

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО РЕВМАТОЛОГИЯ

д-р БОГДАН ФРЕДИЕВ ПЕНЕВ

**РОДНИНИ ПЪРВА СТЕПЕН НА БОЛНИ
СЪС СИСТЕМЕН ЛУПУС ЕРИТЕМАТОЗУС –
КЛИНИЧНИ, ЛАБОРАТОРНИ, СЕРОЛОГИЧНИ
И ИМУНОЛОГИЧНИ АСОЦИАЦИИ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд
за присъждане на образователната и научна степен „доктор“

Докторска програма - Ревматология
Професионално направление - 7.1 Медицина
Област на висшето образование – 7. Здравеопазване и спорт

Научен ръководител:
ПРОФ. Д-Р СИМЕОН ВАЛЕНТИНОВ МОНОВ, ДМ

СОФИЯ, 2025 г.

Дисертационният труд е написан на 163 стандартни машинописни страници. Съдържа 59 таблици и 22 фигури. Литературната справка съдържа 132 заглавия – 2 на кирилица и 130 на латиница. Във връзка с дисертационния труд са направени 4 публикации и 6 участия в български и международни научни форуми.

Изследванията, представени в настоящия дисертационен труд, са проведени в Клиника по вътрешни болести към УМБАЛ „Св. Анна“ София АД, Клиника по ревматология и Лаборатория по клинична имунология към УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ София ЕАД.

Дисертационният труд е обсъден на заседание на Катедрата по ревматология към Медицински университет София на 27.02.2025 г., и е отчислен с право на защита и насочен за представяне пред научно жури със заповеди на Ректора на МУ София, съответно РК36-886/03.04.2025 г. и РК36-890/04.04.2025 г. Защитата на дисертационния труд ще се състои на 25.06.2025 г. в 13,00 ч. в Аулата на УМБАЛ „Света Анна“, София.

Научно жури:

1. Доц. Цветанка Петрова Петранова, дм, УМБАЛ „Св. Анна“ София АД, Клиника по ревматология, Катедра по ревматология към МФ на МУ София

2. Проф. Любомир Маринов Маринчев, дм – УМБАЛ „Лозенец“ София, Катедра по вътрешни болести към МФ на СУ „Св. Климент Охридски“

3. Проф. Анастас Згуров Баталов, дм – УМБАЛ „Каспела“ ЕООД Пловдив, Катедра по пропедевтика на вътрешните болести към МУ Пловдив

4. Проф. Росица Валериева Каралилова, дмн, УМБАЛ „Каспела“ ЕООД Пловдив, Катедра по пропедевтика на вътрешните болести към МУ Пловдив

5. Доц. Радостина Влаева Чернева, дм, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ София ЕАД, Клиника по пулмология, Катедра по белодробни болести към МФ на МУ София

Резервни членове:

1. Проф. Деян Тонев Желев, дм, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ София ЕАД, Клиника по гастроентерология, Катедра по гастроентерология към МФ на МУ София

2. Проф. Мариела Генчева Генева-Попова, дм, УМБАЛ „Св. Георги“ ЕАД Пловдив, Катедра по пропедевтика на вътрешните болести към МУ Пловдив.

СЪДЪРЖАНИЕ:

1. ВЪВЕДЕНИЕ.....	5
2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	6
3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	6
4. РЕЗУЛТАТИ.....	21
4.1.1-2. Демографски характеристики на изследваните групи	21
4.1.3-5. Изследване на АНА-ИИФ, специфични АНА, фракции на комплекта и антифосфолипидни антитела сред изследваните групи.....	23
4.1.6-10. Клинични оплаквания сред изследваните групи.....	41
4.1.11-12. Рискови фактори и COVID 19 сред изследваните групи.....	52
4.1.13. Нива на цитокини (BLys, APRIL, IFN- α , IL-6, IL-8, IL-10 и TGF- β) сред изследваните групи.....	54
4.1.14. Нива на антитела срещу капсидния антиген на Епщайн-Бар вируса сред изследваните групи.....	57
4.1.13.1-5. Конкретни и комплексни зависимости между изследваните променливи сред изследваните групи.....	57
5. ОБСЪЖДАНЕ.....	73
6. ИЗВОДИ.....	81
7. ПРИНОСИ.....	82
8. ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ.....	84

ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:

АИЗ – автоимунно заболяване

АНА – антинуклеарни антитела

АПК – антиген-представяща/и клетка/и

Ат – антицяло/антитела

ААт – автоантицяло/автоантитела

ИИФ – индиректна имунофлуоресценция

НЛЕ – непълен („субклиничен“) лупус еритематозус

РПС – роднини първа степен

СЛЕ – системен лупус еритематозус

АС-1, 2, 3... - alphanumeric code 1, 2, 3... (съгласно ICAP)

ACR – American College of Rheumatology

anti-dsDNA – анти-двойноверижна ДНК

anti-ssDNA – анти-едноверижна ДНК

BAFF, BLys – B-cell activating factor, B-lymphocyte stymulator

EBV – Epstein-Barr virus

ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay

EULAR - European League Against Rheumatism

ICAP – International Consensus of ANA Patterns

IFN – Interferon

IL-1, 2, 3... - Interleukin 1, 2, 3...

HEp – Human epithelioma (cells)

TGF- β - Transforming Growth Factor beta

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Системният лупус еритематозус (СЛЕ) е хетерогенно системно автоимунно ревматично заболяване с неясна етиология, характеризиращо се със системна имунна дисрегулация, патологична автореактивност, образуване на автоантитела и полиорганно засягане. Автоантителата при СЛЕ са насочени срещу разнообразни автоантигени, като тези, насочени срещу собствени ядрени структури - антинуклеарните антитела (АНА), са идентифицирани като най-характерните за СЛЕ и присъстват в около 95% от случаите. Предвид че се засягат в най-голяма степен жени между 20 и 50-годишна възраст, СЛЕ е причина за значима инвалидност на хора в трудоспособна и в детеродна възраст, което обуславя и демографската, и социално-икономическата значимост на заболяването. Задълбочаването на познанията за имуно-логичните промени при СЛЕ е причина за все по-ранна диагноза, съответно по-ранно лечение, което, заедно с терапевтичния напредък през последните десетилетия, постепенно го измества от категорията „смъртна присъда“. Нещо повече, натрупани са данни за имунологични промени предшестващи клиничната изява на болестта; сред тези промени обект на рутинно изследване са именно АНА. Това създава и предпоставки за дръзновено надничане в прогностиката и търсене на още ранни специфични промени или комбинации от такива, които да ни алармират за вече започнал патологичен процес и така да ни „предупредят“ за задаващото се клинично заболяване. От друга страна, СЛЕ се характеризира с подчертана тенденция към фамилна агрегация и роднините първа степен на болните са водеща рискова група. В литературата все още липсват данни за проучвания, които да обединяват в едно изследване предполагаемите рискови фактори на средата, възможните клинични и имунологичните промени при последните. На това е и посветен настоящият труд, чиято цел е да обобщи и провери в изследване досегашните знания за най-ранните промени при „бъдещите болни“, като разглежда роднините на болните, взимайки за отправна точка антинуклеарните антитела, но насочвайки от там погледа към всички останали фактори, които изглежда да имат отношение към развитието на болестта.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е очертаване на общ профил на роднините първа степен на болни със системен лупус еритематодес според риска от развитие на заболяването сред подбрана в България кохорта.

За изложената цел бяха формулирани следните задачи:

1. Клиничен скрининг на роднините и здравите контроли за ранни белези на системно заболяване чрез въпросник и клиничен преглед.

2. Изследване за външни рискови фактори – тютюнопушене, прием на естрогенови препарати, серумни нива на витамин D2/3 и антитела срещу капсидния антиген на вируса на Епщайн-Бар.

3. Изследване на антинуклеарни антитела, фракции на комплемента, антифосфолипидни антитела и цитокини (BLys, APRIL, IFN- α , IL-6, IL-8, IL-10 и TGF- β) при изследваните групи.

4. Изследване на прости и комплексни статистически зависимости между всички описани по-горе както между здрави, роднини и болни, така и вътрегрупово при роднините.

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. Изследвани лица и биологичен материал

С цел да се придобие представа за целия спектър здраве-болест и за мястото на основната група изследвани лица – роднини първа степен на болни със СЛЕ в него, бяха изследвани *три* групи: здрави контроли, роднини първа степен на болни от СЛЕ и болни от СЛЕ. Трите групи ляха изследвани за *клинични прояви* (чрез въпросник и преглед), за *рискови фактори* (тютюнопушене и прием на естрогенни препарати чрез въпросник, лабораторно за нива на витамин Д, и серологично за инфекция с EBV) и *имунологично* (за АНА и подбрани цитокини). Предвид, че РПС са на практика здрави индивиди и цел на изследването е отграничаването им от останалата здрава популация, от една страна, и предвид факта, че болните от СЛЕ с разгърната клинична картина, са в известен смисъл „несравними“ с другите две групи в клиничен аспект, изследването за клинични белези и рискови фактори бе проведено върху РПС и здравите контроли.

По своя тип проведеното проучване е крос-секционно.

• *Подбор на роднини първа степен на болни със СЛЕ и контролни групи от здрави лица, и такива с диагноза СЛЕ*

Включените роднини първа степен на болни със СЛЕ бяха основно роднини на болни, проследявани в Клиниката по ревматология на УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ - София, насочени от ревматолози от други звена в столицата и страната, или сами свързали се с Лаборатория по клинична имунология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ - София с желание за участие в проекта. Диагнозите на болните роднини бяха проверявани по документи, с изброяване на оплакванията и проверка на имунологичните и останалите им изследвания, така че да покриват класификационните критерии, съответстващи на годината на поставяне на диагнозата. Останали критерии за включване на РПС бяха възраст между 20 и 70 г. (предвид малката вероятност за поява на СЗСТ след тази възраст) и дадено информирано съгласие. Като изключваши критерии бяха приети състояния, свързани с образуването на антинуклеарни антитела: активна инфекция, малигнена неоплазия, розацея, декомпенсирано сърдечно заболяване, тежка остеоартроза, бременност, травми и изгаряния, които бяха проверявани чрез снемане анамнеза и преглед на медицински документи.

Контролната група бе съставена от здрави и болни със СЛЕ лица. Включващи критерии за здравите бяха възраст между 20 и 70 г., съответствие по пол и възраст на РПС, а изключващи – наличие на СЗСТ или възпалително ставно заболяване, както и описаните състояния, свързани с образуване на АНА. Здравите контролни лица бяха подбрани измежду медицинския персонал на УМБАЛ „Иван Рилски“ София и УМБАЛ „Св. Анна“ София. Болните от СЛЕ бяха подбрани измежду лекуваните в посочените две болници, на възраст 20 до 70 г., съответстващи по пол и възраст на групата РПС, с еднозначна диагноза по класификационните критерии, съответстващи на годината на поставяне на диагнозата им; изключващи критерии бяха нееднозначна диагноза или припокриващо заболяване.

Първоначално бяха набрани общо 101 лица за участие в проучването. След подробна оценка според включващи и изключващи критерии за участие бяха подбрани 93 лица: 56 РПС, 17 болни със СЛЕ и 20 здрави контроли. Набирането на участници беше осъществено в периода м. март 2018 г.

до м. ноември 2021 г. Демографската характеристика на изследваните лица е представена на табл. 5.

Табл. 5. Демографска характеристика на изследваните лица

	зdrави (n=20)	РПС (n=56)	болни със СЛЕ (n=17)	<i>p</i>
пол – брой (%)				<i>0,584</i>
мъже	4 (20,0)	8 (14,3)	1 (5,9)	
жени	16 (80,0)	48 (85,7)	16 (94,1)	

• *Информирано съгласие и вземане на биологичен материал от изследваните лица*

Всички участници бяха запознати с целите на изследването и доброволно подписаха информирано съгласие според Декларацията от Хелзинки, като проучването беше одобрено от Комисията по етика на научните изследвания към Медицински университет – София (КЕНИМУС). Личните данни и резултатите от изследването са съхранявани, обработвани и представяни в съответствие със Закона за защита на личните данни, в сила от 01.01.2002 г., изм. ДВ. бр. 57 от 13 юли 2007 г. и с Регламент (ЕС) 2016/679 на Европейския парламент и на Съвета, от 27 април 2016 година, относно защитата на физическите лица във връзка с обработването на лични данни и относно свободното движение на такива данни, като е спазен действащият понастоящем Кодекс на професионалната етика – Раздел IV; Лекарска тайна, чл. 51 и чл. 55.

За целите на проучването бе направена рутинна венепункция и взета периферна венозна кръв с вакутейнер за серум (BD Vacutainer®, CATREF 367955, 5 ml). Кръвните проби на всички пациенти бяха изследвани в Лаборатория по клинична имунология към УМБАЛ Иван Рилски. Серумите бяха отделени съобразно стандартната оперативна процедура в лабораторията, описани и съхранявани на -70° С, според изискванията за добра лабораторна практика и според инструкциите на търговските китове.

3.2. Методи

3.2.1. Скринингов въпросник за клинични оплаквания и рискови фактори

Беше изготвен въпросник за прояви на системно страдание. С цел скрининг за признаци, вкл. ранни, на съединително-тъканно заболяване и скрининг за рискови фактори, изследваните лица попълниха съставен от нас въпросник (вж приложение 1 и 2), като отговорите бяха преглеждани на място от автора, специалист по вътрешни болести и ревматология, и при наличие на оплаквания, същите бяха доизяснявани и бе провеждан физикален преглед. Въпросникът бе съставен на база скрининговия въпросник за съединителнотъканни заболявания (CSQ, прил. 1, табл. 58) и актуалните клинични критерии за СЛЕ, прогресивна системна склероза и синдром на Съогрен. През 1995 г. Karlson и сътр. разработват въпросник, т.нар. CSQ – connective tissue diseases screening questionnaire (Karlson et al.,1995). Въпросникът съдържа демографска част и набор от въпроси, съставени на база тогавашните класификационни критерии за основните СЗСТ и ревматоиден артрит; съдържа също така и въпроси относно основни имунологични и лабораторни промени. След съставянето му той е валидиран чрез попълване (по пощата) от три групи – такива със СЗСТ и РА (179 души), пациенти с остеоартроза и мекотъканен ревматизъм (55) и здрави (136). Резултатите са между 83 и 96% сензитивност и между 83 и 93% специфичност, а негативната предиктивна стойност възлиза на 99,7%. В обсъждането авторите обръщат внимание, че скрининговият въпросник винаги трябва да балансира между висока чувствителност с по-малка специфичност, което на практика означава допълнителни разходи за диагностично доуточняване (в сила особено за СЗСТ) и обратното, което носи риск от „неулавяне“ на болни в ранен стадий. При съставянето на въпросника за настоящото изследване бяха взети предвид две съображения – актуализиране според новите данни за ранни прояви на СЗСТ, както и разгръщане на по-висока чувствителност дори за сметка на по-малка специфичност. Последното беше допуснато предвид, че този въпросник включва и обсъждане с пациента след попълването му (т.е. доизясняване на специфичността на оплакванията). Отстранени от CSQ бяха също така

въпросите, касаещи расова принадлежност предвид неприложимостта им към нашата страна.

При обработка на клиничната част на въпросника, оплакванията бяха класифицирани със следните категории: кожни, орални афтоподобни, ставни, синдром на Рейно, сиса-подобни, фоточувствителност, серозит и косопад. В рамките на кожните оплаквания бяха включени всички съобщени обриви; оплаквания като сърбеж (без обрив) или сухота на кожата не бяха включени, тъй като не могат да са проява на ревматично страдание. Съобщените оплаквания, свързани с нарушения целостта на лигавицата на устата и/или носа бяха класифицирани като „орални афтоподобни“ – първо, поради липсата на съобщени носни такива, и второ, предвид честото им обобщаване от изследваните лица с популярното название „афти“ и почти изцяло анамнестичния им характер (т.е. невъзможността за пряка верификация от лекар). Всички оплаквания, свързани със ставите – болка, подуване, скованост бяха обобщени като „ставни“. За синдром на Рейно бяха използвани клинични критерии, а именно промяна на цвета на пръсти(те) на ръцете и/или краката, придружено с чувство на изтръпване и/или болка, спонтанно или при студови или емоционални стимули. За сика-подобни бяха приемани оплаквания, свързани с изразена субективна сухота, включително и такива, които формално не покриват изискванията, описани в класификационните критерии за синдрома на Съогрен. За фоточувствителност беше приемана появата на каквито и да е обривни единици при излагане на слънце. За серозит се приемаше установяването на излив в перикардна или плеврална кухина без друга явна причина. Като косопад бяха класифицирани субективно засиления (различен от обичайното) косопад. Различните органи прояви, както и нарушенията на кръвните редове не бяха класифицирани поради налични явни, еднозначни и различни от системно или ревматично състояние причини за тях.

При разглеждане отговорите от въпросниците, беше установено наличието на множество съобщени оплаквания, които по вид и интензивност категорично не са от системно или възпалително естество, за разлика от други, които могат да бъдат (или да са били) системна проява. Това наложи класифицирането на събраните оплаквания в две категории: първите определихме като „ирелевантни“, а вторите като „потенциално релевантни“.

Избрахме двойката „ирелевантни/ потенциално релевантни“ като най-точна и с най-малко интерпретативен характер, за разлика от двойките „характерни/нехарактерни“ и „специфични/неспецифични“, които вече съдържат немалка степен на предварителна предубедена интерпретация. Водещи критерии в оценката, освен клиничната интуиция по време на прегледа, бяха честотата на поява, тежестта, и най-вече спонтанния характер, т.е. липсата на явна причинност. Например, болка в раменната става след натоварване категоризирахме като ирелевантно оплакване, но болки в малките стави сутрин, макар и без подуване и скованост у човек под 50-годишна възраст, определихме като потенциално релевантни. Както беше отбелязано по-горе, в актуалните класификационни критерии за СЛЕ се обръща внимание, че дадено оплакване се приема за критерий, само ако няма друго по-вероятно медицинско обяснение за него и че критерии могат да бъдат и минали оплаквания/прояви, които в момента не са налични. Освен това и че фебрилитетът може да бъде ранен симптом за СЛЕ. Оттук и взетото от нас решение за доразпитване относно съобщените оплаквания, вкл. минали такива; оттук и решението за включване на въпрос за фебрилитет във въпросника.

Освен клиничната част, във въпросника бяха включени и въпроси за рисковите фактори тютюнопушене и прием на естрогенни препарати, както и за наличие на придружаващи заболявания или прием на медикаменти с оглед евентуално влияние върху изследваните показатели. Предвид, че в хода на провежданото проучване (2018 – 2021 г.) се разгърна пандемията от COVID 19, към въпросника бе добавен и въпрос за преболеване за участниците, включени след началото ѝ. По отношение на тютюнопушенето, съгласно разгледаното проучване, насочващо към евентуалното значение по-скоро на настоящото (а не в миналото) тютюнопушене, във въпросника беше включен съответен уточняващ въпрос (Costenbader et al., 2004).

