

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

д-р Васил Венциславов Василев

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

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

за

присъждане на образователна и научна степен
„доктор”

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

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

Научна специалност: 03.01.15. Нефрология

София, 2018

На Димитър Чукуров

СЪДЪРЖАНИЕ

Използвани съкращения	6
I. Увод	9
II. Цел и задачи	11
III. Литературен обзор	12
3.1. Системен еритематозен лупус и лупусна нефропатия – същност, епидемиология, хистологични и клинично-лабораторни аспекти, диагностика	12
3.2. Роля на комплемента в имунопатогенезата на системния еритематозен лупус и лупусната нефропатия	27
3.3. Автоантитела срещу компоненти на каскадата на комплемента при системен еритематозен лупус и лупусна нефропатия	42
Изводи	53
IV. Материал и методи	55
4.1. Материал	55
4.1.1. Пациенти	55
4.1.2. Контролна група донори на плазми	57
4.2. Методи	58
4.2.1. Клинични изследвания	58
4.2.2. Стандартни лабораторни изследвания	59
4.2.3. Стандартни имунологични изследвания	61
4.2.4. Хистоморфологични изследвания	62
4.2.5. Други клинични методи	65
4.2.6. Определяне на антикомплементните автоантитела	65
4.2.6.1. ELISA за определяне на anti-C1q	67
4.2.6.2. ELISA за определяне на anti-C1r, anti-C1s, anti-C4, anti-C3	67
4.2.7. Дизайн на изследването	67
4.2.8. Статистически методи за обработка на резултатите	68
V. Резултати	69
5.1. Автоантитела срещу C1q компонента на комплемента	69
5.1.1. Автоантитела срещу C1q и пола на пациентите с ЛН	71
5.1.2. Автоантитела срещу C1q и възрастта на пациентите с ЛН	71
5.1.3. Автоантитела срещу C1q и давността на ЛН	72
5.1.4. Автоантитела срещу C1q и основни клинично-лабораторни параметри на ЛН	73
5.1.4.1. Автоантитела срещу C1q и протеинурия	73
5.1.4.2. Автоантитела срещу C1q и уринен седимент	75
5.1.4.3. Автоантитела срещу C1q и бъбречна функция	78
5.1.4.4. Автоантитела срещу C1q и комплексната клинично-лабораторна оценка на активността на ЛН	80
5.1.4.5. Автоантитела срещу C1q и комплексната оценка на ЛН (категиите) по BILAG Renal score	83
5.1.5. Автоантитела срещу C1q и някои основни имунологични маркери при ЛН	87
5.1.5.1. Автоантитела срещу C1q и нива на комплемента C4 и C3	87
5.1.5.2. Автоантитела срещу C1q и антинуклеарни автоантитела (ANA)	93
5.1.5.3. Автоантитела срещу C1q и автоантитела срещу двойноверижна ДНК (anti-dsDNA)	95
5.1.6. Автоантитела срещу C1q и някои хистологични признаци на ЛН	99
5.1.6.1. Автоантитела срещу C1q и хистологичният клас на ЛН	99
5.1.6.2. Автоантитела срещу C1q и основни хистологични лезии за активност и хроничност на ЛН	103
5.1.7. Прогностично значение и динамика на промените в нивата на автоантителата срещу C1q	106
5.1.7.1. Прогностично значение на автоантителата срещу C1q	107
5.1.7.2. Динамика на автоантителата срещу C1q във връзка с някои лабораторни и имунологични показатели при пациентите с ЛН	111
5.1.7.2.1. Динамика на автоантителата срещу C1q и протеинурията	111
5.1.7.2.2. Динамика на автоантителата срещу C1q и бъбречната функция	114
5.1.7.2.3. Динамика на автоантителата срещу C1q и компонентите на комплемента C4 и C3	115
5.1.7.2.4. Динамика на автоантителата срещу C1q и антинуклеарните автоантитела (ANA)	117
5.1.7.2.5. Динамика на автоантителата срещу C1q и автоантителата срещу двойноверижна ДНК (anti-dsDNA)	118
5.1.8. Автоантитела срещу C1q и някои аспекти на лечението при пациентите с ЛН	120
Изводи	126
5.2. Автоантитела срещу C1r компонента на комплемента	128
5.2.1. Автоантитела срещу C1r и пола на пациентите с ЛН	129

5.2.2. Автоантитела срещу C1g и възрастта на пациентите с ЛН	130
5.2.3. Автоантитела срещу C1g и давността на ЛН	131
5.2.4. Автоантитела срещу C1g и основни клинично-лабораторни параметри на ЛН	132
5.2.4.1. Автоантитела срещу C1g и протеинурия	132
5.2.4.2. Автоантитела срещу C1g и уринен седимент	133
5.2.4.3. Автоантитела срещу C1g и бъбречна функция	135
5.2.4.4. Автоантитела срещу C1g и комплексната клинично-лабораторна оценка на активността на ЛН	137
5.2.4.5. Автоантитела срещу C1g и комплексната оценка на ЛН (категиите) по BILAG Renal score	139
5.2.5. Автоантитела срещу C1g и някои основни имунологични маркери при ЛН	142
5.2.5.1. Автоантитела срещу C1g и нива на комплемента C4 и C3	142
5.2.5.2. Автоантитела срещу C1g и антинуклеарни автоантитела (ANA)	145
5.2.5.3. Автоантитела срещу C1g и автоантитела срещу двойноверижна ДНК (anti-dsDNA)	146
5.2.6. Автоантитела срещу C1g и някои хистологични признаци на ЛН	147
5.2.6.1. Автоантитела срещу C1g и хистологичният клас на ЛН	148
5.2.6.2. Автоантитела срещу C1g и основни хистологични лезии за активност и хроничност на ЛН	149
5.2.7. Прогностично значение и динамика на промените в нивата на автоантителата срещу C1g	152
5.2.7.1. Прогностично значение на автоантителата срещу C1g	153
5.2.7.2. Динамика на автоантителата срещу C1g във връзка с някои лабораторни и имунологични показатели при пациентите с ЛН	158
5.2.7.2.1. Динамика на автоантителата срещу C1g и протеинурията	158
5.2.7.2.2. Динамика на автоантителата срещу C1g и бъбречната функция	159
5.2.7.2.3. Динамика на автоантителата срещу C1g и компонентите на комплемента C4 и C3	161
5.2.7.2.4. Динамика на автоантителата срещу C1g и антинуклеарните автоантитела (ANA)	162
5.2.7.2.5. Динамика на автоантителата срещу C1g и автоантителата срещу двойноверижна ДНК (anti-dsDNA)	163
5.2.8. Автоантитела срещу C1g и някои аспекти на лечението при пациентите с ЛН	165
Изводи	169
5.3. Автоантитела срещу C1s компонента на комплемента	171
5.3.1. Автоантитела срещу C1s и пола на пациентите с ЛН	172
5.3.2. Автоантитела срещу C1s и възрастта на пациентите с ЛН	173
5.3.3. Автоантитела срещу C1s и давността на ЛН	174
5.3.4. Автоантитела срещу C1s и основни клинично-лабораторни параметри на ЛН	175
5.3.4.1. Автоантитела срещу C1s и протеинурия	175
5.3.4.2. Автоантитела срещу C1s и уринен седимент	176
5.3.4.3. Автоантитела срещу C1s и бъбречна функция	177
5.3.4.4. Автоантитела срещу C1s и комплексната клинично-лабораторна оценка на активността на ЛН	179
5.3.4.5. Автоантитела срещу C1s и комплексната оценка на ЛН (категиите) по BILAG Renal score	181
5.3.5. Автоантитела срещу C1s и някои основни имунологични маркери при ЛН	184
5.3.5.1. Автоантитела срещу C1s и нива на комплемента C4 и C3	184
5.3.5.2. Автоантитела срещу C1s и антинуклеарни автоантитела (ANA)	186
5.3.5.3. Автоантитела срещу C1s и автоантитела срещу двойноверижна ДНК (anti-dsDNA)	187
5.3.6. Автоантитела срещу C1s и някои хистологични признаци на ЛН	189
5.3.6.1. Автоантитела срещу C1s и хистологичният клас на ЛН	189
5.3.6.2. Автоантитела срещу C1s и основни хистологични лезии за активност и хроничност на ЛН	191
5.3.7. Прогностично значение и динамика на промените в нивата на автоантителата срещу C1s	193
5.3.7.1. Прогностично значение на автоантителата срещу C1s	195
5.3.7.2. Динамика на автоантителата срещу C1s във връзка с някои лабораторни и имунологични показатели при пациентите с ЛН	199
5.3.7.2.1. Динамика на автоантителата срещу C1s и протеинурията	199
5.3.7.2.2. Динамика на автоантителата срещу C1s и бъбречната функция	200
5.3.7.2.3. Динамика на автоантителата срещу C1s и компонентите на комплемента C4 и C3	202
5.3.7.2.4. Динамика на автоантителата срещу C1s и антинуклеарните автоантитела (ANA)	203
5.3.7.2.5. Динамика на автоантителата срещу C1s и автоантителата срещу двойноверижна ДНК (anti-dsDNA)	204
5.3.8. Автоантитела срещу C1s и някои аспекти на лечението при пациентите с ЛН	206
Изводи	210
5.4. Автоантитела срещу C4 компонента на комплемента	212
5.4.1. Автоантитела срещу C4 и пола на пациентите с ЛН	213
5.4.2. Автоантитела срещу C4 и възрастта на пациентите с ЛН	214
5.4.3. Автоантитела срещу C4 и давността на ЛН	215

5.4.4. Автоантитела срещу C4 и основни клинично-лабораторни параметри на ЛН	216
5.4.4.1. Автоантитела срещу C4 и протеинурия	216
5.4.4.2. Автоантитела срещу C4 и уринен седимент	217
5.4.4.3. Автоантитела срещу C4 и бъбречна функция	218
5.4.4.4. Автоантитела срещу C4 и комплексната клинично-лабораторна оценка на активността на ЛН	220
5.4.4.5. Автоантитела срещу C4 и комплексната оценка на ЛН (категориите) по BILAG Renal score	222
5.4.5. Автоантитела срещу C4 и някои основни имунологични маркери при ЛН	225
5.4.5.1. Автоантитела срещу C4 и нива на комплемента C4 и C3	225
5.4.5.2. Автоантитела срещу C4 и антинуклеарни автоантитела (ANA)	228
5.4.5.3. Автоантитела срещу C4 и автоантитела срещу двойноверижна ДНК (anti-dsDNA)	230
5.4.6. Автоантитела срещу C4 и някои хистологични признаци на ЛН	232
5.4.6.1. Автоантитела срещу C4 и хистологичният клас на ЛН	233
5.4.6.2. Автоантитела срещу C4 и основни хистологични лезии за активност и хроничност на ЛН	234
5.4.7. Прогностично значение и динамика на промените в нивата на автоантителата срещу C4	237
5.4.7.1. Прогностично значение на автоантителата срещу C4	238
5.4.7.2. Динамика на автоантителата срещу C4 във връзка с някои лабораторни и имунологични показатели при пациентите с ЛН	243
5.4.7.2.1. Динамика на автоантителата срещу C4 и протеинурията	243
5.4.7.2.2. Динамика на автоантителата срещу C4 и бъбречната функция	244
5.4.7.2.3. Динамика на автоантителата срещу C4 и компонентите на комплемента C4 и C3	246
5.4.7.2.4. Динамика на автоантителата срещу C4 и антинуклеарните автоантитела (ANA)	248
5.4.7.2.5. Динамика на автоантителата срещу C4 и автоантителата срещу двойноверижна ДНК (anti-dsDNA)	249
5.4.8. Автоантитела срещу C4 и някои аспекти на лечението при пациентите с ЛН	251
Изводи	255
5.5. Автоантитела срещу C3 компонента на комплемента	257
5.5.1. Автоантитела срещу C3 и пола на пациентите с ЛН	258
5.5.2. Автоантитела срещу C3 и възрастта на пациентите с ЛН	259
5.5.3. Автоантитела срещу C3 и давността на ЛН	260
5.5.4. Автоантитела срещу C3 и основни клинично-лабораторни параметри на ЛН	261
5.5.4.1. Автоантитела срещу C3 и протеинурия	261
5.5.4.2. Автоантитела срещу C3 и уринен седимент	263
5.5.4.3. Автоантитела срещу C3 и бъбречна функция	264
5.5.4.4. Автоантитела срещу C3 и комплексната клинично-лабораторна оценка на активността на ЛН	266
5.5.4.5. Автоантитела срещу C3 и комплексната оценка на ЛН (категориите) по BILAG Renal score	268
5.5.5. Автоантитела срещу C3 и някои основни имунологични маркери при ЛН	272
5.5.5.1. Автоантитела срещу C3 и нива на комплемента C4 и C3	272
5.5.5.2. Автоантитела срещу C3 и антинуклеарни автоантитела (ANA)	276
5.5.5.3. Автоантитела срещу C3 и автоантитела срещу двойноверижна ДНК (anti-dsDNA)	279
5.5.6. Автоантитела срещу C3 и някои хистологични признаци на ЛН	281
5.5.6.1. Автоантитела срещу C3 и хистологичният клас на ЛН	281
5.5.6.2. Автоантитела срещу C3 и основни хистологични лезии за активност и хроничност на ЛН	283
5.5.7. Прогностично значение и динамика на промените в нивата на автоантителата срещу C3	285
5.5.7.1. Прогностично значение на автоантителата срещу C3	287
5.5.7.2. Динамика на автоантителата срещу C3 във връзка с някои лабораторни и имунологични показатели при пациентите с ЛН	291
5.5.7.2.1. Динамика на автоантителата срещу C3 и протеинурията	291
5.5.7.2.2. Динамика на автоантителата срещу C3 и бъбречната функция	292
5.5.7.2.3. Динамика на автоантителата срещу C3 и компонентите на комплемента C4 и C3	294
5.5.7.2.4. Динамика на автоантителата срещу C3 и антинуклеарните автоантитела (ANA)	295
5.5.7.2.5. Динамика на автоантителата срещу C3 и автоантителата срещу двойноверижна ДНК (anti-dsDNA)	296
5.5.8. Автоантитела срещу C3 и някои аспекти на лечението при пациентите с ЛН	298
Изводи	302
5.6. Значение на комбинации от автоантитела срещу различните компоненти на комплемента за оценка на лупусната нефропатия	304
5.6.1. Комбинацията от автоантитела срещу C1q и C3 и някои аспекти на ЛН	305
5.6.2. Комбинацията от автоантитела срещу C1q и C4 и някои аспекти на ЛН	309
5.6.3. Комбинацията от автоантитела срещу C1q и C1s и някои аспекти на ЛН	314
5.6.4. Комбинацията от автоантитела срещу C1q и C1r и някои аспекти на ЛН	319

Изводи	325
VI. Дискусия	327
VII. Обобщени основни изводи	341
VIII. Основни приноси на дисертационния труд	343
IX. Използвана литература	345
X. Списък на публикациите във връзка с темата на дисертационния труд	360

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ГБМ – гломерулна базална мембрана

ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина

ЕМ – електронна микроскопия (електронномикроскопско изследване)

ИФ – имунофлуоресцентна микроскопия

ЛН – лупусна нефропатия (лупусен нефрит)

ПББ – пункционна бъбречна биопсия

ПКК – пълна кръвна картина

РНК – рибонуклеинова киселина

СЗО – Световна здравна организация

СЛЕ – системен еритематозен лупус

СМ – светлинна микроскопия (светлинномикроскопско изследване)

ЦИК – циркулиращи имунни комплекси

ACR – American College of Rheumatology

aHUS – атипичен хемолитико-уремичен синдром

ANA – антинуклеарни антитела

Anti-C1-inh – антитела срещу C1-инхибитор

Anti-C1q – антитела срещу C1q

Anti-C1r – антитела срещу C1r

Anti-C1s – антитела срещу C1s

Anti-C2 – антитела срещу C2 компонента на комплемента

Anti-C3 – антитела срещу C3 компонента на комплемента

Anti-C4 – антитела срещу C4 компонента на комплемента

Anti-C5 – антитела срещу C5 компонента на комплемента

Anti-dsDNA – антитела срещу двойноверижна ДНК

Anti-FB – антитела срещу фактор В

Anti-FH – антитела срещу фактор Н

Anti-FI – антитела срещу фактор I

Anti-GBM – антигломерулобазалномембранни антитела
Anti-ghA – антитела срещу глобуларен фрагмент на А-веригата
Anti-ghB – антитела срещу глобуларен фрагмент на В-веригата
Anti-ghC – антитела срещу глобуларен фрагмент на С-веригата
Anti-MBL – антитела срещу мано-свързващ лектин
Anti-RNP – антирибонуклеопротеинови антитела
Anti-ssDNA – антитела срещу едноверижна ДНК
APL – антифосфолипидни антитела
BILAG – British Isles Lupus Assessment Group
C4BP – C4-свързващ протеин
CD – cluster of differentiation
CLR – колагеноподобен регион (на C1q)
CR – комплементен рецептор
CRP – C-реактивен протеин
DDD – болест на плътните отлагания
ECLAM – European Consensus Lupus Activity Measurement
EDTA – етилендиамин тетраацетат
eGFR – изчислена скорост на гломерулна филтрация
ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay
GHR – глобуларен регион (на C1q)
HIV – човешки вирус на имунния дефицит
HLA – човешки левкоцитен антиген
HUVS – хипокомплементичен уртикария васкулит – синдром
ICAM – междуклетъчна адхезионна молекула
Ig – имуноглобулин
IFN- α – интерферон-алфа
IL – интерлевкин
ISN – International Society of Nephrology
LPS – липополизахариди

MAC – мембранно-атакуващ комплекс

MASP – MBL-асоциирана серин-протеаза

MBL – манозо-свързващ лектин

MCP – мембранен кофакторен протеин

MHC – главен комплекс на тъканната съвместимост

NeF – нефритен фактор

NPV – негативна предиктивна стойност

n.s. (ns) – несигнификантно (незначимо)

PBS – фосфатно буфериран физиологичен разтвор

PPV – позитивна предиктивна стойност

RPS – Renal Pathology Society

SLAM – Systemic Lupus Activity Measure

SLEDAI – Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index

SLICC – Systemic Lupus International Collaborating Clinics

TNF- α – тумор-некротизиращ фактор – алфа

TTP – тромботична тромбоцитопенична пурпура

VCAM – съдовоклетъчна адхезионна молекула

VDRL – Venereal Disease Research Laboratory

I. УВОД

Системният еритематозен лупус представлява автоимунно заболяване, засягащо различни тъкани и органи в човешкия организъм. Характерна черта на това заболяване е производството на различни по епитопна специфичност автоантитела срещу собствени за организма антигени (ядрени, цитоплазмени, мембранни, плазмени гликопротеини и други). Често срещана проява на това мултиорганно заболяване е бъбречното засягане, известно като лупусна нефропатия (лупусен нефрит), която се разпознава клинично-лабораторно в една четвърт до една втора от пациентите при дебюта на заболяването и за която се установяват хистологични признаци при провеждане на пункционна бъбречна биопсия в над 95% от случаите със системен еритематозен лупус. В патогенетично, клинично, морфологично и прогностично отношение системният еритематозен лупус и лупусната нефропатия са по-скоро хетерогенна група сходни патологични състояния, отколкото отделна нозологична единица.

Лупусната нефропатия, която често води до развитие на бъбречна недостатъчност, определя дългосрочната прогноза при пациентите с това потенциално смъртоносно заболяване, които са основно жени в репродуктивна възраст (между 20 и 40 години). Това прави своевременната диагностична оценка на системният еритематозен лупус и лупусната нефропатия особено важна за изхода от това състояние. Лечението почти винаги е продължително, сравнително често е свързано с множество нежелани последствия за пациента и неговите близки и има значими финансови измерения.

Ролята на автоимунитета и загубата на имунен толеранс към собствените тъкани, особеностите на пола, предвид превалиращата заболяемост сред жените, ролята на различни инфекциозни причинители, ултравиолетовата светлина, някои генетични дефекти, свързани с унаследяване на предразположеност към развитие на това състояние безспорно имат своето място в представите за етиологията и патогенезата на системния еритематозен лупус. В последните 25 години се установиха редица факти, свързани с патогенезата на системния еритематозен лупус и лупусната нефропатия, които поставят системата на комплемента и патологичните отклонения в нейната функция на ключово място в развитието на автоимунния отговор. Патогенетичното значение на комплементната каскада за развитието на болестния процес е двустранно. От една страна, активирането на каскадата на комплемента от отложените в тъканите

имунни комплекси води до активиране и поддържане на автоагресията, а от друга – нарушенията във функцията на ранните компоненти на класическия път на каскадата на комплемента и особено на C1q стоят в основата на непълноценния клирънс на имунните комплекси от тъканите и до натрупване на автоантигени и развитие на автоимунен отговор. Програмираната клетъчна смърт (апоптозата), която е физиологичен процес и се извършва постоянно в човешкия организъм, за да може той да осъществява своите функции и да се развива, налага поддържане на постоянен надзор по отношение на апоптотичните клетки, тъй като те се превръщат в основен източник на автоантигени при автоимунни болестни състояния, каквото е системния еритематозен лупус. В клирънса на апоптотичните клетки отново основна роля има C1q.

Установяването на автоантитела срещу гликопротеините на комплементната каскада при пациентите със системен еритематозен лупус, сред които най-проучено до момента е антиятлото срещу C1q, показва, че системата на комплемента както основен компонент, организиращ правилното функциониране на вродения и придобития имунитет, може да бъде и обект на автоимунна агресиия при системен еритематозен лупус. Данните за наличие на генетични дефекти на компоненти на комплемента при болшинството от случаите на унаследено предразположение за развитие на системен еритематозен лупус са основание за множество изследвания на патогенетичната роля и на придобитите дефекти на комплементната система, значима част от които се явяват антикомплементните автоантитела. Все още, обаче остават неясни ролята и значението на автоантителата срещу други компоненти на комплементната каскада – част от класическия път за активиране на комплемента, на които е посветен настоящия труд.

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

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

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

За изпълнение на дефинираната цел бяха поставени следните задачи:

1. Да се проучи ролята на автоантителата срещу компоненти на каскадата на комплемента при пациенти с лупусна нефропатия чрез анализ на литературните данни.
2. Да се определи наличието и честотата на автоантителата срещу компоненти на каскадата на комплемента при пациенти с лупусна нефропатия.
3. Да се изясни връзката на автоантителата срещу компоненти на каскадата на комплемента с основни маркери за клиничко-лабораторна, имунологична и хистологична оценка на лупусната нефропатия.
4. Да се проследят в динамика нивата на автоантителата срещу компоненти на каскадата на комплемента, като се съпоставят с останалите маркери за комплексната оценка на лупусната нефропатия.
5. Да се определи диагностичното и прогностичното значение на автоантителата срещу компоненти на каскадата на комплемента при пациенти с лупусна нефропатия.
6. Да се проследи динамиката на нивата на автоантителата срещу компоненти на каскадата на комплемента в зависимост от проведеното лечение на пациентите.

III. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

3.1. СИСТЕМЕН ЕРИТЕМАТОЗЕН ЛУПУС И ЛУПУСНА НЕФРОПАТИЯ – СЪЩНОСТ, ЕПИДЕМИОЛОГИЯ, ХИСТОЛОГИЧНИ И КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНИ АСПЕКТИ, ДИАГНОСТИКА

Системният еритематозен лупус (СЛЕ) е хетерогенно, мултисистемно аутоимунно заболяване. [83] Бъбречното засягане в хода на СЛЕ, известно още като лупусна нефропатия (ЛН), е често и сериозно органно усложнение, определящо качеството на живот и прогнозата при пациентите със СЛЕ и се характеризира със специфични клинично-лабораторни и морфологични прояви. [12, 13, 47]

Сведения за клиничните прояви на синдромокомплекса, известен днес като системен еритематозен лупус, датират от времето на Хипократ. За първи път засягането на вътрешните органи в хода на СЛЕ е описано в началото на 19 век във Виена от Ferdinand von Hebra и Moritz Kaposi, за първи път терминът “lupus erythematosus” е използван от френския лекар Pierre Cazenave през 1851 г., а през 1902 г. в Лондон албуминурията се свързва с проява на СЛЕ. През 1946 г. Malcolm Hargraves публикува за първи път описание на LE-клетките, което дава възможност за надеждна и бърза диагностика на заболяването.

