

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ

УМБАЛ „Св. Иван Рилски” - гр. София

Д-Р ЕКАТЕРИНА КРАСИМИРОВА КУРТЕВА

АВТОРЕФЕРАТ

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

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

ДОКТОРСКА ПРОГРАМА “ИМУНОЛОГИЯ”

СОФИЯ, 2019

Дисертационният труд е написан на 158 стандартни печатни страници, онагледен с 37 фигури и 19 таблици. Библиографията съдържа 310 заглавия, от които 3 на кирилица и 307 на латиница.

Във връзка с дисертационния труд са реализирани 5 публикации, 1 глава от книга и 10 участия в научни форуми.

Дисертационният труд е обсъден на заседание на научния съвет към Катедра по клинична имунология - Медицински Университет - София на 12.07.2019 г. и е насочен за официална защита пред научно жури в състав:

Официални рецензенти:

1. Проф. д-р Доброслав Станимиров Кюркчиев, дмн
2. Доц. д-р Любомир Маринов Маринчев, дм

Становища:

1. Проф. д-р Рашо Колев Рашков, дмн
2. Доц. д-р Ирена Манолова Манолова-Василева, дм
3. Доц. Андрей Иванов Чорбанов, дб

Материалите по защитата са на разположение в деловодството на Катедра по клинична имунология.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на **03.10.2019** г. от **13:30 часа** в Аулата на УМБАЛ „Св. Иван Рилски” ЕАД - гр. София, бул. „Акад. Иван Евст. Гешов“ 15А.

ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:

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

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

СЪДЪРЖАНИЕ:

1. ВЪВЕДЕНИЕ	4
2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	6
3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	8
3.1. Изследвани лица	8
3.2. Биологичен материал от изследваните лица.....	15
3.2. Методи на изследване.....	16
4. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	25
4.1. Изследване на нови имунологични показатели в имунодиагностиката на SSc.....	25
4.1.1. Изследване на АНА в серума на болните със SSc чрез HEp-2 ИИФ - определяне на титър и тип имунофлуоресцен образ съгласно Международния консенсус за АНА светения (ICAP).....	25
4.1.2. Изследване на панел от 13 SSc - асоциирани ААт чрез имуноблот метод.....	34
4.2. Проучване на нови патогенетични механизми при SSc.....	48
4.2.1. Оценка на периферния цитокинов профил в серума на пациенти със SSc в сравнителен план със здрави лица.....	48
4.2.2. Определяне на способност за активация на Т-лимфоцитите под въздействието на РНА в периферна кръв от пациентите със SSc и при здрави контроли.....	54
4.2.3. Изследване на Th17 и Tregs в периферна кръв от пациенти със SSc	58
4.2.4. Връзка между болестната активност, стадия на SSc, наличието на висцерално засягане и изследваните имунологични показатели.....	68
5. ИЗВОДИ	70
6. ПРИНОСИ	71
7. Публикации и участия в научни прояви във връзка с дисертационния труд.....	72

1. ВЪВЕДЕНИЕ

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

Макар и рядко срещана, прогресивната системна склероза (Systemic sclerosis, SSc) представлява тежко инвалидиращо заболяване със системен ход и сериозно повлияващо върху живота на засегнатите индивиди. Въпреки че на пръв поглед наподобява други системни автоимунни заболявания на съединителната тъкан, SSc представлява уникална по своята същност нозологична единица, многолика в своята хетерогенна изява.



От трудностите при поставяне на диагнозата и стратифицирането на пациентите, през терапевтичните предизвикателства, до неблагоприятната дългосрочна прогноза, SSc остава неразрешена загадка към настоящия момент, както за научноизследователските екипи, така и за клиничните специалисти. Въпреки

безспорния принос на натрупаните до момента научни данни относно имунопатогенезата на SSc, все още много въпроси остават без отговор. Сред тях са кое точно дава началото на автоимунния процес, какви са причините за преобладаването на Т-хелперния (Th) тип 2 отговор, както и да бъдат определени имунологичните различия между дифузната и ограничената форма на SSc. Необходимо е натрупване на допълнителни научни данни и задълбочено изследване на фенотипа на Т-клетките, въввлечени в имунопатогенезата на SSc, както и дали тези субпопулации реално са израз на транзиторни състояния или представляват терминално-диференцирани клетки, особено по отношение на проинфламаторните Th17 клетки и на регулаторните Т-лимфоцити (Tregs). Голямо предизвикателство представлява интерпретирането и обвързването на получените резултати от животинските модели на SSc и проведените *in vitro* проучвания, с възможността за осигуряване на персонализиран терапевтичен подход при пациентите със SSc.

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

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

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

За постигане на целта си поставихме следните задачи:

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

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

4. Определяне на чувствителността, специфичността, положителната и отрицателната предсказателна стойност на изследваните автоантитела и установяване на диагностичната и предиктивната им стойност по отношение на органното засягане при SSc.

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

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

2. Оценка на периферния цитокинов профил чрез изследване на цитокиновата продукция на свързаните с Th17 и Tregs цитокини (IL-6, IL-17A, IL-23, IL-10, TGF- β 1) в серума на пациенти със SSc и на здравите лица.

3. Флоуцитометрично определяне на способност за активация на Т-лимфоцитите под въздействието на Phytohemagglutinin (PHA) в периферна кръв от пациентите със SSc и при здравите контроли.

4. Флоуцитометрично изследване на процент Th17 и Т регулаторни клетки (Tregs) в периферна кръв от пациентите със SSc и при здравите контроли.

5. Сравняване на получените стойности при пациенти със SSc, с тези на здравите лица и анализиране на връзката им с формата, стадия и активността на SSc.

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. Изследвани лица

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

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

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

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

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

жени и 4 (25%) - мъже. В дисертационния труд те ще бъдат означавани като „зdravi“.

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

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

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

- Пациенти на възраст ≥ 18 години с поставена диагноза СЛЕ, полимиозит/дерматомиозит, еозинофилен фасциит и overlap синдроми;
- Подписали информирано съгласие за вземане на биологичен материал - периферна венозна кръв;

➤ **Критерии за включване на здрави лица от контролната група:**

- Възраст ≥ 18 години;
- Подписали информирано съгласие за вземане на биологичен материал - периферна венозна кръв;
- Липса на СЗСТ или възпалително ставно заболяване и без данни за други хронични тежки придружаващи заболявания

➤ **Критерии за изключване, валидни за всички лица, включени в проучването:**

- Лица на възраст под 18 години;
- Тежки съпътстващи, хронични физически заболявания;
- Пациенти, които показват познавателни или психични увреждания;

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

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

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

На Таблица 1 са представени демографските характеристики на изследваните групи лица.

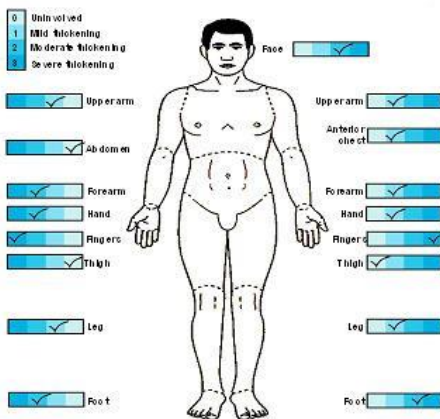
Таблица 1. Демографска структура на отделните групи от изследвани лица. Данните са представени като брой (%) или средна стойност \pm SD

	Пациенти със SSc		Пациенти с други	Здрави лица
			СЗСТ	
Брой	91	24	38	16
Възраст	25 - 74 г. (51 \pm 12 г.)	28 - 64 г. (47.1 \pm 13.2)	23 - 74 г. (48 \pm 12 г.)	26 - 55 г. (43 \pm 12 г.)
Жени/Мъже	82/9 (90% / 10%)	23/1 (95.8%/4.2%)	33/5 (86% / 14%)	12/4 (75% / 25%)
lcSSc	59 (64%)	11 (45.8%)		
dcSSc	32 (36%)	13 (54.2%)		

При всички изследвани пациенти със SSc:

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

всеки пациент при максимален брой точки - 51т. (17 области x 3) (фиг. 1).



Фигура 1. modified Rodnan skin score (mRSS) - точкова система за изчисление на степента на кожното ангажиране при SSc, използвана както в диагностичен аспект, така и за целите на клиничните проучвания.

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

Органното засягане на пациентите, включени в имунодиагностичната част от дисертационния труд, е представено в Таблица 2.

Таблица 2. Кожно и органно засягане при изследваните пациенти със SSc

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

За целите на проучването на нови патогенетични фактори при SSc, пациентите бяха разделени на две групи спрямо степента на кожното засягане - 13 пациента с dcSSc и 11 – с lcSSc (табл. 3). В зависимост от годините от дебюта на заболяването, пациентите и от двете групи бяха стадирани както следва (по *Medsgger et al. 2003*):

➤ Пациенти с dcSSc:

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

➤ Пациенти с lcSSc:

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

Активността на SSc беше оценена според Revised Activity Criteria for SSc, Preliminarily Revised EUSTAR Activity Index (*Valentini et al. 2016*). Клиничните данни на пациентите са представени в Таблица 3.

Таблица 3. Демографски и клинични характеристики на изследваните пациенти със SSc.