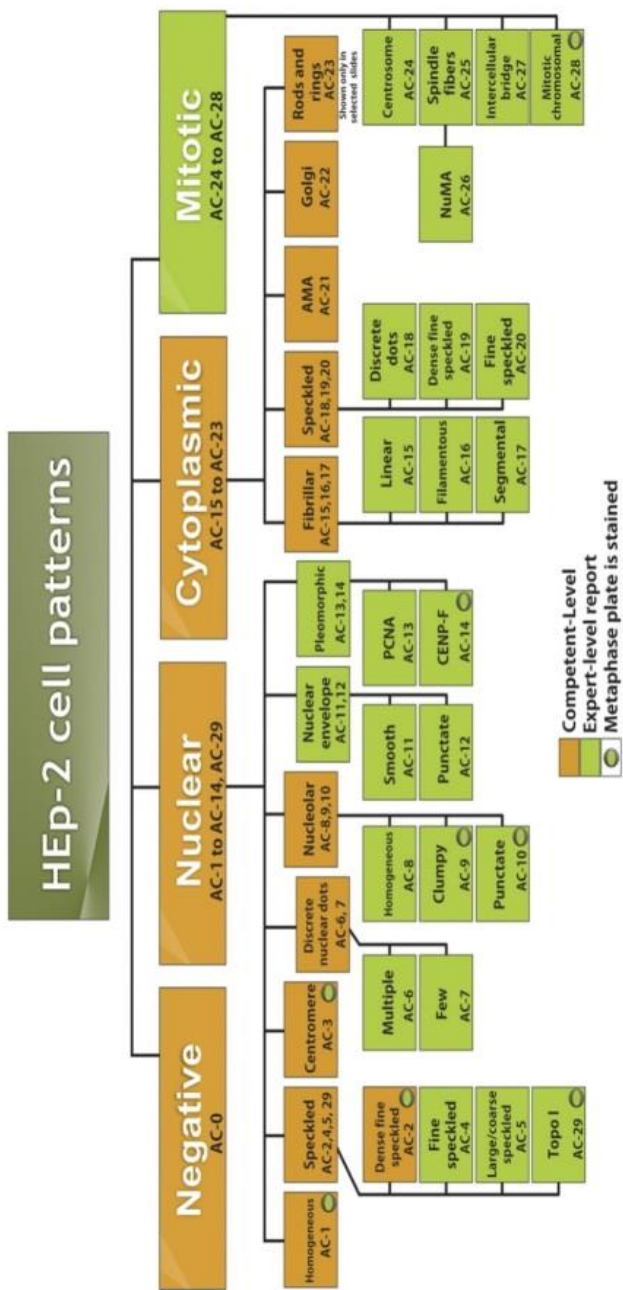
3.2.2. Изследване на АНА

Както беше описано по-горе, освен че АНА предшества началото на клиничните прояви на СЛЕ с години, имат патогенетична роля и са необходим критерий и диагностична „емблема“ на заболяването, те са и основен показател изследван рутинно в клиничната практика. В този смисъл имунологично профилиране на роднините първа степен би било немислимо без изследване на тези антитела. В описаните досега проучвания, АНА у роднини предимно са изследвани по методите ELISA и имуноблот. След унифициране начина на скринингово изследване на АНА в Международния консенсус за типовете АНА светения (International Consensus of ANA Patterns, ICAP), индиректната имуофлуоресценция (ИИФ) е приета като златен стандарт (Damoiseaux et al., 2019). Така в нашето проучване трите групи бяха изследвани и по трите посочени метода – ИИФ, имуноблот и ELISA.

3.2.2.1. Изследване на АНА чрез индиректна имуофлуоресценция на HEp-2 клетъчна линия

Както бе отбелязано по-горе, изследването на АНА чрез ИИФ върху HEp-2 клетки днес е всеобщо приет и унифициран скринингов метод, златен стандарт сред световната имунологична общност. То е неделима част от АНА скрининга на системните и орган-специфичните автоимунни възпалителни заболявания.

Класификационното дърво за АНА ИИФ образи включва 30 типа светене, обозначени с код представен като абривиатурното съкращение – АС, означаващо anti cell pattern и число след него (фиг. 3).



Фиг. 3. Класификационно дърво на специфичните имунофлуоресцентни образи според ICAR, наблюдавани при изследване на човешки серуми върху HEp-2 клетъчна линия

При пациенти със СЛЕ най-често наблюдаваните ядрени образи на ИИФ са АС-1, АС-4 и АС-5, а също могат да се видят АС-13 и АС-7. Характерните за пациенти със СЛЕ автоантитела, които се визуализират чрез тези образи са няколко групи и са насочени срещу следните антигени: 1) dsDNA, ssDNA, Nucleosomes и histones (наблюдават се като светене тип АС-1); 2) U1-RNP и Sm (наблюдават се като светене тип АС-5); 3) SS-A (Ro60), SS-B (La) и Ku (наблюдават се като светене тип АС-4); 4) PCNA (наблюдава се като светене тип АС-13); 5) p-80-collin и SMN (наблюдават се като светене тип АС-7).

Важно е да се обърне внимание върху разликата между негативно светене (АС-0) и неопределимо такова (АС-XX). При АС-0 на практика може да има ИФ светене, но то не е съсредоточено в нито една структура отделно, т.е. не е нито нуклеарно, нито цитоплазмено, нито митотично. За разлика от него, неопределимото светене АС-XX може да бъде предимно в дадена структура, но по вид не може да се причисли към нито една от останалите „прототипни“ групи от АС-1 до АС-29.

Всички серумни проби бяха изследвани за наличие на АНА чрез ИИФ техника, съобразно инструкциите на фирмата производител. Пробите бяха скринирани в разреждане 1:80 в буфериран с фосфат физиологичен разтвор (PBS) заедно с положителен и отрицателен контролен серум във всяка серия. Положителните серуми в скрининговото разреждане 1:80 бяха изследвани в двукратно падащи разреждания за определяне на крайния положителен титър. Приготвянето на слайдовете беше извършено с помоща на машина iPro (Ipro Immunofluorescence Processor, BioSystems S.A., Spain). Анализването на имунофлуоресцентните образи и определянето на титъра и типа светене според номенклатурата на ICAP бе извършено с флуоресцентен микроскоп Nikon Eclipse Ci-L (Japan) чрез двойно сляпо наблюдение от минимум двама обучени специалисти имунолози. За *cutoff* титър бе прието разреждане 1:160, като наличие на светене над 1:160 се приема за положителен резултат, а равно или под 1:160 – за отрицателен, съответно АНА (+) пол. и АНА (-) отр.

3.2.2.2. Изследване на разширен панел от автоантитела от клас IgG чрез имуноблот метод

Серумните проби на трите групи бяха изследвани за наличие на антитела срещу подобрани антигени, често срещани при пациенти със системен лупус. За целта беше използвана имуноблот техника и панел ANA Profile 3 plus DFS70 (EUROIMMUN, Germany), установяващ наличие на специфични автоантитела срещу следните антигени: nRNP/Sm, Sm, Ro-60 (SS-A), Ro-52, La (SS-B), Scl-70, PM-Scl, Jo-1, CENP B, PCNA, dsDNA, Nucleosomes, Histons, Rib.P, AMA M2, DFS70. Всички серумни проби бяха изследвани за наличие на специфични автоантитела съобразно инструкциите на фирмата производител. Бловете бяха приготвени на автоматичен блотер (Immunoblotmaster, Euroimmune. Germany). Резултатите бяха отчетени и анализирани чрез софтуерна програма EUROlineScan.

Тестовите резултати бяха отчитани качествено като положителни, отрицателни или гранични за наличието на ААт.

3.2.2.3. Изследване на anti-dsDNA от клас IgG по метода ELISA

Серумните проби на трите групи бяха изследвани за наличие на антитела срещу двойноверижна ДНК по метода ELISA (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Предвид известната различна чувствителност на имуноблот метода и ELISA метода по отношение детектирането на anti-dsDNA, при обработката на данните са интерпретирани общо всички антитела срещу нуклеопротеиновия комплекс - anti- dsDNA, anti-Histones и anti-Nuc.

3.2.3. Изследване на C₃ и C₄ фракции на комплемента чрез турбидиметрия

Серумните проби на трите групи, с изключение на 13 лица от РПС групата, бяха изследвани за наличие на C₃ и C₄ фракции на комплемента чрез метода турбидиметрия (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Промените в C₃ и C₄ фракциите на комплемента, са част от имунологичните критерии на съвременните класификационни критерии за системния лупус на ACR/EULAR 2019 (Aringer, 2019).

3.2.4. Изследване на анти-кардиолипинови (ACL) и анти-бета-2-гликопротеин-I (anti- β 2-GPI) автоантитела от клас IgG чрез ELISA

Серумните проби на трите групи, с изключение на 13 лица от РПС групата, бяха изследвани за наличие на анти-кардиолипинови (ACL) и анти-бета-2-гликопротеин-I (anti- β 2-GPI) автоантитела чрез ELISA (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Положителните антикардиолипинови (ACL) и анти-бета-2-гликопротеин-I антитела (anti- β 2-GPI) са част от имунологичните критерии на съвременните класификационни критерии за системния лупус на ACR/EULAR 2019 (*нак там*).

3.2.5. Изследване на цитокини в кръвен серум чрез имуноензимни методи

С цел имунологично профилиране на трите групи бяха изследвани следните цитокини: BLys, APRIL, IFN- α , IL-6, IL-8, IL-10 и TGF- β . Изследваните цитокини по своята функция са проинфламаторни (BLys, APRIL, IFN- α , IL-6 и IL-8) и регулаторни (IL-10 и TGF- β). Както е демонстрирано в описаните студии, за развитие на СЛЕ е необходим имунологичен дисбаланс, включващ не само превалиране на проинфламаторните, но и изразен недостиг на регулаторните цитокини.

IFN- α е интерферон тип I, синтезиран от фибробласти и моноцити. IFN- α се потиска регулаторните Т-хелперни лимфоцити, стимулира секрецията на BAFF, активира на НК клетките и увеличава продукцията на IFN- γ , и засилва транскрипцията на IFN-свързаните гени (т. нар. интерферонова сигнатура) (*Shivakumar, 1989; Crispin, Tsokos, 2009*). Така IFN- α участва в образуването на АНА, а нивата му са повишени при болни със СЛЕ (*Pascual et al., 2003*), което причислява СЛЕ към заболяванията с повишена интерферонова сигнатура.

Интерлевкините IL-6 и IL-8 са също известни проинфламаторни цитокини. IL-6 участва в образуването на АНА (*Thien et al., 2004; Guerrier et al., 2012*), нивата му се увеличават във времето преди разгръщане на СЛЕ, особено преди появата на специфични АНА (*Lu et al. 2016*). Метаанализ пък демонстрира ясно значимо повишени нива на IL-8 при болни от СЛЕ (*Mao et al., 2018*).

BLys и APRIL са цитокини от т. нар. TNF-суперфамилия, участваща в регулацията на възпалението и имунния отговор, но също така и на пролиферацията, диференциацията, апоптозата и ембриогенезата. BLys е ключов цитокин в патогенезата на СЛЕ, както беше описано по-горе: той е отговорен за стимулацията на В-клетките, в случая надмерната продължителност на живота на автореактивните клонове В-клетки, което води до постоянното производство на автоантитела. APRIL има сходно на BLys действие и съответно роля в стимулиране преживяемостта на В-клетките. Често се описва т. нар. BLys/APRIL система; нивата и на двата цитокина са повишени при болни със СЛЕ. Според цитираните в нашия обзор студии, BLys и APRIL са повишени у „бъдещи болни“ години преди заболяването (*Lu et al., 2002*), но BLys може и да е понижен при някои АНА-позитивни здрави със запазени имунни регулаторни механизми (*Munroe et al., 2017*). Освен това нивата на BLys и APRIL корелират с активността на СЛЕ.

TGF- β и IL-10 са основни регулаторни цитокини. IL-10 потиска експресията на HLA и костимулаторните молекули по АПК, продукцията на проинфламаторни цитокини и активацията на Т-клетките и др. (*Наумова, 2021*). TGF- β е основен негативен регулатор на проинфламаторните цитокини, инхибира пролиферацията на Т-клетките и благоприятства диференциацията на Т-клетките в регулаторни Т-клетки (Tregs) и др. (*нак там*). Според многократно цитираното вече проучване на *Munroe* и сътр. (*Munroe et al., 2017*), и двата цитокина са с понижени нива у роднините на болни, които впоследствие са развили СЛЕ, а TGF- β дори има самостоятелна предиктивна стойност относно бъдещо заболяване.

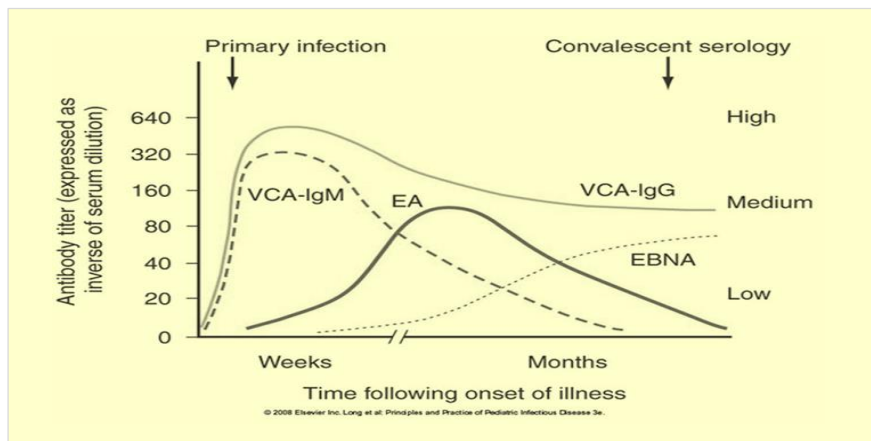
За количествено определяне на BLys, APRIL, IFN- α , IL-6, IL-8, IL-10 и TGF- β в серумите на изследваните здрави контроли, РПС и пациенти със СЛЕ използвахме метод „сандвич“ ELISA (TGF- β : Diaclone, France; BLys: Human BLys ELISA, Abexa, UK; APRIL: Human April ELISA, Biovendor; IFN- α : Diaclone, France, IL-6, IL-8, IL-10: Diaclone, France).

Вътрешният качествен контрол е извършван посредством сравняване на получените стойности на калибраторите и контролите с приложените към всеки кит стойности. Тъй като

за цитокините няма определени референтни граници нито в серум, нито в други биологични материали, стойностите на всяка проба са определени в pg/ml, без да се категоризират като положителни или отрицателни. Получените числа са използвани за последваща статистическа обработка.

3.2.6. Изследване на антитела срещу капсиден антиген (virus capsid antigen, VCA) на Епщайн-Бар вирус от клас IgM и IgG чрез имуноензимни методи

Както бе посочено по-горе, налице са сериозни основания за допускане, че инфекцията с EBV може да има значима патогенетична роля в развитието на СЛЕ, поради което се обсъжда като рисков фактор. Накратко, EBV е ДНК вирус, при който геномът е обграден от нуклеокапсид (протеин), от своя страна обграден от т. нар. тегумент (също протеин), заобиколен от обвивка (envelope), съставена от липиди и „стърчащи“ гликопротеини. Вирусът се предава по въздушно-капков, контактен и полов път, инфектира първоначално епителните клетки, след което се поселва в В-клетките, където остава в латентно състояние с периодични реактивации, водещи до т.нар. литична фаза, съпроводена с отделяне на вируса в телесните течности. Най-общо, съответно на описаните структури на вируса и фази в цикъла на инфекцията са и основните антителата срещу вируса, използвани в рутинната практика (фиг. 4): anti-EA (early antigen, протеин появяващ се в ранната литична фаза), anti-EBNA-1 (Epstein-Barr nuclear antigen 1, срещу нуклеопротеин от генома), anti-VCA (viral capsid antigen, срещу антиген на капсида). Класическата представа за динамиката на серопозитивността за EBV е, че най-ранно позитивират anti-VCA и IgG остават трайно позитивни; постепенно в хода на хроничната инфекция позитивират и остават трайно позитивни anti-EBNA-1, а при реактивация се покачват anti-EA. Предвид, че anti-VCA антителата се асоциират с АНА позитивност у здрави, дори при негативност по anti-EBNA-1 (Cuomo et al. 2014) и че, освен че са белег на състояние на инфектираност, има данни и за възможна асоциация с покачването на титъра им и реактивация на вируса (Besson et al., 2006), избрахме да изследваме антитела именно срещу този антиген.



Фиг. 4. Обичайна динамика на сероконверсията на EBV, Elsevier, *Principles and practice of Pediatric Infectious Diseases*, 2008.

За определяне на серумна концентрация на антитела от клас IgM и IgG, насочени срещу VCA беше използван метод индиректна ELISA и реактиви anti-EBV (VCA) IgM и anti-EBV (VCA) IgG (ORGENTEC Diagnostika GmbH, Germany). Количественото определяне на anti-EBV (VCA) IgM и IgG антителата в серуми на здрави контроли, РПС и пациенти със СЛЕ беше извършено от напълно автоматизирана система Alegria (ORGENTEC Diagnostika GmbH, Germany). Резултатите бяха отчетени като негативни (<20 U/ml), гранични (20 – 25 U/ml) и положителни (>25 U/ml) според препоръките на производителя.

3.2.7. Определяне на количеството 25-ОН Vitamin D3/D2 чрез имуноензимни методи

Витамин Д се обсъжда като възможен рисков фактор за СЛЕ, като литературните данни са противоречиви, както бе отбелязано по-горе (Bae et al., 2002; Costenbader et al. 2007). Въпреки това, по експертно мнение, той се счита за фактор в склонността за развитие на аутоимунно заболяване (Harel, 2006).

Общата концентрация на 25-(ОН)-Vitamin D3 и 25-(ОН)-Vitamin D2 в серум на здрави контроли, РПС и пациенти със СЛЕ беше установено чрез метод конкурентна ELISA. За целта беше използван кит 25-ОН Vitamin D3/D2 (ORGENTEC Diagnostika GmbH, Germany) и напълно автоматизирана система Alegria

(ORGENTEC Diagnostika GmbH, Germany). Резултатите бяха отчетени като дефицит (<12 ng/ml), недостиг ($12 - 20$ ng/ml) и нормална концентрация на витамин D ($>20 - 150$ ng/ml) според препоръките на производителя.

3.2.8. Статистически методи

Данните са въведени и обработени със статистическите пакети IBM SPSS Statistics 27.0.1.0 и MedCalc Version 19.6.3. За фигурите е използван и Excel на Microsoft Office 2021.

За ниво на значимост, при което се отхвърля нулевата хипотеза, е прието $p < 0.05$.

Приложени са изброените по-долу методи.

3.2.8.1. Дескриптивна статистика

Използвани са методите на дескриптивната статистика (анализ) за описание на демографската и клинична характеристика на пациентите, както и за представяне на данните от изследваните имунологични параметри с показателите на централната тенденция и статистическо разсейване (вариационен анализ). Приложен е и графичен анализ за визуализация на получените резултати.

3.2.8.2. Тестове за определяне нормалността на разпределението (Колмогоров-Смирнов, Shapiro-Wilk)

Извършена е проверка за нормалност на разпределението, тест за съответствие между емпиричното и непрекъснатото теоретично разпределение, чрез тестовете на Колмогоров-Смирнов и на Shapiro-Wilk. Тестовете за определяне на вида разпределение са използвани за проверка дали данните за определен изследван параметър са с нормално разпределение. Според вида разпределение са използвани параметрични или непараметрични тестове за сравнение на извадки.

След определяне вида на разпределението на количествените променливи, за установяване на взаимовръзки между тях, както и между категорийните променливи, или между променливи от двата вида, са използвани следните видове анализ.

3.2.8.3. Fisher-Freeman-Halton exact test, Fisher's exact test и тест χ^2 – за проверка на хипотези за наличие на зависимост между категорийни променливи.

3.2.8.4. Еднофакторен дисперсионен анализ ANOVA – за проверка на хипотези за влияние на фактори с повече от две нива.

T-критерий на Student – за проверка на хипотези за различие между средните аритметични на две независими извадки.

3.2.8.5. Непараметричен тест на Kruskal-Wallis – за проверка на хипотези за различие между няколко независими извадки.

3.2.8.6. Непараметричен тест на Man-Whitney – за проверка на хипотези за различие между две независими извадки.

3.2.8.7. Корелационен анализ – за проверка на хипотези за наличие на линейна зависимост между количествени признаци.

3.2.8.8. Бинарен логистичен регресионен анализ – за определяне факторите, свързани с възникването на изследвано събитие и количествена оценка на тяхното влияние.

3.2.8.9. ROC curve анализ – за търсене на прагова величина при количествени признаци, отграничаваща случаите в две изследвани групи.

4. РЕЗУЛТАТИ

Изследвани и анализирани бяха общо 93 лица, разделени в три групи: 56 РПС, 20 здрави контроли и 17 контроли болни със СЛЕ.

4.1. Демографски характеристики на трите включени в проучването групи лица

4.1.1. Разпределение по пол и възраст

При изследваните групи средната възраст е $39,40 \pm 11,59$ години в интервала между 20 и 68 години (табл. 6); значително преобладава женския пол – съответно 85,7% от РПС, 80% от здравите и 91,7% от болните. От табл. 6 става ясно, че трите групи на изследване са статистически уеднаквени по известните

замъгляващи фактори пол и възраст, което е добра предпоставка за коректност на последващите сравнения.