Голямото клинично значение на СЛЕ се определя от факта, че пациентите с ЛН имат потенциално фатален изход, а в същото време поставянето на диагнозата много често е трудно. Многообразната клинична картина на СЛЕ налага последният да присъства в диференциално-диагностичния план при всеки пациент с кожен обрив, фебрилитет, артрит, анемия, левкопения, тромбоцитопения, серозит, нефрит, гърчове, психоза, особено ако пациентът е жена в детеродна възраст. [14, 109] Множество проучвания, включително и в България през последните години, охарактеризираха клиничните, патогенетичните, хистологичните и прогностичните аспекти на ЛН. [1, 3, 17] Различни нарушения на регулацията на имунния отговор с продукция на широк спектър от аутоантитела, насочени към различни собствени антигени, са сред основните характеристики на СЛЕ и ЛН. [14, 109]

3.1.1. Епидемиология на системния еритематозен лупус и лупусната нефропатия

Съобщенията в литературата за честотата на СЛЕ се различават в зависимост от изследваната популация и от критериите, използвани за поставяне на диагнозата. В световен мащаб, честотата на СЛЕ през последните години се определя около 1 на 1000, като най-висока честота на СЛЕ се докладва сред афроамериканци – над 200 лица на 100 000 население. [65] В САЩ през 2004 г. е докладвана честота от 241 лица на 100 000 население, докато в Северноевропейските страни се докладва честота на СЛЕ от приблизително 40 лица на 100 000 население. [65, 83] Проучване от Бирмингам, Великобритания през 1995 г. установява честота на СЛЕ от 27,7 лица на 100 000 население. [65] Като цяло, данните посочват непрекъснато увеличаваща се честота на СЛЕ в световен мащаб, основна причина за което се изтъква увеличаващата се преживяемост на пациентите от една страна и подобряването на диагностичните възможности от друга. [140] Като цяло, заболяемостта от СЛЕ варира между 1,8 и 7,6 случая на 100 000 население. [14, 109, 117] СЛЕ засяга по-често жени в детеродна възраст, като отношението жени към мъже възлиза на 9-10:1 и протича по-тежко при деца и мъже. Пиковата заболяемост е между 20- и 40-годишна възраст. [27, 83] От 4-годишна преживяемост, възлизаща на 50% през петдесетте години на 20 век, последната е нарастнала на 15-годишна преживяемост от 80% към края на деветдесетте години на 20 век. [7] В наши дни 10-годишната преживяемост при пациентите със СЛЕ се определя средно на 70%. [105, 140] Вероятността за смърт в рамките на 15 години при диагностициран СЛЕ на 20-годишна възраст в наши дни все още остава приблизително 17%. [109] Съществува т. нар. бимодална структура на смъртността при пациентите със СЛЕ, установена през 1976 г., определяща се от основните причини за смърт – от една страна самото заболяване и инфекциите, възникващи в хода на неговото лечение сред по-младите пациенти, а от друга – острите съдови инциденти (сърдечни и мозъчни инфаркти) при по-възрастните пациенти с по-голяма продължителност на заболяването, с персистиращ нефротичен синдром, хронично бъбречно заболяване и дългогодишна имunosупресивна терапия. [50, 142]

При 25% до 50% от случайно подбрани пациенти със СЛЕ се установяват клинично-лабораторни данни за ЛН към момента на поставяне на диагнозата на СЛЕ, а около 60% от възрастните пациенти със СЛЕ развиват нефропатия по-късно в хода на системното заболяване. [12, 47, 117] За България се съобщават данни за установени

хистологични данни за ЛН при 268 от общо биопсирани с бъбречно заболяване 2566 пациенти за периода от 1997 г. до 2006 г. От установените пациенти с ЛН 243 са жени (90,7%) и 25 са мъже (9,3%). [2] По обобщени данни, честотата на ЛН, сред пациентите, при които е диагностициран СЛЕ, определена въз основа на клинично-лабораторни данни за бъбречно засягане, е между 60% и 80%, а определена на базата на патоморфологични данни за ЛН – между 80% и 100%. [5]

3.1.2. Хистологични аспекти на лупусната нефропатия

Хистологичната находка при ЛН е хетерогенна. Тази особеност личи при сравняване на морфологичната находка от пункционна бъбречна биопсия (ПББ) при различни пациенти с ЛН, а така също и при сравняване на отделни структури от хистологичния материал при изследване на биопсия от един пациент. Нещо повече, общоизвестен е фактът, че хистологичните лезии могат да се трансформират с времето при прогресия на заболяването, а така също и под въздействието на провежданото лечение. [12, 13, 32, 47]

Таблица 3.1. Класификация на ISN/RPS на лупусните нефрити (ЛН) от 2003 г. [47, 153, 154]

Клас ЛН	Описание
Клас I	Минимален мезангиален ЛН
Клас II	Мезангиален пролиферативен ЛН
Клас III	Огнищен (фокален) ЛН (засягащ под 50% от изследваните гломерули)
III (A)	С активни лезии
III (A/C)	С активни и хронични лезии
III (C)	С хронични лезии
Клас IV	Дифузен ЛН (засягащ 50% и повече от изследваните гломерули), който бива: сегментен (IV-S) и глобален (IV-G)
IV (A)	С активни лезии
IV (A/C)	С активни и хронични лезии
IV (C)	С хронични лезии
Клас V	Мембранозен ЛН
Клас VI	Напреднал склерозиращ ЛН (с 90% и повече глобално склеротични гломерули, без остатъчни активни лезии)

Хистологичната класификация на ЛН е претърпявала промени във времето. Понастоящем общоприетата класификация на ЛН, основаваща се на светлинно-микроскопско изследване (СМ), имунофлуоресцентно изследване (ИФ) и

електронномикроскопско изследване (ЕМ) на бъбречната тъкан, предоставя оптимални възможности за възпроизводимост и сравняване на данните, като предлага стандартизирани дефиниции за по-точни клиничко-морфологични изследвания. [47, 84, 85] Тази класификация е формулирана официално през 2003 г. от работни групи на International Society of Nephrology (ISN) и Renal Pathology Society (RPS) и е представена в оригинален вид на Таблица 3.1. Работните групи на ISN/RPS предлагат и съкратена класификация, отразяваща главните класове лупусна нефропатия, представена на Таблица 3.2.

Таблица 3.2. Съкратена класификация на ISN/RPS на лупусните нефрити от 2003 г. [154]

Клас I ЛН	Минимален мезангиален лупусен нефрит
Клас II ЛН	Мезангиален пролиферативен лупусен нефрит
Клас III ЛН	Огнищен (фокален) лупусен нефрит
Клас IV ЛН	Дифузен сегментен (IV-S) или глобален (IV-G) лупусен нефрит
Клас V ЛН	Мембранозен лупусен нефрит
Клас VI ЛН	Напреднал склеротичен лупусен нефрит

Стандартното описание на хистологичния материал предполага да се посочи броя (процента) гломерули с активни и хронични лезии, да се посочи броя (процента) гломерули с фибриноидна некроза и/или клетъчни полулуния, както и да се посочи степента (лека, средна и изразена) на тубулна атрофия, интерситциално възпаление, интерстициална фиброза, тежестта на атеросклерозата или на други съдови лезии. Дефинициите на отделните класове и подкласове ЛН са както следва.

Клас I ЛН (минимален мезангиален ЛН) се отнася до наличие на гломерули без видима патологична находка при изследване със СМ. При изследване с ИФ и ЕМ се установяват мезангиални имунни отлагания (депозити). [47, 153, 154]

Клас II ЛН (мезангиален пролиферативен ЛН) се отнася до наличие само на мезангиален хиперцелуларитет, изразен в различна степен, при изследване със СМ. Мезангиалният хиперцелуларитет е дефиниран като наличие на повече от 3 мезангиални клетки в мезангиалните области, отдалечени от съдовия полюс на гломерула, при дебелина на среза на хистологичния материал от 3 µm. При изследване с ИФ и ЕМ се установяват основно мезангиални имунни отлагания. Възможно е

наличие на оскъдни субендотелни и субепителни имунни отлагания при изследване с ИФ и ЕМ, които не са установими със СМ. [47, 153, 154]

Клас III ЛН (огнищен или фокален ЛН) се отнася до наличие на патологични гломерулни лезии, засягащи под 50% от изследваните гломерули в хистологичния материал. Това означава, че гломерули с интензивни патологични лезии могат да бъдат в съседство с гломерули с незначителни хистологични промени. Тези патологични огнищни лезии могат да бъдат сегментни, когато засягат под 50% от видимата на хистологичния срез площ на изследвания гломерул и глобални, когато засягат над 50% от видимата на хистологичния срез площ на изследвания гломерул. Могат да бъдат активни (пролиферативни и некротични), означавани като ЛН подклас III А, хронични (склеротични), означавани като ЛН подклас III С или комбинация от активни и хронични, означавани като подклас III А/С. Активните ендокapилярни лезии могат да се изразяват в пролиферация на мезангиални и ендотелни клетки, както и инфилтрация на гломерулите с моноцити и/или полиморфонуклеарни клетки. Активните екстракапилярни лезии могат да се изразяват в клетъчни (целуларни) полулуния. Активни лезии могат да са и фибриноидната некроза, кариорексисът или руптурата на гломерулната базална мембрана (ГБМ). Хроничните ендокapилярни лезии се изразяват в мезангиална склероза, а екстракапилярните хронични лезии – във фиброзни полулуния. [47, 153, 154] Патогномонични при ЛН са т. нар. хематоксилинови телца, които представляват ядрени базофилни остатъци с увреден хроматин в резултат от настъпила апоптоза на клетки и се установяват в зони с интензивна пролиферация или некроза. [47] Характерна активна лезия при ЛН, могат да бъдат интензивните субендотелни имунни депозити, които са установими при изследване със СМ, често означавани като „телени бримки“, тъй като придават задебелен, „ригиден“ изглед на капилярната стена, оприличаващ я на тел. Друга патогномонична находка при ЛН са т. нар. хиалинни тромби, които представляват ацидофилни интракапилярни маси, чиято природа също е на имунни отлагания. Обикновено горопесочените лезии се наблюдават като огнищно-сегментни. [47, 153, 154]

Клас IV ЛН (дифузен ЛН) се отнася до наличие на патологични гломерулни лезии, обхващащи 50% и повече от изследваните гломерули. [47] От своя страна клас IV ЛН може да бъде дифузен – сегментен (обозначаван като клас IV-S), когато патологичните лезии обхващат по-малко от 50% от площта на изследвания гломерул в плоскостта на хистологичния срез и дифузен – глобален (обозначаван като клас IV-G),

когато патологичните лезии обхващат повече от 50% от площта на изследвания гломерул в плоскостта на хистологичния срез. На практика, описаните по-горе при клас III ЛН активни лезии (ендокапилярни и екстракапилярни), каквито са мезангиалноклетъчната и ендотелноклетъчната пролиферация, инфилтрацията с левкоцити, фибриноидната некроза, кариорексисът, хематоксилиновите телца, хиалинните тромби, полулунията са характерни и за клас IV ЛН, като в този случай те обхващат 50% и повече от изследваните гломерули. При наличие на активни лезии, клас IV ЛН се означава като IV A. На свой ред, хроничните лезии, описани по-горе при клас III ЛН качествено присъстват и при клас IV ЛН, отново в случая засягайки 50% и повече от изследваните гломерули. При наличие на хронични лезии, клас IV ЛН се означава като IV C. Комбинацията от едновременно присъстващи активни и хронични лезии се означава като IV A/C [47, 153]. Като цяло, описаните хистологични лезии при клас IV ЛН са по-екстензивни, особено що се отнася до субендотелните депозити в периферните капилярни бримки. Имунни депозити с изследване с ИФ и ЕМ могат да се установяват мезангиално и по-рядко с по-малък интензитет субепително. [47, 84, 153, 154] При клас IV ЛН могат да бъдат налице хистологични лезии, сходни в голяма степен с лезиите при първичен мембранопролиферативен (мезангиокапилярен) гломерулонефрит с интерпозиция на мезангиални елементи (клетки и матрикс) между ендотелния слой и ГБМ, развитие на неомембрана, задебеляване на капилярната стена и изглед на двоен контур на капилярната стена при СМ след обработка със сребърна импрегнация. [47] Мембранопролиферативната хистологична находка налага ЛН винаги да присъства в диференциално-диагностичен план при пациенти с този хистологичен тип гломерулно увреждане. Дифузият ЛН е най-честата хистологична форма на ЛН за българската популация пациенти. [1]

Клас V ЛН (мембранозен ЛН) се отнася до наличие на дифузни глобални псевдолинеарни финогрануларни субепителни имунни отлагания, които оформят мембранозен хистологичен модел на патологичните лезии. [37, 47, 153, 154] В ранните фази на своето развитие, мембранозният ЛН може да няма доловими при изследване със СМ патологични лезии, а субепителните имунни отлагания да се установяват само с изследване с ИФ и ЕМ. [47] По-късните стадии от развитието на мембранозната ЛН се характеризират с формиране на епимембранозни шипчета, обграждащи имунните депозити и задебеляване на ГБМ, което обикновено е установимо при изследване със СМ особено при сребърна импрегнация (по Jones, по Wilder). При наличие на

ендокапилярни огнищни (фокални) или дифузни пролиферативни лезии, както и субендотелни имунни отлагания в комбинация с типичните мембранозни хистологични лезии, хистологичният клас ЛН се определя съответно като клас V+III ЛН и клас V+IV ЛН. [47, 153, 154] Поради факта, че субепителни отлагания, макар и по-рядко и с по-малък интензитет биха могли да се установят при класове III и IV ЛН, диагнозата клас V ЛН би следвало да бъде поставяна при изразен типичен мембранозен модел на патологичните лезии, особено при изследване с ИФ и ЕМ. Наличието на пролиферативни ендокапилярни хистологични лезии много често е диференциално-диагностичен признак, отличаващ мембранозния ЛН от първичната мембранозна нефропатия. Клас V ЛН може да показва и хронични склеротични лезии. [37, 47, 64]

Клас VI ЛН (напреднал склерозиращ ЛН) се отнася до наличие на 90% и повече глобално склерозирали гломерули в изследвания хистологичен материал. [47, 153] Често този хистологичен клас се означава като терминален стадий на ЛН, като понякога е невъзможна и етиологичната хистологична диагноза, ако липсват анамнестични, клиничко-лабораторни, имунологични данни за наличие на предхождащ СЛЕ или ЛН, а така също и при липса на остатъчни имунни отлагания. При клас VI ЛН липсват активни хистологични лезии. [47]

Освен гореупоменатите гломерулни лезии, при ЛН се установяват и извънгломерулни патологични промени в бъбречната тъкан, които се изразяват в тубулоинтерстициални хистологични лезии и съдови патологични промени. [6, 15, 19, 56, 102] Активните тубулоинтерстициални лезии включват интерстициален оток и интерстициално възпаление с инфилтрация от CD4+ Т-лимфоцити, CD8+ Т-лимфоцити, плазматични клетки и моноцити. [31] Рядка находка може да бъде некрозата на тубулни епителни клетки. Обикновено активните тубулоинтерстициални хистологични лезии са характерни най-често за класове III и IV ЛН [47]. Хроничните тубулоинтерстициални хистологични лезии се изразяват в тубулна атрофия и интерстициална фиброза. Налице са данни за обратна корелационна връзка между степента на тубулоинтерстициалните хистологични лезии и бъбречната преживяемост. [55]

Най-честите съдови патологични промени при ЛН са съдовите имунни грануларни отлагания в интимата и медията на малките артерии и артериолите, установявани най-често с ИФ и ЕМ. Те се установяват най-често при класове III и IV ЛН. Друг тип съдово засягане при ЛН е т. нар. невъзпалителна некротизираща

васкулопатия, изразяваща се в участъци на фибриноидна некроза на съдовите стени на артериолите, което води до тяхното стеснение и оклузия, без възпалителен левкоцитен инфилтрат, както при истински васкулит. Тази хистологична съдова находка е най-честа при агресивните форми на клас IV ЛН. [6, 15, 19] Находката, свързана с наличие на истински васкулит, подобен на полиангиит, с възпалителен левкоцитен инфилтрат на съдовата стена на артериолите и малките артериални клонове при пациенти с ЛН е сравнително рядка. Тя може да бъде израз както на бъбречно лимитиран васкулит, така и на генерализирано системно съдово заболяване в хода на СЛЕ – т. нар. вторичен васкулит. Едновременното засягане на съдовете и гломерулите в бъбрека може да е израз на тромботична микроангиопатия в хода на СЛЕ. Такава патология може да бъде свързана с вторичен антифосфолипиден синдром, атипичен хемолитико-уремичен синдром (aHUS) или тромботична тромбоцитопенична пурпура (TTP) – подобен синдром, свързан с автоантитела, насочени към протеазата, разграждаща фактора на von Willebrand. [6, 47, 130]

Имунните отлагания (депозити) в бъбречните структури се прецизират по вид с изследване с ИФ, а по ултраструктурна локализация и по интензитет с ЕМ и с ИФ. Отлаганията на Ig (имуноглобулин) G присъстват почти винаги и много често се установяват съвместно с IgA и IgM. Най-често установявани компоненти на комплементната каскада са C3 и C1q, а също така отложените имунни комплекси могат да съдържат и C4 и C2. Наличието в отложените имунни комплекси на три класа имуноглобулинови молекули и поне два компонента на комплемента се означава като ИФ-находка тип „full house”. [12] Отлаганията на фибрин са чести в областите на екстракапилярна пролиферация (полулунията) и зоните с фибриноидна некроза, а отлаганията на фибриноген говорят за възпалително-коагулационни микроваскуларни процеси в хода на СЛЕ. [47]

ЕМ-изследване установява типичен грануларен електронно плътен модел на отлаганията, установени с ИФ-изследване. Предимството на ЕМ се изразява в разкриване на ултраструктурата на имунните депозити. Някои отлагания могат да показват огнищна организация с формиране на т. нар. „пръстови отпечатъци”, съставени от линейно организирани полипептидни структури с дебелина около 10 до 15 nm в диаметър. [12, 13, 32, 47] Т. нар. тубулоретикуларни включвания (инклузии), състоящи се от разклоняващи се микротубуларни структури с диаметър около 24 nm могат да се установяват при СЛЕ и се разполагат в цистерните на ендоплазмената

мрежа на ендотелните клетки на гломерулните капиляри и останалите бъбречни съдове. Обикновено са индуцирани от действието на IFN- α и често се установяват при вирусни инфекции (в това число и с HIV). [12, 13, 32]

National Institute of Health (NIH) предлага широко прилагана схема за полуколичествена оценка на активните (потенциално обратими) и хроничните (необратими) хистологични лезии при ЛН. За определяне индекса на активност, на хистологичните лезии: ендокапилярна пролиферация; гломерулна левкоцитна инфилтрация; субендотелни депозити, формиращи телени бримки; фибриноидна некроза и/или кариорексис; клетъчни полулуния; интерстициално възпаление, се дава полуколичествена оценка от 0 (липсва) до 3+ (в изразена степен). [47, 119] Активните лезии с най-голяма степен на агресия като фибриноидната некроза и клетъчните полулуния имат двойна тежест във формирането на индекса на активност. Сумата от индивидуалните стойности на всяка активна лезия формира индекс на активност, който може да има стойност от 0 до 24. Индексът на хроничност се определя по аналогичен начин. На хроничните лезии: гломерулосклероза; фиброзни полулуния; интерстициална склероза и тубулна атрофия се дава полуколичествена оценка от 0 (липсва) до 3+ (в изразена степен), като сборът от отделните оценки формира индекса на хроничност, чиято стойност може да варира в диапазона от 0 до 12. [16, 47, 118, 119] Клинични проучвания показват данни за лоша 10-годишна бъбречна преживяемост при пациенти с висок индекс на активност (>12) и висок индекс на хроничност (>4). [16] В противовес на това, други няколко големи проучвания не потвърждават добра корелация между бъбречната преживяемост и индексите на активност и хроничност. [11, 118, 119] Основното предимство на системата за оценка на активността и хроничността при пациенти с ЛН е сравнимостта на данните при повторни бъбречни биопсии.

3.1.3. Клинични аспекти на лупусната нефропатия

Не са установени различия в клиничните прояви на ЛН при двата пола и в различни възрастови групи. [47, 109] Най-често се засягат бъбреците, ставите, кожата, серозните обвивки (плевра, перикард), централната нервна система. [47] ЛН може да дебютира в началото на поява на СЛЕ или да се развие по-късно в хода на системното заболяване, като следва продължителен курс най-често с редуване на обостряния и периоди на ремисии (пристъпно-ремитентен клиничен ход). Клиничният ход обичайно

корелира с хистологичния клас на ЛН, като определяща до голяма степен е гломерулната патология, въпреки че при наличие на доминиращи тубулоинтерстициални или съдови промени, клиничния ход се определя от водещите лезии. [6, 47, 130]

Клиничната картина при ISN/RPS клас I ЛН е оскъдна и често липсват клинично-лабораторни данни за бъбречно засягане. [47]

Пациентите с ISN/RPS клас II ЛН могат да имат имунологична активност, но обичайно протеинурията е нискостепенна – под 1,0 g/24 часа, липсва патологично активен уринен седимент, артериалната хипертония е рядка находка, а бъбречната функция е запазена. [47]

При ISN/RPS клас III ЛН клиничната картина се доминира най-често от нефритен синдром с активен уринен седимент, протеинурия над 1,0 g/24 часа и артериална хипертония. При 25% до 30% от пациентите с този клас ЛН е налице нефротичен синдром при дебюта на ЛН. Бъбречната функция може да бъде запазена или намалена при част от пациентите. Често са налице имунологични белези за активност, които не винаги корелират с хистологичната тежест на ЛН. [47, 80]

Клиничната картина при ISN/RPS клас IV ЛН обикновено се доминира от най-активни и тежки симптоми и признаци. При около 50% от пациентите е налице нефротичен синдром, а при всички пациенти с този клас ЛН е налице патологична протеинурия. Много често е налице патологично активен уринен седимент. Типична находка е артериалната хипертония и намалената бъбречна функция. Тези пациенти имат данни за имунологична активност. [47, 84]

При ISN/RPS клас V ЛН често е налице типична картина на нефротичен синдром. [37, 47] При около 40% от пациентите с този клас ЛН протеинурията е под 3,0 g/24 часа. Пациентите с мембранозна ЛН могат да се демонстрират с картина на идиопатичен нефротичен синдром, без други прояви на СЛЕ, като диагнозата ЛН се поставя въз основа на бъбречната биопсия. [84] Бъбречната недостатъчност не е типична находка, но може да присъства в клиничната картина. Налице е артериална хипертония. При този клас ЛН е най-висок рискът от тромботични усложнения като тромбоза на бъбречна вена, белодробен тромбемболизъм и други. Наличието на

пролиферативни лезии определя присъствието на съответните за пролиферативната хистология симптоми и признаци. [47, 130]

При ISN/RPS клас VI ЛН или т. нар. терминален стадий на ЛН е налице обикновено намалена бъбречна функция и артериална хипертония. Пациентите могат да имат микроскопска хематурия и протеинурия. [47] Хистологичните лезии обикновено не са активни, а клинично е налице най-често неимунологична прогресия на хроничното бъбречно заболяване (ХБЗ). Обичайно при пациентите с този клас ЛН белезите за имунологична активност се нормализират.

Някои автори дефинират понятието „тих (silent) лупусен нефрит”, при който липсват клинични симптоми и признаци за ЛН, а съществуват активни хистологични лезии при бъбречна биопсия. Предвид липсата на данни за бъбречно засягане в хода на СЛЕ, в този случай, провеждането на бъбречна биопсия не е показано, поради което описаните в литературата случаи на тих лупусен нефрит са сравнително малко. [37]

3.1.4. По-често използвани серологични тестове за диагностична оценка на лупусната нефропатия

3.1.4.1. Антинуклеарни антитела (ANA)

Всяко антитяло, насочено към ядрен антиген е антинуклеарно антитяло (ANA). [41] Сред огромния брой автоантитела, установявани при пациенти със СЛЕ и ЛН, антинуклеарните антитела (ANA) и в частност антителата срещу двойноверижна ДНК (anti-dsDNA) са включени като отделен самостоятелен диагностичен критерий на American College of Rheumatology (ACR) за поставяне на диагнозата системен еритематозен лупус. [135, 147] ANA се отличават с висока чувствителност, като се установяват при повече от 90% от пациентите със СЛЕ, които не са били подложени на имunosупресивно лечение. [14, 32, 111] ANA нямат висока специфичност при СЛЕ, тъй като се установяват и при други автоимунни заболявания, поради което имат ниска позитивна предиктивна стойност (PPV) за СЛЕ, особено ако са в ниски титри. [41] Липсват данни за силни корелации на нивата на ANA с наличието или с тежестта на ЛН. [14, 32, 109] Най-честите скринингови тестове за определяне на ANA са индиректната имуофлуоресцентна методика (IIF) върху чернодробна тъкан от плъх или върху тъкан от човешки епителни клетки (Hep-2 cells). [41]

3.1.4.2. Антитела срещу двойноверижна ДНК (anti-dsDNA)

Anti-dsDNA са с по-висока специфичност от ANA, но са с по-малка чувствителност в диагностиката на СЛЕ. [14, 109, 147] Anti-dsDNA от клас IgG, които могат да фиксират комплемента, имат най-силна корелация с наличието на ЛН и са установявани в гломерулните имунни отлагания при пациенти с ЛН. [14, 81, 109, 134] Високите титри на високоафинитетните anti-dsDNA корелират добре с клиничната активност на ЛН. [14, 63, 109, 147] Основните диагностични лабораторни тестове за определяне на anti-dsDNA са dsDNA ELISA (най-разпространен), но съществува имунофлуоресцентен тест, основан на ДНК в кинетопласт на едноклетъчното *Crithidia luciliae*, т. нар. CLIF-тест, както и Fagт имунопреципитационен тест. [41] Като златен стандарт за определяне на специфични за СЛЕ и клинично релевантни anti-dsDNA се приема тестове с ELISA, основани на Fagт-радиоимуноанализ с плазмидна ДНК като антиген. [63]

3.1.4.3. Антитела срещу едноверижна ДНК (anti-ssDNA)

Anti-ssDNA сравнително често се установяват при СЛЕ, а така също и при други автоимунни заболявания и не корелират с активността на СЛЕ и ЛН. [47]

3.1.4.4. Антитела срещу ядрен рибонуклеарен антиген на Smith (anti-Sm), срещу рибонуклеопротеин (anti-Sm/RNP), срещу антиген на Robert (anti-Ro/SSA) и срещу антиген на Lane (anti-La/SSB)

Anti-Sm се установяват само при около една четвърт от пациентите със СЛЕ. Тези автоантитела имат висока специфичност за диагностиката на СЛЕ, поради което присъстват като диагностичен критерий на ACR и се установяват по-често сред афроамериканци и представители на азиатските народи. Корелират с наличието на ЛН и засягане на централната нервна система (ЦНС) в хода на СЛЕ. Все още не е напълно изяснена тяхната прогностична роля. [47, 123] Anti-Sm рядко се установяват без anti-RNP (антитела, насочени срещу рибонуклеопротеин), тъй като двата протеина се свързват в snRNA комплекс в сплайсозомата. В практиката се определят anti-Sm/RNP. Anti-RNP са по-чести, като се установяват при около 30% от пациентите със СЛЕ, но са и по-малко специфични за СЛЕ от anti-Sm. [46] Anti-RNP се установяват при смесената съединителнотъканна болест. [47, 53] Anti-Ro/SSA са с антигенна специфичност към цитоплазмен протеинов комплекс на рибонуклеинова киселина (РНК). Те се

установяват при 25% до 30% от пациентите със СЛЕ. [1] Anti-La/SSB са с антигенна специфичност към нуклеарен рибонуклепротеинов антиген. Установяват се в между 5% и 15% от пациентите със СЛЕ. Anti-Ro/SSA и anti-La/SSB не са специфични за СЛЕ. Установяват се при синдром на Sjögren. [111]

3.1.4.5. Антитела срещу C1q компонент на комплемента (anti-C1q)

Anti-C1q се установяват в между 21% и 60% от пациентите със СЛЕ, а при пациенти с хипокомплементемичен уртикария васкулит в до 100%. [91, 107] В здравата популация се установяват в между 2% и 8%. Докладвани са силни корелации между anti-C1q и наличието и активността на ЛН. Отсъствието на anti-C1q се приема от някои автори като изключващо наличието на ЛН. Позитивната предиктивна стойност на anti-C1q за ЛН се определя от някои автори на 58%, а негативната предиктивна стойност за ЛН – на 91-100% [79, 91, 93, 136]. Повишаване на титрите на anti-C1q може да има прогностична стойност за развитие на обостряне на ЛН. Изследването на anti-C1q не е широко разпространено в рутинната клинична практика. [93]

3.1.4.6. Нива на комплемента

При активен СЛЕ и особено ЛН, нивата на общата хемолитична активност на комплемента (CH50) и на отделни компоненти на комплемента намаляват. [13, 109] Серумните нива на C3 и C4 намаляват непосредствено преди активирането на СЛЕ, като отчитането на намалението на C3 и C4 в динамика при серийни проследявания има по-голяма диагностична и прогностична стойност за поява на екзацербация на СЛЕ в сравнение с ниските еднократни стойности на C3 и C4. [47] Нормализирането на предходно намалени серумни нива на C3 и C4 е свързано с подобряване на изхода на ЛН. [77] При някои форми на наследствени дефицити на компоненти на комплемента (включващи C1r, C1s, C2, C4, C5 и C8) е налице асоциация с предразположение към развитие на СЛЕ и такива пациенти могат да имат намалена обща активност на комплемента, въпреки че не винаги е налице активен СЛЕ и ЛН. [116]

3.1.4.7. Други имунологични тестове

В част от пациентите със СЛЕ могат да се установяват повишени нива на циркулиращи имунни комплекси (ЦИК) и наличие на криоглобулини. Може да е налице т. нар. положителен lupus-band тест. Не се намират данни, които да показват добра корелация на горепосочените с активността на СЛЕ и ЛН. [150] Наличието на

антифосфолипидни антитела (APL) при ЛН определя фалшиво положителен резултат от Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) (псевдоположителен тест за луес). [14]

Таблица 3.3. Критерии на American College of Rheumatology за диагноза на СЛЕ.