Пациент	Пол	Възраст	Форма	Стадий	Активност	Висцерално засягане	АС-светене	Терапия
1	М	50	dcSSc	интермедиерен	Да	ЕД	АС-4	PMP
2	Ж	49	dcSSc	късен	Не	ЕД	АС-29	MTX
3	Ж	55	dcSSc	интермедиерен	Не	ЕД	АС-4	MP
4	Ж	58	dcSSc	късен	Да	ИББ	АС-29	PMP, PCYP
5	Ж	44	dcSSc	ранен	Да	ИББ	АС-29	DPA, MP
6	Ж	27	lcSSc	ранен	Да	Не	АС-29	DPA, MP, TCZ
7	Ж	48	dcSSc	ранен	Да	ИББ	АС-29	DPA, MP
8	Ж	37	lcSSc	ранен	Да	Не	АС-4	CHQ
9	Ж	65	dcSSc	ранен	Не	Не	АС-3	MP, CHQ
10	Ж	36	lcSSc	интермедиерен	Да	Не	АС-4	PMP, PCYP, DPA
11	Ж	47	dcSSc	ранен	Да	SRC	АС-29	PMP, PCYP
12	Ж	32	lcSSc	ранен	Да	ИББ	АС-4	MP, TCZ
13	Ж	62	dcSSc	ранен	Да	Не	АС-4	PMP, PCYP
14	Ж	27	lcSSc	късен	Да	Не	АС-8	MTX
15	Ж	73	lcSSc	интермедиерен	Не	ИББ	АС-4	MP, MTX
16	Ж	32	dcSSc	късен	Да	ИББ	АС-8, АС-29	PMP, PCYP
17	Ж	60	dcSSc	късен	Да	Не	АС-4	PMP, PCYP
18	Ж	34	dcSSc	ранен	Да	Не	АС-29	MP, MTX
19	Ж	56	lcSSc	късен	Не	ЕД	АС-3	MP
20	Ж	53	lcSSc	ранен	Да	Не	АС-8	MP, AZA
21	Ж	30	lcSSc	късен	Да	Не	АС-4	MP, DPA
22	Ж	61	dcSSc	късен	Не	ЕД, ПАХ	ИББ, АС-29	MP
23	Ж	39	lcSSc	ранен	Не	Не	АС-3	MTX
24	Ж	56	lcSSc	интермедиерен	Не	ЕД	АС-4	MP, MTX

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

3.2. Биологичен материал от изследваните лица

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

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

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

От пациентите със SSc и от контролната група здрави лица беше събиран биологичен материал - пълна периферна венозна кръв и кръвен серум. За целите на проучването бе направена рутинна венепункция и взета периферна венозна кръв с вакутейнери за пълна кръв (K2E BD-Plymouth, PL67BP, UK, 5 ml) за серум (BD Vacutainer®, CATREF 367955, 5 ml). Кръвните проби на всички лица бяха изследвани в Лаборатория по клинична имунология към УМБАЛ „Св. Иван Рилски“. Серумите бяха отделени съобразно стандартната оперативна процедура в лабораторията, описани и съхранявани на -70° C, според изискванията за добра лабораторна практика и според инструкциите на търговските китове.

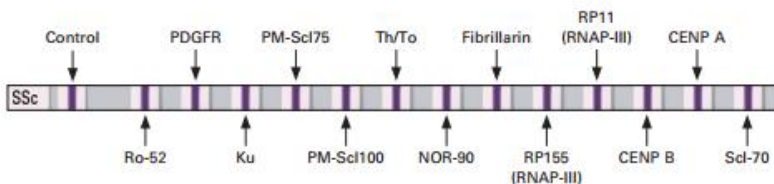
3.3. Методи на изследване

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

За установяване на АНА чрез индиректна имунофлуоресценция бе използван АНА - HEp-2 тест (IIFT: HEp-2, EUROIMMUN AG, Germany), съгласно инструкциите на производителя. Имунофлуоресцентните образи бяха анализирани с помощта на флуоресцентен микроскоп с възбудим филтър 495 nm и емисионен филтър 525 nm за FITC визуализиране - микроскоп Nikon Eclipse Ci-L и софтуерна програма за обработка и съхранение на получените имунофлуоресцентни образи NIS - Elements Analysis D .

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

За изследване на панел от 13 SSc-асоциирани ААт използвахме EUROLINE Systemic Sclerosis (Nucleoli) IgG Profile. Серумните проби на пациентите, както и положителната и отрицателната контроли на всяка серия, бяха изработени съобразно инструкциите на фирмата производител. Резултатите бяха отчетени и анализирани чрез софтуерна програма EUROLinScan.



Фигура 2. Разширен имуноблот тест за изследване на SSc-асоциирани ААт

EUROLINE Systemic Sclerosis (Nucleoli) Profile е качествен метод и резултатите се отчитат по следния начин (табл. 4):

Таблица 4. Отчитане на резултата чрез софтуерна програма EUROLineScan

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

3.3.3. Имуноензимни методи за определяне на цитокини в кръвен серум

За количествено определяне на IL-6, TGF- β 1, IL-10, IL-17A и IL-23, в серумите на изследваните лица, използвахме търговски китове Human ELISA kit (Gene probe, Diaclone, France), специфични за отделните цитокини. Тестирането извършихме съгласно съответните инструкции на производителя за изследване на цитокините.

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

Чрез стимулация на хепаринизирана кръв *in vitro* с PHA в рамките на кратко време (4 часа) може да се докаже функционалната способност на лимфоцитите да се активират, като се определи чрез флоуцитометрия експресията на ранния

повърхностен маркер на активация CD69. Когато към пълна човешка кръв се добави анти-CD3 (FITC-маркирано) / CD69 (PE-маркирано) моноклонални антитела, флуорохром-маркираните антитела се свързват специфично към повърхностните лимфоцитни антигени. Оцветените проби се третират с лизиращ разтвор за лизиране на еритроцитите, промиват се и се фиксират преди флоуцитометричен анализ. Пробите се отчитат на флоуцитометър FACSCalibur, чрез Cell Quest software, като се преброяват 20 000 събития.

Диагностичен набор:

PHA-M, Roche Diagnostics GmbH, Germany;

Mouse anti-Human CD3 (FITC-маркирано), BD Pharmingen, USA;

Mouse anti-CD69 (PE-маркирано), BD Pharmingen, USA;

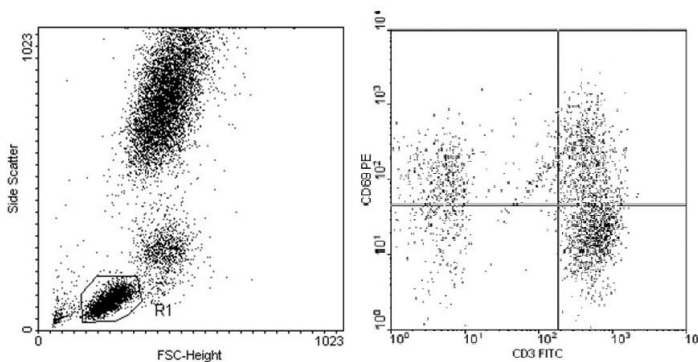
BD FACS Lysing Solution, BD Pharmingen, USA;

Фиксиращ разтвор - CellFIX (1 % разтвор на параформалдехид), pH 7.4.

Методът е изпълнен чрез маркиране на пълна периферна венозна кръв с посочените моноклонални антитела, следвайки стриктно протокола на производителя.

Флоуцитометрия

Флоуцитометърът се приготвя и калибрира с CaliBRITE частички и програмаFACSComp, като се нагласят PMT волтажките, флуоресцентната компенсация и чувствителността на детекторите. Продължава се с двуцветна флоуцитометрия, като се използва BD Cell Quest software. За да се определи процента на Т лимфоцитите, експресиращи CD69, гейт R1 се поставя върху лимфоцитния облак. Определя се % на CD69 / CD3⁺ лимфоцити, съответно за стимулираната и нестимулираната проба на пациента (фиг. 3).



Фигура 3. Определяне на Т клетките, експресиращи CD69. Първоначално се гейтира върху лимфоцитния облак, определен по физични параметри (R1, ляво). R1 се поставя в/у лимфоцитния облак. Определя се % на CD3⁺CD69⁺ лимфоцити, съответно за стимулираната и нестимулираната проба на изследваното лице. Т клетките, които експресират на повърхността си CD69, са дефинирани като активирани Т лимфоцити (горен десен квадрант на R2).

Изчисление индекса на стимулация (ИС) на Т клетките:

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

Начин на представяне на резултата:

ИС - Индекс на стимулация:

ИС < 6.5 - намалена активация;

ИС > 6.5 - нормална активация;

Референтни интервали:

6.5-30.2

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

3.3.5. Флоуцитометрично изследване на процент Th17 лимфоцити

Диагностичен набор:

Mouse anti-Human CD3 (FITC-маркирано), BD Pharmingen, USA;

Mouse anti-Human CD4 (PerCP-маркирано), BD Pharmingen, USA;

Mouse anti-Human CD161 (PE-маркирано), BD Pharmingen, USA;

Mouse anti-Human CD196 (CCR6) (AlexaFluor647-маркирано), BD Pharmingen, USA.

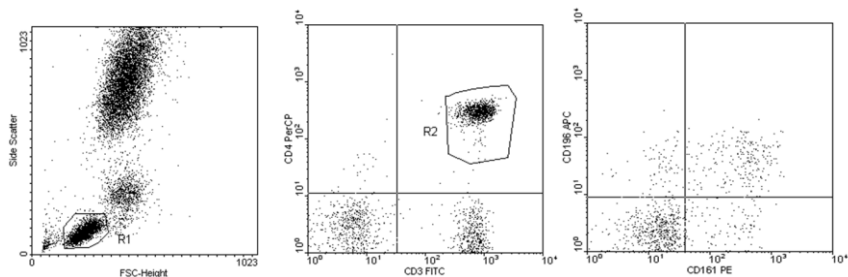
BD FACS Lysing Solution, Pharmingen, USA.

CellFix фиксиращ разтвор (1% разтвор на параформалдехид), pH 7.4.

Методът е изпълнен чрез маркиране на пълна периферна венозна кръв с посочените моноклонални антитела, следвайки стриктно протокола на производителя.

Флоуцитометрия

Резултатите са отчетени на FACSCalibur флоуцитометър, като се преброяват 20 000 събития. За последващ анализ се използва BD Cell Quest software (фиг.4)



Фигура 4. Фенотипно определяне на Th17 лимфоцити. На фигурата е представен репрезентативен пациент с lcSSc. Първоначално се гейтира върху лимфоцитния облак, определен по физични параметри (вляво). Вторият гейт се поставя върху CD3⁺CD4⁺ клетките (в средата). Т-хелперните клетки, които двойно експресират на повърхността си CD161 и CD196 (R3, горен десен квадрант), са дефинирани като Th17 лимфоцити.

3.3.6. Флоуцитометрично определяне на процент на Tregs

Диагностичен набор:

Mouse anti-Human CD4 (PerCP-маркирано), BD Pharmingen, USA;

Mouse anti-Human CD25 (FITC-маркирано), BD Pharmingen, USA;

Mouse anti-Human FoxP3 (PE-маркирано), BD Pharmingen, USA;

Human FoxP3 Buffer A (10x), BD Pharmingen, USA;

Human FoxP3 Buffer B (50x), BD Pharmingen, USA.