Табл. 6. Статистически характеристики на случаите по групи на изследване

	зdrави (n=20)	РПС (n=56)	болни със СЛЕ (n=17)	<i>p</i>
ср. възраст (години, \pm SD)	39,75 \pm 12,19	39,09 \pm 11,67	40,00 \pm 11,28	0,951
пол – брой (%)				0,584
мъже	4 (20,0)	8 (14,3)	1 (5,9)	
жени	16 (80,0)	48 (85,7)	16 (94,1)	

В нашето изследване липсва статистическа зависимост между пола и който и да е от изследваните показатели. В задълбоченото проучване на Munroe и сътр. (Munroe et al., 2017) женският пол не е самостоятелен предиктивен фактор за развитие на СЛЕ при роднините. В нашите резултати липсва статистическа зависимост между възрастта и останалите променливи. Традиционно е приемано, че АНА нарастват с възрастта. Литературните данни обаче са противоречиви или по-скоро не подкрепят подобна хипотеза (Sato et al., 2012; Li et al., 2007; Slight-Webb et al., 2020).

4.1.2. Вид роднинска връзка в групата на РПС

Видът роднинска връзка при подбраните от нас РПС е показан в таблица 8.

Табл. 8. Вид роднинска връзка на РПС с болния от СЛЕ

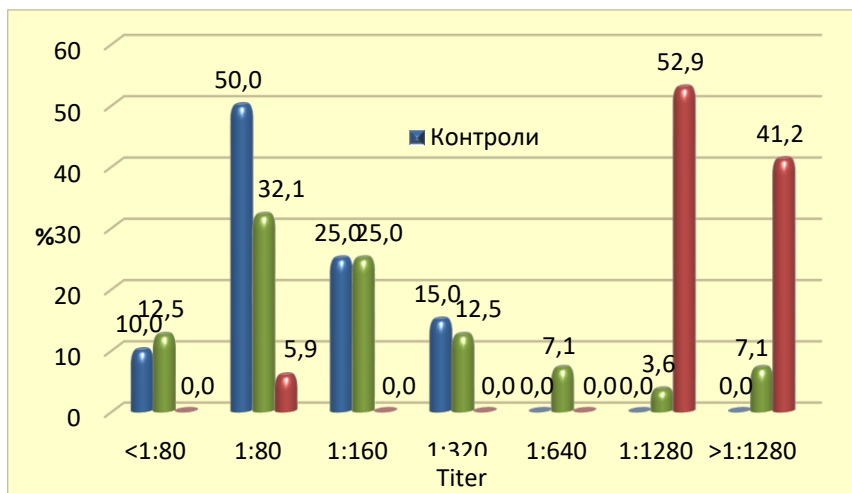
вид роднинска връзка на изследвания РПС	n, (%)
родител със СЛЕ	28 (53,8%)
брат/сестра със СЛЕ	15 (28,8%)
син/дъщеря със СЛЕ	9 (17,3%)

В литературата са налице данни за малки различия в степента на фамилната агрегация, λ , между sibлинги от една страна и родители/поколение от друга в полза на първите (вж по-горе) (Alarcón-Segovia, Fishbein 1972). У Munroe (Munroe et al., 2017)

изрично се отбелязва, че типа роднинска връзка няма отношение към вероятността за разгръщане на заболяване.

4.1.3. Изследване разпределението на АНА по ИИФ - титър и типове светене според номенклатурата на ICAP сред здрави, РПС и болни от СЛЕ

При изследване на честотното разпределение на титрите групи по титър на АНА се вижда, че те се различават сигнификантно при 4 от титрите: 1:80, 1:160, 1:1280 и >1:1280 (табл. 9 и фиг. 5). При 1:80 и 1:160 статистически достоверно по-високи относителни дялове имат здравите и РПС (които не се различават статистически помежду си) спрямо пациентите от групата на болните със СЛЕ, докато при двата най-високи титъра статистически значимо по-висок относителен дял имат болните със СЛЕ спрямо останалите две групи, чиито относителни дялове отново не се различават статистически помежду си. Относителните дялове на РПС по своята динамика наподобяват контролите – намаляват отляво надясно след 1:80 до 3,6% при 1:1280 и бележат леко повишение при > 1:1280 до 7,1%. Както е видно, при РПС се наблюдава тенденция към сигнификантност за „разстилане“ по всички титри, за разлика от здравите, които „заемат“ само ниските стойности.



Фиг. 5. Честотно разпределение на титър на АНА по ИИФ сред трите групи - здрави, РПС и болни със СЛЕ

Табл. 9. Честотно разпределение на титър на АНА по ИИФ сред трите групи - здрави, РПС и болни със СЛЕ ($p < 0,001$)

титър на АНА	честота	групи на изследване			общо
		здрави	РПС	СЛЕ	
< 1:80	брой	2	7	0	9
	% по групи	22,2	77,8	0,0	100,0
	% по титър	10,0 ^a	12,5 ^a	0,0 ^a	9,7
1:80	брой	10	18	1	29
	% по групи	34,5	62,1	3,4	100,0
	% по титър	50,0 ^a	32,1 ^a	5,9 ^b	31,2
1:160	брой	5	14	0	19
	% по групи	26,3	73,7	0,0	100,0
	% по титър	25,0 ^a	25,0 ^a	0,0 ^b	20,4
1:320	брой	3	7	0	10
	% по групи	30,0	70,0	0,0	100,0
	% по титър	15,0 ^a	12,5 ^a	0,0 ^a	10,8
1:640	брой	0	4	0	4
	% по групи	0,0	100,0	0,0	100,0
	% по титър	0,0 ^a	7,1 ^a	0,0 ^a	4,3
1:1280	брой	0	2	9	11
	% по групи	0,0	18,2	81,8	100,0
	% по титър	0,0 ^a	3,6 ^a	52,9 ^b	11,8
> 1:1280	брой	0	4	7	11
	% по групи	0,0	36,4	63,6	100,0
	% по титър	0,0 ^a	7,1 ^a	41,2 ^b	11,8
общо	брой	20	56	17	93
	% по групи	21,5	60,2	18,3	100,0
	% по титър	100,0	100,0	100,0	100,0

* еднаквите букви по хоризонталите означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ($p < 0,05$)

Табл. 10. Честотно разпределение на АНА $< 1:160$ и ≥ 160 сред трите групи - здрави, РПС и болни със СЛЕ ($p < 0,001$)

АНА	честота	групи на изследване			общо
		здрави	РПС	СЛЕ	
< 160	брой	12	27	1	40
	% по групи	30,0	67,5	2,5	100,0
	% по АНА	60,0 ^a	48,2 ^a	5,9 ^b	43,0
≥ 160	брой	8	29	16	53
	% по групи	15,1	54,7	30,2	100,0
	% по АНА	40,0 ^a	51,8 ^a	94,1 ^b	57,0
общо	брой	20	56	17	93
	% по групи	21,5	60,2	18,3	100,0
	% по АНА	100,0	100,0	100,0	100,0

* еднаквите букви по хоризонталите означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ($p < 0,05$)

Табл. 11. Честотно разпределение на АНА $\leq 1:160$ и $> 1:160$ сред трите групи - здрави, РПС и болни със СЛЕ ($p < 0,001$)

АНА	честота	групи на изследване			общо
		здрави	РПС	СЛЕ	
1:160^{\leq}	брой	17	40	1	58
	% по групи	29,3	69,0	1,7	100,0
	% по АНА	85,0 ^a	71,4 ^a	5,9 ^b	62,4
1:160^{>}	брой	3	16	16	35
	% по групи	8,6	45,7	45,7	100,0
	% по АНА	15,0 ^a	28,6 ^a	94,1 ^b	37,6
общо	брой	20	56	17	93
	% по групи	21,5	60,2	18,3	100,0
	% по АНА	100,0	100,0	100,0	100,0

* еднаквите букви по хоризонталите означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ($p < 0,05$)

Табл. 12. Честотно разпределение на АНА $\leq 1:320$ и $> 1:320$ сред трите групи - здрави, РПС и болни със СЛЕ ($p < 0,001$)

АНА	честота	групи на изследване			общо
		здрави	РПС	СЛЕ	
$\leq 1:320$	брой	20	46	1	57
	% по групи	29,9	68,6	1,5	100,0
	% по АНА	100,0 ^a	82,1 ^b	5,9 ^c	61,3
$> 1:320$	брой	0	10	16	36
	% по групи	0,0	54,3	45,7	100,0
	% по АНА	0,0 ^a	18,9 ^b	94,1 ^c	38,7
общо	брой	20	56	17	93
	% по групи	21,5	60,2	18,3	100,0
	% по АНА	100,0	100,0	100,0	100,0

* еднаквите букви по хоризонталите означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ($p < 0,05$)

При сравняване на трите изследвани групи според разпределение по различни *cutoff* титри (1:160, 1:320 и $> 1:320$, табл. 10, 11 и 12) се вижда, че значима разлика между здравите РПС се наблюдава едва при титри *над* 1:320. Така 51,8% от РПС в нашето проучване са с титър на АНА *равен на или по-голям* (\geq) от 1:160, спрямо 40% от здравите контроли и 100% от болните. С титър *над* ($>$) 1:160 от РПС са 28,6%, а от здравите контроли – 15,0%; с покачване на титъра – *над* ($>$) 1:320, разликата между РПС и здрави контроли се задълбочава, съответно 18,9% спрямо 0%. И тук е налице тенденция към сигнификантност още от титър $> 1:160$, която е възможно да се изяви при по-голяма група изследвани лица.

Проучванията за наличието на антинуклеарни антитела у роднините на болни със СЛЕ са десетки (табл. 59 в пълния текст) и категорично свидетелстват за по-голямата честота на серумни АНА в тази група, макар по методологични причини невинаги да са директно сравними по отношение на точната честота. Световните данни за АНА у РПС варират от 5-10 до около 35% наличие у РПС на общи АНА или на отделни антитела. Все пак,

около 10% АНА позитивност прави впечатление от по-мащабните и съвременни проучвания. В нашите данни прави впечатление високият процент АНА *около и над* cutoff титъра у РПС и здрави контроли (съответно 51,8 и 40%, табл. 10); това би могло да се обсъди като специфика на българската популация, но трябва да се вземе предвид и възможна промяна при увеличаване броя на изследваните лица. Самата работна група по ICAP обсъжда, че cutoff титърът следва да бъде определян емпирично и локално (Harel, 2006).

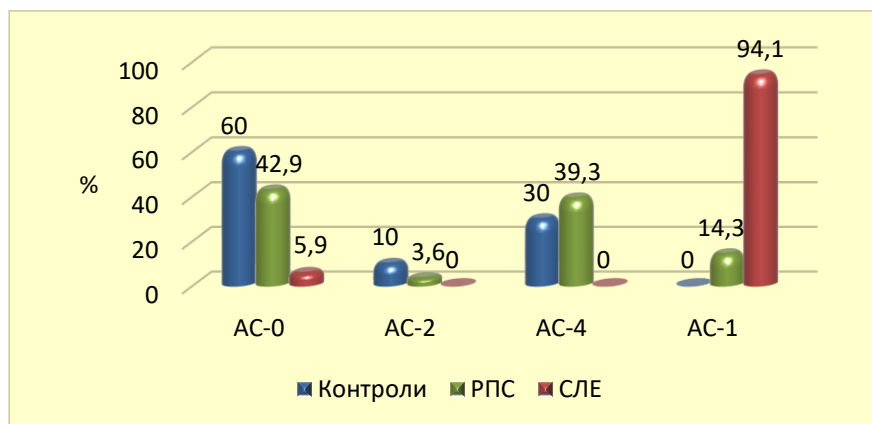
По отношение на получените имунофлуоресцентни образи, сред изследваните се наблюдават следните типове според номенклатурата на ICAP: AC-0, AC-1, AC-2, AC-4 и смесени типове на светене (последните изключени от статистическа обработка поради малък брой). При светене тип AC-0 на практика може да има ИФ светене, но то не е съсредоточено в нито една структура отделно. AC-1, хомогенното ядрено светене, се асоциира с наличието на anti-dsDNA, а AC-4, финото петнисто ядрено светене – често с anti-Ro60, но не винаги; AC-2, пък, плътно петнисто ядрено светене, най-често се дължи на наличие на anti-DFS70 антитела, които в най-голяма степен се асоциират с *липсата* на автоимунно заболяване.

Изследваните групи се различават статистически достоверно по честотното разпределение на три от типовете светене – AC-1, AC-4 и AC-0 (табл. 17 и фиг. 6). При AC-1 статистически значимо по-висок относителен дял имат болните със СЛЕ спрямо останалите две групи, чиито относителни дялове не се различават статистически помежду си, докато при AC-4 и AC-0 сигнификантно по-високи относителни дялове имат здравите и РПС (които отново не се различават статистически помежду си) спрямо пациентите от групата на болните със СЛЕ. Т.е., както и при разпределението по титър на АНА, РПС следват това на здравите, но се „протягат“ и към болните със СЛЕ, покривайки целия спектър; и отново, макар да не достигат статистически значима разлика със здравите, е налице тенденция към значимост във всички видове светене, която би могла да се окаже значима при по-голяма извадка.

Табл. 17. Честотно разпределение на типовете ИФ светене в групите на изследване ($p < 0,001$)

тип ИФ светене	честота	групи на изследване			общо
		зdravi	РПС	СЛЕ	
АС-1	брой	0	8	16	24
	% по групи	0,0	33,3	66,7	100,0
	% по тип ИФС	0,0 ^a	14,3 ^a	94,1 ^b	25,8
АС-4	брой	6	22	0	28
	% по групи	21,4	78,6	0,0	100,0
	% по тип ИФС	30,0 ^a	39,3 ^a	0,0 ^b	30,1
АС-2	брой	2	2	0	4
	% по групи	50,0	50,0	0,0	100,0
	% по тип ИФС	10,0 ^a	3,6 ^a	0,0 ^a	4,3
АС-0	брой	12	24	1	37
	% по групи	32,4	64,9	2,7	100,0
	% по тип ИФС	60,0 ^a	42,9 ^a	5,9 ^b	39,8
общо	брой	20	56	17	93
	% по групи	21,5	60,2	18,3	100,0
	% по тип ИФС	100,0	100,0	100,0	100,0

* еднаквите букви по хоризонталите означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ($p < 0,05$)



Фиг. 6. Честотно разпределение на типовете ИФ светене в групите на изследване

При изследване на зависимостта между титъра на АНА и типовете светене в цялата извадка, се установява сигнификантна зависимост (табл. 18). Казано накратко, в ниските титри преобладава АС-0, в граничните и леко повишените навлиза АС-4, както и АС-2, а от 1:640 нагоре очаквано доминира АС-1, както следва:

- при титър на АНА $<1:80$ и $1:80$ статистически достоверно по-висок относителен дял има АС-0 спрямо останалите три типа светене, чиито относителни дялове не се различават статистически помежду си (при $<1:80$ АС-2 не се различава статистически значимо от АС-0 поради малкия брой случаи – само 4 – с тази категория).

- при титър $1:160$ сигнификантно по-високи относителни дялове имат АС-4 и АС-2 (неразличаващи се статистически помежду си) спрямо останалите два типа ИФ светене, чиито относителни дялове също не се различават статистически помежду си.

- при $1:320$ статистически достоверно по-високи относителни дялове имат АС-4 и АС-2 (неразличаващи се статистически помежду си) спрямо АС-0, но не и спрямо АС-1, чийто относителен дял не се различава статистически от тези на всички останали категории.

- при $1:640$ статистически достоверно по-висок относителен дял има АС-1 спрямо тези на АС-4 и АС-0 (чиито относителни дялове не се различават сигнификантно помежду си), но не и спрямо този на АС-2, който не се различава статистически значимо от тези на АС-1 и АС-0.

- при АНА титър $1:1280$ статистически достоверно по-висок относителен дял отново има АС-1 спрямо тези на АС-4 и АС-0 (чиито относителни дялове не се различават сигнификантно помежду си), но не и спрямо този на АС-2, който не се различава статистически значимо от тези на всички останали категории.

- при $>1:1280$ статистически значимо по-висок относителен дял имат АС-1 и АС-2 (неразличаващи се статистически помежду си) спрямо тези на АС-4 и АС-0 (чиито относителни дялове също не се различават сигнификантно помежду си).

Табл. 18. Анализ на зависимостта между титър и тип ИФ светене в цялата извадка ($p < 0,001$)

титър	честота	тип ИФ светене				общо
		АС-1	АС-4	АС-2	АС-0	
< 1:80	брой	0	0	0	9	9
	% по групи	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	% по титър	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^{ac}	24,3 ^{bc}	9,7
1:80	брой	1	0	0	28	29
	% по групи	3,4	0,0	0,0	96,6	100,0
	% по титър	4,2 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	75,7 ^b	31,2
1:160	брой	0	18	1	0	19
	% по групи	0,0	94,7	5,3	0,0	100,0
	% по титър	0,0 ^a	64,3 ^b	25,0 ^b	0,0 ^a	20,4
1:320	брой	2	7	1	0	10
	% по групи	20,0	70,0	10,0	0,0	100,0
	% по титър	8,3 ^{ac}	25,0 ^a	25,0 ^a	0,0 ^{bc}	10,8
1:640	брой	4	0	0	0	4
	% по групи	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0
	% по титър	16,7 ^a	0,0 ^b	0,0 ^{ac}	0,0 ^{bc}	4,3
1:1280	брой	9	2	0	0	11
	% по групи	81,8	18,2	0,0	0,0	100,0
	% по титър	37,5 ^a	7,1 ^{bc}	0,0 ^{ac}	0,0 ^{bc}	11,8
> 1:1280	брой	8	1	2	0	11
	% по групи	72,7	9,1	18,2	0,0	100,0
	% по титър	33,3 ^a	3,6 ^b	50,0 ^a	0,0 ^b	11,8
общо	брой	24	28	4	37	93
	% по групи	25,8	30,1	4,3	39,8	100,0
	% по титър	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

* еднаквите букви по хоризонталите означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ($p < 0,05$)

Интересно е да се разгледа дали асоциацията на титър с тип светене се различава вътре в отделните групи. Така в групата на здравите наблюдаваме следното (табл. 19):

Налице е статистически значима зависимост между титъра на АНА и типа ИФ светене;

- при титър 1:80 статистически достоверно по-висок относителен дял има АС-0 спрямо АС-4 и АС-2, чиито относителни дялове не се различават статистически помежду си;

- при 1:160 и 1:320 сигнификантно по-високи относителни дялове имат АС-4 и АС-2 (неразличаващи се статистически помежду си) спрямо този на АС-0;

При титър <1:80 разликата в честотното разпределение на типовете светене е статистически нищожна.

Т.е., в нормалните титри очаквано доминира АС-0, което отива на второ място след АС-4 и АС-2 при граничните и леко завишени титри.

