така значимо определя и последващо активиране на ЛН (преминаване от състояние на пълна в частична ремисия или в състояние на активна ЛН или преминаване от състояние на частична ремисия в състояние на активна ЛН) ($p=0,029$) в рамките от 0 до 11 месеца след повишаването на нивата. Подобна прогностична роля се описва и от други изследователи, а именно, че anti-C3b са позитивни при пациенти с ЛН преди обостряне, при които последното е предхождано от повишаване на нивата на anti-C1q (Birmingham и съавт., 2016). Това определя anti-C3 като прогностичен имунологичен маркер за развитие на тласък на ЛН.

При изследване в динамика на anti-C3 във връзка с динамичното проследяване на основните клинично-лабораторни параметри на ЛН не установихме динамични зависимости между anti-C3 и протеинурията и anti-C3 и eGFR. Установихме значими динамични корелационни зависимости между нивата на anti-C3 и плазмените концентрации на C4 ($r=-0,27$, $p<0,0001$), между нивата на anti-C3 и плазмените концентрации на C3 ($r=-0,22$, $p=0,0003$), между нивата на anti-C3 и титрите на ANA ($r=0,43$,

$p < 0,0001$) и между нивата на anti-C3 и концентрациите на anti-dsDNA ($r=0,51$, $p < 0,0001$). Това определя anti-C3 като маркер за динамична оценка на имунологичната активност на ЛН.

Не установихме значими зависимости между нивата на anti-C3 и вида на проведеното имунопатогенетично лечение при пациентите с ЛН, което най-вероятно се дължи на сравнително краткия период на проследяване.

VI. ОБОБЩЕНИ ОСНОВНИ ИЗВОДИ

1. Честотата на повечето автоантитела срещу компонентите на каскадата на комплемента при пациентите с ЛН е значима: anti-C1q при 18,6%, като в динамика се позитивират при 55,6%; anti-C1r при 9,5%, като в динамика се позитивират при 45,2%; anti-C1s при 8,1%, като в динамика се позитивират при 54,8%; anti-C4 при 31,1%, като в динамика се позитивират при 59,5% и anti-C3 при 25,7%, като в динамика се позитивират при 57,1% от пациентите с ЛН. Това разкрива изследваните антитела като динамична популация в автоимунния репертоар при пациентите с ЛН.

2. Липсват значими връзки между нивата на автоантителата срещу компонентите на комплемента с пола и възрастта на пациентите и давността на ЛН, като единствено при anti-C3 е налице намаление на нивата с възрастта на пациентите с ЛН.

3. Значими връзки на протеинурията и наличието на патологично активен уринен седимент като рутинни маркери за оценка активността на ЛН съществуват с anti-C1q и anti-C3, като липсват с anti-C1r, anti-C1s и anti-C4.

4. Значими връзки на рутинни маркери за имунологична активност на СЛЕ и ЛН, каквито са хипокомplementемията за C4, хипокомplementемията за C3, както и нивото на anti-dsDNA съществуват с anti-C1q, anti-C3 и anti-C4, като липсват с anti-C1r и anti-C1s.

5. Значими връзки на хистологичния клас ЛН съществуват с anti-C1q и anti-C3 (най-високи нива на тези антитела се установяват при IV клас ЛН). Налице са връзки между хистологични признаци на активност на ЛН и нивата на anti-C1q, anti-C3 и anti-C4, като липсват значими връзки между хистологичните белези на ЛН и anti-C1r и anti-C1s.

6. Значими връзки на комплексно оценената като активна ЛН съществуват с anti-C1q, anti-C3 и anti-C4, като липсват такива значими връзки с anti-C1s и anti-C1r.

7. Значими динамични връзки на лабораторните маркери за оценка активността на ЛН са налице само с anti-C1q, докато с останалите антикомplementни автоантитела липсват.

8. Значими динамични връзки на някои рутинни маркери за имунологична активност на ЛН съществуват с anti-C1q, anti-C3 и anti-C4, докато такива връзки липсват с anti-C1r и anti-C1s, което прави anti-C1q, anti-C3 и anti-C4 възможни маркери за проследяване имунологичната активност на ЛН.