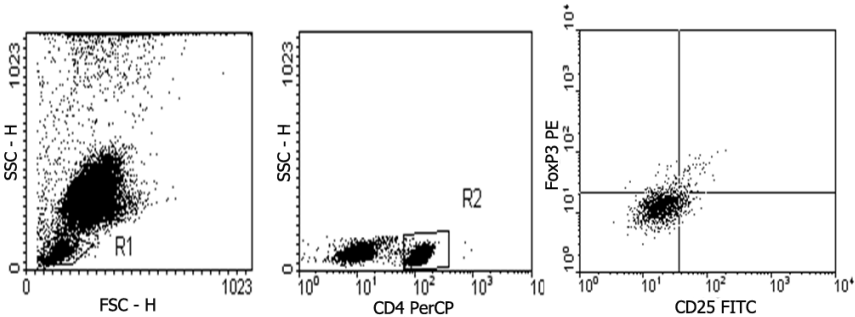
BD FACS Lysing Solution, BD Pharmingen, USA.

CellFix фиксиращ разтвор (1 % разтвор на параформалдеhid), pH 7.4.

Методът е изпълнен чрез маркиране на пълна периферна венозна кръв с посочените моноклонални антитела, следвайки стриктно протокола на производителя.

Отчитане на резултатите

Резултатите са отчетени на FACSCalibur флоуцитометър, като се преброяват 20 000 CD4⁺ клетки. За последващ анализ се използва BD Cell Quest software (фиг. 5).



Фигура 5. Фенотипно определяне на CD4⁺CD25[±]/FoxP3⁺ Т лимфоцити. На фигурата е представен репрезентативен пациент с dcSSc. Първоначално се гейтира върху лимфоцитния облак, определен по физични параметри (вляво). Вторият гейт се поставя върху CD4⁺ клетките (в средата). Десният плот е гейтиран по логичен гейт, направен чрез комбинация между гейт едно и гейт две. Наблюдават се (вдясно) две субпопулации CD4⁺FoxP3⁺ клетки, като се счита, че класическите Tregs са с висока експресия на CD25 (CD25^{high}, горен десен квадрант).

3.3.7. Статистически методи

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

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

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

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

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

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

Изполвахме тестове за асоциации: χ^2 (хи-квадрат) тест за независимост и пермутационен тест на Фишер като непараметрични методи за анализ на номинални данни.

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

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

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

4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

4.1. Изследване на нови имунологични показатели в имунодиагностиката на SSc

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

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

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

Положителни АНА бяха намерени при 86 (94.5%) от пациентите със SSc (табл.13), което отговаря на докладваните до момента резултати от литературата (*Steen 2005, Walker et al. 2007, Mehra et al. 2013*). *Villalta et al. 2012* съобщават за положителни АНА при 89% от изследваната италианска кохорта от пациенти със SSc, а при *Liaskos et al. 2017* процентът на АНА - положителните пациенти достига до 97.7%, при проведено проучване в гръцката популация от пациенти със SSc. От 86-те АНА - положителни пациенти, 77 (89.5%) имат потвърдени чрез имуноблот метод SSc - специфични АНА. Останалите 9 пациенти (10.5%) имат следното разпределение: при 7 болни (8.1% от всички АНА - положителни пациенти със SSc) не се открива нито едно SSc-специфично или друго АНА, изследвано чрез имуноблот метод; при останалите 2-ма болни (2.3% от всички АНА - положителни пациенти със SSc, единственото положително АНА е анти-Ro52, като прави впечатление фенотипното сходство между пациентите - женски пол, lcSSc и наличие на ИББ.

Подробна разбивка на АНА титъра и видовете имунофлуоресцентен образ (AC-светене), според ICAP, при изследваните от нас пациенти със SSc, е представена в Таблица 5. Прави впечатление, че мнозинството от пациентите (84) са с висок титър на АНА 1:640 или \geq 1:1280, а едва 2 (2.2%) от изследваните болни имат слабо положителни АНА.

Таблица 5. АНА титър и имунофлуоресцентен образ при пациентите със SSc. Данните са представени като брой (%)

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

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

- Изразено фино петнисто оцветяване, АС-4 на нуклеоплазмата на интерфазните клетки;
- Плътно и силно изразено фино петнисто оцветяване на кондензирания хроматин в митотичните клетки. В зависимост от серумното разреждане, митотичният хроматин може да свети хомогенно;

- Ярко светене на двойките точки (2) от т.нар. региони на нуклеоларния организатор (NOR), присъединени към кондензиращия хроматин в митотичните клетки;
- Слабо цитоплазмено светене на интерфазните (и митотичните) клетки, изобразяващо деликатната мрежа, излъчваща се от перинуклеарната област към плазмената мембрана;
- Вариращо оцветяване на нуклеолите, което може да се визуализира като пунктатно нуклеоларно или перинуклеоларно светене в интерфазните клетки. Нуклеоларното светене не е универсален белег на AC-29 (*Andrade et al. 2018*);

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

- Дифузно оцветяване на ядръцата (нуклеолите) на ядрата на всички интерфазни клетки;
 - Позитивни нуклеоли;
 - Негативни летки в митоза (метафаза, анафаза, телофаза);
 - Негативен митотичен апарат;
 - Негативна цитоплазма при всички клетки;
- **Таргетни автонтигени:** *PM/ScI-75, PM/ScI-100, Th/To, B23/nucleolin, Nop52/SC6;*

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

- Дискретни, едри точки (40-80 на клетка), разпилени в ядрата на интерфазните клетки;

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

➤ **Таргетни автонтигени: CENP-A/B;**

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

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

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

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

- Фино петнисто светене на всички ядра на интерфазните клетки с малък размер на точките;
- Негативни ядърца;

- Клетки в митоза (метафаза, анафаза, телофаза): Липса на оцветяване на хроматина на клетките в митоза. Наличие на „призрачни” клетки;
 - Негативен митотичен апарат;
 - Негативна цитоплазма при всички клетки;
- **Таргетни автонтигени: SS-A/Ro 60, SS-B/La, Mi-2, TIF1 γ , TIF1 β , Ku;**

При 5.5% от пациентите със SSc се наблюдаваше тufесто нуклеоларно оцветяване, класифицирано като AC-9 според ICAP което се определя по следния начин:

- Ядра на интерфазните клетки: Неравномерно оцветяване на ядрата в ядрата на интерфазните клетки и наличие на телца на Cajal;
 - Позитивни нуклеоли;
 - Перихромозомно оцветяване на метафазните плочки на клетките в митоза;
 - Негативен митотичен апарат;
 - Негативна цитоплазма при всички клетки;
- **Таргетни автонтигени: U3-snoRNP/fibrillarin;**

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

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

- Цитоплазмата на митотичните клетки може да бъде леко положителна;

➤ **Таргетни автоантигени: RNAP I, huBF/NOR90;**

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

- **Смесен тип светене включващ: АС-1, АС-6, АС-29**
- **Доказани специфични АНА: АТА, dsDNA, promyelocytic leukaemia protein (PML), soluble acidic protein 100 kDa (sp100);**
- **Смесен тип светене включващ: АС-29 и анти-Ro52 - подобно светене**
- **Доказани специфични ААт срещу: Scl-70, Ro52;**
- **Смесен тип светене включващ: АС-1, АС-9, АС-18, АС-19**
- **Доказани специфични ААт срещу: dsDNA, fibrillar, Rib-P**
- **Смесен тип светене включващ: АС-3 и неклассифицирано светене, вероятно дължащо се на анти-Ro52 ААт**
- **Доказани специфични ААт: CENP-B, Ro52**

По отношение на изследваната контролна група от пациенти с други СЗСТ, АНА - положителни бяха серумите на 18 лица (47%), като разпределението на

резултатите по титър на серумно разреждане, са представени в Таблица 6. При сравняване на процента АНА - положителни серуми, между двете групи изследвани пациенти, се наблюдаваше сигнификантна разлика в полза на пациентите със SSc (88% спрямо 47%, $p = 0.001$, $r = 0.63$). Следва да се отбележи, като лимитация на използвания от екипа ни подход, че изследваната контролна група от пациенти с други СЗСТ не беше равностойна по големина на групата от пациенти със SSc, както и, че не може да бъде възприета за репрезентативна, по отношение на всички СЗСТ, тъй като не бяха представени всички системни колагенози. Въпреки това, големината на ефекта (r) бе по-голяма от типичната, съгласно класификацията на Cohen, което говори за добра статистическа значимост на получения резултат. Прави впечатление, че, за разлика от пациентите със SSc, мнозинството от които (87.2% от всички АНА - положителни болни със SSc) имаха висок титър на АНА в серума, в контролната група, едва 11 (28.9%) бяха с АНА 1:640 или $\geq 1:1280$. Само 2.2% от пациентите със SSc имаха слабо положителни АНА (титър 1:320), докато в контролната група процентът възлизаше на 23.7%. Процентът АНА - отрицателни серуми при пациентите със SSc възлизаше на 5.5%, спрямо сигнификантно по-висок процент АНА - негативни серуми в контролната група (5.5% спрямо 47.4%, $p < 0.0001$).

Таблица 6. АНА титър при изследваната контролна група пациенти със СЗСТ. Данните са представени като брой (%)

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

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

- **Смесен тип светене включващ: AC-3, анти-Ro52 - подобно светене**
 - **Доказани специфични ААт срещу: CENP-B, Ro52;**
- **Смесен тип светене включващ: AC-1, AC-3, AC-4**
 - **Доказани специфични ААт срещу: dsDNA, CENP-B, Ro52, Ro60**

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

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

Често пъти, при изследване на пациенти със съмнение за SSc и/или припокриващи синдроми с други СЗСТ, екипът ни се натъкваше на ситуация, при която резултатът от АНА скрининга е положителен, във висок титър и с характерен имунофлуоресцентен образ, но класическите SSc-асоциирани АНА (АТА, АСА) са били негативни. Това важи с особена сила за ANoA, както става видно и от гореописаните резултати - общо 27.5% от АНА положителните SSc пациенти, включени в настоящото проучване, имат нуклеоларен тип АС-светене (АС-8, АС-9 и АС-10), като в мнозинството от случаите конкретното ААт не би могло да бъде уточнено посредством наличните до 2016 г. за рутинно изследване ELISA и имуноблот панели. До 2016 г. в България имаше възможност за изследване на АСА и АТА посредством ELISA метод, а чрез имуноблот метод, в рамките на няколко различни диагностични панела, можеха да се открият следните SSc-асоциирани АНА: АСА, АТА, анти-PM/ScI-75, анти-PM/ScI-100 и анти-Ku ААт. Изследването на голяма част от ANoA бе практически невъзможно, а за повечето от тях имаше вече достатъчно литературни данни, в подкрепа на значимостта им по отношение на типа кожно и органно засягане, както и за дългосрочната прогноза на пациентите. Всички тези съображения ни накараха да проведем пилотно за българската популация проучване на разширен панел от 13 асоциирани със SSc ААт, в комбинация с провеждането на АНА скрининг чрез ИИФ, резултатите от което са поместени по-долу.