Табл. 19. Анализ на зависимостта между титър и тип светене в групата на *здравите* ($p < 0,001$)

титър	честота	тип ИФ светене				общо
		АС-1	АС-4	АС-2	АС-0	
< 1:80	брой		0	0	2	2
	% по светене	-	0,0	0,0	100,0	100,0
	% по титър		0,0 ^a	0,0 ^a	16,7 ^a	10,0
1:80	брой		0	0	10	10
	% по светене	-	0,0	0,0	100,0	100,0
	% по титър		0,0 ^a	0,0 ^a	83,3 ^b	50,0
1:160	брой		4	1	0	5
	% по светене	-	80,0	20,0	0,0	100,0
	% по титър		66,7 ^a	50,0 ^a	0,0 ^b	25,0
1:320	брой		2	1	0	3
	% по светене	-	66,7	33,3	0,0	100,0
	% по титър		33,3 ^a	50,0 ^a	0,0 ^b	15,0
общо	брой		6	2	12	20
	% по светене	-	30,0	10,0	60,0	100,0
	% по титър		100,0	100,0	100,0	100,0

* еднаквите букви по хоризонталите означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ($p < 0,05$)

В групата на РПС зависимостите са следните (табл. 20):

Налице е статистически значима зависимост между титъра на АНА и типа ИФ светене;

- при титри $<1:80$ и $1:80$ статистически достоверно по-висок относителен дял има АС-0 спрямо останалите три типа светене, чиито относителни дялове не се различават статистически помежду си (при $<1:80$ АС-2 не се различава статистически значимо от АС-0 поради малкия брой случаи – само 2 – с тази категория, не се различава сигнификантно и от АС-1);

- при титър $1:160$ статистически достоверно по-висок относителен дял има АС-4 спрямо останалите три вида светене, чиито относителни дялове не се различават статистически помежду си (относителният дял на АС-2 не се различава статистически от този на АС-4 поради малкия брой случаи с АС-2);

- при $1:320$ статистически достоверно по-високи относителни дялове имат АС-1 и АС-4 (неразличаващи се статистически помежду си) спрямо АС-0, но не и спрямо АС-2, чийто относителен дял не се различава статистически от тези на всички останали категории;

- при $1:640$ статистически достоверно по-висок относителен дял има АС-1 спрямо тези на АС-4 и АС-0 (чиито относителни дялове не се различават сигнификантно помежду си), но не и спрямо този на АС-2, който не се различава статистически значимо от тези на всички останали;

- при $1:1280$ разликата в честотното разпределение на типовете светене е статистически нищожна;

- при титър $>1:1280$ статистически значимо по-висок относителен дял има АС-2 спрямо тези на всички останали (чиито относителни дялове не се различават сигнификантно помежду си).

Т.е., за разлика от при здравите, тук при слабо повишените титри ($1:320$) се появява и АС-1 светене. При високите титри могат да се срещнат всички видове без, разбира се, АС-0. За отбелязване е наличието на АС-2 при титър $>1:1280$ у двама роднини. Както бе отбелязано, АС-2 е свързано с наличие на anti-DFS70, както е при тези двама изследвани; в клиничната практика често се среща много висок титър АНА, дължащ се единствено на това анти тяло.

Табл. 20. Анализ на зависимостта между титър и тип светене в групата на РПС ($p < 0,001$)

титър	честота	тип ИФ светене				общо
		АС-1	АС-4	АС-2	АС-0	
< 1:80	брой	0	0	0	7	7
	% по светене	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	% по титър	0,0 ^{ac}	0,0 ^a	0,0 ^{ac}	29,2 ^{bc}	12,5
1:80	брой	1	0	0	17	18
	% по светене	5,6	0,0	0,0	94,4	100,0
	% по титър	12,5 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	70,8 ^b	32,1
1:160	брой	0	14	0	0	14
	% по светене	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0
	% по титър	0,0 ^a	63,6 ^{bc}	0,0 ^{ac}	0,0 ^a	25,0
1:320	брой	2	5	0	0	7
	% по светене	28,6	71,4	0,0	0,0	100,0
	% по титър	25,0 ^a	22,7 ^a	0,0 ^{ac}	0,0 ^{bc}	12,5
1:640	брой	4	0	0	0	4
	% по светене	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0
	% по титър	50,0 ^a	0,0 ^{bc}	0,0 ^{ac}	0,0 ^{bc}	7,1
1:1280	брой	0	2	0	0	2
	% по светене	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0
	% по титър	0,0 ^a	9,1 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	3,6
>1:1280	брой	1	1	2	0	4
	% по светене	25,0	25,0	50,0	0,0	100,0
	% по титър	12,5 ^a	4,5 ^a	100,0 ^b	0,0 ^a	7,1
общо	брой	8	22	2	24	56
	% по светене	14,3	39,3	3,6	42,9	100,0
	% по титър	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

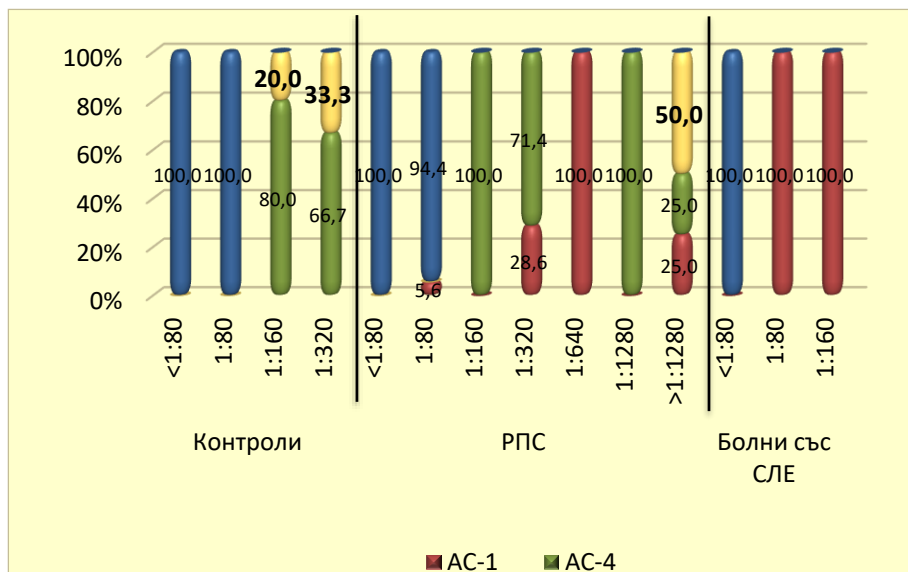
* еднаквите букви по хоризонталите означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ($p < 0,05$)

В групата на болните със СЛЕ не се установява статистически достоверна зависимост между титър и тип светене – на практика при тях всички „светят“ АС-1, с изключение на единственият от групата с титър 1:80 и светене АС-0 (табл. 21).

Табл. 21. Анализ на зависимостта между титър и тип светене в групата на болните със СЛЕ ($p=0,059$)

титър	честота	тип светене				общо
		АС-1	АС-4	АС-2	АС-0	
1:80	брой	0			1	1
	% по светене	0,0	-	-	100,0	100,0
	% по титър	0,0			100,0	5,9
1:1280	брой	9			0	9
	% по светене	100,0	-	-	0,0	100,0
	% по титър	56,3			0,0	52,9
> 1:1280	брой	7			0	7
	% по светене	100,0	-	-	0,0	100,0
	% по титър	43,8			0,0	41,2
общо	брой	16			1	17
	% по светене	94,1	-	-	5,9	100,0
	% по титър	100,0			100,0	100,0

На фиг. 7 е илюстрирано честотното разпределение на пациентите по титър и тип светене в изследваните групи. Докато в групата на здравите се наблюдават най-вече АС-0, по-малко АС-4, още по-малко АС-2 и въобще липсват АС-1, при болните със СЛЕ са налице най-вече АС-1, следвани от АС-0, а АС-4 и АС-2 липсват напълно. В групата РПС се наблюдават всички типове светене, но най-често АС-4, следвани от АС-1 и АС-0.



Фиг. 7. Честотно разпределение на пациентите по титър и тип светене в изследваните групи

На практика с клинично значение са само специфичните видове светене, в нашия случай АС-1, АС-2 и АС-4. Предвид че АС-2 се асоциира с антителата anti-DFS70, които най-често са свързани с липса на аутоимунно заболяване, реално клинично значими остават АС-1 и АС-4 светенията. Така, значими ИФ образи (АС-1 и АС-4) наблюдаваме сред РПС в 53,9%, сред здрави контроли – почти наполовина по-рядко - в 30%; при болните процентът е 94,1 (табл. 19, 20 и 21).

В обобщение, по отношение на АНА титър и тип светене, нашите резултати запазват съотношението между трите групи, известно от световната литература. В нашите резултати процентът на АНА-позитивни, както РПС, така и здрави, е по-висок в сравнение със световните данни; прави впечатление по-големият процент значими ИФ светения при РПС. Тук е мястото да се отбележи и че, доколкото ни е известно, нашето проучване е първото, класифициращо АНА у РПС по ICAP и в този смисъл няма как да съпоставим тази част от резултатите си с чужди.

4.1.4. Изследване на anti-dsDNA по ELISA и на специфични АНА чрез имуноблот и сред здрави, РПС и болни от СЛЕ

При изследване разпределението на anti-dsDNA (ELISA) между трите групи, се открояват сигнификантни различия (табл. 22). Здравите, РПС и болните са сравнени по наличие на стойности в норма (0 – 25), слабо повишени (25,1 – 50) и силно повишени (> 50). Нормалните стойности на anti-dsDNA имат сигнификантно по-висок относителен дял при здравите и РПС (без сигнификантна разлика помежду им), докато значимо повишените - при болните със СЛЕ. За леко завишените стойности (25,1 - 50) може да се твърди с гранична статистическа достоверност ($p < 0,1$), че са с по-висок процент в групата на болните спрямо другите две групи.

При сравняване на трите групи само според нормални или повишени стойности (0 – 25 спрямо > 25) се вижда същото разпределение (табл. 22, ред 4): здравите и РПС са в една група, болните със СЛЕ – в друга. И все пак, и тук наблюдаваме тенденция към сигнификантност: нито един от здравите няма повишени anti-dsDNA спрямо 4 (11,8 %) от роднините.

Табл. 22. Честотно разпределение на наличните anti-dsDNA в групите на изследване ($p < 0,001$)

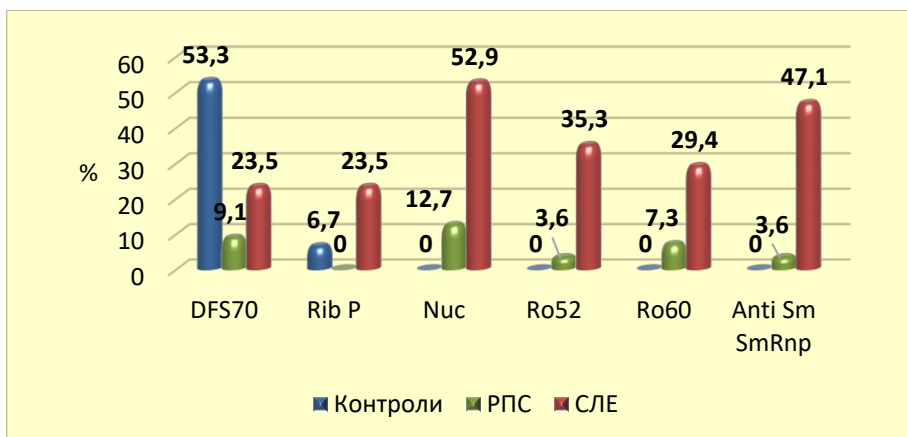
anti-dsDNA	честота	общо	групи на изследване			p
			здрав	РПС	СЛЕ	
0 – 25	брой	47	15	30	2	<0,001
	%	71,2	100 ^a	88,2 ^a	11,8 ^b	
25,1 – 50	брой	6	0	2	4	0,069
	%	9,1	0 ^a	5,9 ^a	23,5 ^a	
> 50	брой	13	0	2	11	<0,001
	%	19,7	0 ^a	5,9 ^a	64,7 ^b	
> 25,1	брой	19	0	4	15	<0,001
	%	28,8	0 ^a	11,8 ^a	88,2 ^b	
общо	брой	66	15	34	17	
	%	100,0	100,0	100,0	100,0	

* еднаквите букви по хоризонталите означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ($p < 0,05$)

Трите групи на изследване се различават сигнификантно по честотното разпределение на 6 от общо 13-те изследвани специфични антитела (фиг. 8), както следва:

- anti-DFS70 – относителният дял на високите им стойности при контролите е статистически значимо по-висок от този на РПС, но не и от този на болните със СЛЕ, който не се различава статистически от тези на останалите две групи;
- anti-RibP – относителният дял на високите им стойности при болните със СЛЕ е статистически значимо по-висок от този на РПС, но не и от този на здравите, който не се различава статистически от тези на останалите две групи;
- anti-Nuc, anti-Ro52, anti-Ro60, anti-Sm и anti-RNP/Sm – относителният дял на високите им стойности при болните със СЛЕ е статистически значимо по-висок от този на останалите две групи, които не се различават статистически помежду си.

На фиг. 8 се вижда, че с изключение на anti-DFS70, които „доминират“ здравите, при останалите 5 специфични антитела най-високите относителни дялове са на болните със СЛЕ. Освен това – независимо от недостигнатата сигнификантност – се вижда, че с изключение на anti-RibP, тези специфични антитела се установяват по-често при РПС, а липсват при здравите.



Фиг. 8. Сравнителен анализ на високите стойности на специфичните антитела, при които е налице сигнификантна разлика между групите на изследване

Сравнителният анализ на групите на изследване по *брой* на изследваните специфични антитела на един участник в проучването и *наличието им като цяло* установява следното (табл. 24).

Първо, наличие на сигнификантна разлика има при брой на специфичните антитела 0, 3 и 4, както следва:

- 0 – статистически значимо по-висок относителен дял се наблюдава в групата на РПС спрямо тази на болните със СЛЕ, но не и от тази на здравите, чийто относителен дял не се различава статистически от тези на другите две групи;

- 3 – относителният дял при болните със СЛЕ е статистически достоверно по-висок от тези на останалите две групи, който не се различават статистически помежду си;

- 4 – относителният дял при болните със СЛЕ е статистически достоверно по-висок от този на РПС, но не и от този на здравите, който не се различава статистически от относителните дялове на останалите две групи;

Второ, *наличието* на изследваните специфични антитела *като цяло* е сигнификантно по-голямо при болните със СЛЕ спрямо групата на РПС, но не и спрямо контролите които по този показател не се различават статистически от другите две групи на изследване.

Табл. 24. Сравнителен анализ на групите на изследване по брой на изследваните специфични антитела на един участник в проучването ($p < 0,001$)

брой антитела при един участник	зdrави		РПС		болни със СЛЕ	
	n	%	n	%	n	%
0	5	33,3 ^{ac}	34	61,8 ^a	1	5,9 ^{bc}
1	5	33,3 ^a	14	25,5 ^a	3	17,6 ^a
2	5	33,3 ^a	7	12,7 ^a	5	29,4 ^a
3	0	0,0 ^a	0	0,0 ^a	5	29,4 ^b
4	0	0,0 ^{ac}	0	0,0 ^a	2	11,8 ^{bc}
5	0	0,0 ^a	0	0,0 ^a	1	5,9 ^a

* еднаквите букви по хоризонталите означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ($p < 0,05$)

На пръв поглед, получените данни за разпределението на специфичните антитела сред трите групи, и особено за разпределението им по брой на един изследван и разпределението според наличие или отсъствие на антитела, изглеждат обратни на очакваното. Предвид фамилната агрегация на заболяването, както и предвид тенденцията за установяване на повече АНА сред РПС би следвало да се очакват и повече специфични антитела. Тук трябва да се обърне внимание на две неща. Първо, и тук е налице тенденция към сигнификантност, най-изявена при anti-dsDNA. Второ, по отношение на наличието на антитела и броя им, наличието на антитялото anti-DFS70 значително повлиява на описаните резултати. А това антитяло, както неколkokратно бе споменато, се асоциира в най-голяма степен с повишен титър на АНА при липса на системно заболяване (*Cheng et al., 2021*). Т.е., в известен смисъл, наличието на повече специфични антитела при здравите, не е клинично значимо по смисъла за потенциал за развитие на болест. Все пак обаче, намираме тези антитела и при болните, в комбинация с по няколко типични лупусни ААт. Това поставя въпроса за значението на тези антитела, когато са изолирани, и когато са в комбинация с други.

Ако трябва да се направи кратко обобщение, получените от нас данни по отношение на наличието на антинуклеарни антитела, изследвани по трите метода – имунофлуоресценция, имуноблот или ELISA, говорят – сигнификантно или с тенденция към сигнификантност – за известно „нюансиране“ на профила по АНА на роднините на болните спрямо здравите. Резултатите ни хармонират с описаните в световната литература и добавят „щрих“ на нюансиране и по типа светене на АНА, по което роднините също леко се отличават от здравите.

4.1.5. Изследване серумните нива на C_3 и C_4 фракции на комплемента, антикардиолипинови (ACL) и анти-бета-2-гликопротеин-I (anti- β 2-GPI) автоантитела сред здрави, РПС и болни от СЛЕ

Проведеният сравнителен анализ на групите на изследване по честотното разпределение на C_3 и C_4 установи, че относителният дял на ниските им стойности при болните със СЛЕ е статистически достоверно по-висок от тези на останалите две групи, които не се различават статистически помежду си (табл. 25).

Табл. 25. Сравнителен анализ на групите на изследване по честотното разпределение на серумните нива на C_3 и C_4 фракциите на комплемента

комплемент	здравни		РПС		болни със СЛЕ	
	n	%	n	%	n	%
C_3 ($p=0,015$)						
нормални	15	100,0	19	100,0	13	76,5
ниски	0	0,0 ^a	0	0,0 ^a	4	23,5 ^b
C_4 ($p<0,001$)						
нормални	15	100,0	19	100,0	9	52,9
ниски	0	0,0 ^a	0	0,0 ^a	8	47,1 ^b

* еднаквите букви по хоризонталите означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ($p<0,05$)

В литературата липсват данни за изследвания, третиращи промени в нивата на фракциите на комплемента у роднини на болните със системен лупус еритематозус. Този факт буди учудване, предвид че понижените нива на C_3 и C_4 фракциите на комплемента са част от съвременните критерии за СЛЕ. Обяснените може да се търси във факта, че промените в комплемента влизат в класификационните критерии за пръв път едва при създадените от SLICC през 2012 г. критерии (вж. гл. I).

По отношение на антифосфолипидните антители, трите групи на изследване се различават сигнификантно по честотното им разпределение (табл. 26). Относителният дял на високите стойности на aCL и anti-beta-2GPI е статистически значимо по-висок при болните със СЛЕ в сравнение с този на контролите, но не и от този на РПС, който не се различава статистически от тези на останалите две групи. При anti-Prothrombin разликата на честотното разпределение в изследваните групи е статистически нищожна.

Табл. 26. Сравнителен анализ на групите на изследване по честотното разпределение на ACL, anti-beta-2GPI и anti-Prothrombin

антифосфолипидни антитела	зdravi		РПС		болни със СЛЕ	
	n	%	n	%	n	%
aCL ($p=0,020$)						
нормални	15	100,0	18	94,7	12	70,6
високи	0	0,0 ^a	1	5,3 ^{ac}	5	29,4 ^{bc}
anti-beta-2GPI ($p=0,020$)						
нормални	15	100,0	18	94,7	12	70,6
високи	0	0,0 ^a	1	5,3 ^{ac}	5	29,4 ^{bc}
anti-Prothrombin ($p=0,336$)						
нормални	8	100,0	14	100,0	13	86,7
високи	0	0,0	0	0,0	2	13,3

* еднаквите букви по хоризонталите означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ($p<0,05$)

Има съобщения за повишени нива на различни антифосфолипидни антитела, при роднини както на болни с първичен антифосфолипиден синдром, така и със СЛЕ (*Radway-Bright, 2000*), но те не са изследвани в цитираните големи проследяващи проучвания, третиращи имунологичните промени с прогностична стойност. На практика в нашите резултати РПС заемат междинно положение по отношение на посочените две антитела, ако и да не се различават формално статистически сигнификантно от другите две групи; възможно достигане на такава сигнификатност може да се очаква при по-голяма извадка.

4.1.6. Наличие на клинични оплаквания сред групите РПС и здрави

Проведеният сравнителен анализ на здравите и РПС по честотното разпределение на изследваните клинични оплаквания установява наличие на статистически достоверна разлика при кожните оплаквания (табл. 27), като сигнификантно по-висок относителен дял се наблюдава в групата на РПС спрямо тази на здравите. При останалите клинични оплаквания разликата

в честотното разпределение в двете разглеждани групи е статистически нищожна.