Критерии	
1.	Пеперудообразен еритемен обрив в областта на лицето
2.	Дискоиден кожен обрив
3.	Фоточувствителност
4.	Орални улцерации
5.	Артрит
6.	Серозит
	- плеврит
	- перикардит
7.	Бъбречно засягане
	- персистираща протеинурия
	- клетъчни цилиндри в уринен седимент
8.	Неврологично засягане
	- психоза
	- гърчове
9.	Хематологично засягане
	- хемолитична анемия
	- левкопения
	- лимфопения
	- тромбоцитопения
10.	Имунологични нарушения
	- anti-DNA
	- anti-Sm
	- антифосфолипидни антитела
11.	Антинуклеарни антитела

3.1.5. Диагностика на СЛЕ и ЛН и оценка на активността на заболяването

Диагностиката на СЛЕ се базира на клинико-лабораторното изследване на пациентите и на общоприетите диагностични критерии на ACR, посочени на Таблица 3.3. Изработването на тези критерии цели идентифицирането на пациенти със СЛЕ, за които диагнозата е сигурна. Последната се поставя при изпълнени 4 от 11 критерия. [22, 57, 132] Критерият за наличие на ЛН включва наличие на персистираща протеинурия от 0,5 g/24 часа или по-висока (или данни от изследване с тест-лента за албумин, показващи 3+ или повече) или наличие на клетъчни цилиндри в уринен седимент (в това число еритроцитни, хемоглобинови, гранулирани, цилиндри от епителни тубулни клетки или смесени цилиндри). [18, 57, 78]

Таблица 3.4. BILAG Renal score

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

Съществуват няколко системи за надеждна комплексна оценка на активността на СЛЕ и ЛН, които обикновено предоставят количествена оценка на активността. [22, 49, 62, 78]

British Isles Lupus Assessment Group (BILAG) е полезен диагностичен инструмент, много често прилаган при клинични проучвания, като категоризирането на болестната активност се основава на необходимостта от провеждане на лечение и се предоставя ясна картина на засегнатите органни системи. [62, 78] BILAG оценява 8 органа/системи поотделно и за активността на СЛЕ във всяка система се получава оценка под формата на определена категория (от А до Е) в зависимост от наличието или липсата на определени клинични, лабораторни или хистологични признаци.

BILAG Renal score определя оценката на активността на лупусната нефропатия, като критериите по които това става са представени на Таблица 3.4.

Други системи за оценка на болестната активност са: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI), както и SLEDAI-AMS, която описва активността на СЛЕ динамично във времето; Systemic Lupus Activity Measure (SLAM); European Consensus Lupus Activity Measurement (ECLAM). [22, 78]

Диагностична система, описваща количествено уврежданията като израз на необратими събития, развили се в хода на СЛЕ или на провежданото лечение, е Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology (SLICC/ACR) Damage Index. Понастоящем е известна връзката между уврежданията и повишените заболяемост и смъртност. [49, 78]

3.2. РОЛЯ НА КОМПЛЕМЕНТА В ИМУНОПАТОГЕНЕЗАТА НА СИСТЕМНИЯ ЕРИТЕМАТОЗЕН ЛУПУС И ЛУПУСНАТА НЕФРОПАТИЯ

3.2.1. Преглед на каскадата (системата) на комплемента

Каскадата на комплемента е открита от Pfeiffer през 1884 г. при опитите му с *Vibrio cholerae*. [4] Той установява, че за да бъдат лизирани бактериалните клетки, освен антибактериални антитела е необходимо и термолабилно вещество, намиращо се

както в имунен така и в нормален серум. Няколко години по-късно, Border потвърждава, че бактериолизата, причинявана от имунен серум изисква наличието на вещество(а), които се инактивират при нагряване. Така през 19 век системата на комплемента е описана като термично лабилен серумен компонент, свързан с бактерицидната активност на кръвта.

Днес е известно, че системата на комплемента се състои от над 30 серумни и мембранни протеини и гликопротеини, които се синтезират от различни клетки, включващи хепатоцити, макрофаги и еритроцити. Компонентите на комплемента играят ключова роля при осъществяване на защитните процеси в организма и в същото време осигуряват поддържане на генетичната хомеостаза на организма. [87] Комплементът осъществява директно лизиране на редица патогени, взема участие във възпалителните процеси, както и в чистенето на апоптотични клетки. Каскадата на комплемента има централна роля във функциите на имунната система, като от една страна е важен компонент на вродения имунитет, а от друга има множество функции, с които участва в модулиране на адаптивния (придобития) имунитет и играе съществена роля в поддържането на имунологичната толерантност към собствени за организма молекулни структури. [4, 21, 87, 106, 112] Каскадата на комплемента участва в патогенезата на множество имунни и автоимунни заболявания, в това число и на СЛЕ и ЛН. Това твърдение се подкрепя от редица клинични факти, най-важните от които са:

1). Наличието на компоненти на комплемента, установявани в хистологични материали от бъбречни биопсии при пациенти с ЛН, посредством методите на имунофлуоресцентната микроскопия и на имунохистохимичните техники по типа на “full house”. [12, 13, 32, 106]

2). Намаляване на циркулиращите нива на компонентите на комплемента – C3 и C4 при пациенти със СЛЕ и ЛН, което корелира с активността на заболяването, показва най-често активиране на комплемента с неговата консумация. [47]

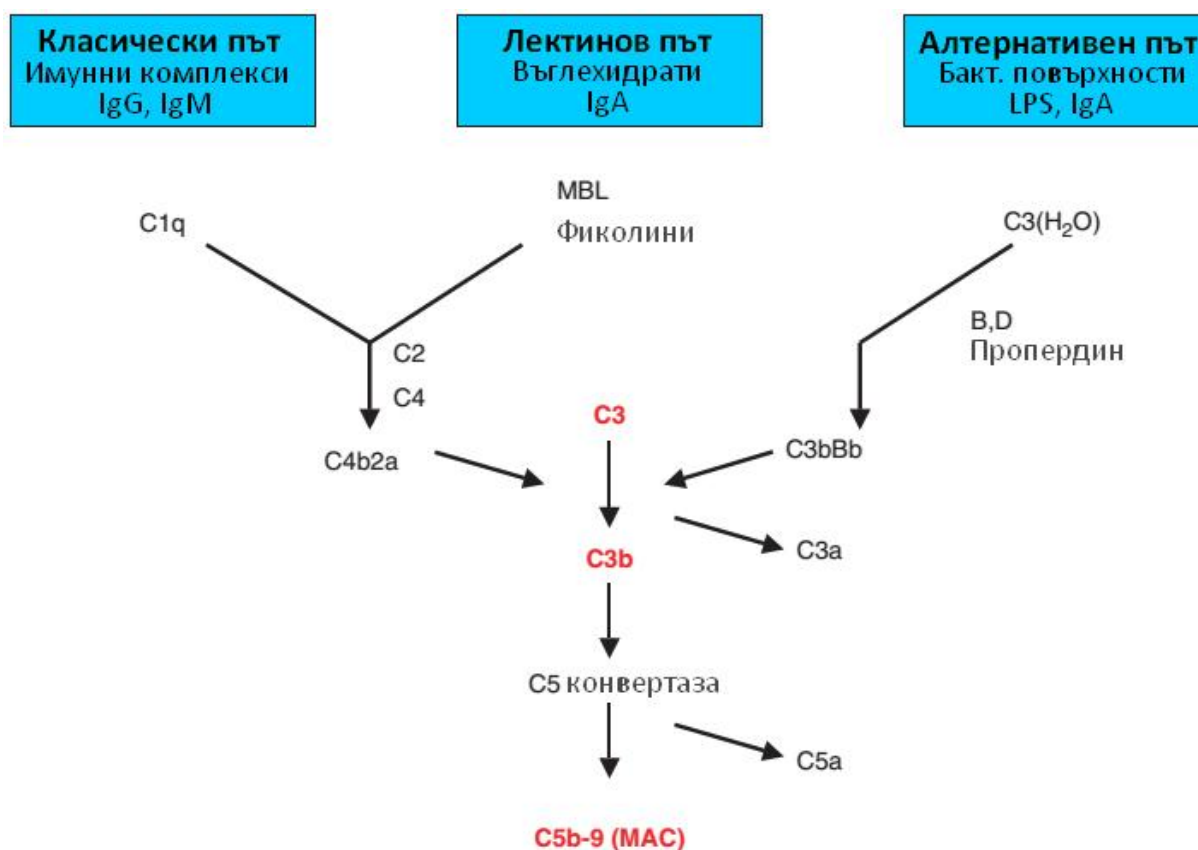
3). Наличие на автоантитела към компоненти на комплемента при пациенти със СЛЕ и ЛН, което насочва, но не доказва непосредствената им връзка, както и значението на тези антитела за тъканното увреждане.

4). Наличие на зависимости между генетични мутации, засягащи компоненти на комплемента, и болестни прояви при пациенти със СЛЕ и ЛН (например, наследствени

дефицити на C1q и C4 са тясно свързани с развитието на СЛЕ), което е доказателно особено, когато е установено при членове на фамилии. [21, 106]

Освен всичко това, предположенията и клиничните факти за участието на комплемента в патогенезата на СЛЕ и ЛН се подкрепят и допълват до известна степен от данните, получени от експериментални животински модели. [106]

Много от комплементните протеините циркулират в кръвообращението в неактивна форма. За да могат да осъществят своите функции, те трябва да бъдат активирани чрез протеолитично срязване. Активирането на комплемента твърде много наподобява механизма на кръвосъсирването – и двата процеса се осъществяват по каскаден механизъм, като всеки следващ компонент се активира благодарение на активното ензимно действие на активен(и) предходен(и) компонент(и) (Фигура 3.1).



Фигура 3.1. Схематично представяне на трите пътя на каскадата на комплемента.

[21]

Известни са три пътя за активиране на комплемента: класически, лектинов и алтернативен. И трите пътя конвергират на ниво C3. Активирането на C3 в крайна сметка води до формиране на мембранно-атакуващ комплекс (MAC), който се образува в повърхности, активирали комплементната каскада.

3.2.1.1. C1q и класическият път за активиране на комплементната каскада

Класическият път за активиране на системата на комплемента представлява последователност от равновесни биохимични реакции с участието главно на 9 гликопротеина (от C1 до C9). Този път се инициира от свързването на първия субкомпонент – C1q с имунни комплекси, съдържащи имуноглобулинови молекули от класове IgG и IgM. [21, 87, 112, 150] Освен от IgG и IgM, съдържащи се често в имунните комплекси, C1q може да се активира и от апоптотични клетки, некротични клетки, от острофазови протеини, каквито са пентраксините с техен представител С-реактивния протеин (CRP), както и от бактериални порини. В тези случаи активирането на класическия път на каскадата на комплемента става по анти тяло-независим начин. [88, 94, 95, 97] Свързването на активиращия лиганд с C1q води до генериране на конформационни промени в четвъртичната структура на C1q, вследствие на което се активират свързаните с C1q серин-протеази – C1r и C1s. C1s хидролизира както C4 така и C2 съответно до продуктите C4a, C4b, C2a и C2b. Чрез подходяща асоциация се формира ензимния комплекс C4b2a, който представлява C3 конвертаза на класическия път. [21, 87, 112, 150]

C1q е с молекулно тегло 460 kDa и представлява хетерохексамерна протеинова молекула, изградена от 18 полипептидни вериги (6A, 6B и 6C) с четвъртична структура, съдържаща N-терминален спирално структуриран колагеноподобен регион (домен) (CLR) и C-терминален хетеротримерен глобуларен регион (домен) (gC1q или GHR). gC1q-доменът е съставен от C-терминалните части на трите вида полипептидни вериги – ghA, ghB и ghC, известни още като „глави”. (Фигури 3.2 и 3.3). [44, 70] C1q може да разпознава и свързва множество собствени за организма и чужди молекули (лиганди), в това число: IgG, IgM, липиди, фосфолипиди, нуклеинови киселини, определени видове ретровируси, β -амилоидни фибрили, липополизахариди (LPS), порини от Gram-негативни микроорганизми, апоптотични клетки, пентраксини (CRP, pentraxin 3 (PTX3)). Свързващото място за IgG от имунните комплекси се намира в глобуларния регион на C1q. Вероятно един глобуларен домен на C1q носи едно водещо,

високоафинитетно свързващо място за IgG в В-веригата, а А- и С-веригите притежават алтернативни, спомагателни центрове, които могат да подпомагат свързването с IgG в рамките на имунните комплекси. [4, 45] Свързващото място за IgM от имунните комплекси също се намира в gC1q. [68, 72] Свързващите места за пентраксините са в областта на глобуларните региони – основно ghB и ghA. [4, 45, 68, 72]

Структурната организация и голямото разнообразие от лиганди на C1q определя неговите функции в процеси, включващи активиране и модулиране на класическия път на каскадата на комплемента, неутрализация на патогенни микроорганизми, клирънс на апоптотични клетки и имунни комплекси от тъканите. [4, 44, 69, 74, 98, 114, 115] Функциите на C1q в редица съществени имунологични и неимунологични процеси, освен горепосочените ключови за вродения имунитет, бихме могли да обособим по следния начин [4, 44, 67, 69, 74, 114, 115]:

- 1). Модулира Fc-рецепторната функция и зависимата от комплементния рецептор – 1 (CR1) цитотоксичност и фагоцитираща активност на моноцити и макрофаги.
- 2). Участва при активиране на туморната цитотоксичност на макрофагите.
- 3). Стимулира оксидативния метаболизъм в неутрофилите и в лейомиоцитите на стените на кръвоносните съдове.
- 4). Стимулира синтеза и освобождаването на редица проинфламаторни цитокини, основни сред които са: интерлевкините – IL-8 и IL-6 и мембранный кофакторен протеин – MCP-1.
- 5). Стимулира зависимите от Ca^{2+} калиеви каналчета и участва в инициране на хемотаксис на еозинофили и неутрофили в местата на възпаление.
- 6). Стимулира експресията на адхезионни молекули, сред които: $\alpha_2\beta_2$ – интегрини на повърхността на тромбоцитната мембрана, Е-селектин, междуклетъчна адхезионна молекула – 1 (ICAM-1), съдовоклетъчна адхезионна молекула – 1 (VCAM-1).
- 7). Участва в модулацията на функциите на дендритните клетки.
- 8). Стимулира продукцията на имуноглобулинови (Ig) молекули от В-лимфоцитите и превключване на класа синтезирани имуноглобулини.
- 9). Индуцира репликацията на дезоксирибонуклеиновата киселина (ДНК) и

пролиферацията на Т-лимфоцитите, както и на фибробластите.

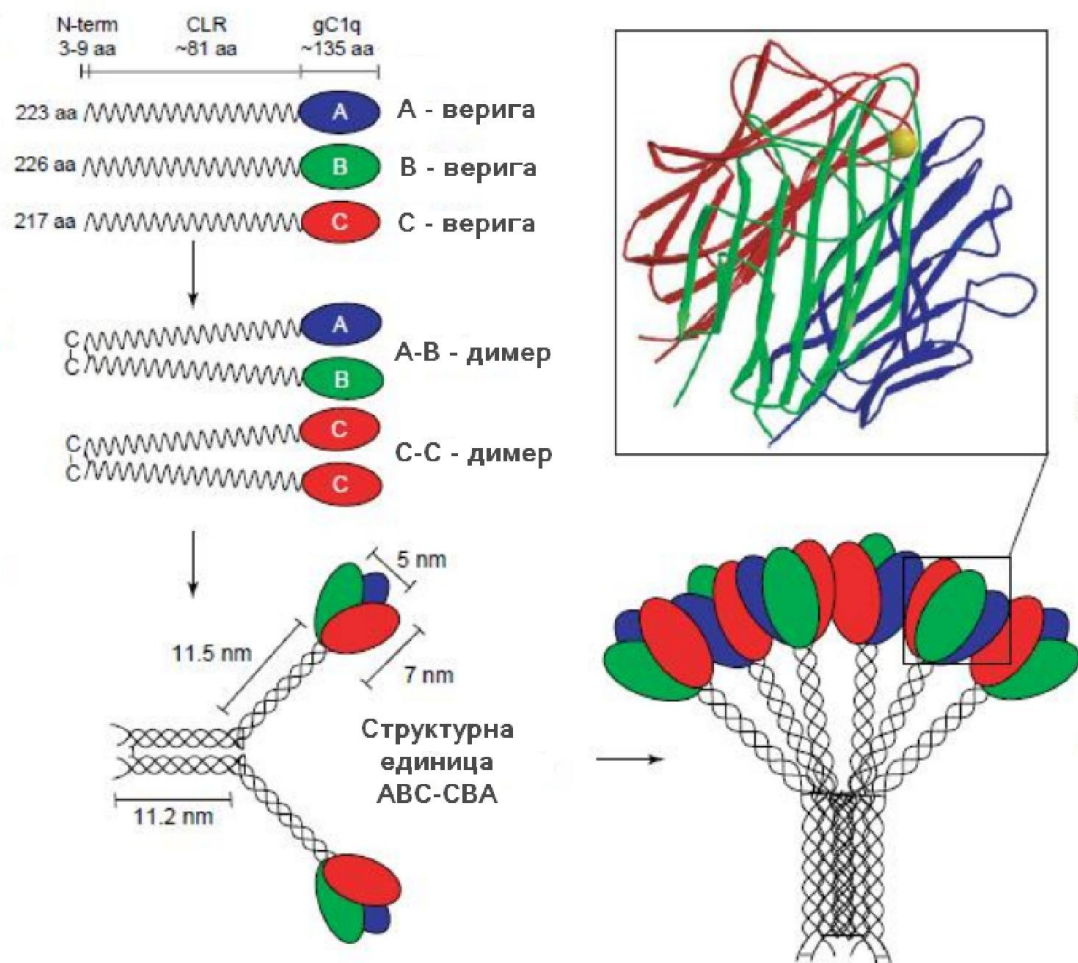
10). Модулира хуморалния имунен отговор, повлиявайки активацията и пролиферацията на антиген-специфични Т-клетки.

11). Участва в развитието на негативната клонална селекция на автореактивни В-лимфоцити.

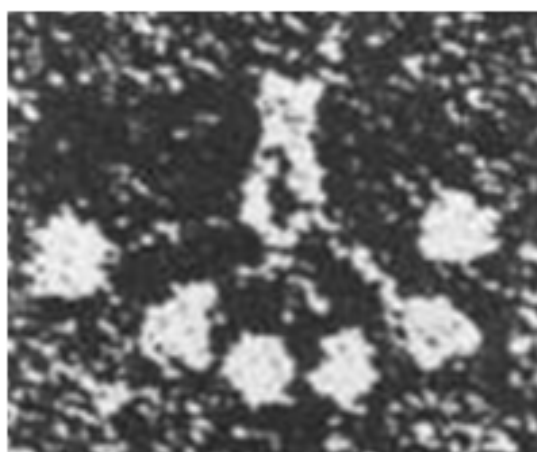
12). Стимулира освобождаването на проинфламаторни цитокини от микроглиалните клетки: IL-6, тумор-некротизиращ фактор – α (TNF- α). Същевременно C1q потиска микроглиалната активация, повишава продукцията на високореактивни кислородни радикали и азотен оксид, стимулира временното повишение на концентрацията на Ca^{2+} в тези клетки.

13). Участва в клирънса на резистентните към протеази изоформи на прионовите протеини от дендритните клетки.

14). Участва в регулацията на тромбоцитната адхезия и агрегация.



Фигура 3.2. Структурна организация на молекулата на C1q. (Обясненията са дадени в текста.)



Фигура 3.3. Електронномикроскопска снимка на молекулата на C1q.

Горепосочените функции показват разнообразната биологична активност на C1q във физиологични и патологични състояния. Ролята му за почистване на тъканите от апоптотични клетки и имунни комплекси, както и активирането и модулирането класическия път на каскадата на комплемента, заедно с функциите му върху имунокомпетентните клетки, определят неговата роля в патогенезата на СЛЕ и ЛН, които ще бъдат разгледани по-долу в настоящия литературен обзор.

Дефицитът на C1q – вроден, дължащ се на различни генни дефекти със синтез на патологична, неефективна молекула, или придобит, дължащ се на антитела срещу C1q или на други инхибиращи фактори, има значителни патофизиологични последствия в частност за развитието на тъканно увреждане при СЛЕ и ЛН. [4, 59]

3.2.1.2. Лектинов път за активиране на комплементната каскада

Лектиновият път за активиране на комплементната каскада се инициира с разпознаването и свързването от страна на манозо-свързващ белтък (лектин) (MBL) или фиколини с въглехидратни последователности, разположени върху повърхността на редица микроорганизми (бактерии, гъби). [141, 150] Структурата на MBL наподобява тази на C1q и представлява хексамер, съставен от 6 трикомпонентни субединици. MBL може да се свързва, подобно на C1q с апоптотични клетки и да спомага за техния клирънс. [94] Свързването на MBL с неговите лиганди води до конформационни промени в неговата четвъртична структура и в крайна сметка до активиране на свързаната с MBL серин-протеаза MASP-2, която пък е аналог на C1s и C1r от класическия път за активиране на комплемента. Следва протеолитично разцепване на C4 и C2 с формиране на C3 конвертазата на класическия път на комплемента – C4b2a. [21, 94, 96, 150]

3.2.1.3. Алтернативен път за активиране на комплементната каскада

Алтернативният път за активиране на комплемента се различава значително от горепосочените. Той се иницира благодарение на спонтанната, протичаща с постоянна ниска скорост във физиологични условия, хидролиза на C3 с формиране на хидролитичен продукт – C3(H₂O), който представлява биологично активна молекула във водна фаза. [87] Тази молекула се свързва с фактор В и в този комплекс, чрез последващо активиране от фактор D, фактор В се хидролизира с образуване на комплекса C3(H₂O)Vb, който представлява C3 конвертаза в течната фаза. Този ензимен

комплекс допълнително хидролизира C3 с формиране на C3a и C3b, като скоростта на това формиране е ниска, а реакцията протича с постоянна скорост във времето. Във физиологични условия, C3b бързо се инактивира от регулаторните инхибиторни за алтернативния път на каскадата на комплемента фактори I и H. [87, 88, 150] Когато обаче е налице активизираща повърхност, например бактериална стена, такова инактивиране не се развива. [21] В резултат на това се формира C3 конвертазата на алтернативния път – C3bBb, която е по-мощна от класическата C3 конвертаза. C3bBb се стабилизира допълнително от пропердин (фактор P). [21, 87, 150]

След формиране на C3 конвертаза, било в хода на активиране на класическия (в частност лектиновия) път или в хода на активиране на алтернативния път, започва общата за трите пътя каскада на комплемента, в хода на която C3, под действието на своите конвертази започва да се хидролизира с формиране на C3a и C3b. Комплексите C4b2a3b за класическия и лектиновия пътища и съответно C3bBb3b за алтернативния път представляват C5 конвертази, благодарение на чиято ензимна активност започва формирането на мембранно-атакуващия комплекс (MAC). C5 се хидролизира до C5a и C5b. От своя страна, C5b формира тример с C6 и C7, който се инкорпорира в клетъчната мембрана на микроорганизма, който подлежи на директна лиза от комплемента. След тази инкорпорация C8 и множество молекули C9 се свързват с този комплекс, в резултат на което се формира перфориращия клетъчната мембрана MAC – C5b-9. Интересен е фактът, че когато MAC се образува в големи количества, това създава достатъчна плътност на формираните от MAC пори в клетъчната мембрана и в крайна сметка клетката-патоген се лизира. Когато обаче MAC е в ниски сублитични количества, плътността на формираните пори в клетъчната мембрана не е достатъчна за развитие на клетъчна лиза, а това може да доведе до клетъчно активиране. [8] Хидролитичните продукти C3a и C5a са анафилатоксини с хемоатрактантни функции, които привличат белите кръвни клетки и медираят възпалението. При свързването си в имунните комплекси, C3b е опсонин (свързвайки се ковалентно с повърхността на патогенната клетка) и заедно с C4b повишават разтворимостта на тези комплекси и улесняват техния клирънс. [21, 87, 88, 150]