Серумите на всички 91 пациента с диагноза SSc, заедно с контролната вътреболнична група, наброяваща 38 души, бяха изследвани за панел от 13 SSc-асоциирани ААт, чрез имуноблот метод Systemic Sclerosis (Nucleoli) Profile (IgG). За всяко едно от изследваните ААт беше изчислена

чувствителност (SE), специфичност (SP), положителна (PPV) и отрицателна предсказателна стойност (NPV), отношение на положителна вероятност (LR+), отношение на отрицателна вероятност (LR-), отношение на шансовете (OR) и критерия „хи квадрат“ на Пирсън (χ^2) за проверка на хипотези, като резултатите са представени в Таблица 7.

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

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

и отрицателна предсказателна стойност на изследвания разширен панел от SSc-асоциирани ААт.

Таблица 7. Предиктивна стойност на всяко едно от изследваните SSc - асоциирани ААт

	SE (%) (CI 95%)	SP (%) (CI 95%)	PPV (%) (CI 95%)	NPV (%) (CI 95%)	LR+ (CI 5%)	LR- (CI 95%)	OR (CI 95%)	χ^2	<i>p</i>
ATA	34.1% (25-45)	97.4 (87-99.9)	96.9 (81-99.5)	38.9 (35-43)	13.3 (1.9-94)	0.68 (0.58-0.8)	18.621 (2.43-34.6)	13.762	0.001
Анти-CENP-A	23.1 (14.9-33)	95 (83-99.4)	91.3 (72-98)	35.2 (32-38)	4.62 (1.2-19)	0.81 (0.71-0.9)	3 (0.96-9.52)	3.887	0.049
Анти-CENP-B	23.3 (15-33.4)	95 (83-99.4)	91.3 (72-98)	35.5 (33-39)	4.67 (1.2-19)	0.81 (0.7-0.9)	6.4 (1.42-28.8)	7.287	0.007
Анти-RNAP155	18.7 (11.3-28)	97.4 (87-99.9)	95 (70-99)	34 (31-36.4)	7.3 (1-53)	0.83 (0.8-0.96)	10 (1.3-78)	6.966	0.008
Анти-RNAP11	9.9 (4.6-18)	100 (96-100)	100 [^]	52.6 (51-54)	-	0.9 (0.8-0.96)	*	-	0.030*
Анти-PM/Scl-75	13.2 (7-22)	84.2 (68.8-94)	66.7 (44.8-83)	28.8 (26-32)	0.84 (0.3-2)	1 (0.9-1.2)	-	-	Ns.
Анти-PM/Scl-100	9.9 (4.6-18)	86.8 (72-95.6)	64.3 (39.2-83)	28.7 (26-32)	0.75 (0.3-2)	1 (0.9-1.2)	-	-	Ns.
Анти-NOR90	6.6 (2.5-13.8)	100 (91-100)	100 [^]	31 (30-32)	-	0.93 (0.9-0.99)	-	-	Ns.
Анти-TbTo	15 (10-16)	97 (89-99)	93 (67-99)	36 (33-37)	6.42 (0.9-13)	0.87 (0.84-1)	7.4 (0.93-58.6)	4.779	0.029
Анти-U3 RNP	7.7 (3.2-15.2)	100 (91-100)	100 [^]	31.2 (30-32.4)	-	0.92 (0.9-0.98)	-	1.632	Ns.
Анти-Ки	12.1 (6.2-20.6)	100 (91-100)	100 [^]	32.2 (31-34)	-	-	**	-	0.016**
Анти-Ro52	19.8 (12-29.5)	60.5 (43.4-76)	54.6 (40.4-68)	24 (19-29)	0.50 (0.3-0.9)	1.3 (1-1.8)	-	1.654	Ns.
Анти-PDGFR***	-	-	-	-	-	-	-	-	-

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

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

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

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

При 79 (91.9%) от серумите на пациентите със SSc, изследвани от нашия екип, поне 1 от 13-те SSc-асоциирани ААт беше положително. При изследване на АНА чрез ИИФ, 86 (94.5%) от същите пациенти имаха положителен АНА титър $\geq 1:160$, т.е. 7 от SSc пациентите имаха положителен резултат за АНА на ИИФ, но изцяло отрицателен имуноблот. Макар тези 7 пациента да не могат да послужат за репрезентативна извадка и без каквито и да били претенции за

статистическа значимост, на екипа ни направи впечателние, че 5 от тези 7 отрицателни по отношение и на 13-те SSc-асоциирани ААт, имаха висок АНА титър $>1:1280$, АС-4 светене и пациентите споделяха сходен клиничен фенотип - lcSSc, ИББ, начална ПАХ и силно изразен васкулит с трудно повлияващи се терапевтично дигитални улцерации. Останалите 2-ма пациенти имаха АНА $>1:1280$, нуклеоларен тип светене и lcSSc без данни за висцерализация към момента на изследването. При гръцката кохорта, 83.3% от негативните при изследване чрез имуноблот пациенти са АНА - положителни на ИИФ. Логично обяснение на тази тенденция би дал фактът, че HEp-2 клетъчната линия съдържа 100 - 150 автоантигена, поради което фалшиво-отрицателни резултати при пациенти с клинично изяви системни колагенози са редки (*Eissfeller et al. 2005*). При италианската кохорта, изследвана от *Villalta et al. 2012*, 75.7% от пациентите са били положителни за поне едно от 13-те SSc-асоциирани ААт на имуноблот, а 89% са били с положителен АНА титър на ИИФ, което демонстрира сходна тенденция с получените от нашия екип резултати. Прави впечатление по-ниския процент пациенти, положителни за изследваните SSc-асоциирани ААт в италианската, спрямо българската кохорта. Резултатите на *Liaskos et al. 2017* най-много се доближават до получените от нашия екип. При гръцката кохорта 92.4% от SSc пациентите имат поне едно положително SSc-асоциирано ААт на имуноблот, а 97.9% от болните са АНА - положителни при изследване чрез ИИФ. При 3 (2.3%) пациента се наблюдава отрицателен АНА скрининг и изцяло отрицателен имуноблот, тенденция, потвърдена и от нашите резултати: 5 (5.5%) от нашите пациенти са „двойно-отрицателни“ за наличие на SSc - асоциирани АНА в серума (както при изследване чрез HEp-2 ИИФ, така и чрез имуноблот панел).

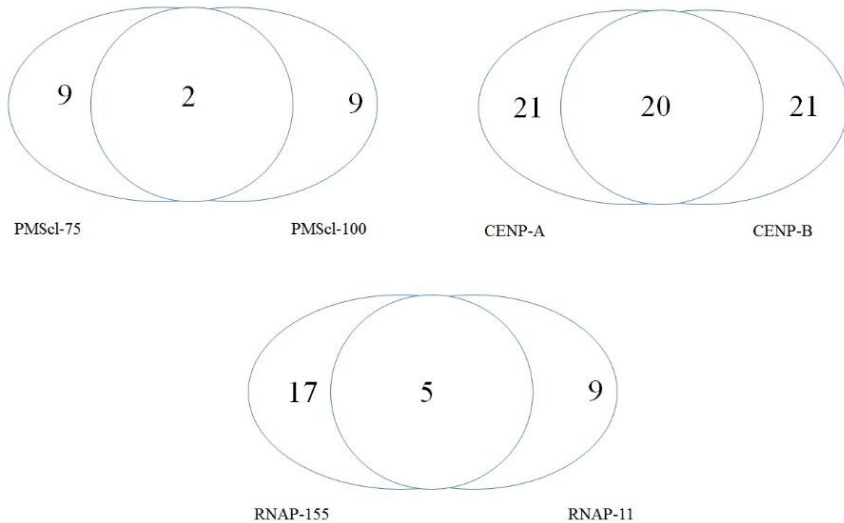
По отношение на най-често изследваните в ревматологичната практика SSc-асоциирани ААт - АТА и АСА, и в българската, и в италианската кохорта,

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

LR+, което представлява вероятността пациент със SSc да има положителен резултат за даденото ААт, сравнена с вероятността същият положителен резултат да бъде наблюдаван и при пациент без SSc, беше висока за АТА (13.3 пъти), анти-RNAP155 (7.3 пъти), анти-Th/To (6.42 пъти) и умерена за АСА

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

По отношение на ААт, насочени срещу различни субединици на един и същи таргетен автоантиген, нашият екип откри при 2-ма пациента едновременно наличие на анти-PM/Scl-75 и анти-PM/Scl-100 ААт, 20 от пациентите бяха едновременно положителни за анти-CENP-A и анти-CENP-B ААт и при 5 от болните се наблюдаваше припокриване на ААт, насочени срещу RNAP-11 и RNAP-155 субединиците на RNAP III комплекса (фиг. 6).



Фигура 6. Диаграма на Вен, илюстрираща едновременното наличие при част от SSc пациентите на ААт срещу двата таргетни епитопа на PM/Scl комплекса, RNAP III комплекса и ACA комплекса.

Обикновено, специфичните за заболяването ААт при SSc са взаимно изключващи се, което се потвърждава и от проучването на *Villalta et al. 2012*, с изключение на анти-PM/Scl-75 ААт, които авторите откриват да се “припокриват” заедно с ACA, при част от пациентите. В изследваната от нашия екип кохорта се наблюдава по-машабно „припокриване“ между отделните SSc-асоциирани ААт (табл. 8) Бихме могли да спекулираме, че това явление се дължи на различен генетичен терен при българските пациенти или на специфични епигенетични промени, но получените от нас резултати предполагат бъдещо задълбочено изследване на възможните етиологични фактори.