Табл. 27. Сравнителен анализ на здравите и РПС по честотното разпределение на изследваните клинични оплаквания

клинични оплаквания	здравни		РПС	
	n	%	n	%
кожни ($p=0,003$)				
не	17	94,4	28	54,9
да	1	5,6	23	45,1
афтоподобни ($p=1,000$)				
не	16	88,9	43	84,3
да	2	11,1	8	15,7
ставни ($p=0,413$)				
не	11	61,1	24	47,1
да	7	38,9	27	52,9
синдром на Рейно ($p=1,000$)				
не	16	88,9	45	88,2
да	2	11,1	6	11,8
sicca-подобни ($p=0,670$)				
не	17	94,4	44	86,3
да	1	5,6	7	13,7
фоточувствителност ($p=1,000$)				
не	16	88,9	43	84,3
да	2	11,1	8	15,7
косопад ($p=0,428$)				
не	17	94,4	43	84,3
да	1	5,6	8	15,7

При изследване отношенията на ирелевантни спрямо потенциално релевантни оплаквания сред двете групи се вижда, че няма сигнификантна разлика между тях (табл. 28). В групата на здравите най-високото съотношение (~7:1) И:ПР (ирелевантни спрямо потенциално релевантни) е при ставните клинични оплаквания, следвано от афтоподобните с 1:1. При останалите оплаквания съотношенията не могат да бъдат изчислени поради липса на една от компонентите. При РПС най-високото съотношение (~6:1) И:ПР отново е при ставните клинични оплаквания, следвано от кожните с ~4:1 и афтоподобните с ~3:1.

При останалите оплаквания съотношенията не могат да бъдат изчислени поради липса на една от компонентите. Двете възможни отношения на съотношенията са при афтоподобни и ставни клинични оплаквания: първото е около 1:3, а второто приблизително 1:1. Т.е. при РПС не се откриват („очакваните“) повече потенциално релевантни оплаквания в сравнение с тези при здравите.

Табл. 28. Сравнителен анализ на здравите и РПС по съотношение на ирелевантни и потенциално релевантни клинични оплаквания

оплаквания	здравни (n=20)			РПС (n=56)			здравни: РПС общ брой = И+ПР
	И	ПР	И:ПР	И	ПР	И:ПР	
кожни	5,6	0	-	35,3	9,8	~4:1	-
афтоподобни	5,6	5,6	1:1	11,8	3,9	~3:1	~1:3
ставни	33,3	5,6	~7:1	45,1	7,8	~6:1	~1:1
синдром на Рейно	0	11,1	-	0	11,8	-	
сисса-подобни	0	5,6	-	0	13,7	-	
фоточувствителност	0	11,1	-	0	15,7	-	
косопад	5,6	0	-	9,8	5,9	~2:1	

*И – ирелевантни; ПР – потенциално релевантни

Табл. 29. Сравнителен анализ на здравите и РПС по брой на изследваните клинични оплаквания на един участник в проучването ($p=0,429$)

брой клинични оплаквания	здравни		РПС	
	n	%	n	%
0	8	44,4	10	19,6
1	6	33,3	19	37,3
2	2	11,1	6	11,8
3	2	11,1	10	19,6
4	0	0,0	4	7,8
5	0	0,0	2	3,9

При сравняване средния брой оплаквания у един изследван сред двете групи става ясно, че няма сигнификантна разлика между здравите и групата на РПС (табл. 29). Прави впечатление

обаче, че почти половината от здравите нямат никакви оплаквания (спрямо едва 20% от РПС), а по 4 и по 5 оплаквания имат само РПС и нито един от здравите. Напълно възможно е при по-голяма извадка тези разлики да се задълбочат и да достигнат статистическа сигнификантност.

Казано накратко, при РПС се наблюдават значимо повече кожни оплаквания, не се наблюдават повече оплаквания, които да дават основание да бъдат „подозирани“ в ранни системни, и е налице набелязана тенденция за струпване на по-голям брой различни видове оплаквания на отделен индивид. Описаните от нас резултати могат и да се дължат на предварителната настройка у попълващите въпросника – човек с болен роднина, участващ в скринингова програма за ранно откриване на заболяване, в много по-голяма степен е склонен да сподели всички възможни оплаквания, на които здравият не би обърнал голямо внимание. Същото важи и за оценяващия въпросника ревматолог, които би бил склонен да се задълбочава повече в съобщените от РПС оплаквания или да ги интерпретира през призмата на възможна системност. Все пак, считаме, че тези съображения не могат да са единствена причина за разликата в броя съобщени оплаквания, тъй като въпросите от въпросника са достатъчно конкретни и трудно могат да бъдат подминати при наличие на реални симптоми.

4.1.7. Изследване наличието на статистическа зависимост между наличието на клинични оплаквания и титъра на антинуклеарните антитела

Проведеният статистически анализ не установява наличие на сигнификантна зависимост между клиничните оплаквания (като цяло и като брой) и титъра на АНА в трите изследвани групи и цялата извадка (табл. 30-33). Не се установява статистически значима зависимост и между клиничните оплаквания (като цяло и като брой) с покачване на титъра на АНА на $\geq 1:160$ в групата на здравите, РПС и в цялата извадка (табл. в пълния текст). Аналогичният анализ при АНА $\geq 1:320$ установява наличие на статистически достоверно различие единствено в цялата извадка: при брой на клиничните оплаквания 5 – по-високият относителен дял е на имащите АНА $\geq 1:320$ (табл. 35, 37).

Табл. 30. Анализ на зависимостта между наличието на клинични оплаквания и титъра на АНА при РПС и здрави

група	клинични оплаквания	честота	титър на АНА						
			< 1:80	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	> 1:1280
здрави (<i>p</i> =0,654)	не	n	1	3	2	2			
		%	100,0	33,3	40,0	66,7			
	да	n	0	6	3	1			
		%	0,0	66,7	60,0	33,3			
РПС (<i>p</i> =0,924)	не	n	1	3	3	1	0	1	1
		%	14,3	18,8	23,1	14,3	0,0	50,0	25,0
	да	n	6	13	10	6	2	1	3
		%	85,7	81,3	76,9	85,7	100,0	50,0	75,0
общо (<i>p</i> =0,979)	не	n	2	6	5	3	0	1	1
		%	25,0	24,0	27,8	30,0	0,0	50,0	25,0
	да	n	6	19	13	7	2	1	3
		%	75,0	76,0	72,2	70,0	100,0	50,0	75,0

Табл. 31. Анализ на зависимостта между броя на наличните клинични оплаквания и титъра на АНА в групата на здравите

група	брой клинични оплаквания	честота	титър на АНА						
			< 1:80	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	> 1:1280
здравни ($p=0,830$)	0	n	1	3	2	2	1	3	2
		%	100,0	33,3	40,0	66,7	100,0	33,3	40,0
	1	n	0	4	2	0	0	4	2
		%	0,0	44,4	40,0	0,0	0,0	44,4	40,0
	2	n	0	1	1	0	0	1	1
		%	0,0	11,1	20,0	0,0	0,0	11,1	20,0
	3	n	0	1	0	1	0	1	0
		%	0,0	11,1	0,0	33,3	0,0	11,1	0,0

Табл. 32. Анализ на зависимостта между броя на наличните клинични оплаквания и титъра на АНА в групата на РПС

група	брой клинични оплаквания	честота	титър на АНА						
			< 1:80	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	> 1:1280
РПС ($p=0,44$ 7)	0	n	1	3	3	1	0	1	1
		%	14,3	18,8	23,1	14,3	0,0	50,0	25,0
	1	n	3	6	6	3	1	0	0
		%	42,9	37,5	46,2	42,9	50,0	0,0	0,0
	2	n	1	2	3	0	0	0	0
		%	14,3	12,5	23,1	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	n	1	4	1	3	0	0	1
		%	14,3	25,0	7,7	42,9	0,0	0,0	25,0
	4	n	1	1	0	0	0	1	1
		%	14,3	6,3	0,0	0,0	0,0	50,0	25,0
	5	n	0	0	0	0	1	0	1
		%	0,0	0,0	0,0	0,0	50,0	0,0	25,0

Табл. 33. Анализ на зависимостта между броя на наличните клинични оплаквания и титъра на АНА в цялата извадка

група	брой клинични оплаквания	честота	титър на АНА						
			< 1:80	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	> 1:1280
цяла извадка (p=0,167)	0	n	2	6	5	3	0	1	1
		%	25,0	24,0	27,8	30,0	0,0	50,0	25,0
	1	n	3	10	8	3	1	0	0
		%	37,5	40,0	44,4	30,0	50,0	0,0	0,0
	2	n	1	3	4	0	0	0	0
		%	12,5	12,0	22,2	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	n	1	5	1	4	0	0	1
		%	12,5	20,0	5,6	40,0	0,0	0,0	25,0
	4	n	1	1	0	0	0	1	1
		%	12,5	4,0	0,0	0,0	0,0	50,0	25,0
	5	n	0	0	0	0	1	0	1
		%	0,0	0,0	0,0	0,0	50,0	0,0	25,0

Табл. 35. Анализ на зависимостта между наличието на клинични оплаквания и АНА $\geq 1:320$

група	клинични оплаквания	честота	АНА $\geq 1:320$	
			не	да
зdrави ($p=0,559$)	не	n	6	2
		%	40,0	66,7
	да	n	9	1
		%	60,0	33,3
РПС ($p=1,000$)	не	n	7	3
		%	18,9	21,4
	да	n	30	11
		%	81,1	78,6
общо ($p=0,756$)	не	n	13	5
		%	25,0	29,4
	да	n	39	12
		%	75,0	70,6

Табл. 37. Анализ на зависимостта между броя на наличните клинични оплаквания у един изследван и АНА $\geq 1:320$

група	брой клинични оплаквания	честота	АНА $\geq 1:320$		p
			не	да	
зdrави	0	n	6	2	0,412
		%	40,0	66,7	
	1	n	6	0	
		%	40,0	0,0	
	2	n	2	0	
		%	13,3	0,0	
	3	n	1	1	
		%	6,7	33,3	

група	брой клинични оплаквания	честота	АНА $\geq 1:320$	<i>p</i>	
РПС	0	n	7	3	0,059
		%	18,9	21,4	
	1	n	16	3	
		%	43,2	21,4	
	2	n	6	0	
		%	16,2	0,0	
	3	n	6	4	
		%	16,2	28,6	
	4	n	2	2	
		%	5,4	14,3	
5	n	0	2		
	%	0,0	14,3		
цяла извадка (<i>p</i> =0,012)	0	n	13	5	0,722
		%	25,0	29,4	
	1	n	22	3	0,068
		%	42,3	17,6	
	2	n	8	0	0,088
		%	15,4	0,0	
	3	n	7	5	0,136
		%	13,5	29,4	
	4	n	2	2	0,223
		%	3,8	11,8	
	5	n	0	2	0,013
		%	0,0	11,8	

4.1.8. Изследване наличието на статистическа зависимост между наличието на клинични оплаквания и типовете имунофлуоресцентно светене на антинуклеарните антитела

Проведеният статистически анализ не установява наличие на сигнификантна зависимост между клиничните оплаквания (като

цяло и като брой) и типовете имунофлуоресцентно светене в здравите, РПС и цялата извадка (табл. в пълния текст).

4.1.9. Изследване наличието на статистическа зависимост между наличието и броя на клиничните оплаквания и наличните специфични антинуклеарни антитела

Направеният анализ не показва статистически достоверна зависимост между наличието и/или броя клинични оплаквания и специфичните антитела anti-dsDNA, anti-DFS70, anti-M2, anti-RibP, anti-Nuc, anti-PCNA, anti-CENT-B, anti-Jo1, anti-PM100, anti-Ro52, anti-Ro60, anti-Sm и anti-RNP/Sm. Anti-Scl не участва в анализа, тъй като има само нормални стойности, а anti-La – само една висока, при която няма стойности на променливата, отразяваща наличието на клинични оплаквания. Проведеният статистически анализ на зависимостта между наличието на клинични оплаквания и броя специфични антитела при здравите, РПС и цялата извадка не установява наличие на сигнификантна такава (табл. в пълния текст). Не се установява статистически значима зависимост също така между броя на наличните клинични оплаквания и броя специфични антитела в контролната група, РПС и цялата извадка (табл. в пълния текст).

4.1.10. Изследване наличието на статистическа зависимост между наличието и/или броя на клиничните оплаквания, и наличието на повишени антитела срещу EBV, понижените нива на витамин Д, както и наличието на промени в нивата на цитокините BLys и TGF- β

Наличието и/или броя кл. оплаквания не корелират статистически достоверно, както с категорийните показатели EBV-позитивност (т.е. наличие повишени IgM или IgG антитела срещу EBV) и понижени стойности на витамин Д (т.е. стойности на 25-OH vitamin D3/D2 < 20 ng/ml), така и с количествените показатели нива на BLys, TGF- β , anti-EBV (VCA) IgM и IgG (табл. в пълния текст).

В края на настоящата глава („Резултати“), след изложението на разпределението на всички изследвани величини, в подточка „5.1.10. Изследване на конкретни или комплексни зависимости между изследваните променливи“ са представени други зависимости на клиничните оплаквания с участието на антинуклеарните антитела.

4.1.11. Изследване разпределението на рисковите фактори тютюнопушене, употреба на естрогенови препарати и нива на витамин D2/3 сред изследваните групи

Проведеният сравнителен анализ на групите на изследване по показателите витамин D3/D2 < 20 ng/ml, тютюнопушене и прием на естрогенни препарати не установява наличие на сигнификантна разлика между тях (табл. 45).

Табл. 45. Сравнителен анализ на групите на изследване по честотното разпределение на нива на витамин D3/D2 < 20 ng/ml, тютюнопушене и прием на естрогенни препарати

рискови фактори	зdravi		РПС		болни със СЛЕ	
	п	%	п	%	п	%
витамин D3/D2						
< 20 ng/ml						
<i>(p=0,239)</i>						
не	7	46,7	24	58,5	5	33,3
да	8	53,3	17	41,5	10	66,7
тютюнопушене						
<i>(p=0,456)</i>						
не	12	66,7	26	51,0		
актуално	4	22,2	19	37,3		
минало	2	11,1	6	11,8		
естрогени						
<i>(p=0,363)</i>						
не	15	83,3	36	70,6		
да	3	16,7	15	29,4		

Данните в литературния обзор относно тютюнопушенето, естрогенния прием и нивата на витамин Д насочват към разбирането, че това все още са кандидат-рискови фактори, за които липсват достатъчно данни относно ролята им в етиопатогенезата на заболяването.

4.1.12. Изследване на COVID 19 статуса сред трите групи изследвани

Както бе отбелязано, набирането на участници беше осъществено в периода м. март 2018 г. до м. ноември 2021 г., т.е. значима част от участниците, вкл. всички здрави контроли и болни от СЛЕ, са набрани преди началото на пандемията от COVID 19. Статусът по отношение на COVID 19 (боледувал/не боледувал) на трите групи участници е представен на табл. 46: преболедували са само четирима от роднините. Това прави невъзможен статистическия анализ поради непредставителност на извадката (табл. в пълния текст).

Табл. 47. Сравнителен анализ на групите на изследване по показателите TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10, BLys, IFN- α и APRIL

показател	групи	n	\bar{X}	SD
IL-10	здрави	11	9,98 ^a	11,95
	РПС	37	7,29 ^a	6,77
	болни със СЛЕ	4	5,62	0,00
TNF- α	здрави	11	7,35 ^a	0,00
	РПС	37	6,95 ^a	1,68
	болни със СЛЕ	4	7,35	0,00
IL-6	здрави	11	0,23 ^a	0,00
	РПС	37	0,35 ^a	0,56
	болни със СЛЕ	4	0,23	0,00
IL-8	здрави	11	26,09 ^a	86,53
	РПС	37	2,52 ^a	15,31
	болни със СЛЕ	4	0,00	0,00
BLys	здрави	15	80,67 ^a	65,65
	РПС	51	86,42 ^a	69,61
	болни със СЛЕ	17	902,00 ^b	2398,54
IFN- α	здрави	15	4,27 ^a	7,32
	РПС	42	9,55 ^a	15,70
	болни със СЛЕ	15	14,29 ^a	19,66

показател	групи	n	\bar{X}	SD
APRIL	зdravi	15	0,67 ^a	2,58
	РПС	42	106,59 ^a	466,18
	болни със СЛЕ	15	1,63 ^a	6,30

* еднаквите букви по вертикалите означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ($p < 0,05$)

** подгрупите с размер под 8 случая не участват в анализа поради липса на статистическа представителност

4.1.13. Изследване нивата на цитокини (BLys, IL-6, IL-8, IL-10, APRIL, IFN- α и TGF- β) сред здрави, РПС и болни от СЛЕ и наличието на статистически зависимости с останалите изследвани променливи

Разликата между групите на изследване по показателите TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10, IFN- α и APRIL е статистически нищожна (табл. 47).

Изследваните цитокини TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10, APRIL и IFN- α са налични в детектируеми нива в едва 10% от всички изследвани лица и съответно статистически връзки не са открити с който и да е от останалите изследвани показатели или клинични оплаквания. Вероятно при по-голяма извадка изследвани лица биха могли да се открият описаните в литературата зависимости, а именно IL-10 да бъде с по-ниски нива у някои РПС с потенциал за развитие на заболяване, а IL-6 и APRIL да са с по-високи нива при тази подгрупа (*Munroe et al., 2017*); или пък IFN- α и IL-8 да са с по-високи нива при болните от СЛЕ в сравнение с останалите (*Pascual et al., 2003; Mao et al., 2018*).

Налице е и сигнификантна разлика в нивата на BLys между лупусно болните от една страна, и здравите и РПС, от друга (табл. 47). Представената зависимост е напълно закономерна и съответства на досегашните проучвания. Както споменахме по-горе обаче, според литературата групата на РПС е по-хетерогенна по отношение нивата на BLys, където обичайно „здравите АНА-позитивни“ могат да са с компенсаторно намалени нива на цитокина, а „бъдещите болни“ – с нормални или завишени такива.

Възможно е при по-голяма извадка да се достигнат статистически значими разлики в нивата на $VLys$ вътре в групата на РПС.

Сигнификантна разлика между *трите* изследвани групи има единствено при $TGF-\beta$. Със статистически значимо най-висока средна стойност е групата на здравите, следвана от тази на РПС и на последно място от болните със СЛЕ (табл. 48, фиг. 9). За отбелязване е, че при някои от болните $TGF-\beta$ не се детектира въобще, т.е. напълно липсва.

Табл. 48. Сравнителен анализ на групите на изследване по показателя $TGF-\beta$

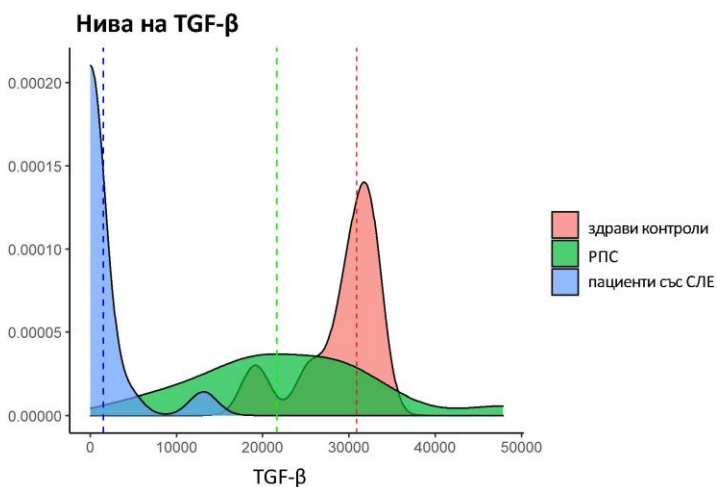
показател	групи	n	\bar{X}	SD
$TGF-\beta$	зdrави	8	29112,38 ^a	4663,15
	РПС	16	22899,56 ^b	10637,79
	болни със СЛЕ	15	1160,40 ^c	3487,62

* еднаквите букви по вертикалите означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ($p < 0,05$)



Фиг. 9. Сравнителен анализ на изследваните групи по показателя $TGF-\beta$

TGF- β е регулаторен цитокин с много ниски нива при лупусно болните, нормални нива в АНА-негативните здрави и повишени у АНА-позитивните здрави (Lu et al., 2016). Това е израз на работещи регулаторни механизми в имунната система: здравите с нормални АНА не са застрашени от автоимунитет и TGF- β няма причина да е повишен. В повишени нива той е необходим само при тези с белези на автоимунитет – АНА-позитивните. При роднини на болни понижените му нива са самостоятелен предикторен фактор за развитие на СЛЕ (Munroe et al., 2017). Ето защо, бихме очаквали и нашата извадка на роднини да съдържа такива с високи стойности на TGF- β , които ще останат здрави и такива с ниски стойности, които са с потенциал да се разболеят. И вероятно при достатъчно голяма извадка биха се открили съответни подгрупи с различни нива на цитокина; така настоящата междинна стойност вероятно отразява такава вътрешна нехомогенност (фиг. 10).