3.2.1.4. Активиране на комплемента при апоптоза и при инфекция

3.2.1.4.1. Активиране на комплемента при апоптоза

Трите пътя на комплементната каскада се активират върху повърхността на

постоянно появяващите се във физиологични условия апоптотични клетки. Апоптозата е неделима част от нормалната клетъчна хомеостаза на организма и ежедневно огромно количество клетки се подлагат на този физиологичен процес. Свързването на разпознаващите молекулни комплекси на класическия път (комплексът C1, съставен от C1q, C1r и C1s) и на лектиновия път (MBL и MASP), както и на C3b (генериран постоянно с ниска скорост в хода на алтернативния път) с апоптотичните клетки води до сравнително ниско интензивно активиране на комплементната каскада. Този „тих“ клирънс на апоптотичните клетки се осъществява чрез свързването на C1q, MBL и фиколини с тяхната клетъчна повърхност, а тези молекули на свой ред се свързват с рецептори на фагоцитиращите клетки (макрофаги, дендритни клетки). В хода на тези процеси апоптотичните клетки не се лизират, тяхното вътреклетъчно (включително ядрено) съдържимо остава екранирано (скрито) за имунната система, поради което се развива толеранс към собствените за организма антигени. [20, 29, 88, 94, 151] Подложените на апоптоза клетки бързо се отстраняват от тъканите чрез фагоцитиращите клетки. Наличието на множество регулаторни протеини осигурява ограничаване на активирането на комплемента във физиологични граници и по този начин превентира развитие на тъканно увреждане, без да се активират допълнителни механизми на вродения или придобития имунитет. [87, 151] Собствените за организма клетки, за разлика от клетките, подложени на апоптоза, са протектирани от активиране на комплемента върху тяхната повърхност, и такова не се развива. Това става чрез експресиране на повърхността им на молекули – негативни регулатори на комплементното активиране, каквито са мембранныят кофакторен протеин (MCP), комплементен рецептор-1 (CR1 или CD46), CD35, а така също и чрез засилване действието на кофактори, какъвто е фактор H. Свързвайки се с C3b върху нормалната клетка, фактор H улеснява връзката с инхибиторните фактори на алтернативния път, какъвто е фактор I. Фактор I е плазмена серин-протеаза, която хидролизира C3b до неактивен продукт iC3b. iC3b не може да свърже фактор D и да се оформи C3-конвертаза. Единствено CR1 в качеството си на кофактор на фактор I може да осигури следващата хидролиза на iC3b до C3c (освобождава в течната фаза) и C3dg, който чрез допълнителна трансформация се превръща в C3d. По този начин се пречи на свързването с активиращите фактори – B и D и на образуването на C3 конвертаза с последващо активиране на комплемента. [88]

3.2.1.4.2. Активиране на комплемента при инфекция

По време на инфекция, пълното и интензивно активиране на комплемента води до опсонизация (чрез ковалентно свързване на C3b с клетъчната повърхност) на патологичната клетка (например, бактериална), привличане на възпалителни клетки с развитие на възпаление, деструкция, фагоцитоза и елиминация на патологичната структура, чужда за имунната система. Освен това, в крайна сметка се развива активиране на адаптивния (придобития) имунитет с активиране на имунокомпетентни Т и В клетки, синтез на специфични антитела и генериране на имунна памет. Секретираните от плазмоцитите антитела се свързват с клетката-патоген, като след това се разпознават от молекулата на C1q, като свързвайки се с нея се активира впоследствие класическата каскада на комплемента (вижте, по-горе) и в крайна сметка – елиминиране на патогена. [87, 151]

3.2.1.5. Ролята на комплементната каскада в имунопатогенезата на системния еритематозен лупус и лупусната нефропатия

Активирането на комплементната каскада при СЛЕ и ЛН става по класическия път, като се инициира от взаимодействието на C1q с имунните комплекси, съдържащи автоантигени и насочени към тях патогенни автоантитела, каквито са ANA, anti-dsDNA, anti-Sm/RNP и други, а поддържането на имунните процеси зависи в голяма степен от допълнителното усилване на комплементната каскада по алтернативния път за активиране на комплемента чрез т. нар. амплификационна бримка с разграждане на C3. [76, 87, 88, 149]

3.2.1.5.1. “Waste-disposal” хипотеза на Walport за патогенезата на системния еритематозен лупус и лупусната нефропатия

В основата на тази хипотеза стои схващането за антиинфламаторната и проинфламаторната функции на каскадата на комплемента и тяхното взаимно съществуване в болестните условия на СЛЕ. Антиинфламаторната функция на комплемента се изразява в свързването на имунните комплекси в циркулацията и тяхното „изчистване” от тъканите. [35, 151] Освен това, съществуват достатъчно данни за свързването на C1q с клетки, които се подлагат на апоптоза и тяхното елиминиране от тъканите. [48, 73, 90, 133, 151] При условие, че тези функции на комплемента не се изпълняват пълноценно, натрупаният материал, съдържащ автоантигени – частично

разградени ядрени и цитоплазмени клетъчни компоненти, ще се увеличава и ще предизвика автоимунен отговор. [151] Първата хипотетична стъпка в този процес на развитие на автоимунитет при СЛЕ е непълноценното изчистване на автоантигените. Именно тук е патогенетичната роля на дефицитите на комплемента. Втората стъпка е поглъщането на автоантигените от незрели дендритни клетки в присъствие на проинфламаторни цитокини, което предизвиква трансформацията на тези дендритни клетки в зрели антиген-представящи клетки (APC). Това позволява представянето на автоантигените в имуногенна форма на Т-клетките. Третата стъпка е активирането на автореактивни В-клетки, които предварително са поели автоантигените от апоптотични клетки посредством своите имуноглобулинови рецептори. Тези клетки узряват до плазмоцити, които секретират автореактивни антитела. [151] Според Walport, СЛЕ се развива при наличие на отклонения в повече от една от тези стъпки, но в същото време СЛЕ се развива в около 93% от пациентите с генетичен дефицит на C1q и последният се оказва достатъчно силна предпоставка за развитие на болестно състояние.

3.2.1.5.2. Клинико-имунологични наблюдения, подкрепящи “waste-disposal” хипотезата на Walport

Плазмените нива на C1, C2 и C4 при пациенти с активен СЛЕ обикновено са ниски, като нивата им корелират негативно с активността на заболяването. [149] Плазмените нива на C3 се поддържат на долна граница и само понякога са ниски, обяснение за което е фактът, че съществуват регулаторни механизми за контрол на класическия път за активиране на комплемента, ключово участие в които взема C4-свързващия протеин (C4BP), който инхибира класическия път. [33, 151] При ниски плазмени нива на C3 обикновено е налице усилване (амплификация) на хидролизата на C3 в рамките на т. нар. амплификационна (усилваща) бримка на алтернативния път на каскадата на комплемента със стабилизиране на алтернативната C3 конвертаза. [149] При оценка на плазмените нива на комплементните компоненти трябва да се вземат предвид и няколко допълнителни факта: 1) съществуват различия в нивата на комплементните компоненти, поради генетични различия; 2) плазменото ниво на всеки протеин се определя от баланса между неговите синтеза и катаболизъм, а последният при СЛЕ зависи от образуването на имунни комплекси, в които участват компоненти на комплемента; на този фон съществуват различия в скоростта на синтеза на компонентите на комплемента при различните индивиди; 3) C3 и C4 са острофазови протеини, което означава, че тяхната синтеза е усилена в отговор на възпалителни

стимули, което може да маскира евентуална хипокомплементемия в хода на комплементното активиране и 4) плазмените нива на компонентите на комплемента не винаги са реално отражение на процесите, които протичат в различните тъкани. Поради тези факти, динамичното серийно определяне и проследяване в рамките на няколко измервания на нивата на компонентите на комплемента има по-голяма диагностична стойност в сравнение с еднократното измерване. [149]

В много от тъканите при СЛЕ, в това число в бъбречната тъкан при ЛН, се установяват характерни отлагания на имунни комплекси, съдържащи имуноглобулинови молекули и компоненти на комплемента, определяни в клинично-патологичната медицина като имунофлуоресцентен модел тип “full house”. [12, 13, 32, 47, 103, 106]

При пациенти с активен СЛЕ се наблюдава намаление на комплементен рецептор – 1 (CR1) върху повърхността на еритроцитите. CR1 освен по външната повърхност на еритроцитната мембрана се разполага и по мембраните на други клетъчни типове, каквито са неутрофили и други фагоцитиращи клетки, като неговата основна функция се изразява в свързване и поглъщане на патогени или имунни комплекси, които са свързани (обградени) с деградационни продукти на C4 и C3. Формирането на имунни комплекси в хода на заболяването води до отлагане на деградационните продукти на C4 и C3 и намаление на концентрацията на CR1 по повърхността на еритроцитите, което би могло да бъде патофизиологичен механизъм, спомагащ за улесняване и ускоряване на трансфера на опсонизирани имунни комплекси от еритроцитите до тъканните макрофаги. [103]

Наследствени хомозиготни дефицити на компоненти на класическия път на каскадата на комплемента са свързани с развитие на СЛЕ. Оказва се, че генетичните отклонения, свързани с тези мутации, са установени в гените, които са най-силни кандидати за кодиращи гени на предразположението към развитие на СЛЕ. [104, 149, 151] Най-често и с най-голяма тежест СЛЕ се установява при дефицити на C1q (с честота от около 93%), C1r и C1s (с честота от около 57%, като почти винаги дефектите на двете серин-протеази се установяват заедно), а така също и на дефицит на C4 (с честота от около 75%). За разлика от тези честоти, обаче при пациенти с дефицит на C2 честотата на развитие на СЛЕ е около 10%, което показва обратната зависимост между позицията на съответния компонент на комплемента в класическия път за активиране

на каскадата и честотата и тежестта на СЛЕ, които са свързани с неговия дефицит. С други думи, колкото по-начален е компонентът на комплемента, толкова по-често и по-тежко е автоимунното заболяване при неговия дефицит. Дефицитът на C3 е свързан рядко с развитие на СЛЕ, но поради много ниската честота на хомозиготен C3 дефицит съществуват малко данни в литературата. [25, 104, 151]

При проучвания на фамилии с наследствени дефицити на компоненти на класическия път на каскада на комплемента, конкордантността за развитие на СЛЕ в комбинация с наследствен дефицит на компонент на комплемента е изключително висока. В случаи с дефицит на C1q тази конкордантност е над 90%, докато конкордантността за проява на СЛЕ при монозиготни близнаци е била 24%. [36, 149, 151] Тези данни говорят в полза на схващането, че при физиологични условия, началните компоненти на класическия път на комплемента осигуряват протективна роля срещу развитие на СЛЕ, докато тяхната липса е тясно свързана с развитие на заболяване. Обикновено при пациенти, при които е констатиран наследствен дефицит на компонент на комплемента, СЛЕ се проявява рано в детска възраст, а съотношението мъже към жени е приблизително 1:1, за разлика от доминиращия дял на женския пол сред пациентите със СЛЕ без наследствен дефицит на компоненти на комплемента. [91] Съществува предразположение към СЛЕ, кодирано от гени на МНС. С по-висока предразположеност към развитие на СЛЕ са пациенти с хаплотипове: HLA-A1, B8, C4AQ0, C4B1, DR3. [149]

Както бе споменато по-горе, дефицитът освен наследствен може да бъде и придобит, освен структурен може да бъде и функционален. В контекста на функционалните дефицити на компонентите на комплемента ще бъдат разгледани случаите с антитела срещу протеини на комплементната каскада. Сред най-рано описаните в литературата антикомплементни антитела са имуноконглютинините, свързващи iC3b – продукт от инактивацията на C3b, установени в серуми на пациенти със СЛЕ, за които до този момент не са установени директни доказателства за патогенетична роля в развитието на автоимунно заболяване. [23, 99] Сред установени автоантитела при пациенти със СЛЕ е C3 нефритния фактор (антитяло, насочено срещу алтернативната C3 конвертаза, типично за болестта на плътните отлагания), както и антитяло срещу C1-инхибитор. [10, 148] Едно от автоантителата, насочени срещу компонент на комплемента, с най-важно клинично значение при СЛЕ е anti-C1q, което ще бъде дискутирано по-долу. Наличието на това антитяло е показателно за тежест на

СЛЕ и наличие на ЛН. Свързано е с консумативна хипокомплементемия. [35, 151]

Важна особеност на спектъра от специфичности на автоантителата при СЛЕ е, че последните не са насочени към един изолиран антиген, а срещу молекулно хетерогенни комплекси от антигени – протеини, нукреинови киселини, фосфолипиди и други. [38] Така например, anti-dsDNA обикновено се установяват в съчетание с антихистонови антитела и антинуклеозомни антитела, anti-Ro/SSA и anti-La/SSB са насочени срещу основен протеинов компонент на малък цитоплазмен рибонуклепротеинов комплекс, а anti-Sm и anti-RNP са насочени към различни протеини на сплайсозомата. При около 30% от пациентите със СЛЕ се установяват антифосфолипидни антитела (APL), които са насочени към негативно заредени фосфолипиди и най-вече към фосфатидилсерин, който нормално се разполага по вътрешната ламела на двойния фосфолипиден слой на клетъчната мембрана, а се транслоцира на повърхността на клетката, когато последната е подложена на апоптоза. APL са свързани с автоантитела към плазмения β 2-гликопротеин-I (anti- β 2GPI), който се свързва с негативно заредените фосфолипиди. [149] Тези факти насочват към идеята, че автоантигените при СЛЕ се обособяват в големи клетъчни частици – клетъчни фрагменти.

Всички по-горе изброени клинично-имунологични факти подкрепят обяснението на въпроса, как от една страна дефицити на C1q причиняват СЛЕ и как при СЛЕ се развива автоимунитет срещу C1q. Една от основните функции на C1q се изразява в клирънса на апоптотични клетки и имунни комплекси от тъканите, които съдържат автоантигени, и по този начин превентира развитието на автоимунитет и болестно състояние. Липсата на C1q води до натрупване на автоантигенен материал и развитие на автоимунен отговор, което стои в основата на “Waste-disposal” – хипотезата на Walport. Свързвайки се в комплекс с автоантигени, самата молекула на C1q или части от нея могат да се превърнат в автоантигени и бидейки обект на имунна атака в хода на СЛЕ, това да намали допълнително клирънса на автоантигените от тъканите. В същото време, активирането на комплемента поради наличие на anti-C1q и патогенни антинуклеарни антитела с образуване на активиращи комплемента имунни комплекси в бъбречните гломерули при ЛН води до тъканно възпаление и развитие на същото заболяване, но по друг механизъм. [88]

От горепосочените факти следва, че комплементът има двойна роля в имунопатогенезата на СЛЕ и ЛН. От една страна е дефицитът на компоненти на

комплемента, особено на ранните компоненти на класическия път и в частност C1q (било поради генетичен дефект с липса на синтез или със синтез на функционално непълноценна протеинова молекула, или поради автоимунитет срещу протеиновата молекула с последващо нарушаване на нейните функции), води до недостатъчното активиране на комплемента с непълноценна клирънсва функция по отношение на автоантигените, натрупващи се в хода на постоянно протичащата в организма апоптоза. От друга страна е развиващият се имунен отговор към автоантигените (в това число и към самата молекула на C1q като автоантиген) води до активиране на комплемента с развитие на тъканно възпаление и в крайна сметка с обособяване на характерната клинично-морфологична картина на СЛЕ и ЛН.

3.3. АВТОАНТИТЕЛА СРЕЩУ КОМПОНЕНТИ НА КАСКАДАТА НА КОМПЛЕМЕНТА ПРИ СИСТЕМЕН ЕРИТЕМАТОЗЕН ЛУПУС И ЛУПУСНА НЕФРОПАТИЯ

Както вече бе показано по-горе, СЛЕ е автоимунно заболяване, при което се установяват огромен брой автоантитела с различна антигенна специфичност, чиято продукция може да бъде предизвикана от поликлонална В-клетъчна активация, от увреждания на механизмите за развитие на апоптозата, а така също и от нарушения в регулацията на идиотип-антиидиотипните взаимодействия. [60] При пациенти със СЛЕ са описани повече от 100 различни автоантитела, към голямата част от които влизат антитела, насочени срещу ядрени, цитоплазмени, мембранни, фосфолипидни антигени, кръвни и ендотелни клетки, антигени на нервната система, плазмени и матриксни протеини и различни други. [123] Компонентите на комплементната каскада също могат да бъдат антигенен таргет за тези автоантитела. Съществуват литературни данни за редица антикомплементни антитела към компоненти от трите пътя на активиране на комплементната каскада, които са описвани не само при СЛЕ и ЛН, а така също при редица други автоимунни заболявания [39, 66]:

1) Антитела срещу компоненти на класическия път на активиране на комплемента: антитела срещу C1q (anti-C1q); антитела срещу C1s (anti-C1s); антитела срещу C1-инхибитор (anti-C1-inh).

2) Антитела срещу компоненти на лектиновия път на активиране на комплемента:

антитела срещу манозо-свързващия лектин (anti-MBL); антитела срещу фиколин-3 (anti-Ficolin-3).

3) Антитела срещу компоненти на алтернативния път на активиране на комплемента: антитела срещу C3 (anti-C3); антитела срещу фактор В (anti-FB).

4). Антитела срещу C3 конвертазите: C3-нефритен фактор (anti-C3NeF); C4-нефритен фактор (anti-C4NeF).

5). Антитела срещу комплементни регулатори: антитела срещу фактор Н (anti-FH); антитела срещу фактор I (anti-FI).

6). Антитела срещу комплементни рецептори: антитела срещу комплементен рецептор – 1 (anti-CR1); антитела срещу комплементен рецептор – 2 (anti-CR2); антитела срещу комплементен рецептор – 3 (anti-CR3).

СЛЕ е патологично състояние, при което дисрегулацията на комплементната каскада, в това число и в хода на взаимодействието на нейните компоненти със специфични, насочени срещу тях автоантитела, значително усложнява механизмите на болестния процес. При определени условия се появят автоантитела към неоепитопи в молекулите на компоненти на комплемента. Неоепитопите са имуногенни структурни области в молекулите, които не са представени в нативните протеини, но се появяват след структурни промени (най-често конформационни промени) в тези молекули в хода на активиране на комплементната каскада. [60]

В следващото изложение ще бъдат разгледани по-често описваните в литературата автоантитела срещу комплементната каскада, установявани при пациенти със СЛЕ и ЛН.

3.3.1. Антитела срещу C1q (anti-C1q)

Anti-C1q е най-проученото антикомплементно автоантитяло при пациентите със СЛЕ и ЛН. [39, 42, 60, 66, 75, 135, 137]

3.3.1.1. Имунологични аспекти на anti-C1q

Първото съобщение за съществуването на anti-C1q в литературата е на Agnello през 1971 г. [9] Установява се, че серуми на пациенти със СЛЕ преципитират C1q в агарозен гел. Първоначално се е приемало, че тази активност в серумите се дължи на

IgG в състава на имунни комплекси. По-късно се доказва съществуването на anti-C1q в серумите на пациенти със СЛЕ, като се установява взаимодействие между мономерен IgG и C1q. Но едва Uwatoko през 1984 г. провежда голям брой изследвания за определяне на диагностичните и прогностичните свойства на anti-C1q при пациенти със СЛЕ, както и опити за определяне механизмите на взаимодействие между C1q и отделните класове имуноглобулини. [143, 144]

Anti-C1q се откриват в между 2% и 8% от серумите на здрави донори, но в тези случаи те не са свързани с бъбречна патология. [79, 120] Anti-C1q в серумите на здрави донори най-вероятно са част от т. нар. естествен физиологичен репертоар от автоантитела в организма, които не предизвикват имунно възпаление. Предполага се, че последните участват в отстраняването на отпадните продукти, получени в резултат на клетъчния метаболизъм и не е задължително да са свързани с болестни състояния, както и да играят роля в патогенезата им. Установено е, че титрите на естествените автоантителата срещу C1q от IgG и IgA класове се покачва с възрастта. Този феномен е най-ясно изразен при пациенти над 50 години. Това разпределение отговаря на тенденциите, които се наблюдават и при други типове автоантитела в здравите донори. [125, 126] Anti-C1q са насочени главно към CLR на C1q. Това взаимодействие се осъществява чрез антиген-свързващите участъци на IgG – F(ab)₂, докато IgG от имунните комплекси се свързва с C1q чрез Fc участъка си. [127] Експериментални изследванията показват, че изолирани F(ab)₂ участъци на anti-C1q от клас IgG реагират с висок афинитет с C1q в твърда фаза или с C1q в състава на имунни комплекси, като такова взаимодействие не се установява, когато C1q е в течна фаза. Това се обяснява с разкриването на неоепитопи в колагеноподобния район на C1q, когато той взаимодейства с имуноглобулинови молекули от имунните комплекси. [145]

Освен anti-C1q със специфичност към CLR са установени и anti-C1q със специфичност към C-терминалните части на трите вида полипептидни вериги – anti-ghA, anti-ghB и anti-ghC, известни в литературата със сборното наименование антиглобуларни антитела срещу C1q (anti-gC1q). В българско проучване на Tsacheva и съавт. е установен повишен титър на anti-gC1q при пациенти с ЛН чрез използване на ELISA с тест-антигени – рекомбинантни протеинови конструкции за ghA, ghB и ghC. На този етап тяхното биологично и клинично значение при пациентите със СЛЕ и ЛН все още не е напълно изяснено, но е възможно тези антиглобуларни anti-C1q да инхибират

важни функции на C1q, каквито са клирънс на имунни комплекси и апоптотични клетки от тъканите. [139]

3.3.1.2. Патогенетични аспекти на anti-C1q при лупусна нефропатия

Anti-C1q се установяват в между 21% и 60% от пациентите със СЛЕ. [79, 91, 107] Установено е, че концентрацията на anti-C1q антитела от IgG клас, изолирани от бъбречна тъкан на пациенти с ЛН, е повече от 50 пъти по-висока от концентрацията им в циркулацията, което недвусмислено насочва към директната роля на тези автоантитела в бъбречната патология, съпровождаща СЛЕ. [82]

Данни за патогенетичната роля на anti-C1q идват и от изследванията на Norsworthy и сътр., които установяват, че преобладаващия подклас IgG anti-C1q е IgG2 подкласа. Освен това, FcγRIIA при неутрофили и моноцити е единственият Fcγ-рецептор, който взаимодейства с имуноглобулини от подклас IgG2. При гена за този рецептор е установен полиморфизъм, определящ алел, който кодира рецептор с нисък афинитет към IgG2 (FcγRIIA R131) и друг алел, кодиращ рецептор с висок афинитет към IgG2 (FcγRIIA H131). Установено е отклонение във функциите на FcγRIIA R131 при пациенти с ЛН, които били позитивни за anti-C1q. [101] Това насочва към възможността IgG2 подклас anti-C1q да се изчистват в недостатъчна степен, което да позволява тяхното натрупване в бъбречната тъкан и развитие на автоимунитет.

Друго важно доказателство за патогенетичната роля на anti-C1q следва от изследвания in vivo с експериментални мишки модели на Trouw и сътр. Нормални здрави мишки са инжектирани с моноклонални антитела срещу C1q, което довело до намаление на неговите концентрации в циркулацията и отлагането на имунни комплекси, съдържащи C1q и anti-C1q по хода на гломерулните базални мембрани (ГБМ) в бъбрека. При тези мишки били установени, обаче липса на протеинурия и само лека гранулоцитна инфилтрация на гломерулите. След това мишките били инжектирани едновременно със субнефритогенни дози от комплемент-фиксиращо заешко антияло, насочено срещу мишите ГБМ (anti-GBM) и с моноклонално anti-C1q. В резултат на това, мишките развили масивна протеинурия и изразена гранулоцитна инфилтрация в гломерулите. Когато били използвани мишки с дефицит за един от компонентите – C1q, C3, C4 или Fc-рецептори не са били наблюдавани бъбречни лезии. Anti-C1q се свързва с C1q, който преди това се е свързал със заешкото anti-GBM.