Таблица 8. В табличен вид е представен броя серуми на пациентите със SSc, положителни за SSc-асоцирани ААт. Представено е и едновременното наличие („припокриване“) на повече от едно SSc-асоцирани ААт в серумите на пациентите

	АТА	Анти- CENP-A	Анти- CENP-B	Анти- RNAP155	Анти- RNAP11	Анти- PM/Sc1-75	Анти- PM/Sc1-100	Анти- NOR90	Анти- TbTo	Анти- U3RNP	Анти-Ку	Анти-Ro52
АТА	27											
Анти- CENP-A	2	21										
Анти- CENP-B	2	20	21									
Анти- RNAP155	1	4	4	17								
Анти- RNAP11	1	1	0	5	9							
Анти- PM/Sc1-75	5	2	2	3	1	9						
Анти- PM/Sc1-100	1	2	2	3	1	2	9					
Анти- NOR90	6	3	3	3	-	-	-	6				
Анти- TbTo	2	6	6	7	1	3	3	4	13			
Анти- U3 RNP	-	1	2	3	1	1	1	1	4	7		
Анти-Ку	1	1	1	3	2	1	2	1	3	1	11	
Анти- Ro52	3	7	7	3	1	3	3	3	4	1	2	18
Анти- PDGFR+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

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

Най-голям брой от тестираните серуми бяха положителни за АТА: 27 (29%). АТА бяха установени в комбинация с почти всички автоантитела с изключение на анти-fibrillarin и анти-PDGFR ААт. Най-голям брой от АТА - положителните серуми бяха едновременно положителни и за анти-NOR90

ААт: 6 (22%) и за анти-PMScI-75 ААт - 5 (18%). Следващи по честота бяха анти-CENP-A - 21 (23%) и анти-CENP-B - 21 (23%) положителните серуми. Двадесет серума бяха позитивни едновременно за анти-CENP-A и анти-CENP-B ААт.

Най-голям брой от анти-CENP-A и анти-CENP-B положителните серуми „припокриваха“ ААт срещу Th/To - 6 (29%) и анти-Ro52 - 7 (33%). 17 (18%) от тестираните пациентски серуми бяха положителни за анти-RNAP155 ААт. Най-голям брой от тях бяха едновременно положителни и за анти-Th/To ААт - 7 (41%). Серумите, положителните за анти-Ro-52 бяха 18 (19%). 13 (14%) от изследваните пациентски серуми бяха положителни за ААт срещу Th/To, а по 9 (10%) серума бяха положителни съответно за наличието на: анти-RNAP11, анти-PM/ScI-75 и анти-PM/ScI-100. Анти-RNAP11, анти-PM/ScI-75 и анти-PM/ScI-100 се комбинираха с почти всички ААт, освен с анти-NOR90 ААт.

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

В таблица 9 са представени изследваните от нашия екип асоциации между SSc-асоциираните ААт, кожното и органното засягане при SSc. Представените отношения на шансовете (OR) са коригирани по пол и възраст, т.е. отразяват промяната в относителния шанс за наличието на определена кожна форма или

органно засягане при пациент, положителен за даденото ААт, спрямо пациент от същия пол и на същата възраст, но отрицателен за същото ААт.

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

Предвид факта, че АСА и АТА биват положителни при половината от болните със SSc, представляват сериозен интерес клиничните асоциации между останалите SSc-асоциирани ААт и различните форми на заболяването, както и с възможните таргетни органи. Нашите резултати показаха различни клинични асоциации за ААт, насочени срещу двете субединици на RNAP III: анти-RNAP11 се асоциира със сърдечно засягане, докато анти-RNAP155 се свързва с бъбречно засягане. С бъбречно засягане се асоциират също и анти-fibrillarin ААт, както и анти-PM/Scl-100.

Прави впечатление, че и при анти-PM/Scl ААт, както и при тези срещу RNAP III и АСА, двете субединици имат различни клинични корелации. Лимитация на проведеното от нашия екип проучване е броя включени пациенти със SSc и теоретично е възможно при увеличаване на броя болни да се промени тенденцията отделните субединици на един и същи таргетен автоантиген, да се асоциират с различно органно засягане.

Таблица 9. Асоциация между двете форми на кожно засягане, както и между видовете органно засягане с изследваните SSc - асоциирани ААт

ААт	lcSSc	dcSSc	Бъбречно засягане	ИББ	ПАХ	Сърдечно засягане	ГИТ засягане
	OR (CI 95%) <i>p</i> value [†]	OR (CI 95%) <i>p</i> value [†]	OR (CI 95%) <i>p</i> value [†]	OR (CI 95%) <i>p</i> value [†]	OR (CI 95%) <i>p</i> value [†]	OR (CI 95%) <i>p</i> value [†]	OR (CI 95%) <i>p</i> value [†]
АТА		13.1 (4.9-26) < 0.0001 ^a	4.8 (1.6-14) 0.006 ^a	Ns.	Ns.	Ns.	0.19 (0.038-0.948) 0.043 ^b
Анти- CENP-A	12.7 (2.3-21) < 0.0001 ^a	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.
Анти- CENP-B	12.9 (2.4-21.2) < 0.0001 ^a	Ns.	Ns.	0.17 (0.06-0.54) 0.003 ^b	Ns.	Ns.	Ns.
Анти- RNAPI55	Ns.	Ns.	5.3 (0.87-32) 0.069 ^a	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.
Анти- RNAPI11	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	8 (0.0-70) 0.061 ^a	Ns.
Анти- PM/Scl-75	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.
Анти- PM/Scl-100	Ns.	Ns.	12 ^a (1.53-20) 0.19	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.
Анти-NOR90	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.
Анти-Th/To	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	20 ^a (10-30) 0.029
Анти-U3RNP	Ns.	Ns.	0.5 ^b (0.3-0.7) 0.038	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.
Анти-Ку	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.
Анти-Ro52	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.
Анти- PDGFR***	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.	Ns.

[†]Two-tailed *p* value (Wald test).

^a Положителна сигнификантна асоциация

^b Отрицателна сигнификантна асоциация

Ns. Несигнификантна разлика

Прави впечатление, че и при анти-PM/Scl ААт, както и при тези срещу RNAP III и ACA, двете субединици имат различни клинични корелации. Лимитация на проведеното от нашия екип проучване е броя включени пациенти със SSc и теоретично е възможно при увеличаване на броя болни да

се промени тенденцията отделните субединици на един и същи таргетен автоантиген, да се асоциират с различно органично засягане. Последната значима асоциация, която открихме, е тази между анти-Th/To ААТ и ГИТ - засягане, която може да се определи като особено силна. Подобна клинична асоциация не е съобщавана до момента в литературата и този факт донякъде се дължи на ниската честота на разпространение на анти-Th/To ААТ. В гръцката кохорта на *Liaskos et al.* няма нито един положителен от общо 131 изследвани болни, а в италианската кохорта на *Villalta et al. 2012* едва 7/210 са положителни за анти-Th/To ААТ. При изследваните от нас пациенти, 13 (14%) от пациентите позитивират ААТ срещу Th/To, което, макар и косвено, дава основание да се спекулира, че честотата на разпространение на това ААТ сред българската популация, е по-висока.

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

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

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

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

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

4.2. Проучване на нови патогенетични механизми при SSc

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

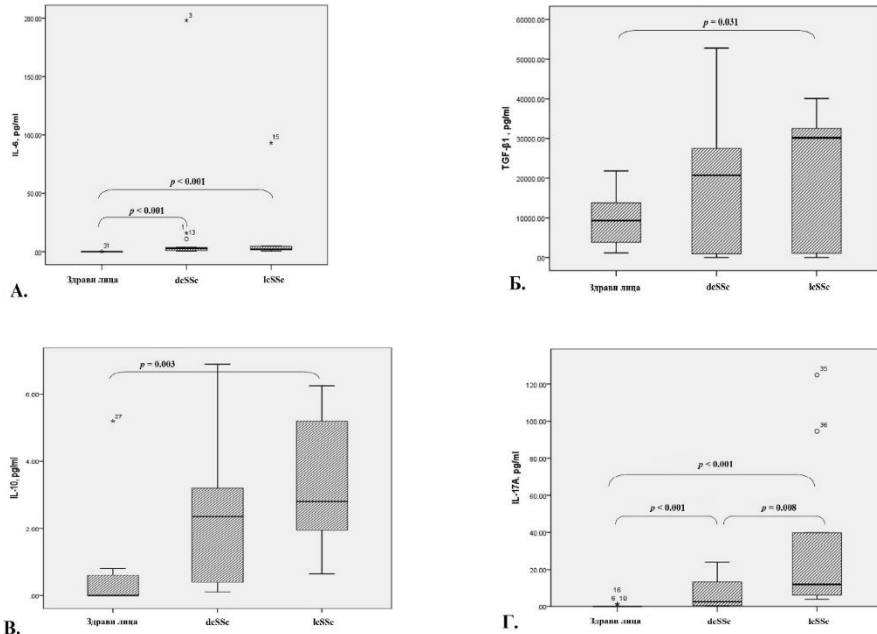
Цитокините и растежните фактори са основни регулатори на процесите на имунна активация, ремоделиране на съдовата стена и ексцесивна продукция на екстрацелуларен матрикс, които са ключови събития в патогенезата на SSc. Цитокините модулират както междуклетъчните взаимоотношения, така и взаимодействието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

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

Таблица 10. Циркулиращ цитокинов профил при пациентите със SSc и при здравите лица. Данните са представени като средна \pm SE (Range) и медиана [IQR] (Range)

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

По отношение на типа кожно засягане, IL-6, TGF- β , IL-10 и IL-17A в серума на пациентите с lcSSc бяха завишени, спрямо здравите контроли, както следва: IL-6 (2.08 [1.51 - 4.69] *спрямо* 0.00 pg/ml, $p < 0.001$), TGF- β 1 (22.82 \pm 4.99 ng/ml *спрямо* 10.03 \pm 2.25 ng/ml, $p = 0.031$), IL-10 (3.32 \pm 0.59 pg/ml *спрямо* 0.68 \pm 0.51 pg/ml, $p = 0.003$) и IL-17A (14.50 [8.55 - 41.65] pg/ml *спрямо* 0.00 [0.00 - 0.05] pg/ml, $p < 0.001$). Нещо повече, открихме значително увеличение на серумния IL-17A при пациенти с lcSSc *спрямо* dcSSc (31.99 \pm 13.29 pg/ml *спрямо* 7.14 \pm 3.01 pg/ml, $p = 0.008$). При пациентите с dcSSc бяха намерени завишени серумни нива на IL-17A и IL-6, *спрямо* здравите контроли, както следва: IL-17A (2.60 [0.45 - 9.80] pg/ml *спрямо* 0.00 [0.00 - 0.05] pg/ml, $p < 0.001$), IL-6 (2.80 [1.03 - 7.23] pg/ml *спрямо* 0.00 pg/ml, $p < 0.001$). Данните са представени на Фигура 7.