Фиг. 10. Серумни нива на TGF- β (pg/ml) в трите изследвани групи.

Ясно видима е разликата в „профилите“ на групите на болните и на здравите контроли по отношение на TGF- β в сравнение с групата на РПС: първите са в двете крайности почти без да се припокриват, докато РПС са разпределени сравнително равномерно и се припокриват и с двете групи.

4.1.14. Изследване нивата на антитела от класовете IgM и IgG срещу вирус-капсидния антиген на вируса на Епщайн-Бар (EBV-VCA) сред здрави, РПС и болни болни от СЛЕ и наличието на статистически зависимости с останалите изследвани променливи.

Сравнителният анализ на групите на изследване по нивата на anti-EBV (VCA) IgM и anti-EBV (VCA) IgG антителата не установява статистически значими разлики между групите. Трите групи на изследване не се различават статистически и по наличие на позитивност по EBV, т.е. по наличие на повишени нива на антитела от който и да е клас (таблици в пълния текст).

Известно е, че вирусът на Epstein-Barr е с убиквитерно разпространение и че 100% от лупусно болните имат налични антитела срещу него, за разлика от около 70% от здравите (*James et al., 1997; James et al., 2001*). В нашите данни наистина абсолютно всички болни са с повишени антитела поне от един клас, докато при другите две групи се срещат и изследване без никакви антитела, без обаче да се достига сигнификантност. Необходими са по-големи извадки изследвани с по-комплексна оценка на състоянието на инфектираност с EBV и серологичния профил на изследваните лица.

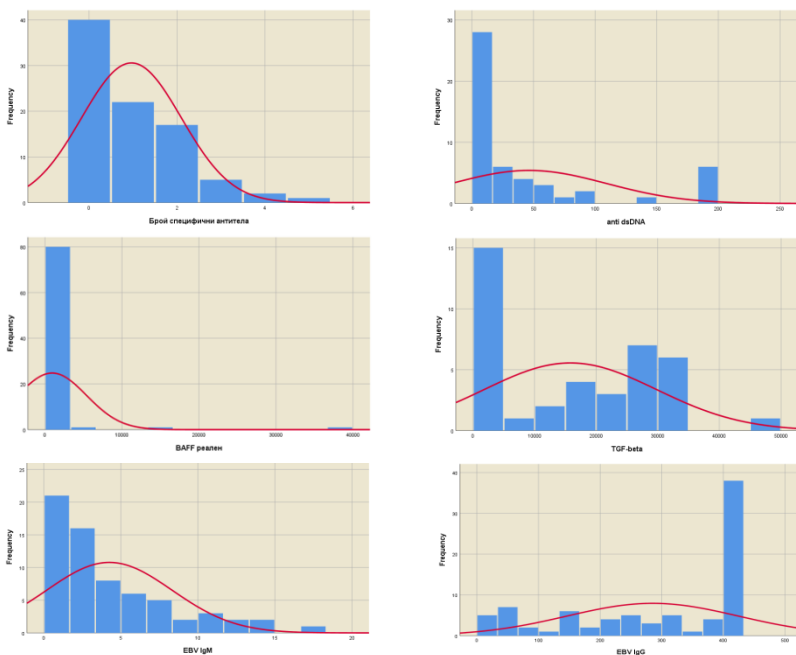
4.1.15. Изследване на конкретни или комплексни зависимости между изследваните променливи

Дотук в настоящия раздел изложихме разпределението на всички изследвани клинични и параклинични променливи сред трите групи, както и изследване на елементарни зависимости помежду им. В настоящата подточка ще изложим търсенето на точно определени или комплексни зависимости между тях.

4.1.15.1. Изследване на връзка между броя клинични оплаквания при един изследван, от една страна, и някаква комбинация от всички други изследвани показатели, от друга

При изследваниет 69 от участниците в проучването (т.е. здрави и РПС) с най-голям относителен дял (36,2%) са имащите едно клинично оплакване, следвани от тези при които няма такива с 26,1%. Най-малко са имащите 5 клинични оплаквания – 2,9%. Ако приемем, че по-голям брой оплаквания е над две, тогава отговарящите на това условие са 18 или 26,1% от изследваните.

За да се определи кои от изследваните показатели са във връзка с по-голям брой клинични оплаквания е приложен бинарен логистичен регресионен анализ. Изследвани са следните показатели - *количествени*: брой специфични антитела, BLYs, TGF- β , anti-EBV IgM и IgG и *категорийни*: АНА $\geq 1:160$, АНА $\geq 1:320$, тип имунофлуоресцентно светене, повишени/нормални специфични антитела anti-dsDNA, anti-DFS70, anti-M2, anti-RibP, anti-Nuc, anti-PCNA, anti-CENT-B, anti-Jo1, anti-PM100, anti-Ro52, anti-Ro60, anti-Sm, anti-Sm/RNP, EBV-позитивност, витамин D3/D2 < 20 ng/ml.



Фиг. 12. Честотно разпределение на количествените признаци: брой специфични антитела, anti-dsDNA, BLYs, TGF- β , EBV IgM и EBV IgG

За да участват директно в бинарен логистичен регресионен анализ *количествените* показатели трябва да имат нормално разпределение. Тъй като нито един от тях няма такова, е приложен ROC curve анализ за определяне при възможност на прагова стойност, разделяща имащите малък и по-голям брой клинични

оплаквания. За нито един от количествените признаци не са установява статистически достоверна прагова стойност (фиг. 12).

При *категорийните* показатели единственият, при който отношението на шансовете (*odds ratio, OR*) е със сигнификантен характер ($p=0,006$) е АНА $\geq 1:320$ – $OR = 5,375$ при 95% доверителен интервал (ДИ 1,630 – 17,721). Това означава, че шансът за наличие на повече от 2 клинични оплаквания при имащите АНА титър $\geq 1:320$ е около 5,4 пъти по-висок спрямо имащите по-нисък такъв.

4.1.15.2. Изследване наличието на връзка между наличието на някое определено клинично оплакване, от една страна, и титърът на АНА, или наличието на титър $\geq 1:160$, или $\geq 1:320$, от друга

Проведеният статистически анализ не установява наличие на статистически значима зависимост между наличието на някое определено оплакване измежду кожни, афтоподобни, ставни, синдром на Рейно, сисса-подобни, фоточувствителност и косопад, от една страна, и титърът на АНА, или наличието на титър $\geq 1:160$, или $\geq 1:320$, от друга, нито в групите на контролите и РПС, нито в цялата извадка. Предвид негативния резултат таблиците не са приложени.

4.1.15.3. Изследване наличието на връзка между наличието на някое определено клинично оплакване, от една страна, и наличието на специфични антинуклеарни антитела, от друга

Проведеният статистически анализ за наличие на статистически значима зависимост между наличието на някое определено оплакване измежду кожни, афтоподобни, ставни, синдром на Рейно, сисса-подобни, фоточувствителност и косопад, от една страна, и наличието на някое от специфичните антитела anti-dsDNA, anti-DFS70, anti-M2, anti-RibP, anti-Nuc, anti-PCNA, anti-CENT-B, anti-Jo1, anti-PM100, anti-Ro52, anti-Ro60, anti-Sm, anti-Sm/RNP, от друга, установява следните асоциации.

Първо, налице е сигнификантна зависимост между наличието на кожните оплаквания и косопада със специфичните антитела anti-dsDNA в групата на РПС (табл. 51, фиг. 13):

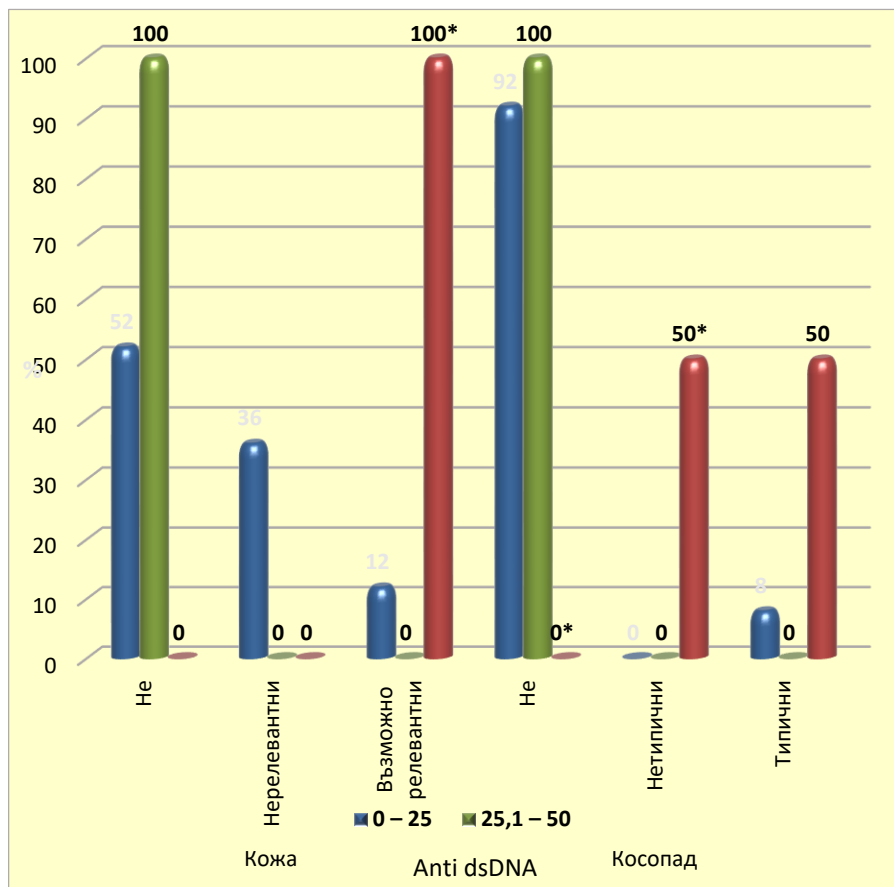
- възможно релевантните кожни оплаквания са статистически достоверно свързани със значимо повишените стойности на anti-dsDNA;

- липсата на косопад е сигнификантно свързана с по-ниските стойности на anti-dsDNA, докато ирелевантния косопад – със значимо повишените. При потенциално релевантния косопад разликата в честотното разпределение на anti-dsDNA е статистически нищожна, но това може да се дължи и на малкия брой случаи – само три.

Табл. 51. Анализ на зависимостта между клиничните кожни оплаквания и косопада, и специфичните антитела anti-dsDNA в групата на РПС

клинични оплаквания	честота	anti-dsDNA		
		0 – 25	25,1 – 50	> 50
кожа ($p=0,035$)				
не	n	13	2	0
	%	52,0 ^a	100,0 ^a	0,0 ^a
ирелевантни	n	9	0	0
	%	36,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a
възможно релевантни	n	3	0	2
	%	12,0 ^a	0,0 ^{ac}	100,0 ^{bc}
косопад ($p=0,030$)				
не	n	23	2	0
	%	92,0 ^a	100,0 ^{ac}	0,0 ^{bc}
ирелевантни	n	0	0	1
	%	0,0 ^a	0,0 ^{ac}	50,0 ^{bc}
възможно релевантни	n	2	0	1
	%	8,0 ^a	0,0 ^a	50,0 ^a

* еднаквите букви по хоризонталите означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ($p<0,05$)



Фиг. 13. Анализ на зависимостта между клиничните кожни оплаквания и косопада, и специфичните антитела anti-dsDNA в групата на РПС

Второ, установява се статистически достоверна зависимост между наличието на афтоподобни оплаквания и специфичните антитела anti-Ro60 в групата на РПС - потенциално релевантните афтоподобни оплаквания са статистически значимо свързани с висок относителен дял на високи anti-Ro60 (табл. 52).

Табл. 52. Анализ на зависимостта между афтоподобните оплаквания и специфичните антитела anti-Ro60 в групата на РПС

клинични оплаквания	честота	anti-Ro60		<i>p</i>
		нормални	високи	
афтоподобни (<i>p</i> =0,009)				
не	n	40	2	0,055
	%	87,0	50,0	
ирелевантни	n	6	0	0,477
	%	13,0	0,0	
възможно релевантни	n	0	2	<0,001
	%	0,0	50,0	

4.1.15.4. Изследване на връзка между серумните нива на TGF- β , от една страна, и титър и тип светене на АНА, специфични АНА, нива на BLys, anti-EBV антитела и нива на витамин Д, от друга

Чрез корелационен анализ между TGF- β и *количествените* показатели anti-dsDNA, anti-EBV (VCA) IgM и IgG, BLys и витамин D2/D3 се установява, че TGF- β корелира статистически достоверно с anti-dsDNA: силно и обратнопропорционално в цялата извадка, изразено по сила и обратнопропорционално в групите РПС + болни със СЛЕ (табл. 53). Това означава, че увеличаването на TGF- β е свързано с намаляване на стойностите на anti-dsDNA и обратно (фиг. 14 и 15).

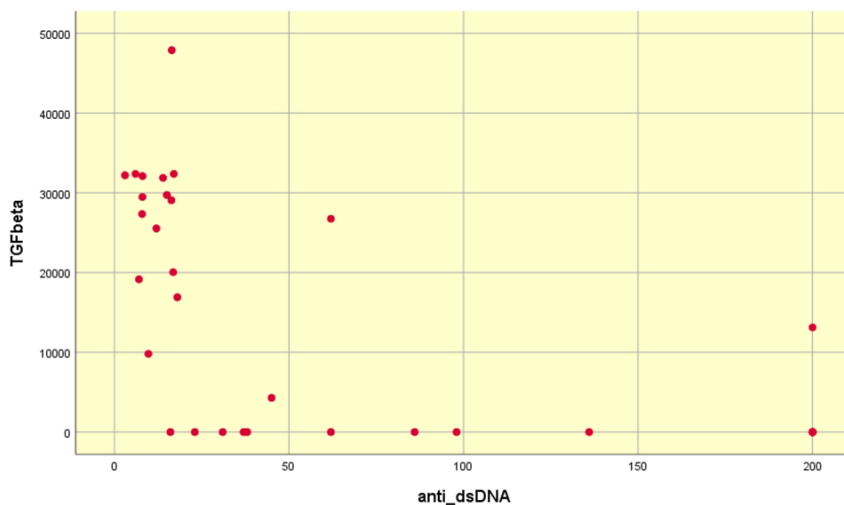
Табл. 53. Корелационен анализ между TGF- β и количествените показатели anti-dsDNA, anti-EBV (VCA) IgM и IgG, BLys и витамин D2/D3 в цялата извадка, и групите РПС + болни със СЛЕ

групи	показатели	TGF- β , <i>r</i>
зdravi	anti-dsDNA	0,024
	anti-EBV IgM	0,120
	anti-EBV IgG	0,024
	BLys	-0,286
	витамин D2/D3	0,595
РПС	anti-dsDNA	-0,143
	anti-EBV IgM	0,286
	anti-EBV IgG	0,280
	BLys	-0,153
	витамин D2/D3	-0,659**

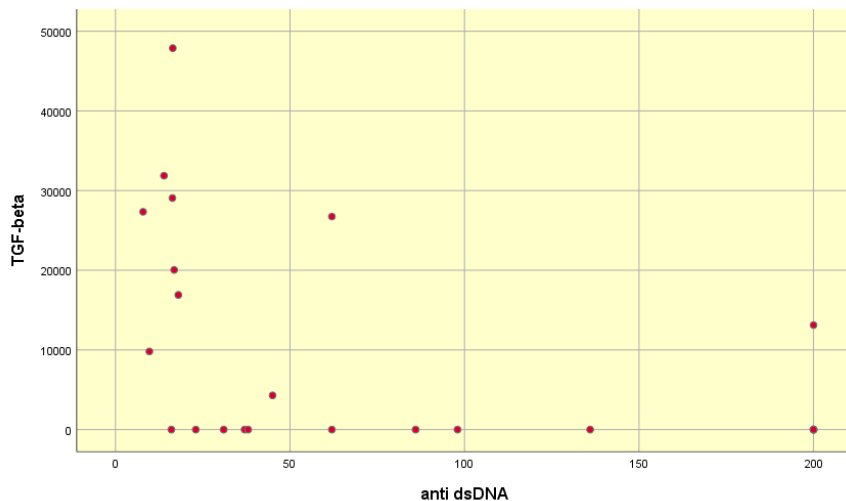
болни със СЛЕ	anti-dsDNA	0,160
	anti-EBV IgM	0,073
	anti-EBV IgG	-0,020
	BLys	0,187
	витамин D2/D3	-0,392
РПС болни със СЛЕ +	anti-dsDNA	-0,580**
	anti-EBV IgM	0,008
	anti-EBV IgG	-0,198
	BLys	-0,267
	витамин D2/D3	-0,051
цяла извадка	anti-dsDNA	-0,710***
	anti-EBV IgM	0,186
	anti-EBV IgG	-0,098
	BLys	-0,203
	витамин D2/D3	-0,006

* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$,

r – сила на връзката: $< 0,3$ - слаба; $0,3 - 0,499$ – умерена; $0,5 - 0,699$ – изразена; $0,7 - 0,9$ – силна; $> 0,9$ – много силна.