9. Като диагностични предиктори за последващо активиране на ЛН биха могли да бъдат използвани anti-C1q, anti-C3, anti-C4, както и anti-C1s, като съществено такова прогностично значение на anti-C1r не се установи.

10. Относително повлияване на нивата на anti-C1q при пациентите с ЛН се установи при приложение на дву- и трикомпонентни имунопатогенетични терапевтични схеми в сравнение с повлияването от монотерапия. Налице е значимо повлияване в хода на терапията на нивата на anti-C4, като последното не зависи от вида на приложената терапевтична схема. Липсва съществено повлияване на нивата на anti-C3, anti-C1r и anti-C1s от проведеното лечение. Това вероятно би могло да определи нивата на anti-C4 като маркер за проследяване ефекта от лечението.

VII. ОСНОВНИ ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. ПРИНОСИ С ОРИГИНАЛЕН ХАРАКТЕР

1. За първи път са определени наличието и честотата на антикомплементните автоантитела anti-C1r, anti-C1s, anti-C4, anti-C3 сред пациенти с ЛН от българската популация. (С научно-теоретичен характер.)

2. За първи път комплексно са проучени връзките на антикомплементните автоантитела anti-C1r, anti-C1s, anti-C4, anti-C3 с маркери за лабораторна, имунологична и хистологична активност при пациенти с ЛН както в кроссекционно, така и в лонгитудинално проучване. (С научно-теоретичен и научно-практичен характер.)

3. За първи път е проучена диагностичната стойност на антикомплементните автоантитела anti-C1r, anti-C1s, anti-C4 и anti-C3 сред пациенти с ЛН. (С научно-практичен характер.)

4. За първи път е проучена прогностичната стойност на антикомплементните автоантитела anti-C1r, anti-C1s, anti-C4 и anti-C3 сред пациенти с ЛН. (С научно-практичен характер.)

5. За първи път е проучена диагностичната стойност на комбинации от антикомплементни автоантитела по отношение на активността на ЛН и хистологичния клас на ЛН. (С научно-практичен и научно-теоретичен характер.)

6. Чрез проучване на наличието на антикомплементните автоантитела anti-C1r, anti-C1s, anti-C4 и anti-C3 и техните връзки с останалите лабораторни, имунологични и хистологични параметри, характеризиращи ЛН, в известна степен се демонстрира ролята на придобитите дефекти на класическия и алтернативния път на каскадата на комплемента за развитие на ЛН. (С научно-теоретичен характер.)

2. ПРИНОСИ С ПОТВЪРДИТЕЛЕН ХАРАКТЕР

1. Проучено е наличието и честотата на anti-C1q при пациенти с ЛН от българската популация.

2. Проучени и потвърдени са връзките на anti-C1q с основни лабораторни, имунологични и хистологични признаци, характеризиращи ЛН, както в кроссекционно, така и в лонгитудинално проучване.

3. Проучени и потвърдени са диагностичната и прогностичната стойности на anti-C1q при пациенти с ЛН.

VIII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Stoyanova V, Bogoeva V, Petrova L, Tchorbadjieva M, Petrova S, Georgieva V, Georgiev G, Deliyska B, **Vasilev V**, Tsacheva I. Autoantigenicity of human C1q is associated with increased hydrophobicity due to conformational transitions in the globular heads. *Mol BioSyst.* 2015; 11: 1370-1377. [IF: 3,21]
2. Radanova M, Bratoeva K, **Vasilev V**, Deliyska B, Ikonov V, Argirova T. Association between anti-C1q and anti-dsDNA antibodies in patients with Lupus nephritis. *Science & Technologies*, 2015; V(1): 55-60.
3. Radanova M, Stoyanova V, Bratoeva K, **Vasilev V**, Ivanova D. Antibodies recognizing the globular domain of C1q - view on association between lupus nephritis activity and anti-gC1q autoantibodies. *Scripta Scientifica Medica*, 2016; 48(1): 13-21.