Фигура 7. Сравнение на серумните нива на циркулиращите цитокини между lcSSc (n = 11) и dcSSc (n = 13) и спрямо здравите лица (n = 16). Боксплотовете са представени като средна стойност ± стандартно отклонение (SD). **А.** Повишен IL-6 при lcSSc спрямо здравите лица, $p < 0.001$. Повишен IL-6 при dcSSc спрямо здравите лица, $p < 0.001$. **Б.** Повишен TGF-β1 при пациентите с lcSSc спрямо здравите лица, $p = 0.031$. **В.** Увеличен IL-17A, при lcSSc спрямо dcSSc, $p = 0.008$, и спрямо здравите лица, $p < 0.001$; Увеличен IL-17A при dcSSc спрямо здравите лица, $p < 0.001$. **Г.** Увеличен IL-10, при lcSSc спрямо здравите лица, $p = 0.003$.

Цитокините TGF-β и IL-10 се произвеждат от Tregs, които от своя страна са задължителни за установяването на имуен толеранс. TGF-β е основен регулатор на фибротичния процес и промените в TGF-β - сигналните пътища са добре описани при SSс (*Varga et Abraham 2007*). TGF-β подпомага фиброзата чрез стимулиране на синтеза и потискане на разграждането на

екстрацелуларния матрикс (*Varga et Abraham 2007*). В същото време, TGF- β също участва в генерирането на периферни Tregs (*Yamagiwa et al. 2001*). Друга особеност на TGF- β е, че е въввлечен в генерирането на две функционално противоположни Т-клетъчни субпопулации - Th17 клетките и Tregs, и в зависимост от присъствието в средата на проинфламаторни цитокини, като IL-6 и IL-1, определя съдбата на Т-клетките, изложени на TGF- β (*Fenoglio et al. 2011*). По този начин, едновременното присъствие на TGF- β и IL-6 в кожни инфилтрати от пациенти със SSc може да благоприятства генерирането на Th17 клетки за сметка на Tregs, което води до пълно изменение на хомеостатичното равновесие. *Dziadzio et al. 2005* не откриват разлика в нивата на TGF- β между lcSSc и dcSSc. Въпреки това, пациентите с dcSSc имат по-ниски нива на активен TGF- β в сравнение с пациентите с lcSSc или здравите контроли. При dcSSc, серумните активни нива на TGF- β корелират отрицателно с mRSS и положително с давността на заболяването (*Dziadzio et al. 2005*). *Dantas et al. 2016* намират значително по-високи серумни нива на TGF- β при пациенти със SSc, отколкото при здрави контроли, което кореспондира и с резултатите, получени от нашия екип. Пациентите с повишени серумни нива на TGF- β по-често страдат от dcSSc, дигитални улцерации и ИББ, като авторите намират асоциация и с положителни АТА и по-висок mRSS (*Dantas et al. 2016*). Ние не открихме сигнификантна разлика в нивата на TGF- β между двете форми на SSc, нито описаните от *Dantas et al. 2016* клинични асоциации, като отчитаме факта, че изследваната от нас кохорта от пациенти със SSc е относително малка и при набиране на по-голяма група от пациенти е възможно да бъдат намерени клинични асоциации.

Нашите резултати по отношение на IL-10 потвърждават получените от други групи, които го намират увеличен в серума на SSc пациенти (*Hasegawa et al. 1997, Gourh et al. 2009*). *Sziksz et al. 2015* съобщават, че IL-10

(самостоятелно или в комбинация с IFN- γ) има инхибиторна функция по отношение на фибротичния процес при SSc. В същото време, има данни, че повишените серумни нива на IL-10 и IL-6 корелират положително с ИББ и mRSS на пациентите със SSc (*Sato et al. 2001*), макар нашият екип да не намери такива клинични корелации.

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

IL-17 е индуктор на повърхностната експресия на ICAM-1 и VCAM-1 от ендотелните клетки и фибробластите в кожата и индуцира производството на IL-1 и IL-6 (*Fossiez et al. 1996, Kurasawa et al. 2000*). IL-17 също така увеличава производството на провъзпалителни цитокини като CCL2, IL-6, IL-8 от кожни и белодробни синовиоцити и фибробласти (*Fossiez et al. 1996, Yamamoto et al.*

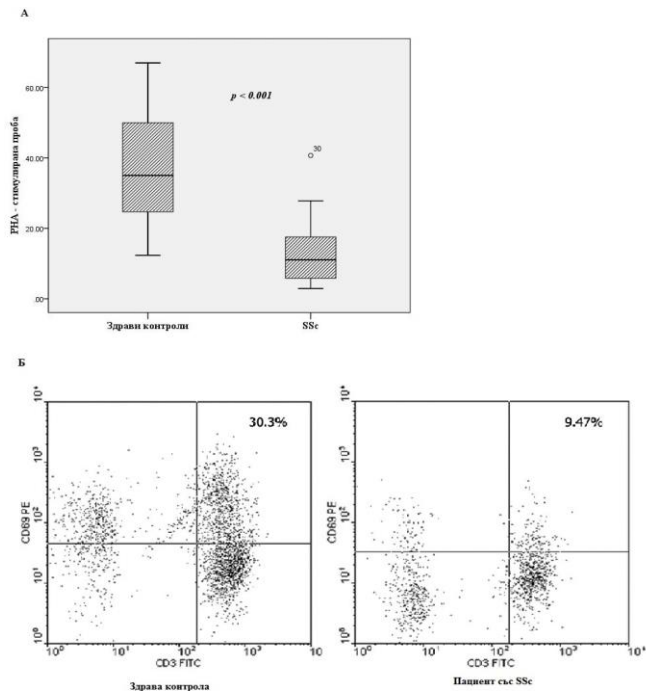
2001). По отношение на фибротичния процес при SSc, IL-17 инхибира отлагането на колаген от тип I и тип III (*Fossiez et al. 1996, Kurasawa et al. 2000, Brembilla et al. 2013*) и намалява производството на съединително-тъканен растежен фактор (CTGF) чрез повишена регулация на miR-129-5p в дермалните фибробласти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

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

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

При изследване на „спонтанна“ Т-клетъчна активация не открихме значими разлики в процента на ранните активирани Т клетки ($CD3^+CD69^+$) в нестимулирани проби от периферна кръв между здрави лица и пациенти със SSc, нито с определна форма на SSc. Въпреки това, $CD4^+CD25^+$ лимфоцитите, които се считат за активирани клетки, бяха представени в статистически намален процент при пациентите, в сравнение с контролната група ($p = 0.016$, табл. 11). По отношение на фенотипа на заболяването, пациентите с dcSSc бяха с по-нисък процент на $CD4^+CD25^+$ Т клетки спрямо здравите индивиди ($5.95 \pm 0,89\%$ спрямо $9.36 \pm 1.08\%$, съответно, $p = 0.025$).

Във PHA - стимулираните проби, $CD3^+CD69^+$ Т клетките бяха представени в намален процент при пациентите, в сравнение със здравите контроли ($13.35 \pm 2,90\%$ спрямо $37.0 \pm 2.33\%$, $p < 0,001$) (фиг. 8). Що се отнася до lcSSc и dcSSc, екипът ни не намери разлика между двата фенотипа, нито в сравнение със здравите лица.



Фигура 8. Намален процент на CD3⁺CD69⁺ клетки след стимулация с PMA-M в периферна кръв на пациенти със SSc, в сравнение със здрави контроли. А: Процент на CD3⁺CD69⁺ клетки във PMA-стимулирани проби от SSc пациенти ($n = 24$) и здрави контроли ($n = 16$), както следва: $13.35 \pm 2.90\%$ срещу $37.03 \pm 2.33\%$, $p < 0.001$. Боксплотозите представят средна стойност \pm SD. В: Показана е PMA - стимулирана проба от един представителен субект от всяка група. Изобразен е процентът CD69⁺ клетки в целия T клетъчен пул (CD3⁺ клетки).

Би могло да се допусне, че периферният циркулиращ цитокинов профил при нашите SSc пациенти може да е отговорен за намалената активационна способност на T клетките. Данните на нашия екип показват повишени нива на IL-10, TGF- β и IL-6 в периферната кръв на пациенти със SSc и всички тези цитокини са ангажирани директно или непряко в процеса на потискане на T

клетъчното активиране. IL-10 е плейотропен цитокин с важни противовъзпалителни и имунорегулаторни функции, който инхибира активността на Th1 клетките (*O'Garra et Vieira 2007, Ng TH et al. 2013*). Освен толерогенните дендритни клетки, Tregs, B клетките, NK клетките, неутрофилите, както и макрофагите могат да бъдат източник на IL-10. Ролята на Th2 клетките, които произвеждат IL-10, също е добре установена (*Chaudhry et al. 2011*). Но скорошни данни парадоксално показват, че Th1 и Th17 клетките са способни също да секретират IL-10. Смята се, че тези "двойствени по природа" Т клетъчни субпопулации използват секрецията на IL-10, за да потиснат тяхната собствена провъзпалителна активност - директно или съвместно с толерогенни антиген-представящи клетки (*O'Garra et Vieira 2007*).

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

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

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

От друга страна, периферната Т клетъчна анергия след РНА-стимулация при нашите пациенти със SSc може да се дължи на приложената имunosупресивна терапия. Повечето от пациентите, включени в проучването, са били подложени на лечение с глюкокортикоиди (GCs).