Изводът от този експеримент бил, че anti-C1q се отлага в гломерулите, но това не е достатъчно за развитие на патологичен процес. Anti-C1q са патогенни само при наличие на предварително отложени имунни комплекси в бъбрека, както е при ЛН, като в тези случаи усилват отлагането на имунните комплекси и спомагат за активиране на имунното възпаление. Резултатите и изводите от експерименталната работа на Trouw и сътр. биха могли да обяснят защо не се развива значимо бъбречно заболяване при хипокомплементемичен уртикария васкулит – синдром (HUVS), въпреки високата честота на установявани anti-C1q при тези пациенти. [138]

C1q е най-важната молекула за отстраняване на апоптотичните клетки в организма, които при физиологични условия се образуват постоянно. При отстраняване на C1q от циркулацията, поради свързване с anti-C1q, апоптотичните клетки се натрупват в тъканите, в това число и в бъбрека. Клетките, подложени на апоптоза експресират на своята повърхност автоантигени и по този начин могат да предизвикат развитие на автоимунен отговор, част от който да бъдат антитела, насочени срещу самата молекула на C1q. [104] Наличието на anti-C1q може да предизвика отстраняване на апоптотичните клетки, които са свързани с C1q, тъй като това активира фагоцитиращите клетки, посредством свързването на anti-C1q с техните Fc-рецептори. [110]

3.3.1.3. Лабораторно-диагностични аспекти на anti-C1q

Патогенните anti-C1q са с епитопна специфичност към неоепитопи в CLR. Тези неоепитопи се появяват в хода на конформационни промени в молекулата на C1q, когато последната е свързана в солидна фаза, включително и в лабораторните тестове за детекция на anti-C1q, основани на ELISA. [39, 82] За да се разграничи имунно специфичното взаимодействие на anti-C1q с C1q (F(ab)₂ – фрагментът на anti-C1q взаимодейства специфично с CLR на C1q) от взаимодействието на C1q с имуноглобулиновите молекули от имунните комплекси (GHR от C1q свързва Fc-фрагмента на Ig-молекули от имунните комплекси), взаимодействието трябва да се осъществи в буферен разтвор с висока йонна сила (0,5-1,0 M NaCl). Последната потиска взаимодействието между GHR и Fc-фрагмента на Ig-молекулите от имунните комплекси, докато високоафинитетното имунно взаимодействие между anti-C1q и CLR на C1q-молекулата може да се осъществи. [71] В последните години са разработени диагностични тестове, които използват като антиген пречистен CLR и по този начин

високосолевитите буфери в методиките за детекция на anti-C1q не са необходими. [39] През последните години бе съобщена нова диагностична методика с установяване на линейарни таргетни за патогенните anti-C1q пептиди в CLR, съставен от фрагменти на А- и В-веригите на C1q. [146]

3.3.1.4. Клинични аспекти на anti-C1q

Според едно проучване, anti-C1q са били установявани при различни заболявания: хипокомплементичен уртикария васкулит – синдром (HUVS) – в до 100% от пациентите; синдром на Felty – в до 76%; системен еритематозен лупус – 33%; лупусен нефрит – 63%; равматоиден васкулит – 77%; синдром на Sjögren – 13%; мембранопролиферативен гломерулонефрит – 54%; IgA нефропатия – 31%; здрави индивиди – 5%. [120, 137, 156] Поради този факт, тяхната нозологична специфичност е твърде ниска. [66, 137] Наличието на 100% чувствителност на anti-C1q за HUVS предполага тяхната патогенетична роля при това състояние, но последната все още не е напълно изяснена с достатъчно експериментални и клинични проучвания. Проучвания върху имуноглобулиновите субкласове и епитопите на anti-C1q при пациенти с HUVS и СЛЕ показват голяма идентичност на anti-C1q при двете заболявания, а това дава основание на някои автори да разглеждат HUVS като част от синдромокомплекса на СЛЕ. [155] Смята се, че анти-C1q от IgG2 субклас вероятно имат патогенетична роля, докато антителата от IgG3 субклас могат да се използват като по-специфичен биомаркер за активността на лупусния нефрит. Anti-C1q се установяват значимо по-често при пациенти със СЛЕ и ЛН (особено пролиферативните хистологични класове ЛН), в сравнение с пациентите със СЛЕ без ЛН. [42]

В едно английско проучване се установяват 74% от пациенти с активен ЛН позитивни за anti-C1q, в сравнение с 53% позитивни с неактивен ЛН и 32% позитивни без ЛН. Титрите на anti-C1q са били значимо по-високи при пациентите с ЛН, в сравнение с тези при пациентите без ЛН. Констатирано е било, че 9 от 33 пациенти със СЛЕ, но без ЛН, които са били положителни за anti-C1q, са развили ЛН след среден период от 10 месеца, което показва прогностичната роля на тези автоантитела, а 1 от пациентите е развил HUVS. [86]

В друго италианско проучване са изследвани 61 пациенти със СЛЕ, от които 44% са били положителни за anti-C1q. Anti-C1q са били установени при 60% от пациентите с

ЛН и при значимо по-малко от пациентите без ЛН – само при 14%. При пациентите с активен ЛН anti-C1q са били положителни при 89%, докато никой от пациентите без активност не е бил положителен за anti-C1q. [129]

В друго международно многоцентрово проспективно проучване е било установено, че при 35 от 36 (97,2%) пациенти с активен пролиферативен ЛН се установяват патологично повишени титри на anti-C1q, докато позитивни за anti-C1q са били само 35% от пациентите с неактивен ЛН и само 25% от пациентите с активен СЛЕ, но без ЛН, поради което авторите заключават, че липсата на anti-C1q почти изключва наличието на активен пролиферативен ЛН. [135]

В педиатричната популация също е изследвано клиничното значение на anti-C1q. При 6 от 7 деца с активен ЛН са били установени положителни титри на anti-C1q срещу само 1 от 5 с неактивен ЛН. При 8 от 24 случая на постстрептококов гломерулонефрит са установени позитивни титри на anti-C1q, като наличието на автоантитела е било свързано с по-високи нива на протеинурия, по-висока честота на артериална хипертония и с липса на спонтанно обратно развитие. [75]

В друго проспективно проучване, Coremans и съавт. изследват в динамика 43 пациенти със СЛЕ за връзката между клиничната активност на заболяването и серумните нива на anti-C1q, anti-dsDNA, C3 и C4. Anti-C1q са били положителни при 82% от пациентите с ЛН и при 38% от пациентите със СЛЕ, но без ЛН. Установява се, че при пациентите с неактивно заболяване не се отбелязва промяна в титрите на anti-C1q. Нивата на anti-C1q са се повишавали сигнификантно в бошинството от пациенти преди рецидив на ЛН при позитивните за тях. При пациентите със СЛЕ без ЛН, само при 50% от позитивните за anti-C1q се констатирало повишение на титрите им преди извънбъбречен рецидив на СЛЕ. За разлика от anti-C1q, титрите на anti-dsDNA са били повишени при голяма част от пациентите с и без ЛН преди рецидив. [30]

В подкрепа на тези данни е и друго италианско проучване, показващо, че промените в титрите на anti-C1q са били в тясна корелация с активността на заболяването при пациенти с ЛН, като е определена чувствителност от 87% и специфичност от 92%. [93]

В заключение, клиничните и експериментални данни показват, че anti-C1q имат патогенетична роля за развитието на автоимунитет при ЛН. Те не са нозологично

специфичен маркер, но корелират добре с признаците за активност на пролиферативните форми на ЛН и имат прогностична роля по отношение на развитието на рецидив на ЛН.

3.3.2. Антитела срещу C1s (anti-C1s)

При пациенти със СЛЕ и ЛН чрез ELISA са били установени автоантитела, насочени срещу епитоп на свързващото място на тежката и леката верига на C1s. Сред изследвани 15 пациента със СЛЕ и ЛН, при 7 от тях (46,7%) са били установени anti-C1s, които отсъствали в серумите на здравите контроли. Чрез изследване на протеолитичната активност на C1s се установява, че при наличие на anti-C1s тази активност е приблизително 4 пъти по-висока, в сравнение с протеолитичната активност на C1s при липса на anti-C1s. [54]

Патогенетичното значение на anti-C1s при СЛЕ и ЛН вероятно се основава на повишената протеолитична активност на C1s, която може да бъде причина за намалени нива на C4 и придобит функционален комплементен дефицит. При активиране на класическия път на комплемента чрез разграждане на C4 в хода на повишената от anti-C1s протеолитичната активност на C1s, може да бъде активирана зависимата от комплемента клетъчна лиза и това да бъде в основата на поява на автоантигени за В-клетките и причина за развитие на автоимунитет. От друга страна, повишеното формиране и отлагане на имунни комплекси в тъканите в хода на активирането на класическия път на комплемента, може да доведе до забавен клирънс на тези имунни комплекси. [54]

Тъй като тези автоантитела са описани само в малък брой изследвани пациенти (15 пациента), са необходими допълнителни проучвания за изясняване на тяхната патогенетична и клинична роля при пациенти със СЛЕ и ЛН.

В литературата липсват данни за наличието и ролята на автоантитела срещу C1r при пациенти със СЛЕ и ЛН.

3.3.3. Антитела срещу C1-инхибитор (anti-C1-inh)

C1-инхибиторът е член на фамилия серин-протеазни инхибитори, наречени с общия термин серпини. [39] Освен инхибиращите функции в каликреин-кининовата, коагулационната и фибринолитичната системи, C1-инхибиторът потиска ензимната

активност на серин-протеазите C1s и C1r от първия компонент на класическия път на каскадата на комплемента – C1. Ако C1-инхибиторът не функционира пълноценно, се развива рецидивиращ ангиоедем. [52, 58] Дефицитът на C1-инхибитора може да бъде генетичен, както е при състояние на наследствен ангиоедем, или придобит – при наличие на автоантитела срещу C1-инхибитора (anti-C1-inh). Придобитият дефицит на C1-inh е често свързан с лимфопролиферативни заболявания, при които е налице В-клетъчна клонална експанзия с повишена продукция на anti-C1-inh. Към тези състояния спадат не-Hodgkin-овите лимфоми и моноклоналните гамопатии с недетерминирана сигнификантност. [26, 28, 46] Наличие на anti-C1-inh се описва, макар и много рядко, и при пациенти със СЛЕ. [89]

В едно мултицентрово проучване върху 202 пациенти със СЛЕ и 134 здрави контроли се установяват повишени титри на anti-C1-inh – при 17% от пациентите със СЛЕ и при само 4% от здравите контроли. SLEDAI-скорът и давността на СЛЕ са били значимо по-високи при пациентите със СЛЕ, позитивни за anti-C1-inh в сравнение с тези при отрицателните за anti-C1-inh. [89]

Патогенетичната роля на anti-C1-inh за развитието на СЛЕ и ЛН се изразява в потискане активността на класическия път на каскадата на комплемента с намаление на клирънсовите функции, натрупване на автоантигени и развитие на автоимунитет.

3.3.4. Антитела срещу манозо-свързващ лектин (anti-MBL)

За първи път наличието на anti-MBL е описано от Seelen и съавт. през 2003 г. По аналогия с anti-C1q, в серуми от 20 пациента със СЛЕ авторите установяват повишени титри на anti-MBL, като не се установява корелация с наличието или активността на заболяването. В това проучване се установява корелация между титрите на anti-C1q и титрите на anti-MBL. [121] Anti-MBL са установявани при пациенти с ревматоиден полиартрит с висока специфичност (над 98%). [51] В друго проучване, при пациенти със СЛЕ сред европейската раса от група от 90 пациента, anti-MBL IgM са установени само при двама, а anti-MBL IgG не са установени. Не са установени корелации между anti-MBL и активността на автоимунното заболяване. [92] Японско проучване показва наличието на anti-MBL при 9 от 111 пациенти със СЛЕ, без да установява корелация на титрите на anti-MBL с активността на заболяването. [131] При други проучвания в различни етнически популации от пациенти със СЛЕ също се описват anti-MBL, отново

без да се установява някакво значимо клиничко-диагностично значение на тези автоантитела по отношение на активността на заболяването. [108, 124]

3.3.5. Антитела срещу фиколин-3 (anti-Ficolin-3)

Автоантитела срещу фиколин-3 също са установявани при пациенти със СЛЕ, макар и изключително рядко. [61, 157] При малко на брой пациенти със СЛЕ се установява временен дефицит на фиколин-3, но на този етап не е ясно дали този дефицит се дължи на наличие на anti-Ficolin-3 и каква е патогенетичната и клиничната роля на тези автоантитела при пациенти със СЛЕ и ЛН. [61]

3.3.6. Антитела срещу C3 (anti-C3)

Литературните данни за наличие на anti-C3 при пациенти със СЛЕ са оскъдни. През 1984 г. Durand и Burge установяват, посредством ELISA с тестов антиген активационния продукт от хидролизата на C3 – C3b, повишени титри на anti-C3 (наричани имуноконглатинини, ИК) в серуми на 34 пациента със СЛЕ. Нивата на anti-C3 били по-високи в групата от пациенти с активен СЛЕ, в сравнение с нивата им при пациентите с неактивен СЛЕ. [40] По-късно, Nilsson и съавт. установяват повишени нива на anti-C3 от IgG изотип в серуми от пациенти със СЛЕ, докато имуноконглатинини от изотипове IgA и IgM не се различавали при пациентите със СЛЕ и при здравите контроли. При повечето пациенти със СЛЕ, максималното повишение на нивата на anti-C3 се развивало преди рецидив на заболяването, но не са били установени корелации между индексите на активност на заболяването и нивата на anti-C3. Епитопното характеризиране на ИК показало широк спектър на антигенни специфичности – C3b, iC3b, C3c и C3dg. Нивата на anti-C3 корелирали със отношението C3d/C3, което насочва към заключението, че тези автоантитела са в отговор на активирането на C3. Автоантителата били от IgG1 и IgG3 субкласове и само при двама от пациентите – от IgG4 субклас, което би могло да бъде предпоставка за допълнително активиране на комплементната каскада от anti-C3 при пациенти със СЛЕ. [100] В американско проучване се констатира по-ниска чувствителност, но по-висока специфичност на anti-C3b в сравнение с anti-C1q по отношение наличието на ЛН при пациенти със СЛЕ. В лонгитудинално изследване на същите автори, нивата на anti-C1q се повишават към момента на обостряне на ЛН само при пациенти, които са били позитивни за anti-C3b, като по този начин последните биха могли да бъдат

прогностичен маркер за обостряне на ЛН. [24] На този етап все още не съществуват достатъчно литературни данни за патогенетичната роля и клиничното значение на anti-C3.

C3-нефритният фактор (C3NeF) е автоантитяло, насочено срещу неоепитоп, формиран на базата на четвъртичната структура на алтернативната C3 конвертаза – C3bBb, като няма епитопна специфичност по отношение на нейните отделни компоненти – C3b и Bb. [39] Когато C3NeF се свърже с C3bBb той удължава значимо нейния полуживот като пречи на нейното разграждане. Вследствие на това се увеличава хидролизата и активирането на C3. C3NeF се установява в серуми на около 80% от пациентите с болест на плътните отлагания – DDD (мембранопролиферативен гломерулонефрит – II тип). [122] Има съобщения за установен C3NeF при пациенти със СЛЕ, но какво е клиничното и патогенетичното значение на това автоантитяло при пациенти със СЛЕ и ЛН на този етап все още не е изяснено напълно. [148] За разлика от C3NeF, anti-C3 (макар и да показват известна активност, подобна на C3NeF, по отношение на стабилизиране на C3bBb) разпознават отделни епитопи от C3 конвертазата в молекулите на нейните субкомпоненти. [39]

3.3.7. Антитела срещу C4 (anti-C4)

В литературата съществуват оскъдни данни за автоантитела срещу C4 компонента на комплементната каскада. Riposte и съавт. през 1983 г. описват клиничен случай на 17-годишен пациент с тежък СЛЕ с данни за парциален C4-дефицит, с C4A3,C4BQo хаплотип, унаследен от майката и установен във всяко едно от децата ѝ. При пациента се установява anti-C4 от изотип IgM, принадлежащ към фамилията на IK. [113]

C4-нефритният фактор (C4NeF) е автоантитяло, насочено срещу C3 и C5 конвертазите на класическия/лектиновия път на активиране на комплемента – C4b2a и C4b2aBb, като стабилизира последните чрез потискане на тяхното разграждане и удължаване на полуживота им. [158] Стабилизирането на C3 конвертазата на класическия път от C4NeF става чрез препятстване на свързването ѝ с C4-свързващия протеин (C4BP) и CR1 и чрез потискане на хидролизата ѝ от фактор I. C4NeF е установяван при малко на брой пациенти със СЛЕ и C3 нефропатия, но каква е неговата патогенетична и клинична роля до този момент не е напълно изяснено. [34, 158]

ИЗВОДИ:

1. Системният еритематозен лупус показва клинична, имунологична и морфологична хетерогенност, което е основание да се приема по-скоро като синдромокомплекс, отколкото като нозологична единица.

2. Основна роля в имунопатогенезата на системния еритематозен лупус и лупусната нефропатия има системата на комплемента с основен компонент – C1q, чиито дефицити са свързани в най-голяма степен с предразположение към развитие на болестен процес.

3. Ролята на комплемента в имунопатогенезата на системния еритематозен лупус и лупусната нефропатия е двустранна: от една страна, активирането на комплементната каскада с включване на механизмите на вродения и придобития имунитет водят до развитие на възпаление, имунен отговор към автоантигени и в крайна сметка персистиращо тъканно увреждане, а от друга – недостатъчното активиране на комплементната каскада води до нарушен клирънс на имунни комплекси и апоптотични клетки с тяхното натрупване и развитие на аутоимунитет.

4. Активирането на комплементната каскада при СЛЕ и ЛН става по класическия път, но се поддържа и усилва чрез амплификационната бримка, в която участва C3 и алтернативната C3-конвертаза

5. Основна роля в придобитите функционални дефицити на комплементната каскада при системен еритематозен лупус и лупусната нефропатия имат аутоантителата срещу компоненти на комплемента, т. е., компонентите на комплемента могат на свой ред да бъдат аутоантигени.

6. Най-важното и най-детайлно проучено аутоантитяло, което има патогенетична роля за развитието на СЛЕ и ЛН, е anti-C1q. То няма нозологична специфичност, но се характеризира със сравнително висока чувствителност и висока негативна предиктивна стойност по отношение на лупусната нефропатия, като корелира с маркерите за активност на заболяването и има прогностична стойност по отношение на рецидиви на лупусната нефропатия.

7. Останалите автоантитела срещу компоненти на комплементната система, описвани при системен еритематозен лупус и лупусна нефропатия не са достатъчно проучени и тяхното патогенетично и клинично значение на този етап не е напълно изяснено.

IV. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

4.1. Материал

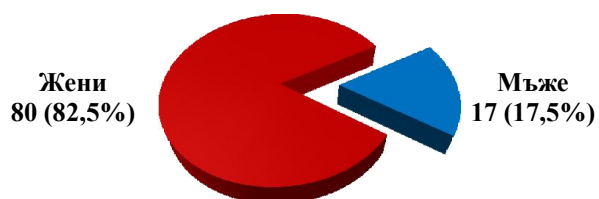
4.1.1. Пациенти

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

Диагнозата СЛЕ е поставяна на базата на анамнеза, клиничен преглед, клинико-лабораторни и имунологични изследвания, съгласно критериите за ACR („Литературен обзор”, Таблица 3). Хистологичната верификация на ЛН е била провеждана при пациенти с протеинурия над 0,5 g/24 часа и/или патологично активен уринен седимент и/или ограничена бъбречна функция след изключване на друга причина за лабораторните отклонения.

4.1.1.1. Разпределение по пол на пациентите с ЛН

В проучването са включени 17 (17,5%) мъже и 80 (82,5%) жени. (Фигура 4.1)

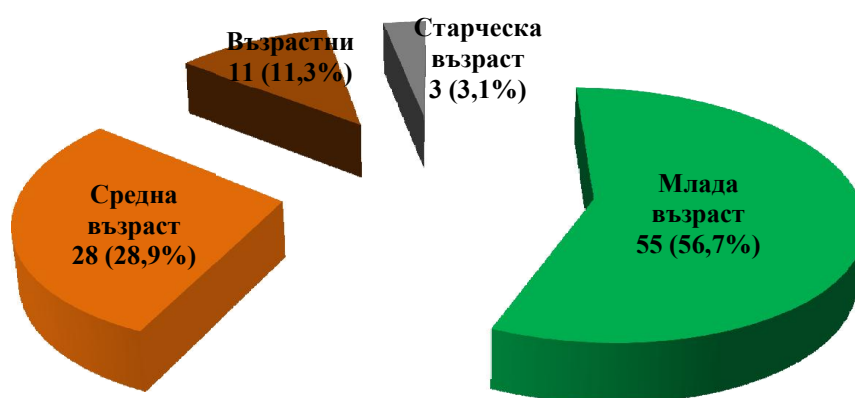


Фигура 4.1. Разпределение на пациентите с ЛН по пол.

4.1.1.2. Разпределение по възраст на пациентите с ЛН

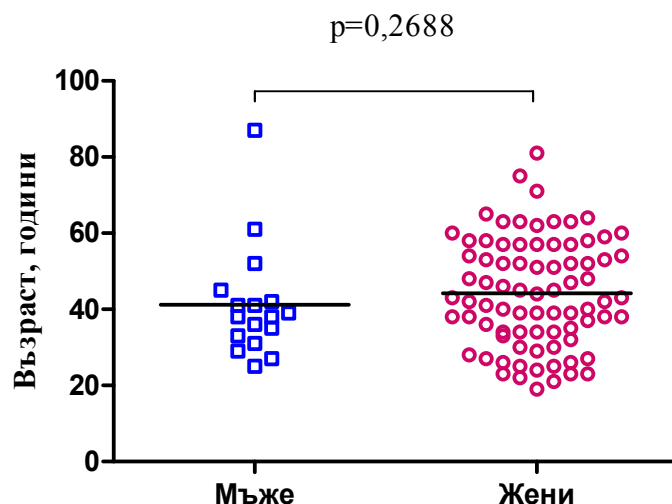
Проучваните пациенти са на средна възраст $43,69 \pm 14,28$ (от 19 до 87) години, като статистическото разпределение на възрастта е нормално (тест на Колмогоров-Смирнов, $p=0,09$).

Според възрастовото разпределение по СЗО, в млада възраст (от 18 до 44 години) са 55 човека (56,7%), в средна (зряла) възраст (от 45 до 59 години) са 28 човека (28,9%), възрастни (от 60 до 74 години) са 11 човека (11,3%) и в старческа възраст (от 75 до 89 години) са 3 човека (3,1%). (Фигура 4.2)



Фигура 4.2. Разпределение на пациентите с ЛН по възрастови групи според СЗО.

Средната възраст при мъжете е 41,8 (от 25 до 87) години, като статистическото разпределение на възрастта в групата на мъжете не е нормално (тест на Колмогоров-Смирнов, $p=0,009$). Средната възраст при жените е $44,23 \pm 14,21$ (от 19 до 81) години, като статистическото разпределение на възрастта в групата на жените е нормално (тест на Колмогоров-Смирнов, $p>0,1$). Липсва сигнификантна разлика в средната възраст между мъже и жени ($p=0,2688$). (Фигура 4.3)



Фигура 4.3. Възрастово разпределение при мъжете и жените с ЛН.

4.1.1.3. Давност на лупусната нефропатия при проучваните пациенти

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

4.1.2. Контролна група донори на плазми

С оглед определяне на референтните нива на автоантителата срещу компоненти на комплементната каскада бяха изследвани 72 доброволци, пролежавали в Клиника по Ортопедия и Травматология на УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ”, също след подписване на Информирано съгласие. Заделяни са проби от кръвна плазма в хода на

стандартните клинико-лабораторни изследвания при всеки един от пациентите и са съхранявани при -80°C . При контролната група доброволци бяха изключени възпалителни инфекциозни или автоимунни заболявания, както и активно бъбречно заболяване по анамнестични, клинични, лабораторни и документални данни. Разпределението по пол сред доброволците е 15 (20,8%) мъже и 56 (77,8%) жени на средна възраст $44,85 \pm 15,73$ (от 18 до 86) години. Средната възраст при мъжете доброволци е $42,30 \pm 14,63$ (от 18 до 86) години, а средната възраст при жените доброволци е $41,40 \pm 15,96$ (от 21 до 74) години, като липсва сигнификантна разлика във възрастта между мъже и жени ($p=0,6251$).

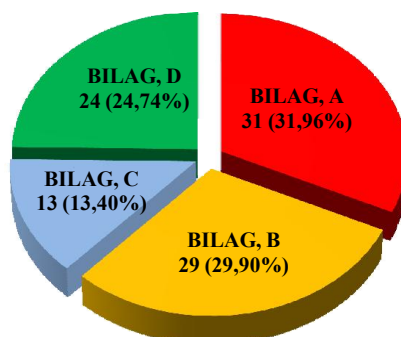
4.2. Методи

4.2.1. Клинични изследвания

Диагнозата на пациентите е изградена въз основа на подробна анамнеза и пълен обективен статус, като акцентът е бил върху бъбречните прояви на системното автоимунно заболяване. Диагнозата СЛЕ е поставена при наличие на най-малко 4 от 11 критерия на American College of Rheumatology, 1982, ревизирани през 1997 г. („Литературен обзор”, Таблица 3).

За определяне на активността на ЛН и категоризиране на пациентите според тази активност е използвана точковата система BILAG Renal score („Литературен обзор”, Таблица 4), като се вземат предвид и клинико-лабораторни и хистологични показатели, които ще бъдат разгледани по-долу в настоящото изложение. Разпределението на пациентите според активността на ЛН е както следва: в категория А (активно заболяване, налагащо провеждане на имунопатогенетично лечение) попадат 31 пациента (31,96% от изследваните с ЛН); в категория В (заболяването е умерено активно и налага лечение) попадат 29 пациенти (29,90% от изследваните с ЛН); в категория С (стабилно, леко изразено бъбречно заболяване, не налагащо провеждане на специфично симптоматично или имунопатогенетично лечение) попадат 13 пациента (13,40% от изследваните с ЛН); в категория D (предхождащо, неактивно в момента бъбречно заболяване, не налагащо провеждане на специфично симптоматично или имунопатогенетично лечение) попадат 24 пациенти (24,74% от изследваните с ЛН).

Липсват пациенти, категоризирани в категория Е (липса на данни за бъбречно заболяване). (Фигура 4.4)

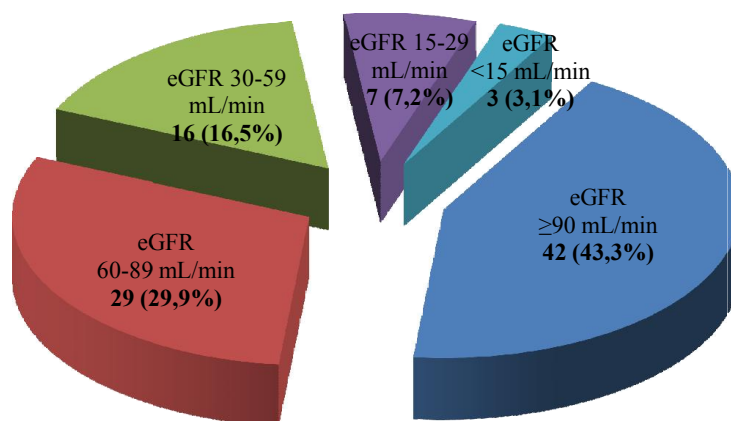


Фигура 4.4. Разпределение на пациентите според активността на ЛН въз основа на BILAG Renal score.

4.2.2. Стандартни лабораторни изследвания

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

серумния креатинин. Всички резултати са представяни като стойности в мерни единици в система SI.

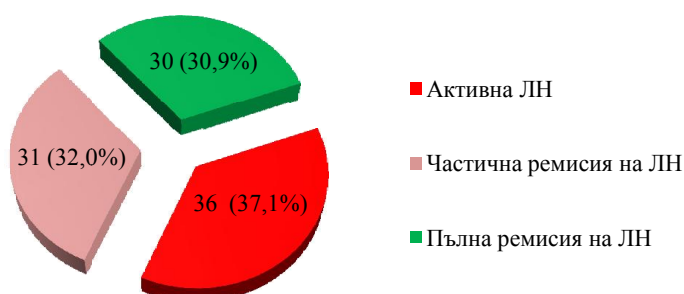


Фигура 4.5. Разпределение на пациентите според стойността на eGFR.

В зависимост от стойността на изчислената скорост на гломерулна филтрация (eGFR), проучваните пациенти с ЛН бяха разпределени в следните групи: 42 пациенти (43,3%) в групата с $eGFR \geq 90$ mL/min; 29 пациенти (29,9%) в групата с eGFR от 60 до 89 mL/min; 16 пациенти (16,5%) в групата с eGFR от 30 до 59 mL/min; 7 (7,2%) пациенти в групата с eGFR от 15 до 29 mL/min и 3 пациенти (3,1%) в групата с $eGFR < 15$ mL/min. (Фигура 4.5)

За пълна клинико-лабораторна ремисия на ЛН приемаме състояние, при което липсва патологична протеинурия, липсва патологично активен уринен седимент и бъбречната функция е запазена. Частична клинико-лабораторна ремисия на ЛН се приема при намаляване на протеинурията с над 50% спрямо изходно изследвана протеинурия, когато протеинурията е под 3,0 g/24 часа и концентрацията на серумния албумин е 30 g/L или по-висока, при липса на повишение на серумния креатинин спрямо изходно измерен с над 25% или при спадане на серумния креатинин под 130 $\mu\text{mol/L}$ при пациенти с изходно измерен серумен креатинин от 130 до 260 $\mu\text{mol/L}$ или при спадане на серумния креатинин с над 50% от изходно измерения при пациенти с изходен серумен креатинин над 260 $\mu\text{mol/L}$. Проучваните пациенти са разпределени според клинико-лабораторната активност на ЛН, както е показано на Фигура 4.6: в състояние на активна ЛН са 36 пациенти (37,1%), в състояние на частична клинико-

лабораторна ремисия на ЛН са 31 пациенти (32,0%) и в състояние на пълна клинико-лабораторна ремисия са 30 пациенти (30,9%).