Фиг. 14. Диаграма на разсейване между показателите TGF- β и anti-dsDNA (цяла извадка)



Фиг. 15. Диаграма на разсейване между показателите TGF- β и anti-dsDNA (РПС + болни със СЛЕ)

Табл. 55. Анализ на зависимостта между TGF- β и показателите титър и тип светене на АНА, anti-dsDNA, anti-Nuc, anti-Sm и anti-RNP/Sm (РПС + болни със СЛЕ)

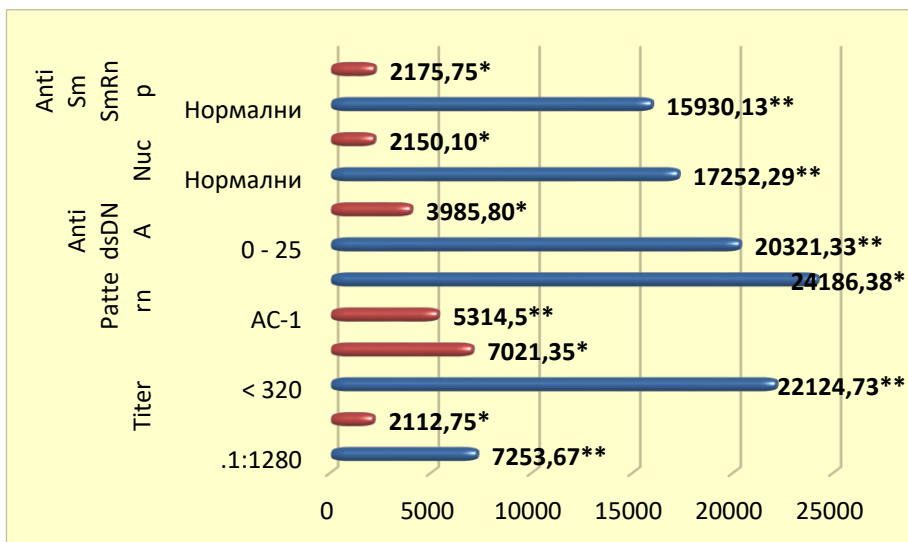
показател	TGF- β		
	n	\bar{X}	SD
титър на АНА			
< 1:80	2	20472,00	12150,92
1:80	4	22079,25	13115,00
1:160	5	22822,20	6552,80
1:320	2	15751,50	8411,04
1:640	1	26739,00	.
1:1280	9	7253,67 ^a	15847,53
> 1:1280	8	2112,75 ^a	5975,76
титър на АНА			
< 1:160	7	21150,86	10595,39
\geq 1:160	24	9822,63	13444,68

титър на АНА ($p=0,001$)			
< 1:320	11	22124,73 ^a	9183,22
≥ 1:320	20	7021,35 ^b	12699,61
тип ИФ светене			
АС-1	18	5314,50 ^a	10518,55
АС-4	8	24186,38 ^b	11682,39
АС-0	5	18929,40	10748,18
anti-dsDNA			
0 - 25	17	24458,29 ^a	15678,81
25,1 - 50	4	1071,75	2143,50
> 50	10	3985,80 ^b	8995,16
anti-Nuc ($p=0,006$)			
нормални	21	17252,29 ^a	13821,07
високи	10	2150,10 ^b	4229,87
anti-Sm ($p=0,016$)			
нормални	23	15930,13 ^a	13900,60
високи	8	2175,75 ^b	4669,28
anti-RNP/Sm ($p=0,016$)			
нормални	23	15930,13 ^a	13900,60
високи	8	2175,75 ^b	4669,28

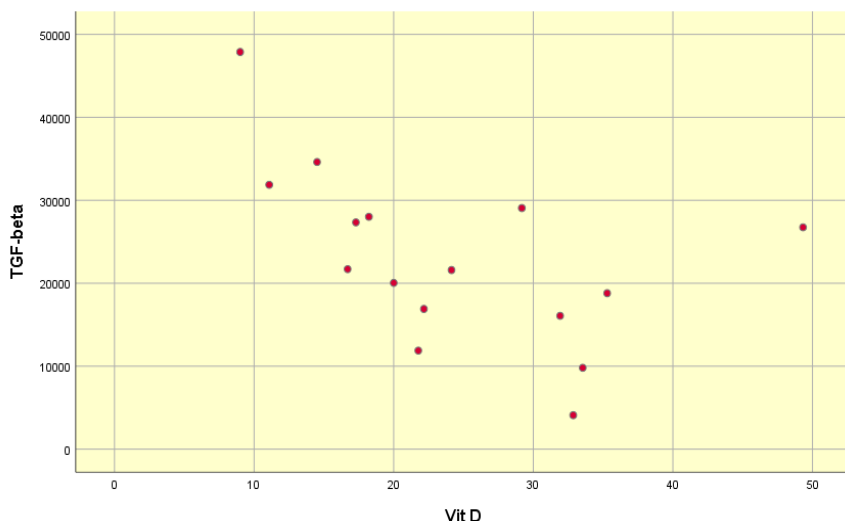
* еднаквите букви по вертикалите означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ($p<0,05$)

** подгрупите с размер под 8 случая не участват в анализа поради липса на статистическа представителност

Сигнификантна обратнопропорционална зависимост на TGF- β се наблюдава и с *категорийните* показатели титър на АНА, anti-dsDNA (< 25, 25,1 – 50 и > 50), anti-Nuc, anti-Sm и anti-RNP/Sm (цяла извадка и сборната група РПС + болни със СЛЕ). Освен това, в цялата извадка средната стойност на TGF- β е статистически значимо по-ниска при тип светене АС-1 спрямо тези на АС-4 и АС-0, които не се различават статистически помежду си. В сборната група РПС + болни със СЛЕ средната стойност на TGF- β е сигнификантно по-ниска при АС-1 спрямо тази на АС-4 (табл. 55, фиг. 18).



Фиг. 18. Анализ на зависимостта между TGF- β и показателите титър и тип светене на АНА, anti-dsDNA, anti-Nuc, anti-Sm и anti-RNP/Sm (РПС + болни със СЛЕ)



Фиг. 19. Диаграма на разсейване между показателите TGF- β и нивата на витамин D2/D3 (само в групата на РПС)

Освен това, проведенният корелационен анализ между нивата на TGF- β и количествения показател ниво на витамин D2/D3 установява, че TGF- β корелира статистически достоверно с нивата на витамина *единствено в групата РПС*, изразено по сила и правопрпорционално по посока ($r = 0,659$). Това означава, че увеличаването на нивата на витамин D2/D3 е свързано с увеличаване на стойностите на TGF- β и обратно (табл. 53, фиг. 19).

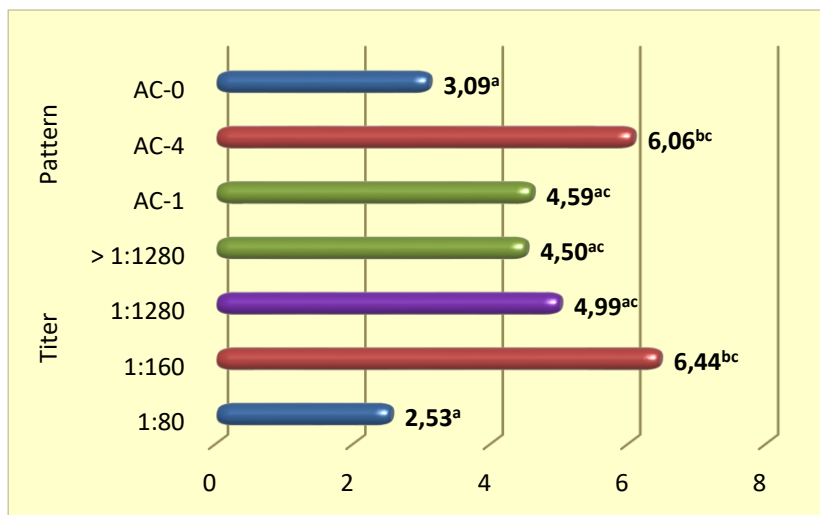
Описаните взаимовръзки на TGF- β с останалите показатели са в съгласие с фундаменталната имунопатогенетична и биомедицинска логика, според която недостатъчната регулация в имунната система води до условия за образуване на антинуклеарни антитела. Те хармонират и с данните на Munroe и сътр. (*Munroe et al., 2017*), извеждащи TGF- β като самостоятелен предиктор за развитие на заболяване. Трето, тези резултати насочват към разбирането, че като белези на *недостатъчност на имунна регулация* биха могли да се обсъждат АНА $\geq 1:320$, тип светене АС-1, наличието на позитивни anti-dsDNA ≥ 50 , повишените стойности на anti-Nuc, anti-Sm и anti-RNP/Sm. Това има голямо значение предвид факта, че TGF- β не е рутинно изследван показател. Не на последно място, трябва да се подчертае, че тези резултати затвърждават значението на имунофлуоресцентните образи, в случая на АС-1, като надежден показател. Доколкото ни е известно, нашето проучване е първото, което сравнява светенията по ICAP сред болни, роднини и здрави.

И докато коментиранияте взаимовръзки са асоциативни и за посоката им говорят само фундаментално научните данни, то внимание заслужават данните от корелационния анализ на връзката между TGF- β с anti-dsDNA и с витамин D2/D3. Силно изразена корелация се наблюдава между регулаторния цитокин и лупусното антитяло в цялата извадка. Особено интересна е зависимостта между витамин D2/D3 и TGF- β *само сред роднините*. При потвърждаване на такава връзка във фундаментални и по-мощабни изследвания, това би означавало, че *склонните към аутоимунитет индивиди*, според концепцията на на Harel и Schoenfeld (*Harel, 2006*), наистина следва да приемат витамин Д като една от профилактичните мерки с цел превенция на развитие на заболяване. Възможността TGF- β да бъде повлиян от фактор на средата – в случая витамин D2/D3 – и то само при

роднините на болните, навежда към разбирането, че съществуват групи лица с двойк потенциал – и към развитие на заболяване, и към това да останат клинично здрави; и че роднините на болните, със своя специфичен имунологичен терен, са представител на този тип лица.

4.1.15.5. Изследване на взаимовръзки между нивата на anti-EBV (VCA) IgM и IgG или позитивността по EBV въобще, от една страна, и някоя или комбинация от някои от следните величини, от друга: титър и тип ИФ светене на АНА, АНА $\geq 1:160$ или $\geq 1:320$, anti-dsDNA, anti-DFS70, anti-M2, anti-RibP, anti-Nuc, anti-PCNA, anti-CENT-B, anti-Jo1, anti-PM100, anti-Ro52, anti-Ro60, anti-Sm, anti-Sm/RNP, BLys, TGF- β и витамин D3/D2 ≤ 20 ng/m

Проведеният корелационен анализ между нивата на anti-EBV IgM и IgG и количествените показатели anti-dsDNA, TGF- β , BLys и витамин D3/D2 не установи наличие на статистически достоверна зависимост между тях. Позитивността по EBV не може да участва в анализа, тъй като има само 4 отрицателни стойности в цялата извадка.



Фиг. 20. Анализ на зависимостта между anti-EBV IgM и показателите титър и тип ИФ светене на АНА (РПС + болни със СЛЕ)

Сигнификантна зависимост на anti-EBV IgM се наблюдава с категорийните показатели титър на АНА (в цялата извадка), титър и тип ИФ светене на АНА (сборна група РПС + болни със СЛЕ) (табл. в пълния текст, фиг. 20).

Статистически достоверна зависимост на anti-EBV IgG се наблюдава с категорийните показатели титър и тип ИФ светене на АНА, anti-Sm, anti-RNP/Sm и витамин D2/D3 < 20 ng/ml (цяла извадка), и титър и тип ИФ светене на АНА, anti-Sm и anti-RNP/Sm (сборна група РПС + болни със СЛЕ) (табл. 57, фиг. 22):

- в извадката като цяло, при титър на АНА 1:80 средната стойност на anti-EBV IgG е статистически значимо по-ниска от при титри 1:160 и 1:1280 (които не се различават статистически помежду си), но не и от тази при >1:1280, която не се различава статистически от тези на останалите категории имащи статистическа представителност;

- в сборната група РПС + болни със СЛЕ, при титър 1:80 средната стойност на anti-EBV IgG е статистически достоверно по-ниска от тази при титър 1:1280, но не и от тези при титри 1:160 и >1:1280, които не се различават статистически помежду си, и от тази на 1:1280, която не се различава сигнификантно от тези на останалите категории имащи статистическа представителност;

- в извадката като цяло и в сборната група РПС + болни със СЛЕ средната стойност на anti-EBV IgG е статистически достоверно по-малка при титър < 1:160 спрямо по-големите титри, при АС-0 спрямо АС-1 и АС-4 (които не се различават статистически помежду си), при нормалните anti-Sm и anti-Sm/RNP спрямо високите;

- само в извадката като цяло средната стойност на anti-EBV IgG е сигнификантно по-висока при витамин D2/D3 < 20 ng/ml спрямо по-големите стойности.

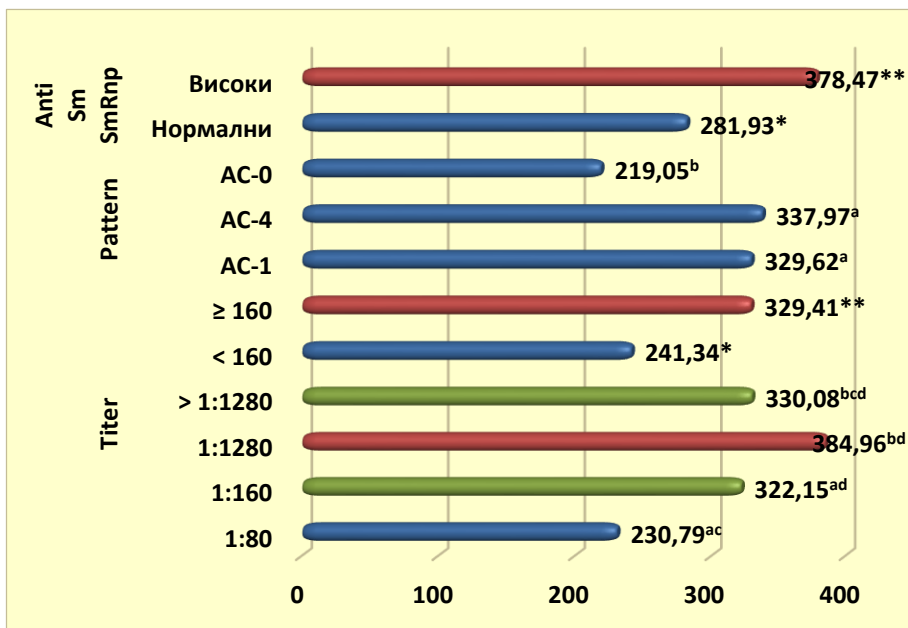
Табл. 57. Анализ на зависимостта между anti-EBV IgG и показателите титър и тип ИФ светене на АНА, anti-Sm и anti-Sm/RNP и витамин D2/D3 < 20 ng/ml (цяла извадка, РПС + болни със СЛЕ)

групи	показател	anti-EBV IgG		
		n	\bar{X}	SD
	титър на АНА			
	< 1:80	6	170,85	134,86
	1:80	27	219,68 ^{ac}	155,77
	1:160	18	336,23 ^b	118,75
	1:320	8	284,83	145,82
	1:640	3	301,77	159,87
	1:1280	10	384,96 ^b	31,47
	> 1:1280	11	330,08 ^{bc}	73,93
	титър на АНА (<i>p=0,001</i>)			
	< 160	35	220,75 ^a	152,54
	≥ 160	48	332,23 ^b	107,80
	тип ИФ светене			
цяла извадка	АС-1	21	329,62 ^a	108,93
	АС-4	26	341,45 ^a	108,97
	АС-2	4	329,15	81,97
	АС-0	32	204,89 ^b	149,90
	anti-Sm (<i>p=0,015</i>)			
	нормални	67	275,83 ^a	139,34
	високи	10	378,47 ^b	47,84
	anti-RNP/Sm (<i>p=0,015</i>)			
	нормални	67	275,83 ^a	139,34
	високи	10	378,47 ^b	47,84
	витамин D2/D3 < 20 ng/ml (<i>p=0,041</i>)			
	не	35	251,21 ^a	148,29
	да	34	313,08 ^b	120,48

групи	показател	anti-EBV IgG		
		n	\bar{X}	SD
РПС + болни със СЛЕ	титър на АНА			
	< 1:80	4	214,40	135,49
	1:80	17	230,79 ^{ac}	160,36
	1:160	13	322,15 ^{ad}	134,07
	1:320	5	274,48	182,36
	1:640	3	301,77	159,87
	1:1280	10	384,96 ^{bd}	31,47
	> 1:1280	11	330,08 ^{bcd}	73,93
	титър на АНА ($p=0,038$)			
	< 160	23	241,34 ^a	152,69
	≥ 160	40	329,41 ^b	113,87
	тип ИФ светене			
	АС-1	21	329,62 ^a	108,93
	АС-4	20	337,97 ^a	119,06
	АС-2	2	332,30	95,74
	АС-0	20	219,05 ^b	151,52
	anti-Sm ($p=0,026$)			
	нормални	53	281,93 ^a	140,94
	високи	10	378,47 ^b	47,84
	anti-RNP/Sm ($p=0,026$)			
нормални	53	281,93 ^a	140,94	
високи	10	378,47 ^b	47,84	

* еднаквите букви по вертикалите означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ($p < 0,05$)

** подгрупите с размер под 8 случая не участват в анализа поради липса на статистическа представителност



Фиг. 22. Анализ на зависимостта между anti-EBV IgG и показателите титър и тип светене на АНА, anti-Sm и anti-RNP/Sm (РПС + болни със СЛЕ)

Накратко, наблюдават се няколко асоциации на антителата срещу капсидния антиген на EBV и имунологичните показатели. И при IgM, и при IgG е налице еднозначна разлика в титъра спрямо нормален или повишен титър на АНА (< 1:160 спрямо ≥ 1:160). При IgG такава асоциация продължава с повишаването на титрите на АНА – по-високите титри срещу вируса се асоциират с по-високи титри на антинуклеарните антитела; при IgM тази тенденция не е консистентна. По подобен начин, повишените титри на двете антитела срещу вируса се асоциират със негативно с AC-0 светенето, т.е. са по-високи при значимите светения. Същото важи само за IgG, които се асоциират негативно с нормални стойности anti-Sm и anti-RNP/Sm.

Очаквано, при по-високи титри на anti-EBV IgG се асоциират с по-ниски нива на витамин D2/D3 (< 20 ng/ml) в цялата извадка. Проучванията относно връзка между витамин Д и серопозитивност за Епщайн-Бар касаят най-вече патогенезата на множествената склероза (*Brütting et al., 2021*) и насочват към разбирането

за протективна роля на витамини по отношение на инфекция и/или реактивация на вируса. Необходими са по-широки изследвания за разбиране на тази асоциация сред индивиди с генетична предразположеност към системен лупус.

Предвид известните данни, дали основание за обсъждане на етиологична или тригерираща роля на EBV по отношение на СЛЕ, описаните резултати представляват интерес. Известно е, че вирусът е с убиквитерно разпространение и че 100% от лупусно болните имат налични антитела срещу него, за разлика от около 70% от здравите (*James et al., 1997; James et al., 2001*). Нашите данни показват ясна асоциация между титъра на антитела срещу капсидния антиген на вируса и белези на автореактивност, каквито са АНА. Тук, разбира се, не бива да се пренебрегва възможността за флукутации в хода на времето на антителата срещу вируса и шансът настоящата находка да е случайна. Освен това, антителата срещу VCA далеч не отразяват цялата динамика на инфекцията, макар да има данни, че се асоциират с АНА позитивност при здрави (*Cuomo et al., 2014*), и че има данни и за възможна асоциация с покачването на титъра им с реактивация на вируса (*Besson et al., 2006*). Ако оставим това настрана, би могло да се обсъжда, че степента на напрегнатост на имунитета срещу вируса и/или реактивацията му стоят във връзка с формирането на АНА. При потвърждение в по-мощни изследвания, тези резултати могат да допринесат за изясняването на една от множеството причини за формиране на „бенигни“ АНА сред популацията. Разбира се, ако въобще е налице причинност между двата феномена, напълно възможно е тя да е с обратна посока – хората с тлеещ автоимунитет (каквито са РПС) да поддържат по-висок титър антитела срещу вируса.

5. ОБСЪЖДАНЕ

Представеното изследване си поставя за цел да добие интегрален поглед върху роднините първа степен на болните със системен лупус еритематозус като изследва техния клиничен, параклиничен, серологичен и имунологичен профил, и налични рискови фактори, поглеждайки ги от перспективата на вероятността за развитие на болест, през „призмата“ на антинуклеарните антитела в серума им. Доколкото ни е известно,

нашето проучване е първи опит за обединяване на всички аспекти на проблема – от рискови фактори през клинични прояви и рутинни имунологични показатели до цитокинови нива. Като ограничения на изследването могат да се посочат неголемия брой участници, едноцентровостта и липсата на генетични изследвания. Подобни проучвания от чужбина обръщат внимание върху възможната непредставителност на извадката си и поради факта, че са набирани предимно роднини на болни проследявани в клиниките, т.е. такива с по-тежко протичане. В нашият случай това няма съществено значение, тъй като на практика болните със СЛЕ, поради организацията на ревматологичната помощ, са контингент преди всичко на стационарните звена, а не на амбулаторията. Друга слабост на проучването е неговият едномоментен характер – както поради липсата на възможност за открояване на тенденции във времето, така и поради възможно наличие на преходни фактори, които могат да повлияят най-вече имунологичните показатели. Въпреки това считаме, че проучването е проведено методологично коректно; дискутабилността на някои от методите, преди всичко клиничните, е взета предвид при интерпретацията на резултатите. Получените резултати до голяма степен потвърждават досегашния опит в областта, а именно, че РПС заемат „междинно“ място между болните и общата популация в имунологичен аспект – процентът на повишени АНА сред тях е по-висок от този у здравите и по-нисък от този у болните, а нивата на някои цитокини също се отличават от тези на другите две групи, в нашия случай TGF- β . Нещо повече, нашите данни насочват и към възможен собствен клиничен облик на роднините.

В нашето проучване прави впечатление по-големия процент на повишени АНА в сравнение със световните данни - както у РПС, така и у здравите контроли (вж по-горе). Възможните обяснения за тези повишени АНА, могат да се търсят вкл. и на популационно ниво, за което е необходимо разширяване на изследваната извадка, и задълбочаване изследванията за съпътстващия имунологичен профил на тези лица. Както беше споменато по-горе, различните популации могат да имат различна норма (cut-off титър) за АНА и при нашата той би бил по-висок, напр. 1:320 (*Andrade et al., 2018*). За отбелязване е, че, както става и с много други изследвания, все по-честото им прилагане (обосновано или не) води до натрупване

на нови знания за тяхната диагностична стойност, както като сензитивност, така и като специфичност, и съответно до коригиране на техните референтни граници. Така например, в ежедневната ревматологична практика, титър от 1:320 без насочващи към системно страдание симптоми рядко е причина за по-подробни изследвания за АНА.