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

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

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

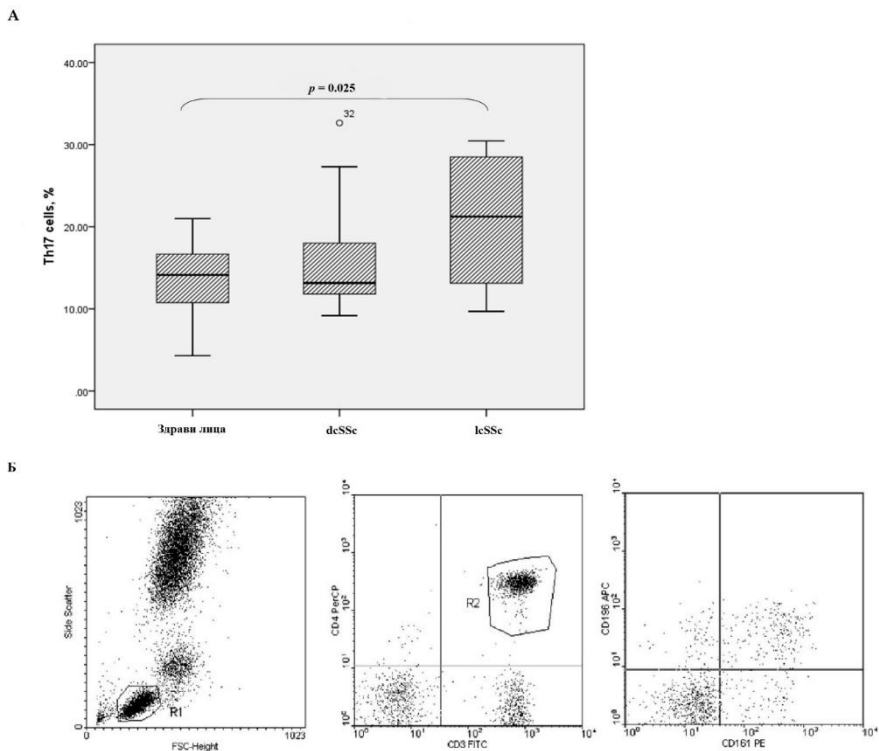
Въпреки безспорния принос на натрупаните до момента научни данни относно имунопатогенезата на SSc, все още много въпроси остават без отговор. Сред тях са: кое точно дава началото на автоимунния процес, какви са причините за преобладаването на Th2 имунния отговор, както и да бъдат определени имунологичните различия между дифузната и ограничената форма на SSc. Необходимо е натрупване на допълнителни научни данни и задълбочено изследване на фенотипа на Т-клетките, въввлечени в имунопатогенезата на SSc, както и дали тези субпопулации реално са израз на транзиторни състояния или представляват терминално-диференцирани клетки, особено по отношение на проинфламаторните Th17 клетки и на Tregs, чиято роля при SSc е все още неизяснена. Поради тези причини екипът ни се насочи към изследване баланса между Th17 и Tregs в периферната кръв на пациенти със SSc и да потърси връзка с типа кожно и органно засягане. На таблица 11 са представени обобщено резултатите за всяка една от изследваните Т хелперни субпопулации, при пациенти със SSc и при здрави лица, които ще бъдат разгледани поотделно по-долу.

Таблица 11. Т-хелперни субпопулации при пациентите със SSc и при здравите лица. Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка (SE)

Т субпопулация (%)	клетъчна	Пациенти със SSc	Здрави лица	Сигнификантност, <i>p</i>
Th17		18.13 \pm 1.55 (9.18 – 32.64)	13.73 \pm 1.21 (4.30 – 20.99)	0.031
CD4+Foxp3+		14.24 \pm 1.39 (5.68 – 28.73)	11.04 \pm 1.22 (3.55 – 20.84)	Ns.
CD4+CD25-Foxp3+		10.22 \pm 1.21 (2.09 – 23.09)	6.88 \pm 0.91 (1.42 – 12.79)	0.052
CD4+CD25+Foxp3+		4.02 \pm 0.52 (0.71 – 10.77)	4.16 \pm 0.53 (2.08 – 8.05)	Ns.
CD4+CD25+		6.30 \pm 0.68 (1.40 – 13.36)	9.36 \pm 1.08 (2.84 – 19.6)	0.016

4.2.3.1. Th17 лимфоцити

По отношение на Th17 лимфоцитите открихме увеличен процент Th17 клетки при пациентите със SSc, спрямо здравите контроли ($p = 0.031$, табл. 19). Освен това, Th17 клетките бяха процентно увеличени при пациентите с lcSSc, спрямо контролната група ($20.46 \pm 2.41\%$ спрямо $13.73 \pm 1.21\%$, $p = 0.025$) (фиг. 9). Не намерихме разлика между пациентите, по отношение на двете форми на кожно засягане - lcSSc и dcSSc.



Фигура 9. А. Увеличен процент Th17 клетки при пациентите с lcSSc, спрямо здравите лица. Боксплотовете са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение (SD). **Б.** На фигурата е представен репрезентативен пациент с lcSSc. Гейтираща стратегия: Първоначално се гейтира върху лимфоцитния облак, определен по физични параметри (вляво). Вторият гейт се поставя върху $CD3^+CD4^+$ клетките (в средата). Th клетките, които двойно експресират на повърхността си CD161 и CD196 (R3, горен десен квадрант), са дефинирани като Th17 лимфоцити.

Един от най-значимите резултати, получени от нашия екип, е увеличеният процент Th17 лимфоцити и завишените серумни нива на респективния им цитокин, IL-17, при пациентите със SSc. Th17 клетките, описани за първи път през 2005 г, продуцират IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, и IL-26 и осигуряват масивен проинфламаторен отговор (*Korn et al. 2009*). Направените до момента проучвания показват, че Th17 клетките са въввлечени в патогенезата на аутоимунни заболявания като астма, ревматоиден артрит, мултипленна склероза, псориазис, graft versus host disease (GVHD) (*Hemdan et al. 2010*). Th17-диференциацията се благоприятства от IL-23, в кооперация с IL-6 и TGF- β , посредством увеличена продукция на IL-22 (*Manel et al. 2008*). За да определим популацията от Th17 лимфоцити, използвахме описан от няколко екипа подход, включващ повърхностно маркиране на периферната кръв с моноклонални антители, насочени срещу: CD3; CD4; лектин-подобния рецептор CD161 (IL-17-продуциращите клетки произхождат от наивни CD161⁺CD4⁺ Т лимфоцити); и срещу хемокиновия рецептор CD196 (CCR6), експресиран от всички Th17 клетки (*Annunziato et al. 2007, Cosmi et al. 2008, Singh et al. 2008*). Голяма част от проведените до момента проучвания съобщават за увеличение на Th17 клетките в периферната кръв на пациенти със SSc, спрямо здрави лица (*Radstake et al. 2009, Fenoglio et al. 2011, Rodriguez-Reyna et al. 2011, Truchetet et al. 2011*), което отговаря на получените от нашия екип резултати. *Kurasawa et al. 2000* описват свръхпродукция на IL-17 в периферната кръв, кожен биоптат и бронхоалвеоларен лаваж на пациенти със SSc, което предполага централната роля на IL-17 в патогенезата на SSc. Смята се, че IL-17 е ключов цитокин особено в ранните стадии на заболяването, когато усилюва фибробластната пролиферация, продукцията на IL-1 и експресията на адхезионни молекули върху ендотелните клетки. Нашият екип не установи значими разлики в серумните нива на IL-17 през различните

стадии на SSc, но съобщаваме за първи път в литературата за значима разлика в серумните нива на IL-17 в зависимост от типа кожно ангажиране, намирайки IL-17 сигнификантно завишен в периферната кръв на пациенти с lcSSc спрямо dcSSc.

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

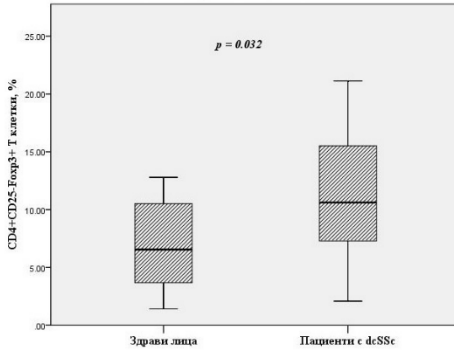
Дали Th17 cells и IL-17 могат да упражняват индиректен профибротичен ефект, чрез взаимодействието между ендотелни и епителни клетки или посредством увеличаване продукцията на про-ангиогенни фактори, като IL-8 и CCL-2, предстои да бъде изяснено. Обект на бъдещи изследвания е и ролята на Th17 клетките в образуването на автоантитела при SSc. При животински модели е установено, че IL-17 спомага за образуването на автоантитела при BXD2-миши модел, чрез организиране на спонтанното формиране на автореактивни герминативни центрове (*Hsu et al. 2008*).

4.2.3.2. Treg лимфоцити

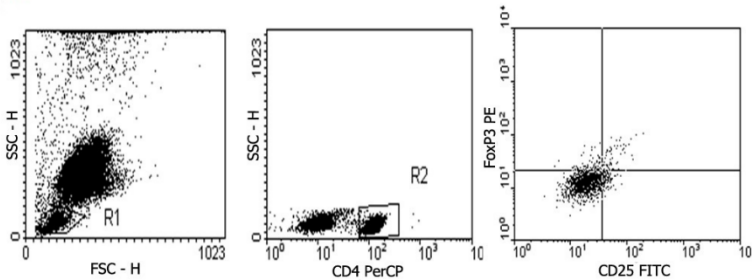
Екипът ни не откри сигнификантна разлика по отношение на общата популация $CD4^+Foxp3^+$ клетки между пациенти и здравите лица. Бе отчетена тенденция към покачване процента на тези клетки при пациентите с dcSSc спрямо контролите ($14.73 \pm 1.71\%$ спрямо $11.04 \pm 1.22\%$, $p = 0.083$). Установихме гранично увеличен процент $CD4^+CD25^-Foxp3^+$ Т клетки при пациентите със SSc, спрямо контролите ($p = 0.052$, табл. 11), а сигнификантно повишение на $CD25^-$ Tregs бе отчетено при пациентите с dcSSc, в сравнение с контролната група ($10.94 \pm 1.65\%$ спрямо 6.88 ± 0.91 , $p = 0.032$), но не и спрямо пациентите с lcSSc (фиг. 10).

Не намерихме разлика и по отношение на „класическите“ Tregs $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Т клетки, нито при сравнение на пациентите със здравите лица, нито между lcSSc и dcSSc (табл.11).

А



Б



Фигура 10. А. Увеличен процент $CD4^+CD25-Foxp3^+$ Т клетки при пациентите с dcSSc ($n = 13$), спрямо здравите лица ($n = 16$), съответно, $10.94 \pm 1.65\%$ vs $6.88 \pm 0.91\%$, $p = 0.032$. Боксплотовете са представени като средни стойности \pm SD. **Б.** Фенотипно определяне на $CD4^+CD25^{+/-}FoxP3^+$ Т лимфоцити. На фигурата е представен репрезентативен пациент с dcSSc. Първоначално се гейтира върху лимфоцитния облак, определен по физични параметри (вляво). Вторият гейт се поставя върху $CD4^+$ клетките (в средата). Десният плот е гейтиран по логичен гейт, направен чрез комбинация между гейт едно и гейт две. Наблюдават се (вдясно) две субпопулации $CD4^+FoxP3^+$ клетки, като се счита, че класическите Tregs са с висока експресия на CD25 (CD25 high, горен десен квадрант).