Фигура 4.6. Разпределение на изследваните пациенти според клинико-лабораторната активност на ЛН.

4.2.3. Стандартни имунологични изследвания

Стандартните имунологични изследвания са извършени в Отделение по Клинична лаборатория на УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ” и в Централна имунологична лаборатория на Клиниката по Клинична имунология на УМБАЛ „Александровска”. При 71 от изследваните пациенти с ЛН първоначално са изследвани нивата на C4 и C3 компоненти на комплементната каскада в кръвна плазма с антикоагулант EDTA (имунодифузионен метод). Впоследствие, нивата на C4 и C3 при пациентите с ЛН са проследени в динамика, като са изследвани общо 264 проби за плазмени нива на C4 и C3. След провеждане на изследванията за плазмени концентрации на C4 и C3, пробите от кръвни плазми с антикоагулант EDTA са заделени и съхранявани за определяне на антикомплементни автоантитела.

При 28 (39,4%) от първоначално изследваните за ниво на C4 пациенти е установена хипокомплементемия за C4. При 14 (19,7%) от първоначално изследваните за ниво на C3 пациенти е установена хипокомплементемия за C3. При изследване в динамика, при 107 (40,5%) от пробите се установява хипокомплементемия за C4, а хипокомплементемия за C3 се установява при 32 (12,1%) от пробите.

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

При показания, с оглед прецизиране на диагнозата, когато това е било показано, при някои от пациентите са изследвани и антитела срещу екстрахируеми нуклеарни антигени (ENA): anti-Sm, anti-RNP. При показания са изследвани и антифосфолипидни антитела (APL): антикардиолипинови антитела (ACL), антитела срещу β 2-гликопротеин I (anti- β 2GPI). При някои пациенти по показания са изследвани антинеутрофилноцитоплазмени антитела (чрез индиректна имунофлуоресценция върху човешки фиксирани гранулоцити и чрез ELISA): MPO-ANCA и PR3-ANCA.

4.2.4. Хистоморфологични изследвания

Всички хистологични материали от пункционни бъбречни биопсии (преди и по време на настоящото проучване) са обработени и диагностицирани от нефропатолози: д-р Д. Дойчинов, дм; доц. д-р В. Минкова, дм; доц. д-р Т. Тодоров, дм; доц. д-р Т. Бакърджиев, дм; доц. д-р В. Ценова, дм в Отделение по Патологична анатомия на УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“ и Имуноморфологична лаборатория на Катедра по патологична анатомия на Медицински университет, гр. София. Биопсично диагностицирани са 94 (96,91%) от включените в изследването пациенти, като при 3 от тях пункционна бъбречна биопсия не е проведена, поради анатомични

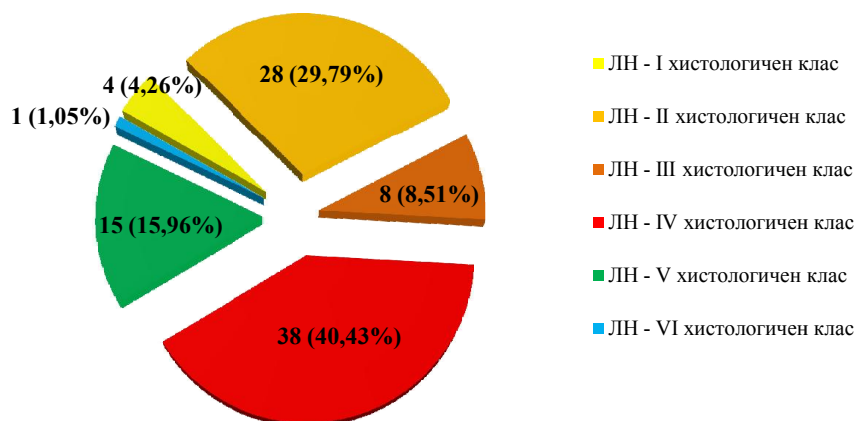
противопоказания или поради отказ на пациент. При част от пациентите са проведени повторни бъбречни биопсии (при показания за това) с оглед актуална оценка на хистологичната активност в динамика.

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

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

Диагнозата ЛН е поставяна на базата на минимум 6 гломерула, изследвани в хистологичния материал. За определяне на хистологичните промени и класа на ЛН са използвани критериите на International Society of Nephrology (ISN) и Renal Pathology Society (RPS). („Литературен обзор”, Таблица 2).

Хистологично диагностицираните пациенти с ЛН (общо 94) при включване в изследването са разпределени в зависимост от хистологичния клас на заболяването, както следва: 4 пациенти (4,26%) с I хистологичен клас ЛН; 28 пациенти (29,79%) с II хистологичен клас ЛН; 8 пациенти (8,51%) с III хистологичен клас ЛН; 38 пациенти (40,43%) с IV хистологичен клас ЛН; 15 пациенти (15,96%) с V хистологичен клас ЛН и 1 пациент (1,05%) с VI хистологичен клас ЛН (Фигура 4.7). Смесени хистологични класове на ЛН не бяха установени. При 10 от изследваните пациенти в рамките на периода на проучването са проведени бъбречни ребиопсии (с показания и при десетте случая – оценка хистологичната активност на ЛН с оглед излизане от имунопатогенетичното лечение), като при 2 от тях се установява трансформация на класа ЛН (при една пациентка от III във II хистологичен клас и при една пациентка от IV в III хистологичен клас).



Фигура 4.7. Разпределение на проучваните пациенти с ЛН в зависимост от хистологичния клас по ISN/RPS.

Изменения като хипертрофия на мезангиалния матрикс, мезангиалноклетъчна пролиферация, левкоцитна инфилтрация на гломерулите, полулуния (целуларни, фиброцелуларни или фиброзни), фибриноидна некроза, гломерулна склероза, интерстициална инфилтрация, интерстициална фиброза, тубулна дистрофия, тубулна атрофия са категоризирани полуколичествено, като липсата на такива е отчитана като 0, леката степен на изразеност като 1, умерената степен на изразеност като 2 и силната степен на изразеност като 3. Отчетени са хистологичните индекси на активност и хроничност съгласно критериите на National Institutes of Health (NIH). (Таблица 4.1)

Таблица 4.1. Индекси на активност и хроничност според NIH.

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

4.2.5. Други клинични методи

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

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

4.2.6. Определяне на антикомплементните автоантитела

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

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

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

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

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

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

Предвид определянето на антикомплементните автоантитела в три различни лаборатории (макар и съгласно унифицирани методики), с оглед хомогенизиране на кохортата, нивата на антикомплементните автоантитела са представяни като съотношение спрямо стойността на Cut-off за всяко антикомплементно автоантитяло, като за патологично повишени стойности се приемат значения над 1,00, а за референтни стойности – под 1,00.

4.2.6.1. ELISA за определяне на anti-C1q

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

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

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

4.2.7. Дизайн на изследването

Изследването е организирано в два аспекта:

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

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

4.2.8. Статистически методи за обработка на резултатите

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

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

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

V. РЕЗУЛТАТИ

5.1. АВТОАНТИТЕЛА СРЕЩУ C1q КОМПОНЕНТА НА КОМПЛЕМЕНТА.

Автоантитела срещу C1q (anti-C1q) са изследвани при всички 97 пациенти, първоначално включени в проучването, като в динамика са изследвани общо 301 проби на пациентите с ЛН. Anti-C1q са изследвани и при 72 здрави доброволци (контроли), без автоимунни и инфекциозни възпалителни заболявания, със запазена бъбречна, чернодробна и хемопоетична функции (вижте, „IV Материали и методи”, „1.2. Контролна група донори на плазми”). При изследваните за anti-C1q в контролната група здрави доброволци се установиха плазмени нива на anti-C1q $0,235 \pm 0,213$ единици оптична плътност при дължина на вълната от 450 nm (OD 450 nm) на оптичния анализатор (Фигура 5.1.1).



Фигура 5.1.1. Нива на anti-C1q при изследваните здрави контроли (показана е средната със стандартното отклонение).

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

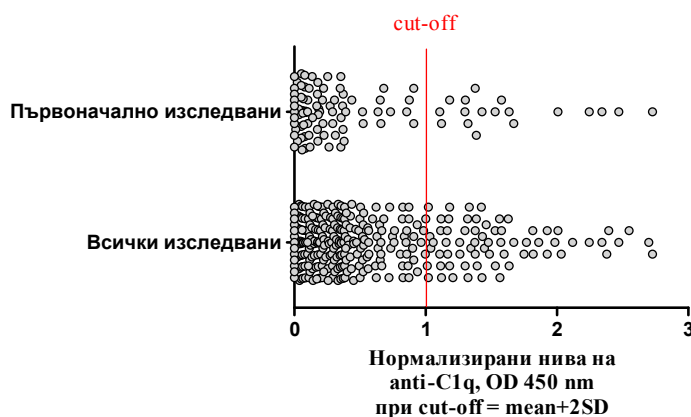
$$\text{Cut-off} = \text{mean (средна за контролната група здрави донори)} + 2 \times \text{SD}$$

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

При изследваните пациенти с ЛН определихме нива на anti-C1q, съответно на $0,327 \pm 0,395$ OD 450 nm при cut-off от 0,660 OD 450 nm (при една част от включените

пациенти, като изследването е проведено в Катедра „Биохимия, молекулярна медицина и нутригеномика” на МУ-Варна и в Националната референтна лаборатория за изследване на белтъците от системата на комплемента, при Европейската болница “Georges Pompidou”, Париж) и на $0,092 \pm 0,138$ OD 450 nm при cut-off от 0,187 OD 450 nm (при друга част от изследваните в Катедра „Биохимия” при Биологически факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски”). Изследванията в различните лаборатории са провеждани съгласно унифицирана методика. С оглед на различните изследвания проведохме нормализиране на стойностите на нивата на anti-C1q в групите пациенти с ЛН, представяйки нивата на anti-C1q като съотношение на получените стойности за оптичната плътност към съответното ниво на cut-off за лабораторията (Фигура 5.1.2). Така, за гранична стойност се приема 1,00, над която нормализираните нива на anti-C1q се приемат за повишени, а под която – за референтни. Не се установи статистически значима разлика (Mann-Whitney, $p=0,715$) между нивата на anti-C1q в контролната група здрави доброволци и тези при пациентите с ЛН.

Установихме патологично повишени титри на anti-C1q при 18 (18,56%) от изходно изследваните пациенти с ЛН. Сред изследваните общо 301 проби от кръвни плазми на пациентите с ЛН в динамика установихме патологично повишени нива на anti-C1q при 68 (22,6%) проби (Фигура 5.1.2).



Фигура 5.1.2. Разпределение на нивата на anti-C1q при изходната група първоначално изследвани пациентите с ЛН и при всички изследвани в динамика проби, след хомогенизиране на кохортата. Граничната стойност (cut-off) е представена като 1,00, над която нивата на anti-C1q се приемат за патологично повишени.

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

При мъжете с ЛН се установиха патологично повишени нива на anti-C1q при 5 от 17 пациенти (29,4%), докато при жените с ЛН – при 13 от 80 (16,3%), както е показано на Таблица 5.1.1. Не се установи статистически значимо влияние на пола на пациентите с ЛН върху наличието на патологично повишени нива на anti-C1q (Fisher's exact test, $p=0,299$).

Таблица 5.1.1. Разпределение на патологично повишените нива на anti-C1q според пола на пациентите с ЛН.

Пациенти	Патологично повишени anti-C1q	Референтни anti-C1q	Общо
Мъже	5	12	17
Жени	13	67	80
Общо	18	79	97

При анализ на нормализираните нива на anti-C1q се установи, че при мъжете с ЛН средното ниво на anti-C1q е $0,629 \pm 0,803$, а при жените с ЛН – $0,465 \pm 0,590$. Не се установи статистически значима разлика в нивата на anti-C1q при двата пола на пациентите с ЛН (Mann-Whitney, $p=0,628$).

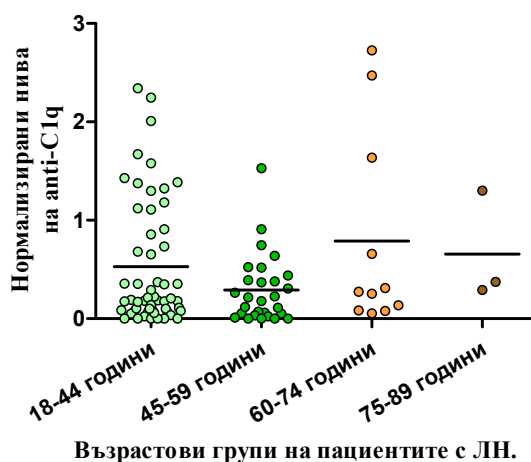
5.1.2. Автоантитела срещу C1q и възрастта на пациентите с ЛН.

Средната възраст на първоначално изследваните пациентите с ЛН е $43,69 \pm 14,28$ години. Пациентите на възраст $\leq 43,6$ години са 54, а тези на възраст над 43,6 години са 43. При анализ на нормализираните нива на anti-C1q се установи, че при пациентите на възраст $\leq 43,6$ години средното нормализирано ниво на anti-C1q е $0,547 \pm 0,640$, а при пациентите на възраст над 43,6 години това ниво е $0,426 \pm 0,620$. Не се установи статистически значима разлика в нормализираните нива на anti-C1q при двете групи пациенти ($p=0,495$).

Разпределението на пациентите по брой във възрастовите групи според СЗО е показано в „Материали и методи”, „1.1.2. Разпределение по възраст на пациентите с ЛН” и Фигура 4.2. Във възрастовата група от 18 до 44 години позитивни за anti-C1q са 13 (23,6%) пациенти; във възрастовата група от 45 до 59 години позитивен за anti-C1q е 1 (3,6%) пациент; във възрастовата група от 60 до 74 години позитивни за anti-C1q са 3

(27,3%) пациенти; във възрастовата група от 75 до 89 години позитивен за anti-C1q е 1 (33,3%) пациент.

Във възрастовите групи по СЗО, средните нормализирани нива на anti-C1q са както следва: в групата от 18 до 44 години: $0,541 \pm 0,636$; в групата от 45 до 59 години: $0,267 \pm 0,338$; в групата от 60 до 74 години: $0,790 \pm 1,003$ и в групата от 75 до 89 години: $0,655 \pm 0,562$. Данните за възрастовото разпределение на пациентите с ЛН и нормализираните нива на anti-C1q са представени на Фигура 5.1.3.



Фигура 5.1.3. Средни нива на anti-C1q в различните възрастови групи по СЗО при пациентите с ЛН.

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

Не се установи статистически значима корелационна зависимост между възрастта на изходно изследваните пациенти с ЛН и нивата на anti-C1q (Spearman, $r=-0,055$, $p=0,595$).

5.1.3. Автоантитела срещу C1q и давността на ЛН.

Средната давност на ЛН при проучваните пациенти е $10,67 \pm 9,63$ години (от 0,02 до 41,00 години).

При съпоставяне на нормализираните нива на anti-C1q при пациенти с давност на ЛН по-малка от 10,6 години и тези при пациентите с давност на ЛН над 10,6 години не се установи статистически значима разлика (Mann-Whitney, $p=0,763$).

Установи се слаба позитивна статистически незначима корелационна зависимост между anti-C1q и давността на ЛН – с увеличаване на давността на ЛН се увеличават нивата на anti-C1q (Spearman, $r=0,026$, $p=0,804$).

5.1.4. Автоантитела срещу C1q и основни клиничко-лабораторни параметри на ЛН.

Изследвахме връзките на нивата на anti-C1q с някои основни клиничко-лабораторни параметри на ЛН, каквито са: протеинурията, уринния седимент, бъбречната функция, клиничко-лабораторната активност на ЛН, както и с комплексната оценка на активността на ЛН по BILAG Renal Score (категорията по BILAG Renal score). Изследвахме и връзката на anti-C1q с наличието или липсата на извънбъбречни прояви на СЛЕ, като при пациентите с ЛН и екстраренални прояви на СЛЕ средното ниво на anti-C1q е $0,522\pm0,631$, а при пациентите с ЛН без засягане на други органи и системи: $0,378\pm0,437$. Въпреки по-високите нива на anti-C1q при пациентите с извънбъбречни прояви на СЛЕ и ЛН, тази разлика е статистически незначима (Mann-Whitney, $p=0,473$). Липсата на влияние на anti-C1q върху проявите на екстраренални признаци на СЛЕ в изследваната група пациенти с ЛН потвърдихме и с екзактен тест на Fisher (Fisher's exact test, $p=1,000$).

5.1.4.1. Автоантитела срещу C1q и протеинурия.

За патологично ниво на протеинурията приехме такава от 0,15 g/24 часа (g/d) и по-висока. Сред изследваните пациенти в нашето проучване, патологично ниво на протеинурия се установи при 69 (71,1%), а протеинурия, по-ниска от 0,15 g/d (референтна по степен протеинурия) – при 28 (28,9%) пациенти. Сред всички изследвани уринни проби (общо 301) на пациентите с ЛН в динамика за периода на проучването, патологична протеинурия се установи при 204 (67,8%) от пробите. Изходно, при пациентите с повишени нива на anti-C1q (18 пациенти) се установи

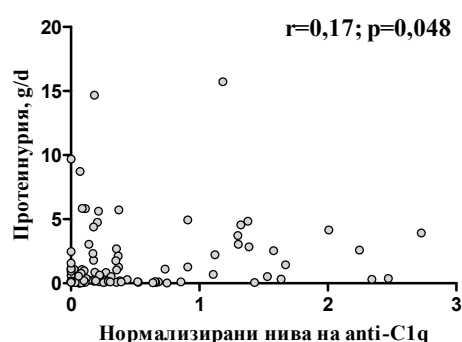
протеинурия от 0,15 g/d и по-висока при 17 (94,4%) пациенти и по-ниска от 0,15 g/d – при 1 (5,6%) от тях. При пациентите с референтни нива на anti-C1q (79 пациенти), протеинурия $\geq 0,15$ g/d се установи при 52 (65,8%) пациенти, а протеинурия $< 0,15$ g/d се установи при 27 (34,2%) пациенти (Таблица 5.1.2).

Сред изходно изследваните в нашето проучване пациенти с ЛН се установи статистически значимо влияние на нивата на anti-C1q върху протеинурията – патологично повишените нива на anti-C1q определят наличието на патологична по степен протеинурия ($\geq 0,15$ g/d) при пациентите с ЛН (Fisher's exact test, $p=0,019$).

Таблица 5.1.2. Разпределение на пациентите с патологична и референтна по степен протеинурия в зависимост от серологичния статус по отношение на anti-C1q.

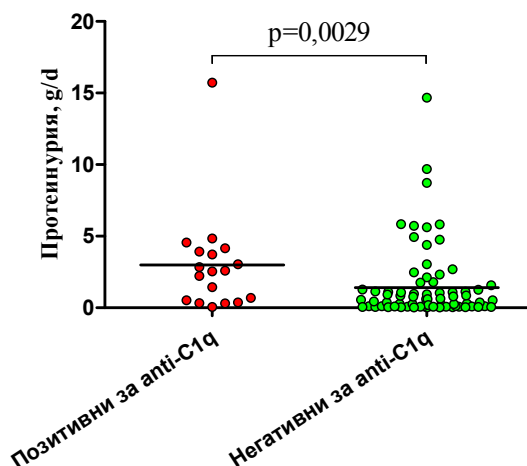
Пациенти:	Протеинурия $\geq 0,15$ g/d	Протеинурия $< 0,15$ g/d	Общо
Повишени anti-C1q	17	1	18
Референтни anti-C1q	52	27	79
Общо	69	28	97

При изследване на протеинурията (g/d) в зависимост от нормализираните нива на anti-C1q при проучваните пациенти с ЛН, се установи слаба позитивна статистически значима корелация – нарастването на нивата на anti-C1q е свързано с нарастване на протеинурията (g/d) (Spearman, $r=0,17$, $p=0,048$, Фигура 5.1.4).



Фигура 5.1.4. Корелационна зависимост на протеинурията (g/d) от нивата на anti-C1q при пациентите с ЛН (Spearman, $r=0,17$, $p=0,048$).

При пациентите, позитивни за anti-C1q, средните стойности на протеинурията са $3,00 \pm 3,56$ g/d (от 0,05 до 15,72 g/d), докато при пациентите, негативни за anti-C1q, средните стойности на протеинурията са $1,41 \pm 2,50$ g/d (от 0,02 до 14,67 g/d). При



уринен седимент се установи при 45 (46,4%) пациенти. При проследяване в динамика, патологично активен уринен седимент е установен при общо 145 (48,2%) от всички обработени уринни проби.

Сред пациентите с ЛН с повишени нива на anti-C1q, патологично активен уринен седимент се установи при 12 (66,7%) пациенти, а при 6 (33,3%) пациенти не се установи патологична находка в уринния седимент. Сред пациентите с ЛН с референтни нива на anti-C1q, патологично активен уринен седимент се установи при 33 (41,8%) пациенти, а при 46 (58,2%) пациенти не се установи патологична находка в уринния седимент (Таблица 5.1.3). Сред изходно изследваните пациенти с ЛН в нашето проучване се установи статистически значимо влияние на позитивния статус за anti-C1q върху наличието на патологично активен уринен седимент – патологично повишените нива на anti-C1q определят наличието на патологично активен уринен седимент (Fisher's exact test, $p=0,049$).

Горепосочената зависимост бе потвърдена и сред общо изследваните в динамика проби при пациентите с ЛН. Сред общо изследваните лабораторни проби, позитивни за anti-C1q, патологично активен уринен седимент се установи при 43 (63,2%) проби, докато пробите, позитивни за anti-C1q, с липса на патологична активност в уринния седимент са 25 (36,8%). Сред общо изследваните лабораторни проби, негативни за anti-C1q, патологично активен уринен седимент се установи при 102 (43,8%), докато пробите, негативни за anti-C1q, с липса на патологична активност в уринния седимент са 131 (56,2%) (Таблица 5.1.4). Сред общо изследваните проби в динамика се установи статистически значимо влияние на позитивния статус за anti-C1q върху наличието на патологично активен уринен седимент – патологично повишените нива на anti-C1q определят наличието на патологично активен уринен (Fisher's exact test, $p=0,0035$).

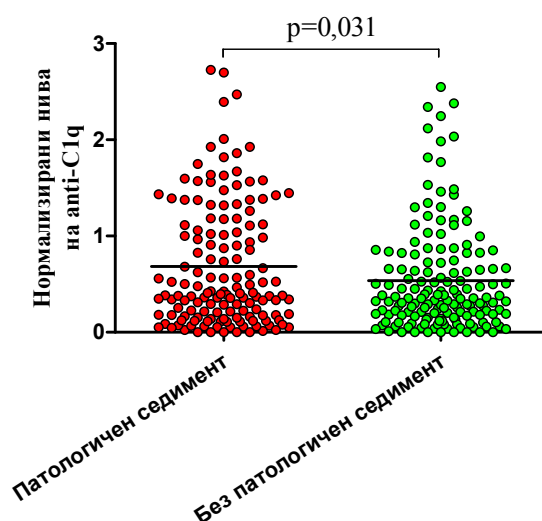
Таблица 5.1.3. Разпределение на пациентите с ЛН, първоначално изследвани в проучването, с патологично активен уринен седимент и без патологична находка в уринния седимент в зависимост от серологичния статус по отношение на anti-C1q.

Пациенти	Патологично активен уринен седимент	Без патологична находка в уринния седимент	Общо
Повишени anti-C1q	12	6	18
Референтни anti-C1q	33	46	79
Общо	45	52	97

Таблица 5.1.4. Разпределение на всички изследвани лабораторни проби при пациентите с ЛН в динамика с патологично активен уринен седимент и без патологична находка в уринния седимент в зависимост от серологичния статус по отношение на anti-C1q.

Общо проби в проучването	Патологично активен уринен седимент	Без патологична находка в уринния седимент	Общо
Повишени anti-C1q	43	25	68
Референтни anti-C1q	102	131	233
Общо	145	156	301

При всички проби от пациентите, изследвани в динамика с патологично активен уринен седимент, се установиха статистически значимо по-високи нормализирани нива на anti-C1q ($0,683 \pm 0,637$) в сравнение с нивата на anti-C1q ($0,536 \pm 0,546$) при пациентите без патологична находка в уринния седимент (Mann-Whitney, $p=0,031$), както е показано на Фигура 5.1.6.



Фигура 5.1.6. Нормализирани нива на anti-C1q при пациентите с и без патологично активен уринен седимент, при всички проби, изследвани в динамика.

5.1.4.3. Автоантитела срещу C1q и бъбречна функция.

При изследваните пациенти с ЛН, първоначално включени в проучването, 71 (73,2%) са с изчислена скорост на гломерулната филтрация (eGFR) ≥ 60 mL/min, докато тези с eGFR < 60 mL/min са 26 (26,8%). Сред всички проведени в динамика на проучването проби, при 235 (78,1%) се установи eGFR ≥ 60 mL/min, а при 66 (21,9%) – eGFR < 60 mL/min. Разпределението на пациентите с ЛН в групи според eGFR е показано на Фигура 4.5 в Глава „Материал и методи”.