Както отбелязахме в хода на изложението, резултатите ни по отношение на антинуклеарните антитела, изследвани по трите метода, хармонират с описаните в световната литература и представят роднините като „друг вид“ здрави – такива с тенденция към повишени нива на антинуклеарни антитела. Освен това, нашите резултати добавят „щрих“ в този образ на роднитите и по типа светене на АНА, по което тази група също леко се отличава от общата популация.

Вторият вид резултати, които отличават нашето проучване от описаните досега, са данните за наличие на повече оплаквания в групата на РПС и асоциацията им с титъра на АНА. Едно от малкото проучвания, третиращи клинични промени, е това на Munroe M. и сътр. (*Munroe et al., 2017*), което открива, че един от независимите предиктори за разгръщане на СЛЕ у „здрави“ роднини е наличието на клинични симптоми (т.е. висок брой точки от „Скринингов въпросник за съединителнотъканни заболявания (CSQ) по Karlson и сътр., 1995 г.“ или брой критерии по ACR). Там също така се отбелязва, че повишените нива на BLys, SCF (Stem Cell Factor) и някои MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), както и намалените на TGF- β , корелират (съответно позитивно и негативно) с броя клинични белези както при изходните изследвания, така и при проследяване. Както отбелязахме по-горе в обсъждането на съставения от нас въпросник, скринирането за симптоми на СЗСТ може да бъде по-специфично за сметка на по-малка чувствителност или обратното. В изследването на Munroe и сътр. се обсъждат оплаквания, които са на практика с характер на типични критерии за заболяването (виж CSQ в приложението, сравни ACR критерии за СЛЕ); в известен смисъл това проучване може да се обсъжда като такова на индивиди с непълнен (субклиничен) СЛЕ. В нашето изследване разглежданите оплаквания са на границата с неспецифичните такива; наблюдава се асоциация на броя оплаквания с високите титри на АНА в цялата извадка, както и асоциация на нарастване броя

на оплакванията с нарастване титъра на АНА над 1:320. Още по-интересни са две зависимости, налични само в рамките на групата на роднините и то касаещи потенциални релевантите оплаквания: асоциацията между anti-dsDNA с кожни оплаквания и между anti-Ro60 и оралните афтоподобни оплаквания. Ако и да поставят повече въпроси, отколкото да дават отговори, тези две зависимости най-малкото отварят вратата за допускане на субстанциална връзка между неспецифични и леко изразени по степен клинични оплаквания и наличието на определена „степен“ автореактивност (в случая проявяваща се в повишени антинуклеарни антитела). Разбира се, за изясняването на този въпрос са необходими още много многопластови и мащабни проучвания, и натрупан клиничен опит.

По отношение на регистрираните от нас промени в цитокиновия профил, а именно средните нива на TGF- β при РПС спрямо болните и здравите, нашето изследване не се отличава от описаните досега, а само ги потвърждава. Както отбелязахме, вероятно при по-голяма изследвана група и възможно при проследяване във времето, сред родствениците ще се открият подгрупи с по-високи и нормални нива на цитокина и такива с пониски, които ще бъдат с по-голям риск от развитие на заболяване. Статистически значимо е потвърдено влиянието на цитокина върху рутинните показатели титър и тип светене на антинуклеарните антитела, както и върху някои специфични лупусни антитела, най-вече anti-dsDNA: зависимост, касаеща цялата изследвана извадка. Особено заслужаваща внимание е установената силната правопрпорционална корелация между нивата на витамин D2/D3 и TGF- β само в групата на роднините първа степен. Това навежда към разбирането, че съществуват групи лица с потенциал и към развитие на болест, и към оставане клинично здрави, и че решаващи за посоката на „поемане“ са променени външни фактори, в случая витамин Д.

Измежду останалите рисковите фактори – (актуално) тютюнопушене и прием на естрогенни препарати, изследвани по така описаните методи - не се установява асоциация с някой от другите изследвани показатели, вкл. клиничните. Отдаваме това на сравнително малката извадка и липсата на проследяване, тъй като окончателна интерпретация относно възможен техен дял в етиопатогенезата би била възможна единствено при развитие

на болест у някои от изследваните. Разбира се, както бе описано в литературния обзор, нито един от тези външни фактори не е доказано еднозначно свързан с повишен риск от развитие на болест.

За разлика от тях обаче, серологичните данни за EBV в качеството му на обсъждан рисков фактор, показват известна асоциация между титър на антитела срещу вируса и титъра и типа светене на АНА, както и със специфичните anti-RNP/Sm и anti-Sm. Макар и само асоциативни, тези данни са в съгласие с биомедицинските и емпирични данни за имунопатогенезата на болестта и могат да свидетелстват за връзка между известна степен на автоимунитет и давността или напрегнатостта на имунитета срещу EBV. Както бе обсъдено по-горе, ако въобще е налице причинност, не е ясна посоката ѝ. Предвид фундаментално-научните данни за този вирус и неговото многостранно въздействие върху имунната система (поселване в В-клетките, молекулна мимикрия с Ro60 и Sm, производство на цитокинови аналози и др.), е логично да се предположи, че вирусът е причина/тригер за автоимунитет. От друга страна, предвид убиквитерното му разпространение, изследователите приемат, че е необходимо наличие на „склонен към автоимунитет“ терен, върху който EBV да попадне и причини субклинични или клинични промени. Много вероятно е връзката да е и в двете посоки: вирусът причинява промените, които причинява, *само* при предразположени индивиди. Като доказателство за това може да служи популацията на лупусно болните, при които се установява серопозитивност в 100%. По-далечно предположение би било, че наличието на белези на (реактивиране на) EBV инфекция могат да се разглеждат – разбира се в комбинация с други показатели – като още един маркер за автореактивност или автоимунитет.

Накратко, представеното проучване потвърждава досегашните литературни данни за особеното имунологично място на роднините първа степен на болните със СЛЕ, като поставя известен акцент върху интерпретирането на ранни клинични оплаквания (макар и неспецифични) в светлината на налични АНА, затвърждава разбирането на ролята на имунната регулация в антиялогенезата и патогенезата на СЛЕ, и също така повдига някои въпроси относно мястото на Epstein-Barr инфекцията в разпространението на АНА сред общата популация.

За доизясняване и потвърждаване или отхвърляне на оформящите се закономерности са необходими както увеличаване броя изследвани лица, така и проследяването им във времето.

За да могат да бъдат разбрани описаните при роднините и при здравите контроли промени, трябва да бъдат разгледани феномените на автореактивност, автоимунитет (продължителна или патологична автореактивност) и автоимунна болест. Въпреки че липсва общоприета терминология, се касае за три различни действителности. *Автореактивността* по своята същност представлява разпознаване и реакция на имунната система към собствени структури на организма (*Наумова, 2021*). Това е нормален и задължителен процес, особено в стадията на съзряване на имунната система, но и постоянно протичащ; така тя се „учи“ да разпознава „своето“ от „чуждото“. Тази автореактивност остава във физиологични граници благодарение на механизмите на имунния толеранс; в него централна роля играят обсъжданите нееднократно регулаторни цитокини – IL-10 и TGF- β . В контекста на СЛЕ и АНА, пример за функциониращи нормално механизми на имуноен толеранс е именно описаното почистване чрез опсонизация и последваща фагоцитоза на екстернализираните вследствие на апоптоза интрацелуларни антигени в условията на „имунологична тишина“ – т.е. без това да индуцира реакция на специфичната имунна защита. Важно е да се отбележи, че в този случай ЕИА са разпознати като чужди, но без „патологични последици“. *Патологичната автореактивност или автоимунитетът* се състоят в разгръщане и утвърждаване във времето на специфичен имуноен отговор вследствие на нарушение на един или повече от механизмите на имунния толеранс и се изразяват в наличие на автореактивни Т- и В-клетки и автоантитела (*Alspaugh et al., 1976*). В контекста на горния пример, т.е. екстернализирането на вътреклетъчни антигени, когато клетъчната смърт е надмерна или има дефекти в опсонизацията, или в друг механизъм на фагоцитозата, ЕИА не са очистени своевременно и могат да станат обект на антигенно представяне чрез механизъм от няколко последователни процеса (*Иванова-Тодорова, 2018*). Веднъж представени от съответния тип АПК, те стават причина за активиране на Т-клетките, които от своя страна стимулират автореактивни В-клетки, диференциращи се в плазматични и секретирани антитела срещу ЕИА, част от които

са всъщност АНА. Т.е., вследствие на външни за имунната система обстоятелства (повишена клетъчна смърт) и/или нарушения във нормалното функциониране на имунитета (опсонизация, фагоцитоза, активиране на АПК и др.) се стига не само до разпознаване като чужди на собствени структури от имунната система, но и до разгърната специфична реакция срещу тях. В рамките на описвания пример, илюстрация на това е детекцията на повишени серумни АНА при лице без автоимунна (ревматична) болест: в този случай най-често се касае за т.нар. инфекциозни или тумор-индуцирани АНА, или АНА вследствие на различни процеси, водещи до надмерна клетъчна смърт и тогава обикновено АНА изчезват с изчезване и на „външната“ причина за повече ЕИА. Важно е обаче да се отбележи, че за повишеното образуване на АНА в тези случаи е необходима и „имунологична компонента“ – т.е. нарушения в някои от описаните механизми, водещи до известна недостатъчност на имунния толеранс. За разлика от физиологичната автореактивност и патологичната такава (наричана още автоимунитет), при *автоимунната болест* е налице комбинация от нарушения в механизмите на имунитета, водеща до самовъзпроизвеждане на автоимунния процес и последващи тъканни увреди. В разглеждания пример към описаните нарушения, се прибавят и други, особено ключовото в патогенезата на СЛЕ продължително „оцеляване“ на автореактивните В-клетки (при повишен BAFF), които освен антиялопродукция осъществяват и антигенно представяне. Стига се до значително повишени нива на АНА и самите те, залавяйки се за ЕИА, индуцират реакция, което води до нова клетъчна смърт с екстернализация и респ. репродукция на цялата каскада. Т.е., за да говорим за автоимунна болест, трябва да са налице автореактивни клетки, автоантитела и патогенетично свързани с тях тъканни увреди.

Така, в контекста на гореизложеното, установяването на повишени АНА при лице от общата популация би следвало да се третира като следствие от автоимунна болест (настояща или „задаваща се“) или друга причина свързана с надмерна клетъчна смърт (инфекции, неоплазии и т.н.). Все пак обаче, на популационно ниво честотата на повишени АНА при случайно подбрани лица, особено и в нашето изследване, далеч не може винаги да се обясни с някоя от тези два вида причини (автоимунна болест или клетъчна разруха) (*Wandstrat et al., 2006; Satoh et al.,*

2012; Li et al., 2019; Slight-Webb, et al., 2020). Следователно, може да се допусне, че сред общата популация са налице разпространени състояния на лекостепенна патологична персистираща автореактивност (автоимунитет), която никога не достига такива размери, че да доведе до автоимунна болест, или поне не в „нормални“ условия. За това твърдение са доказателство именно изследваните от нас роднини първа степен на болни със системен лупус: те нямат никаква видима неимунологична причина за прояви на патологична автореактивност, но я проявяват в по-голяма степен от общата популация, и то трайно. Доказателства за наличието на тази автореактивност са повишените АНА – ИИФ и специфични ААт, промените в цитокиновите нива, вероятно и по-високите титри на anti-EBV антитела при повишени АНА, цитокиновите промени, а неизключено и повечето им клинични оплаквания. Като единствена причина за проявената от РПС автореактивност остава споделеният с болните им роднини генетичен терен: споделен дотолкова, че повечето от тях да останат на ниво „глееща“ автореактивност и никога да не стигнат до болест, а само 0,1% от всички роднини да се разболеят сред всички 30% с повишени АНА сред тях (Feldman et al., 2013; Lim et al., 2014; Somers et al., 2014; Ferucci et al., 2014; Rees et al., 2017; Alarcón-Segovia et al., 2005). Оттук можем да разберем и защо повишените АНА не са самостоятелен предиктивен фактор за развитие на СЛЕ, дори сред роднини на болните, въпреки факта че те предхождат появата на заболяването (Munroe et al., 2017). Както стана ясно, повишените АНА не са „само автоимунитет“ (Иванова-Тодорова, 2018) – те могат да се дължат и на други причини, макар дори тогава имунната система да има своя дял. Но, дори когато са с „чисто“ автоимунна генеза, АНА могат не само да са „не още автоимунна болест“ (нак там), т.е. етап от предклиничното ѝ развитие, но могат и да са „просто автореактивност“, която никога няма да се развие. До този момент, както многократно бе отбелязано, предиктори за развитие на болест, т.е. за вероятността проявите на автореактивност да са етап от развитие, а не състояние, са данните за по-кардинални имунологични промени – превалиране на проинфламаторни и/или недостатъчност на регулаторни цитокини. Тези данни могат на пръв поглед да „дискредитират“ рутинното изследване на АНА като лишени от прогностична стойност. Това не би било оправдано по две причини. Първо, АНА са част от класификационните

критерии (т.е. приетите по статистически данни за същности белези) за СЛЕ и другите СЗСТ; второ, АНА остават единственото рутинно изследване в ежедневната практика, което би могло да се свърже с прояви на автореактивност.

В обобщение, в лицето на роднините първа степен на болните със системен лупус еритематодес виждаме специфична група от клинично здрави лица, сред която определен процент са с различна степен на прояви на патологична автореактивност – повишени АНА, промени в цитокиновите нива, може би повишен титър антитела срещу вируса на Епщайн-Бар. Само много малка част от този процент би развила заболяване и то при стечение на комплексни обстоятелства, които да доведат до пречупване на имунния толеранс с разгръщане на болест с имунна патогенеза. По-голямата част от този процент ще останат клинично здрави, но с описаните белези на патологична автореактивност. Като такива, те са пример за съществуването на феномена персистираща патологична автореактивност сред популацията.

6. ИЗВОДИ

6.1. В нашите резултати, както и в тези на световната литература, роднините първа степен на болни със системен лупус еритематозус се оформят като група със специфичен имунологичен облик: отличават се от здравите с тенденция към по-висока честота на наличие на завишени антинуклеарни антитела в серума, по-високите им титри и честотата на наличие на специфичен тип имунофлуоресцентно светене според International Consensus of ANA Patterns, както и по междинни (спрямо здрави и болни) стойности на серумните нива на регулаторния цитокин TGF- β . Техният специфичен облик ясно се изразява и с демонстрираните налични само сред тяхната група зависимости между изследваните показатели.

6.2. Нашите резултати насочват към възможността роднините първа степен да се характеризират и с повече, макар и неспецифични, клинични оплаквания от здравите и тези оплаквания да стоят във връзка с нивата на антинуклеарните антитела в серума.

6.3. Данните за изразена по сила и права по посока корелация между нивата на витамин D2/D3 и тези на TGF- β

единствено в групата на РПС насочват към разбирането, че това е група с двойк потенциал – за развитие на болест или оставане в състояние на здраве.

6.4. Преди всичко, поредното доказване на имунологични промени сред значим процент от рисковата популация на роднините първа степен, значително надвишаващ процента, който по статистически данни би развил заболяване, насочва към разбирането за персистираща патологична автореактивност като относително разпространен феномен.

6.5. Предвид установените по-високи спрямо литературните данни стойности на антинуклеарните антитела в серума както при здравите, така и при роднините на болни със системен лупус еритематозус, нашите резултати могат да са основание за разбирането, че референтните граници за нивата на антинуклеарните антитела в серума, изследвани по имунофлуоресцентен метод, могат да варират в известни граници сред различните популации.

6.6. Предвид резултатите по отношение на вируса на Epstein-Barr, нашите резултати подкрепят разбирането, че вирусът би могъл да има отношение към автоимунитета – било като агент, било като маркер за такъв.

7. ПРИНОСИ

7.1. Научно-теоретични

- за първи път в света е проведено изследване на антинуклеарни антитела при болни, роднини и здрави по метода на индиректната имунофлуоресценция според ICAP и е демонстрирана неговата значимост;

- потвърждават се в българската популация световните литературни данни за заеманото в имунологично отношение междинно място на РПС спрямо болните със СЛЕ и здравите. Доколкото ни е известно, настоящото проучване е едно от малкото в света, изследващо цитокинов профил на РПС, освен АНА;

- потвърждава се значимостта на регулаторния цитокин TGF- β както в патогенезата на болестта, така и в процесите на автореактивност и генеза на антинуклеарни антитела;

- демонстрира се значимостта на нивата на серумния витамин D2/D3 като протективен фактор срещу автоимунитет сред

предразположените индивиди, каквито са групата на роднините на болните;

- демонстрира се зависимост между титъра и имунофлуоресцентното светене на АНА от една страна, и титъра на антителата срещу капсидния антиген на вируса на Epstein-Barr, от друга;

- затвърждава се разбирането за разпространени в популацията различни по степен увреди във функциите на имунната система, водещи до персистираща автореактивност.

7.2. Методични

- настоящото проучване е първото, обследващо *заедно* рискови фактори, клинични белези и имунологичен профил у РПС

- съставен е подробен скринингов въпросник за системни заболявания на съединителната тъкан с висока чувствителност.

7.3. Научно-приложни

- за първи път в настоящото проучване се установява възможна връзка между наличието и титъра на АНА, от една страна, и наличието на клинични оплаквания, от друга;

- потвърждава се значимостта на рутинното изследване на АНА като надежден показател за автореактивност/автоимунитет;

- за първи път в нашата страна е започнат клиничен и имунологичен скрининг на роднини на болни със СЛЕ и е започната програма за тяхното системно проследяване.

Публикации и научни съобщения

Публикации

1. Penev B. et al, First-degree relatives of patients with systemic lupus erythematosus: Autoreactivity but not autoimmunity?, International Journal of Rheumatic diseases, Mar 2023, doi: 10.1111/1756-185X.14669
2. Penev B. et al, Systemic lupus erythematosus and Q-fever: which comes first? A clinical case, Bulgarian Journal of Clinical Immunology, Vol. 13, Aug 2020
3. Б. Пенев, Родственици на болни със системен лупус еритематодес – антинуклеарни антитела, имунологичен профил и риск от развитие на болест, Ревматология (България), Vol. XXX, №2/2022
4. Б. Пенев, Системен лупус еритематодес и антинуклеарни антитела – от науката до практиката, GP News, бр. 9 (244), година 21, септ. 2020

Участия в научни форуми и научни съобщения

1. Пенев, Б., Кюркчиев, Д., Рашков, Р., Монов, С., Кога и при кого започва системният лупус еритематодес?, доклад на Първа национална конференция на Българската ревматологична асоциация с международно участие, 2020 г., София
2. Penev B. et al, First degree relatives of patients with systemic lupus erythematosus – clinical, serological and immunological correlations, AB0815, Annals of the Rheumatic diseases, Jun 2021, doi: 10.1136/annrheumdis-2021-eular.511 (резюме от конгрес EULAR 2021)
3. Пенев, Б., Василев, Г., Кюркчиев, Д., Рашков, Р., Монов, С., Автореактивност, а не аутоимунитет: АНА при здрави и роднини на болни със системен лупус еритематодес, доклад на Втора научна конференция Хронични заболявания – патогенеза, диагностика, клиника и превенция, 2022 г., Несебър
4. Пенев, Б., Василев, Г., Куртева, Е., Юзеир, К., Иванова-Тодорова, Е., Монов, С., Кюркчиев, Д., Антинуклеарни антитела и антитела срещу вируса на Епщайн-Бар, доклад на Конгрес на

Българското дружество по ревматология с международно участие, 2023 г., Плевен

5. Пенев Б., Кюркчиев, Д., Рашков, Р., Монов, С., Роднини първа степен на болни със системен лупус еритематозус – клинични, лабораторни, серологични и имунологични асоциации, доклад на Конгрес на Българското дружество по ревматология с международно участие, 2024 г., Казанлък

6. Пенев, Б., „Клинична“ ли е автореактивността?, доклад на Втори интердисциплинарен уебинар на Българската асоциация по клинична имунология, 14 май 2024 г.