Освен Th17 лимфоцитите, Tregs вероятно също играят ключова роля в патогенезата на SSc, имайки предвид, че Tregs имат критично значение за

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

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

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

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

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

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

добре известно е, че много други клетъчни популации могат да бъдат източник на IL-10.

Нашият екип установи увеличен процент на CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ Т клетки при пациентите с dcSSc спрямо здравите лица. Скорошно проучване съобщава за увеличен процент CD25⁻ негативни CD4⁺Foxp3⁺ Т клетки в периферна кръв на пациенти със СЛЕ (*Lin et al. 2007, Zhang et al. 2008, Suen et al. 2009*). Описано е, че както CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ Tregs, така и CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs при пациенти със СЛЕ, демонстрират сходен профил по отношение на експресията на CD62L, CD95, GITR, CD127, и CTLA-4 - типични маркери за фенотипа на Tregs (*Yan et al. 2009*). Според *Yan et al. 2009* CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ Т клетките притежават значителна супресорна активност, сравнима с тази на класическите Tregs (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Т клетки). Съществува и друга хипотеза по отношение на тази клетъчна популация - CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ Т клетките биха могли да представляват периферен резервоар за Tregs (*Yan et al. 2009*). В случай на автоимунна реактивация, както при пациентите със СЛЕ, CD25⁻ негативните Foxp3⁺ Т клетки, могат да си възвърнат експресията на CD25, в опит да компенсират хомеостатичния дисбаланс, изместен в посока агресивна експанзия на автореактивни Т и В клетки. Трето проучване намира CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ Т клетките за функционално некомпетентни при пациенти със СЛЕ (*Walker et al. 2009*).

При изследваните от екипа ни пациенти с dcSSc, пулс-терапията с глюкокортикостероиди би могла също да обясни увеличения процент CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ Т клетки в периферната циркулация. При пациенти с РА, лекувани с ГКС, е докладвано увеличение на CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ Т клетките, като е установена обратнопропорционална зависимост с клиничните параметри (*de Paz et al. 2012*). Пациентите с РА, носители на вискоекспресиращ генотип за IL-10 демонстрират завишени CD4⁺CD25⁻

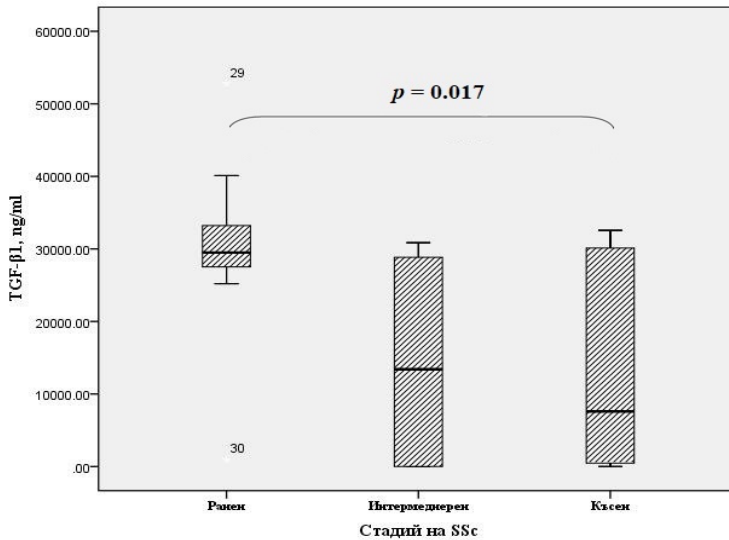
Foxp3⁺ Т клетки, което кореспондира и с установените от нашия екип резултати при пациентите със SSc (*de Paz et al. 2012*).

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

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

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

Висцерално засягане имаше при 12 от пациентите, както следва: ПАХ, $n = 1$; ИББ, $n = 7$; езофагеален дисмотилитет (esophageal dysmotility, ED), $n = 5$; SRC, $n = 1$ (табл. 3). Не бяха намерени разлики при изследваните имунологични показатели между пациентите с и без висцерално засягане.



Фигура 11. Сравнение на серумните нива на TGF-β1 между трите стадия от развитието на SSc. Боксплотове са представени като средна стойност ± стандартно отклонение (SD). Наблюдават се завишени серумни нива на TGF-β1 при пациентите с ранен стадий на SSc, спрямо късния стадий, независимо от клиничната форма на заболяването, $p = 0.017$.

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

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

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

5. ИЗВОДИ:

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

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

5.2. Изводи относно имунопатогенетичната част от дисертационния труд:

1. Получените от екипа резултати, относно увеличения процент Th17 и CD4⁺CD25⁻FoxP3⁺ Т клетки в периферната циркулация на пациенти със SSc, дават основание да се предположи, че двете Т клетъчни популации играят ключова роля в патогенезата на SSc.
2. Повишените серумни нива на IL-17A при пациентите с lcSSc, спрямо тези с dcSSc хвърлят светлина върху бъдещи възможности за терапия на lcSSc, посредством използването на анти-IL17A човешко моноклонално антитяло.

3. Циркулиращият цитокинов профил вероятно повлиява Т клетъчните популации при пациенти със SSc, както и баланса между Th17/Tregs.
4. Цитокиновото обкръжение, както и употребата на глюкокортикостероиди биха могли да бъдат фактор, повлияващ Т клетъчната активация при пациенти със SSc.

6. Приноси

6.1. Научно-теоретични:

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

6.2. Методични:

1. Валидиран е имуноблот метод за изследване на 13 SSc-асоциирани А Ат.

6.3. Научно-приложни:

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

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

➤ Публикации, реализирани във връзка с дисертационния труд:

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

➤ Монографии, учебници, ръководства

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

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

1. **Е. Krasimirova**, D. Kalinova, Ts. Velikova, K. Tumangelova-Yuzeir, E. Ivanova-Todorova, V. Reshkova, A. Kopchev, R. Rashkov, D. Kyurkchiev. New approaches for immunological testing of patients with Systemic sclerosis. V II-ма Работна среща "Експериментални модели и методи в биомедицинските изследвания", проведена в Института по експериментална морфология, патология и антропология с музей - БАН, 16-18 май 2016 г.
2. Е. Иванова-Тодорова, Ц. Великова, К. Тумангелова-Юзеир, **Е. Красиминова**, Д. Кюркчиев. Международен консенсус относно антинуклеарните антитела: нови подходи в тълкуването на цитоплазмени и митотичния тип светене. Юбилейна научна конференция "10 години Българска асоциация по клинична имунология" 28-29.10.2016, София, Шератон Хотел Балкан.
3. **Е. Krasimirova**, D. Kalinova, Ts. Velikova, K. Tumangelova-Yuzeir, E. Ivanova-Todorova, V. Reshkova, A. Kopchev, R. Rashkov, D. Kyurkchiev. An extended autoantibody profile in the diagnostics of systemic sclerosis. Oral and poster presentation at 8yh EFIS-EJI South East European Immunology School *SEEIS 2016), 14-17.10. 2016, Durres, Albania.
4. **Е. Красиминова**, Д. Калинова, Ц. Великова, К. Тумангелова-Юзеир, Е. Иванова-Тодорова, В. Решкова, Р. Рашков, Д. Кюркчиев. Разширен панел от автоантитела подобрява имунодиагностиката и клиничното проследяване при пациенти със системна склероза. Юбилейна научна конференция "10 години Българска асоциация по клинична имунология" 28-29.10.2016, София, Шератон Хотел Балкан.
5. **Ekaterina Krasimirova**, Tsvetelina Velikova, Ekaterina Ivanova-Todorova, Kalina Tumangelova-Yuzeir, Desislava Kalinova, Vladimira Boyadzhieva, Nikolay Stoilov, Tsvetelina Yoneva, Rasha Rashkov and Dobroslav Kyurkchiev. Alterations of Tregs and Th17 cell populations and serum levels of their respective cytokines in peripheral blood of Systemic sclerosis patients – poster and e-poster presentation. 4th International Congress on Controversies in Rheumatology & Autoimmunity, CORA 2017, Bologna, Italy, 9-11 March, 2017.
6. Ekaterina Ivanova-Todorova, Kalina Tumangelova-Yuzeir, Tsvetelina Velikova, **Ekaterina Krasimirova**, Dobroslav Kyurkchiev. International consensus on anti-nuclear antibodies patterns: standartization of nuclear, cytoplasmic and mitotic patterns on hep-2 cells. National conference of Rheumatology 11-14 may 2017 Aheloy, Bulgaria. Rheumatology Vol.XXV, №1/2017: 10-11.
7. **Ekaterina Krasimirova**, Tsvetelina Velikova, Ekaterina Ivanova-Todorova, Kalina Tumangelova-Yuzeir, D. kalinova, V. Boyadzhieva, N. Stoilov, Ts Yoneva, R. Rashkov, Dobroslav Kyurkchiev. Up-regulated peripheral cd4+cd25-foxp3+ cells along with pronounced Th17 circulating profile in patients with ssc. National Conference of Rheumatology 11-14 may 2017 Aheloy, Bulgaria. Rheumatology Vol.XXV, №1/2017: 12-13. oral presentation.
8. **Е. К. Куртева**, G. Vassilev, M. Ivanova, E. Ivanova-Todorova, K. Tumangelova-Yuzeir, V. Boyadzhieva, N. Stoilov, R. Stoilov, D. Kyurkchiev. Adipose-derived mesenchymal stem cells alter the Th17/Tregs axis in patients with Rheumatoid arthritis yet not in patients with Systemic sclerosis - preliminary data, Poster presentation. European Congress of Immunology ECI, Amsterdam, 2-5 September 2018.

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

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

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

1. **Участник** в Конкурс „ГРАНТ - 2015” на МУ-София ДОГОВОР №59/2015 г., ПРОЕКТ с вх. № 242/14.01.2015г. на тема: **“Оптимизиране имунологичната диагностика при различните форми на прогресивна системна склероза чрез изследване на широк набор от автоантитела”**. Отчетен с оценка „много добра“.

2. **Водещ изследовател** в Конкурс „Млад изследовател - 2017“ на МУ-София, ДОГОВОР № Д-140/02.05.2017 г., ПРОЕКТ с вх. № 8480/09.12.2016 г. на тема: **“ Изследване на фенотип и цитокинова секреция на Т-хелперните субпопулации Th17 и Tregs при пациенти със системна склероза**. Отчетен с оценка „много добра“.

➤ **Други:**

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