Сред позитивните за anti-C1q пациенти с ЛН, при 10 (55,6%) се установи eGFR < 60 mL/min, а при 8 (44,4%) – eGFR ≥ 60 mL/min. Сред негативните за anti-C1q пациенти с ЛН, при 18 (22,8%) се установи eGFR < 60 mL/min, а при 61 (77,2%) – eGFR ≥ 60 mL/min (Таблица 5.1.5). Установи се статистически значимо влияние на нивата на anti-C1q върху eGFR – патологично повишените нива на anti-C1q определят декомпенсация на бъбречната функция в изследваната група пациенти с ЛН ($\chi^2=3,51$, $p=0,031$). Сред всички изследвани в динамика проби, при позитивните за anti-C1q 21 (30,9%) от пробите са с eGFR < 60 mL/min, а 47 (69,1%) от пробите са с eGFR ≥ 60 mL/min. Сред негативните за anti-C1q проби 45 (19,3%) от пробите са с eGFR < 60 mL/min, а 188 (80,7%) от пробите са с eGFR ≥ 60 mL/min (Таблица 5.1.6). Горепосоченото влияние на серологичния статус по отношение на anti-C1q се потвърди при изследване на общия брой проведени в динамика проби – позитивните нива на anti-C1q определят декомпенсирана бъбречна функция ($\chi^2=4,12$, $p=0,043$).

При пациентите с eGFR < 60 mL/min се установи средно нормализирано ниво на anti-C1q от $0,615 \pm 0,749$ (от 0,000 до 2,727), докато при пациентите с eGFR ≥ 60 mL/min средното ниво на anti-C1q е $0,449 \pm 0,582$ (от 0,000 до 2,471). Въпреки относително повисоките нива в групата с декомпенсирана бъбречна функция, разликата в нивата на anti-C1q не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,997$).

Таблица 5.1.5. Разпределение на пациентите с ЛН, първоначално изследвани в проучването, с eGFR < 60 mL/min и eGFR ≥ 60 mL/min в зависимост от серологичния статус по отношение на anti-C1q.

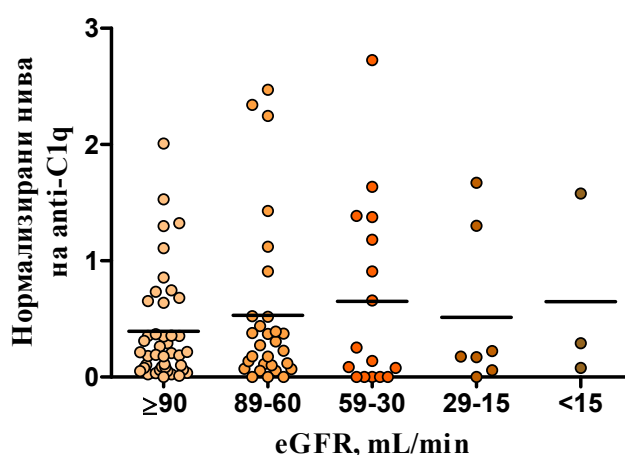
Пациенти	eGFR < 60 mL/min	eGFR ≥ 60 mL/min	Общо
Повишени anti-C1q	10	8	18
Референтни anti-C1q	18	61	79
Общо	26	71	97

Таблица 5.1.6. Разпределение на всички проведени в динамика на проучването проби при пациентите с ЛН с eGFR <60 mL/min и eGFR ≥60 mL/min в зависимост от серологичния статус по отношение на anti-C1q.

Пациенти	eGFR <60 mL/min	eGFR ≥60 mL/min	Общо
Повишени anti-C1q	21	47	68
Референтни anti-C1q	45	188	233
Общо	66	235	301

Не се установи корелационна зависимост между нивата на anti-C1q и eGFR нито сред първоначално изследваната група от 97 пациенти с ЛН (Spearman, $r=0,004$, $p=0,969$), нито сред всички изследвани в динамика проби (Spearman, $r=0,036$, $p=0,539$).

В групата от пациенти с eGFR ≥90 mL/min нормализираното ниво на anti-C1q е $0,394 \pm 0,466$ (от 0,000 до 2,008); в групата пациенти с eGFR от 89 до 60 mL/min нормализираното ниво на anti-C1q е $0,531 \pm 0,714$ (от 0,000 до 2,471); в групата пациенти с eGFR от 59 до 30 mL/min нормализираното ниво на anti-C1q е $0,652 \pm 0,812$ (от 0,000 до 2,727); в групата пациенти с eGFR от 29 до 15 mL/min нормализираното ниво на anti-C1q е $0,515 \pm 0,677$ (от 0,000 до 1,671) и в групата пациенти с eGFR <15 mL/min нормализираното ниво на anti-C1q е $0,649 \pm 0,811$ (от 0,079 до 1,578). Не се установи статистически значима зависимост между нивата на anti-C1q в групите, обособени въз основа на eGFR, и нивата на anti-C1q (One-way ANOVA, $p=0,677$) (Фигура 5.1.7)



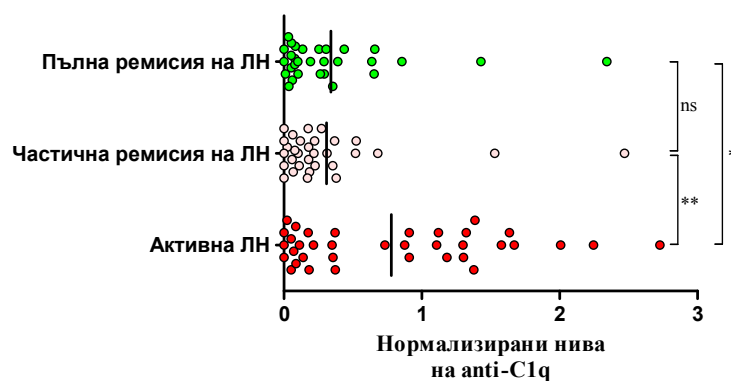
Фигура 5.1.7. Средни нива на anti-C1q в обособените според eGFR групи от пациенти с ЛН, първоначално изследвани в проучването.

5.1.4.4. Автоантитела срещу C1q и комплексната клинико-лабораторна оценка на активността на ЛН.

Както бе показано в „Материал и методи”, за пълна клинико-лабораторна ремисия на ЛН приемаме състояние без патологична протеинурия, без патологична находка в уринния седимент и наличие на компенсирана бъбречна функция. Частична клинико-лабораторна ремисия на ЛН приемаме при налична редукция на протеинурията с над 50% спрямо изходно изследвана такава, когато протеинурията е под 3,0 g/d и концентрацията на серумния албумин е ≥ 30 g/L, при липса на повишение на серумния креатинин спрямо изходно измерен с над 25% или при спадане на серумния креатинин под 130 $\mu\text{mol/L}$ при пациенти с изходно измерен серумен креатинин от 130 до 260 $\mu\text{mol/L}$ или при спадане на серумния креатинин с над 50% от изходно измерения при пациенти с изходен серумен креатинин над 260 $\mu\text{mol/L}$. Проучваните пациенти са разпределени според клинико-лабораторната активност на ЛН, както е показано на Фигура 4.6: в състояние на активна ЛН са 36 пациенти (37,1%), в състояние на частична клинико-лабораторна ремисия на ЛН са 31 пациенти (32,0%) и в състояние на пълна клинико-лабораторна ремисия са 30 пациенти (30,9%).

В групата с активна ЛН се установиха 14 (38,9%) пациенти, позитивни за anti-C1q, в групата с частична ремисия на ЛН позитивни за anti-C1q са 2 (6,5%) пациенти и в групата с пълна клинико-лабораторна ремисия на ЛН позитивни за anti-C1q са 2 (6,7%) пациенти. Средните нормализирани нива на anti-C1q в трите групи пациенти с ЛН са както следва: в групата с активна ЛН – $0,779 \pm 0,739$ (от 0,000 до 2,727; Median – 0,553); в групата с частична ремисия на ЛН – $0,310 \pm 0,497$ (от 0,000 до 2,471; Median – 0,179); в групата с пълна клинико-лабораторна ремисия на ЛН – $0,342 \pm 0,491$ (от 0,000 до 2,342; Median – 0,164), както е показано на Фигура 5.1.8.

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



Фигура 5.1.8. Разпределение на пациентите с ЛН в зависимост от комплексната клиничко-лабораторна оценка активността на ЛН. Представени са средните нормализирани нива на anti-C1q в трите групи.

След прилагане на множествен сравнителен тест на Bonferroni (Таблица 5.1.7) установихме, че нивата на anti-C1q при пациентите с активна ЛН са статистически значимо по-високи от нивата на anti-C1q при пациентите с пълна клиничко-лабораторна ремисия на ЛН ($p < 0,05$; 95% CI: 0,077-0,797) и значимо по-високи от нивата на anti-C1q при пациентите с частична клиничко-лабораторна ремисия на ЛН ($p < 0,05$; 95% CI: 0,112-0,826). Не се установи статистически значима разлика между нивата на anti-C1q при пациентите с частична клиничко-лабораторна ремисия на ЛН и нивата на anti-C1q при пациентите с пълна ремисия на ЛН ($p > 0,05$) (Фигура 5.8, Таблица 5.7).

Таблица 5.1.7. Множествен сравнителен тест на Bonferroni за изследване разликите в нивата на anti-C1q в групите от пациенти с активна ЛН, с частична ремисия на ЛН и с пълна ремисия на ЛН.

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

Сред позитивните за anti-C1q пациенти с ЛН, 14 (77,8%) са с активна ЛН, 2 (11,1%) от пациентите са с частична ремисия на ЛН и 2 (11,1%) от пациентите са в състояние на пълна клинико-лабораторна ремисия на ЛН. Сред пациентите с ЛН с референтни нива на anti-C1q, 22 (27,8%) са с активна ЛН, 29 (36,7%) са с частична ремисия на ЛН и 28 (35,4%) са с пълна клинико-лабораторна ремисия на ЛН. При отчитане на липсата на клинико-лабораторна активност на ЛН (имайки предвид само пациентите в състояние на пълна клинико-лабораторна ремисия на ЛН) и наличието на активност на ЛН (обединявайки групите с активна ЛН и частична ремисия на ЛН) (Таблица 5.1.8) установихме, че позитивните нива на anti-C1q определят статистически значимо наличието на активност на ЛН (Fisher's exact test, $p=0,036$).

Таблица 5.1.8. Разпределение на пациентите с ЛН, първоначално изследвани в проучването с активност и без активност на ЛН в зависимост от серологичния статус по отношение на anti-C1q.

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

При анализ на всички изследвани 301 проби, установихме, че от всички позитивни за anti-C1q, 33 (48,5%) от пробите са при пациенти в състояние на активна ЛН, 18 (26,5%) от пробите са при пациенти с частична клинико-лабораторна ремисия на ЛН и 17 (25,0%) от пробите са при пациенти в състояние на пълна клинико-лабораторна ремисия. Сред пробите с референтни нива на anti-C1q, 66 (28,3%) от пробите са при пациенти с активна ЛН, 83 (35,6%) от пробите са при пациенти с частична ремисия на ЛН и 84 (36,1%) от пробите са при пациенти с пълна ремисия на ЛН. При отчитане на липсата на клинико-лабораторна активност на ЛН (имайки предвид само състоянията на пълна клинико-лабораторна ремисия на ЛН) и наличието на активност на ЛН (обединявайки групите с активна ЛН и частична ремисия на ЛН), както е показано на Таблица 5.1.9, установихме, че позитивните нива на anti-C1q определят статистически значимо наличието на активност на ЛН (χ^2 , $p=0,045$), при чувствителност от 25,5% (95% CI: 19,6-32,1) и специфичност от 83,2% (95% CI: 74,4-89,9).

Таблица 5.1.9. Разпределение на всички проведени в динамика на проучването проби при пациентите с ЛН с активност и без активност на ЛН в зависимост от серологичния статус по отношение на anti-C1q.

Пациенти	С активност на ЛН	Без активност на ЛН	Общо
Повишени anti-C1q	51	17	68
Референтни anti-C1q	149	84	233
Общо	200	101	301

При пациентите с продължителност на пълната клиничко-лабораторна ремисия на ЛН ≥ 12 месеца се отчетоха сравнително по-ниски нива на anti-C1q ($0,371 \pm 0,589$) в сравнение с нивата на anti-C1q при продължителност на пълната клиничко-лабораторна ремисия под 12 месеца ($0,498 \pm 0,477$), макар тази разлика да не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,142$). Независимо от състоянието на пациентите с ЛН към момента на включване в проучването, при съпоставяне на нормализираните нива на anti-C1q при тези с епизоди на ремисия в миналото ($0,440 \pm 0,622$) с нивата при пациентите без ремисия в миналото ($0,574 \pm 0,575$) също не се установи статистически значима разлика (Mann-Whitney, $p=0,204$), въпреки по-високите нива на anti-C1q при пациентите, при които в миналото не е достигана пълна клиничко-лабораторна ремисия на ЛН.

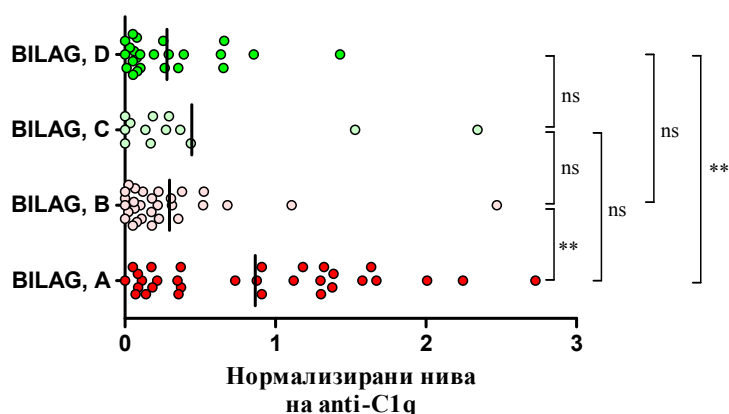
5.1.4.5. Автоантитела срещу C1q и комплексната оценка на ЛН (категиорите) по BILAG Renal score.

Диагностичната система от критерии на British Isles Lupus Assessment Group (BILAG) – Renal score дава възможност за комплексна оценка на активността на ЛН въз основа на клинични, лабораторни и хистологични белези, както е описано по-горе в „III. Литературен обзор” и Таблица 3.4. Разпределението на изследваните в проучването пациенти с ЛН според категорията по BILAG Renal score е показано по-горе в „IV. Материали и методи” на Фигура 4.4.

При пациентите с ЛН от категория А по BILAG Renal score (наличие на активно заболяване, налагащо провеждане на модифициращо хода на болестта имунопатогенетично лечение) позитивните за anti-C1q са 13 (41,9%); при пациентите от категория В позитивни за anti-C1q са 2 (6,9%); при пациентите от категория С позитивни за anti-C1q са 2 (15,4%) и 1 (4,2%) от пациентите от категория D е позитивен

за anti-C1q. Средните нормализирани нива на anti-C1q при различните категории пациенти с ЛН по BILAG Renal score са както следва: при категория А: $0,866 \pm 0,741$ (от 0,000 до 2,727; Median – 0,876); при категория В: $0,295 \pm 0,485$ (от 0,000 до 2,471; Median – 0,176); при категория С: $0,444 \pm 0,697$ (от 0,000 до 2,342; Median – 0,185) и при категория D: $0,279 \pm 0,347$ (от 0,000 до 1,429; Median – 0,102), както е показано на Фигура 5.1.9.

Имайки предвид горепосоченото установихме статистически значима връзка между нивата на anti-C1q и категориите на активност на ЛН по BILAG Renal score, като по-високите нива на anti-C1q са свързани с по-висока активност, определена по BILAG Renal score (One-way ANOVA, $p=0,0005$).



Фигура 5.1.9. Разпределение на пациентите с ЛН в зависимост от комплексната клинично-лабораторна оценка активността на ЛН по BILAG Renal score. Представени са средните нормализирани нива на anti-C1q в отделните категории.

След провеждане на множествен сравнителен тест на Bonferroni (Таблица 5.1.10) установихме, че нивата на anti-C1q при пациентите от категория А по BILAG Renal score са статистически значимо по-високи от нивата при пациентите от категория В ($p<0,05$; 95% CI: 0,165-0,977) и от нивата при пациентите от категория D ($p<0,05$; 95% CI: 0,160-1,015). Не се установи статистически значима разлика между нивата на anti-C1q при пациентите от категории А и С, В и С, С и D, В и D.

Таблица 5.1.10. Множествен сравнителен тест на Bonferroni за изследване разликите в нивата на anti-C1q в отделните категории по BILAG Renal score на пациентите с ЛН.

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

Сред всички изследвани в динамика проби на пациенти с ЛН (N=301), които са позитивни за anti-C1q, пробите на пациенти от категория А по BILAG Renal score са 28 (41,2%), пробите на пациенти от категория В са 18 (26,5%), пробите на пациенти от категория С са 6 (8,8%), пробите на пациенти от категория D са 16 (23,5%). Сред всички изследвани в динамика проби на пациенти с ЛН, които са с референтни нива на anti-C1q, пробите на пациенти от категория А по BILAG Renal score са 37 (15,9%), пробите на пациенти от категория В са 92 (39,5%), пробите на пациенти от категория С са 33 (14,2%), пробите на пациенти от категория D са 71 (30,5%). Таблица 5.1.11 показва разпределението на всички изследвани проби от пациентите с ЛН в категория А и в другите останали категории по BILAG Renal score (В, С и D) в зависимост от серологичния статус по отношение на anti-C1q.

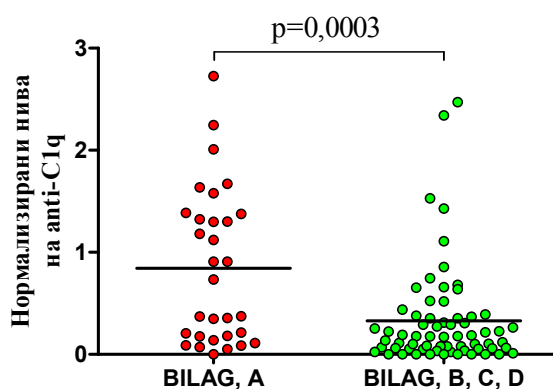
Таблица 5.1.11. Разпределение на всички изследвани в динамика проби от пациентите с ЛН в категория А и останалите категории по BILAG Renal score в зависимост от серологичния статус по отношение на anti-C1q.

Пациенти	BILAG, A	BILAG, B, C, D	Общо
Повишени anti-C1q	28	40	68
Референтни anti-C1q	37	196	233
Общо	65	236	301

Имайки предвид по-горе установените зависимости (Фигура 5.1.9), изследвайки влиянието на патологично повишените нива на anti-C1q върху активността на ЛН, категоризирана по BILAG Renal score (с оглед определяне на произтичащите от това абсолютни индикации за провеждане на имунопатогенетично лечение на ЛН) установихме, че наличието на патологично повишени нива на anti-C1q определя статистически значимо наличието на категория А по BILAG Renal score на ЛН, т. е.

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

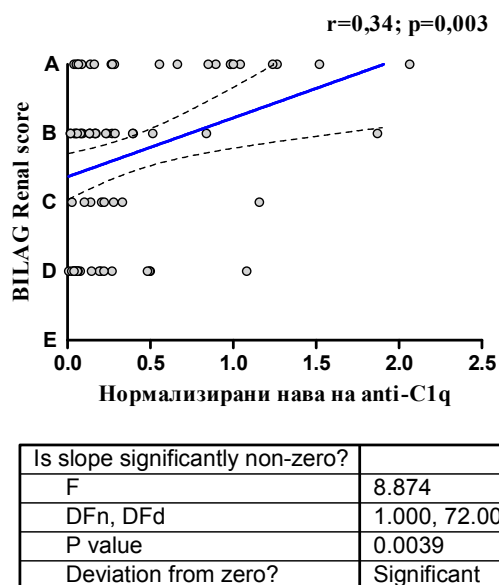
Средното нормализирано ниво на anti-C1q при пациентите от категория А по BILAG Renal score е $0,845 \pm 0,750$ (от 0,000 до 2,727), а средното нормализирано ниво на anti-C1q при всички останали пациенти с ЛН (от категории В, С и D) е $0,329 \pm 0,489$ (от 0,000 до 2,471). Сравнявайки нивата на anti-C1q от групата пациенти от категория А с нивата при останалите пациенти с ЛН (Фигура 5.1.10) установихме, че средните нормализирани нива на anti-C1q при пациентите от категория А са статистически значимо по-високи от нормализираните нива на anti-C1q при пациентите от останалите категории по BILAG Renal score (Mann-Whitney, $p = 0,0003$), което е в съответствие със зависимостите, получени от по-горе проведените анализи (вижте, Фигура 5.1.9).



Фигура 5.1.10. Нива на anti-C1q при пациенти с ЛН с категория А по BILAG Renal score и при пациенти от останалите категории по BILAG Renal score.

При изследване на зависимостта между нормализираните нива на anti-C1q и категорията по BILAG Renal score (след квантифициране на категориите: категория А – 5; категория В – 4; категория С – 3; категория D – 2 и категория Е – 1 (в последната категория Е липсват пациенти) установихме статистически значима средна по сила позитивна корелационна зависимост между нивата на anti-C1q и категорията по BILAG

Renal score (Spearman, $r=0,34$; $p=0,003$). Тази зависимост се потвърди и при прилагане на линеен регресионен анализ (Фигура 5.1.11).



Фигура 5.1.11. Корелационна зависимост между нормализираните нива на anti-C1q и категорията по BILAG Renal score (Spearman, $r=0,34$; $p=0,003$). На графиката е показан и линеен регресионен модел (в синьо) с граници на 95% CI (с пунктир). Данните от линейния регресионен анализ са дадени в таблицата под графиката.

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

С оглед диагностиката и оценката на имунологичната активност на ЛН при изследваните пациенти са определени плазмените нива на C4 компонента на комплемента, C3 компонента на комплемента, титрите на антинуклеарните антитела (ANA) и нивата на антителата срещу двойноверижна ДНК (anti-dsDNA).

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

Сред пациентите с ЛН, включени в проучването ($N=97$), плазмените концентрации на C4 са изследвани при 66 (68,0%) пациенти, а плазмените

концентрации на С3 – при 71 (73,2%) пациенти. Едновременно нивата на С4 и С3 са изследвани при 66 (68,0%) от пациентите с ЛН изходно включени в проучването.

За лабораторни референтни стойности на плазмените концентрации на С4 са приети граници от 0,20 до 0,65 g/L, а за С3 – от 0,75 до 1,65 g/L. Намалените концентрации на С4 и С3 бяха отчитани като признак на консумативна хипокомплементемия, като белег на активация на комплементната каскада и имунологична активност на заболяването.

Пациентите с ЛН с хипокомплементемия С4 са 28 (42,4%) от всички (N=66), при които са изследвани нивата на С4 изходно при включване в проучването, а пациентите с ЛН с хипокомплементемия С3 – 14 (19,7%) от всички (N=71), при които са изследвани нивата на С3 изходно при включване в проучването. Пациентите с хипокомплементемия едновременно за С4 и С3 са 13 (19,7%) от тези при които са изследвани едновременно С3 и С4.

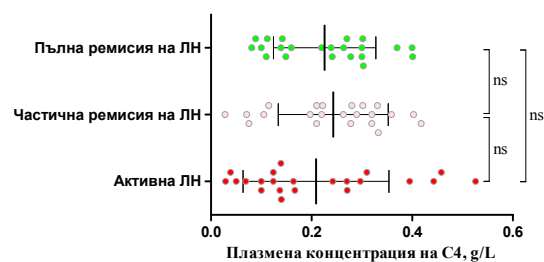
Плазмените концентрации на С4 и С3 при пациентите с активна ЛН, при тези с частична ремисия на ЛН и при тези с активна ЛН са показани на Фигура 5.1.11. Средните концентрации на С4 при изходно включените в проучването пациенти (N=66) са както следва: при пациентите с активна ЛН – $0,209 \pm 0,145$ g/L; при пациентите с частична ремисия на ЛН – $0,243 \pm 0,109$ g/L; при пациентите с пълна ремисия на ЛН – $0,226 \pm 0,102$ g/L. Средните концентрации на С4, изследвани в динамика при пациентите (N=250) са както следва: при пациентите с активна ЛН – $0,227 \pm 0,132$ g/L; при пациентите с частична ремисия на ЛН – $0,226 \pm 0,107$ g/L; при пациентите с пълна ремисия на ЛН – $0,228 \pm 0,111$ g/L. Средните концентрации на С3 при изходно включените в проучването пациенти (N=71) са както следва: при пациентите с активна ЛН – $1,021 \pm 0,483$ g/L; при пациентите с частична ремисия на ЛН – $1,187 \pm 0,345$ g/L; при пациентите с пълна ремисия на ЛН – $1,253 \pm 0,292$ g/L. Средните концентрации на С3, изследвани в динамика при пациентите (N=258) са както следва: при пациентите с активна ЛН – $1,086 \pm 0,405$ g/L; при пациентите с частична ремисия на ЛН – $1,226 \pm 0,292$ g/L; при пациентите с пълна ремисия на ЛН – $1,192 \pm 0,271$ g/L.

Не се установи статистически значима зависимост между плазмените концентрации на С4 и клинико-лабораторната активност на ЛН, както сред изходната група пациенти с ЛН (Фигура 5.1.12. А) (One-way ANOVA, $p=0,640$), така и при изследваните в динамика проби на пациентите с ЛН (Фигура 5.1.12. В) (One-way

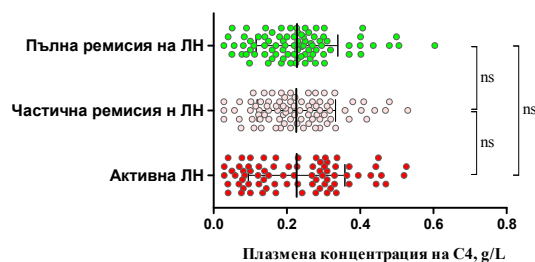
ANOVA, $p=0,994$). След прилагане на множествен сравнителен тест на Bonferroni не се установиха статистически значими разлики в концентрациите на C4 между различните групи пациенти, обособени въз основа на активността на ЛН (Фигура 5.1.12. А и В).

Налице е статистически незначимо намаление на концентрациите на C3 с нарастване активността на ЛН (Фигура 5.1.12. С) (Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$). Установи се статистически значима зависимост между плазмените концентрации на C3 и активността на ЛН при всички пациенти, изследвани за C3 в динамика (Фигура 5.1.12. D) (One-way ANOVA, $p=0,017$), като се установи статистически значима разлика единствено между плазмените концентрации на C3 в групата пациенти с активна ЛН и тези в групата с частична ремисия на ЛН (Bonferroni's multiple comparison test, $p<0,05$).

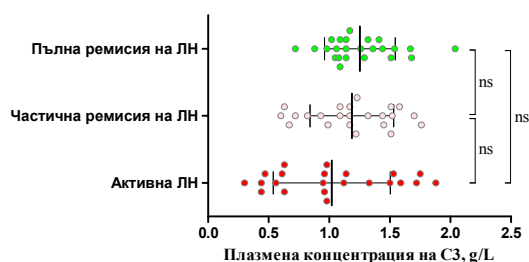
Сред пациентите с ЛН с повишени нива на anti-C1q в началото на проучването, плазмени концентрации на C4 са изследвани при 14 (77,8%), като хипокомплементемия C4 се установи при 12 (85,7%) от тези пациенти. Сред пациентите с референтни нива на anti-C1q в началото на проучването, плазмени концентрации на C4 са изследвани при 52 (65,8%), като хипокомплементемия C4 се установи при 16 (30,8%) от тези пациенти (Таблица 5.1.12). Плазмената концентрация на C4 при пациентите с повишени anti-C1q е $0,142\pm0,093$ g/L и е статистически значимо по-ниска от плазмената концентрация на C4 при пациентите с референтни нива на anti-C1q, която е $0,249\pm0,116$ g/L (Mann-Whitney, $p=0,003$), както е показано на Фигура 5.1.13.А. Средното нормализирано ниво на anti-C1q при пациентите с хипокомплементемия C4 е $0,917\pm0,795$ и е статистически значимо по-високо от средното нормализирано ниво на anti-C1q при пациентите без хипокомплементемия C4, което е $0,257\pm0,280$ (Mann-Whitney, $p=0,0003$), както е показано на Фигура 5.1.13 В.



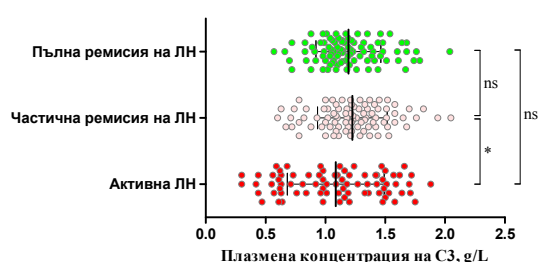
A



B



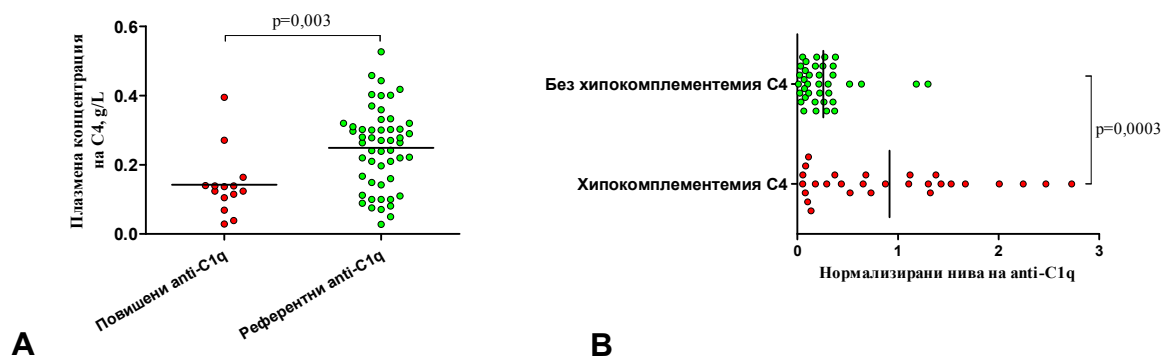
C



D

Фигура 5.1.12. Плазмени концентрации на C4 и C3 при пациенти с активна ЛН, при пациенти в състояние на частична ремисия на ЛН и при пациенти с пълна ремисия на ЛН. **A.** Концентрации на C4 при изходно включените в проучването пациенти (N=66). **B.** Концентрации на C4 при пациентите, изследвани в динамика (N=250). **C.** Концентрации на C3 при изходно включените в проучването пациенти (N=71). **D.** Концентрации на C3 при пациентите, изследвани в динамика (N=258).

Установихме, че повишените нива на anti-C1q определят статистически значимо наличието на хипокомplementемия C4 (Fisher's exact test, $p=0,0004$) с чувствителност от 42,9% (95% CI: 24,5-62,8), специфичност от 94,7% (95% CI: 82,3-99,4), позитивна предиктивна стойност от 85,7% (95% CI: 57,2-98,2) и негативна предиктивна стойност от 69,2% (95% CI: 54,9-81,3).

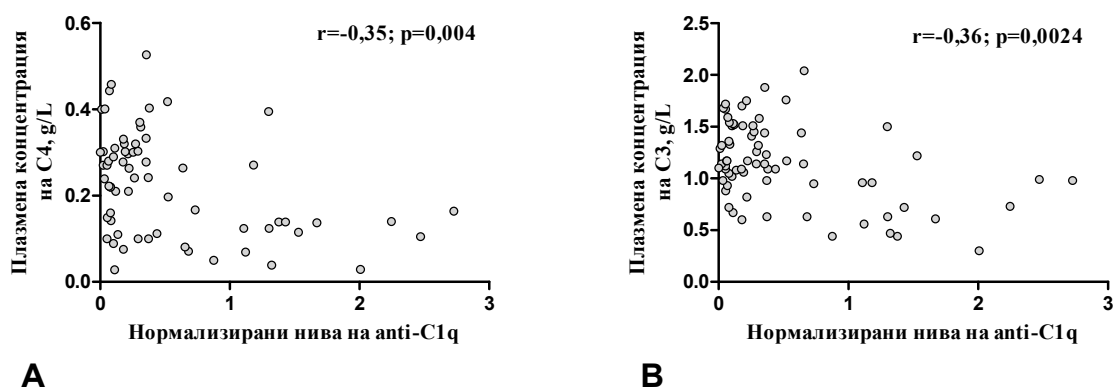


Фигура 5.1.13. **А.** Плазмени концентрации на C4 в зависимост от серологичния статус по отношение на anti-C1q при пациентите с ЛН. **В.** Нормализирани нива на anti-C1q в зависимост от наличието на хипокомplementемия C4 при пациентите с ЛН.

Таблица 5.1.12. Разпределение на пациентите с ЛН в зависимост от наличието или липсата на хипокомplementемия C4 и серологичния статус по отношение на anti-C1q.

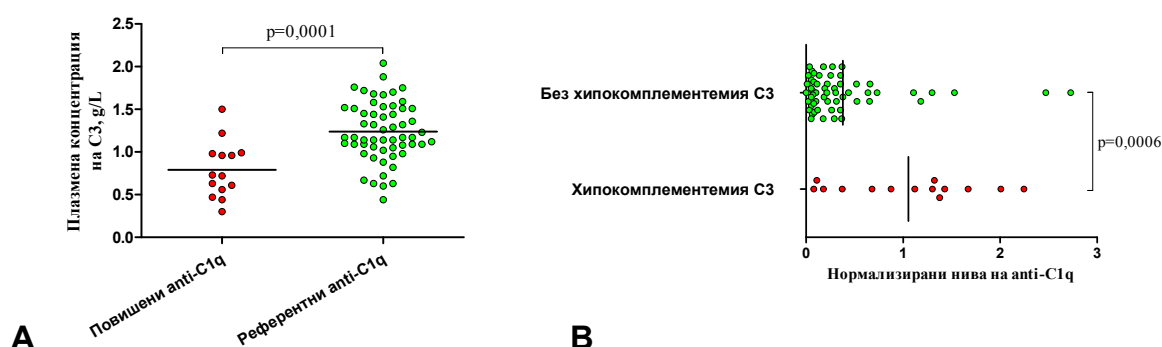
Пациенти	Хипокомplementемия C4	Без хипокомplementемия C4	Общо
Повишени anti-C1q	12	2	14
Референтни anti-C1q	16	36	52
Общо	28	38	66

Установихме статистически значима слаба обратна корелационна зависимост между нормализираните нива на anti-C1q и плазмените концентрации на C4 при пациентите с ЛН (Spearman, $r=-0,35$; $p=0,004$), както е показано на Фигура 5.1.14 А.



Фигура 5.1.14. **А.** Корелационна зависимост между нивата на anti-C1q и плазмените концентрации на C4 при пациенти с ЛН (Spearman, $r=-0,35$; $p=0,004$). **В.** Корелационна зависимост между нивата на anti-C1q и плазмените концентрации на C3 при пациенти с ЛН (Spearman, $r=-0,36$; $p=0,0024$).

Сред пациентите с ЛН с повишени нива на anti-C1q в началото на проучването, плазмени концентрации на C3 са изследвани при 15 (83,3%), като хипокомplementемия C3 се установи при 9 (50,0%) от тези пациенти. Сред пациентите с референтни нива на anti-C1q в началото на проучването, плазмени концентрации на C3 са изследвани при 57 (72,2%), като хипокомplementемия C3 се установи при 6 (10,5%) от тези пациенти (Таблица 5.1.13). Плазмената концентрация на C3 при пациентите с повишени anti-C1q е $0,791 \pm 0,329$ g/L и е статистически значимо по-ниска от плазмената концентрация на C3 при пациентите с референтни нива на anti-C1q, която е $1,239 \pm 0,344$ g/L (Mann-Whitney, $p=0,0001$), както е показано на Фигура 5.1.15 А. Средното нормализирано ниво на anti-C1q при пациентите с хипокомplementемия C3 е $1,055 \pm 0,698$ и е статистически значимо по-високо от средното нормализирано ниво на anti-C1q при пациентите без хипокомplementемия C3, което е $0,379 \pm 0,540$ (Mann-Whitney, $p=0,0006$), както е показано на Фигура 5.1.15 В.



Фигура 5.1.15. А. Плазмени концентрации на C3 в зависимост от серологичния статус по отношение на anti-C1q при пациентите с ЛН. **В.** Нормализирани нива на anti-C1q в зависимост от наличието или липсата на хипокомplementемия C3 при пациентите с ЛН.

Аналогично, както и при C4, установихме, че повишените нива на anti-C1q определят статистически значимо наличието на хипокомplementемия C3 (Fisher's exact test, $p=0,0005$) с чувствителност от 57,1% (95% CI: 28,9-82,3), специфичност от 89,5% (95% CI: 78,5-96,0), позитивна предиктивна стойност от 57,1% (95% CI: 28,9-82,3) и негативна предиктивна стойност от 89,5% (95% CI: 78,5-96,0).

Таблица 5.1.13. Разпределение на пациентите с ЛН в зависимост от наличието или липсата на хипокомplementемия C3 и серологичния статус по отношение на anti-C1q.

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

Аналогично, както при C4, установихме статистически значима слаба обратна корелационна зависимост между нормализираните нива на anti-C1q и плазмените концентрации на C3 при пациентите с ЛН (Spearman, $r=-0,36$; $p=0,0024$), както е показано на Фигура 5.1.14 В.

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

ANA са самостоятелен диагностичен критерий за СЛЕ, като се отличават със сравнително висока чувствителност, но с ниска специфичност и ниска позитивна предиктивна стойност при диагностиката на СЛЕ. Липсват статистически силни зависимости между титрите на ANA и наличието и активността на ЛН, както бе отбелязано в “III. Литературен обзор”.

Сред пациентите с ЛН, изходно включени в нашето проучване, ANA са изследвани при 72 (74,2%) и в общо 237 (78,7%) от всички изследвани проби. Патологично повишени титри на ANA ($>1:80$) установихме при 50 (69,4%) от първоначално изследваните за ANA и anti-C1q пациенти с ЛН и при 187 (78,9%) от всички изследвани за ANA и anti-C1q проби от пациенти с ЛН в динамика. В нашето проучване установихме липса на статистически значимо влияние на титрите на ANA върху активността на ЛН (Fisher's exact test, $p=0,510$).

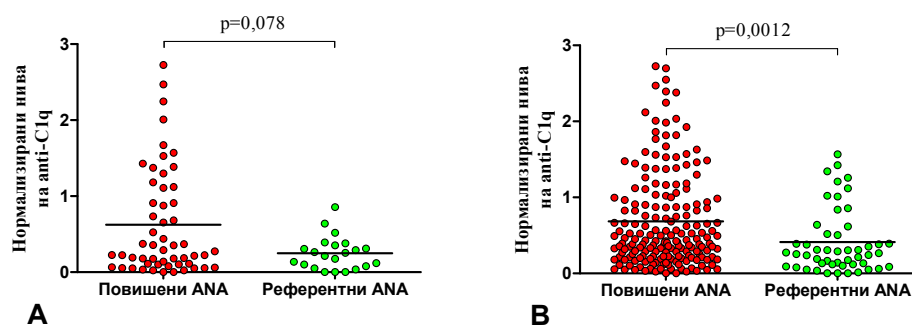
Сред всички изследвани в динамика по време на проучването пациенти с ЛН, пробите с повишени нива на anti-C1q и повишени титри на ANA са 45 (84,9% от всички проби с повишени нива на anti-C1q, изследвани за ANA), а пробите с повишени anti-C1q и референтни титри на ANA са 8 (15,1% от всички проби с повишени anti-C1q, изследвани за ANA), докато пробите с референтни нива на anti-C1q и повишени титри на ANA са 142 (77,2% от всички проби с референтни нива на anti-C1q, изследвани за ANA), а тези с референтни нива на anti-C1q и референтни титри на ANA са 42 (22,8% от всички проби с референтни нива на anti-C1q, изследвани за ANA) (Таблица 5.1.14).

Таблица 5.1.14. Разпределение на пробите от пациенти с ЛН, изследвани в динамика по време на цялото проучване в зависимост от серологичния статус на ANA и този на anti-C1q.

Пациенти	Повишени ANA	Референтни ANA	Общо
Повишени anti-C1q	45	8	53
Референтни anti-C1q	142	42	184
Общо	187	50	237

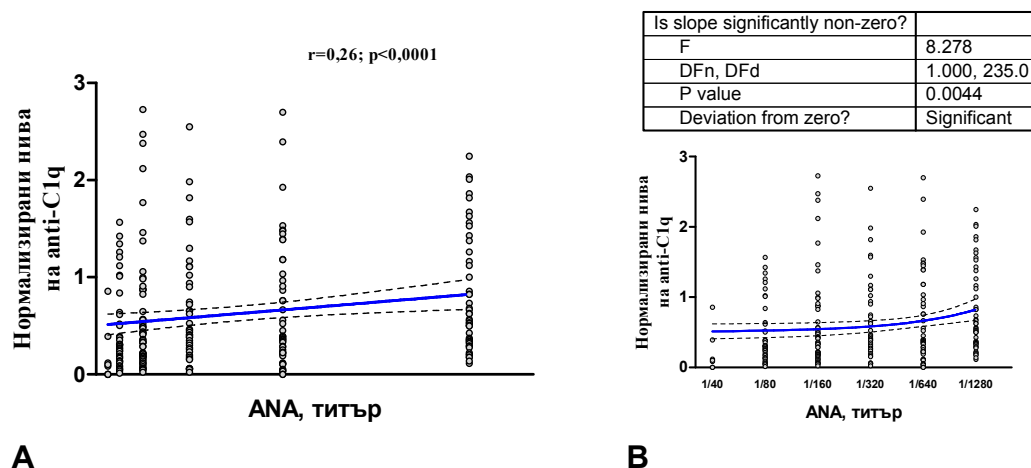
На базата на това разпределение на изследваните в динамика пациенти с ЛН, установихме, че липсва статистически значимо влияние на серологичния статус на anti-C1q върху този на ANA (Fisher's exact test, $p=0,257$).

Средното нормализирано ниво на anti-C1q при изходно изследваните пациенти с ЛН с патологично повишени титри на ANA са $0,625 \pm 0,701$, докато нивото на anti-C1q при пациентите с референтни титри на ANA са $0,249 \pm 0,219$. Не се установи статистически значима разлика между нивата на anti-C1q при пациентите с повишени ANA и тези с референтни титри на ANA (Mann-Whitney, $p=0,078$). При изследване на тази зависимост сред всички проби на пациентите с ЛН, проведени по време на проучването, установихме, че нивата на anti-C1q при пациентите с патологично повишени титри на ANA ($0,683 \pm 0,626$) са значимо по-високи от нивата на anti-C1q при пациентите с референтни титри на ANA ($0,412 \pm 0,421$) (Mann-Whitney, $p=0,0012$), както е показано на Фигура 5.1.16 А и В.



Фигура 5.1.16. Нормализирани нива на anti-C1q при пациентите с ЛН в зависимост от наличието или липсата на патологично повишени титри на ANA. **А.** Сред първоначално изследваните пациенти с ЛН (Mann-Whitney, $p=0,078$). **Б.** Сред всички, изследвани в динамика на проучването пациенти с ЛН (Mann-Whitney, $p=0,0012$).

Установихме статистически значима слаба позитивна корелационна зависимост между титрите на ANA и нормализираните нива на anti-C1q (Spearman, $r=0,26$; $p<0,0001$), като приложението на линеен регресионен анализ също показва статистически значима зависимост на нивата на anti-C1q от титрите на ANA (Linear regression, $p=0,0044$), както е показано на Фигура 5.1.17 А и В.



Фигура 5.1.17. Корелационна зависимост на нивата на anti-C1q от титрите на ANA (Spearman, $r=0,26$; $p<0,0001$). Представен е и линеен регресионен модел (в синьо) на зависимостта между нивата на anti-C1q и титрите на ANA, както и границите при 95% CI (с пунктир). **А.** При линеен мащаб на титрите на ANA. **В.** При логаритмичен мащаб ($\log_2$) на титрите на ANA.

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

Anti-dsDNA са с по-висока специфичност от ANA, но с по-ниска чувствителност при диагностиката на СЛЕ. Anti-dsDNA корелират силно и значимо с наличието и активността на ЛН, както бе отбелязано в „III. Литературен обзор”.

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

отношение на anti-dsDNA и активността на ЛН, изходно включени в проучването, е показано на Таблица 5.1.15, а същото разпределение, но сред всички изследвани в динамика проби от пациенти с ЛН – на Таблица 5.1.16.

Таблица 5.1.15. Разпределение на пациентите с ЛН, изходно включени в проучването, според серологичния статус по отношение на anti-dsDNA и активността на ЛН.

Пациенти	Активност на ЛН	Без активност на ЛН	Общо
Повишени anti-dsDNA	25	6	31
Референтни anti-dsDNA	26	19	45
Общо	51	25	76

Въз основа на това установихме зависимост между нивата на anti-dsDNA и активността на ЛН – повишените нива на anti-dsDNA определят статистически значимо наличието на активна ЛН, както сред първоначално включените в проучването пациенти с ЛН (Fisher's exact test, $p=0,048$), така и сред всички проби изследвани в динамика от пациентите с ЛН (Fisher's exact test, $p=0,007$).

Таблица 5.1.16. Разпределение на всички изследвани в динамика проби от пациентите с ЛН според серологичния статус по отношение на anti-dsDNA и активността на ЛН.

Пациенти	Активност на ЛН	Без активност на ЛН	Общо
Повишени anti-dsDNA	96	35	131
Референтни anti-dsDNA	62	49	111
Общо	158	84	242

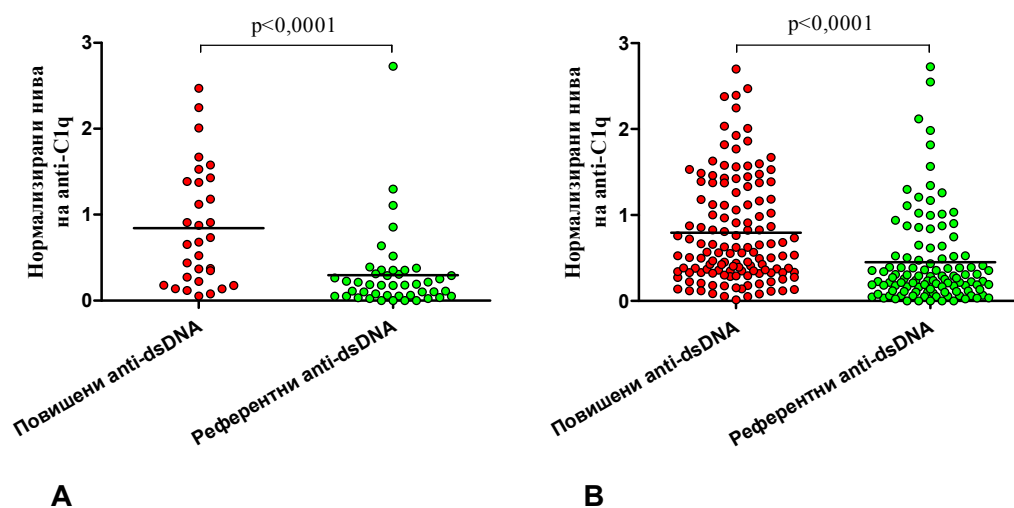
Сред всички изследвани в динамика по време на проучването пациенти с ЛН, пробите с повишени нива на anti-C1q и повишени нива на anti-dsDNA са 41 (73,2% от всички проби с повишени нива на anti-C1q, изследвани за anti-dsDNA), а пробите с повишени anti-C1q и референтни нива на anti-dsDNA са 15 (26,8% от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

референтни нива на anti-dsDNA са 96 (51,6% от всички проби с референтни нива на anti-C1q, изследвани за anti-dsDNA) (Таблица 5.1.17).

Таблица 5.1.17. Разпределение на всички изследвани в динамика проби от пациентите с ЛН според серологичния статус по отношение на anti-dsDNA и anti-C1q.

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

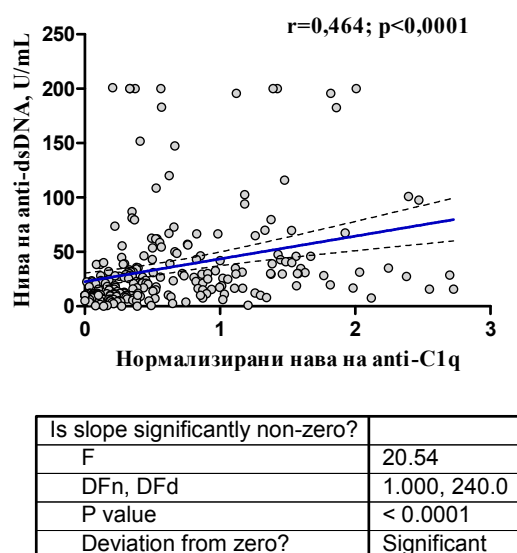
Въз основа на това разпределение установихме наличие на зависимост между нивата на anti-C1q и нивата на anti-dsDNA – повишените нива на anti-C1q определят статистически значимо наличието на повишени нива на anti-dsDNA (Fisher's exact test, $p=0,0012$).



Фигура 5.1.18. Нормализирани нива на anti-C1q при пациентите с ЛН в зависимост от наличието на патологично повишени нива на anti-dsDNA. Нивата на anti-C1q са значимо по-високи при пациентите с повишени нива на anti-dsDNA, както при изходно изследваните пациенти с ЛН ($p<0,0001$) (A), така и при всички изследвани в динамика проби от пациентите с ЛН ($p<0,0001$) (B) (Mann-Whitney).

Средните нормализирани нива на anti-C1q при изходно изследваните пациенти с ЛН с патологично повишени нива на anti-dsDNA са $0,845 \pm 0,687$, докато нивата на anti-C1q при пациентите с референтни нива на anti-dsDNA са $0,296 \pm 0,462$. Установихме, че нивата на anti-C1q са статистически значимо по-високи при пациентите с повишени нива на anti-dsDNA в сравнение с нивата на anti-C1q при пациентите с референтни нива на anti-dsDNA (Mann-Whitney, $p < 0,0001$). При изследване на тази зависимост сред всички проби на пациентите с ЛН, проведени по време на проучването, също установихме, че нивата на anti-C1q при пациентите с патологично повишени нива на anti-dsDNA ($0,794 \pm 0,610$) са значимо по-високи от нивата на anti-C1q при пациентите с референтни нива на anti-dsDNA ($0,452 \pm 0,528$) (Mann-Whitney, $p < 0,0001$), както е показано на Фигура 5.1.18 А и В.

Установихме статистически значима средна по сила корелационна зависимост между нивата на anti-C1q и нивата на anti-dsDNA – с нарастване нивата на anti-C1q се установява значимо нарастване на нивата на anti-dsDNA (Spearman, $r = 0,464$; $p < 0,0001$), като тази зависимост се потвърди и след прилагане на линеен регресионен анализ на данните (Фигура 5.1.19).



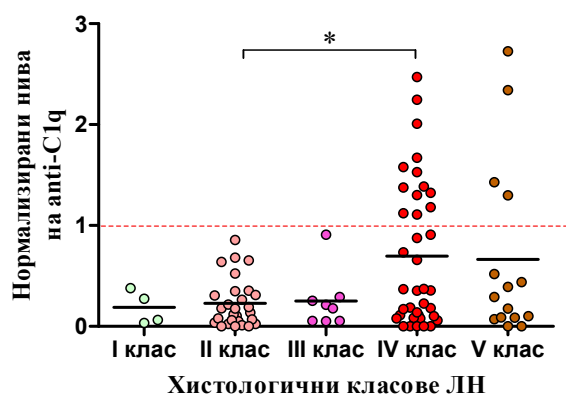
Фигура 5.1.19. Корелационна зависимост между нивата на anti-C1q и anti-dsDNA (Spearman, $r = 0,464$; $p < 0,0001$). Линеен регресионен модел на зависимостта (в синьо) и границите при 95% CI (с пунктир), данните са показани в таблицата под графиката.

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

Пациентите с ЛН, са диагностицирани с провеждане на пункционна бъбречна биопсия, като хистологична диагноза е налична при 94 (96,9%) от изходно включените в проучването пациенти и при 288 (95,7%) от всички обработени в проучването случаи. Определени са хистологичните класове на ЛН, съгласно критериите на International Society of Nephrology (ISN) и Renal Pathology Society (RPS). (Вижте, „IV. Материали и методи”, Фигура 4.7). Единствено при 2 (2,1%) пациенти е отчетена промяна на хистологичния клас на ЛН за периода на проучването. Отчетени са хистологичните индекси на активност и хроничност, съгласно критериите на National Institutes of Health (NIH). (Вижте, „IV. Материали и методи”, Таблица 4.1). С оглед клинична достоверност на изследваните зависимости, когато са изследвани връзки, касаещи белези на хистологична активност на ЛН, при статистическите анализи са отчитани само случаите, при които времето между вземането на кръвните проби за изследване на anti-C1q и провеждането на пункционната бъбречна биопсия е било до 12 месеца. Това условие е изпълнено при 32 (34,0%) от пациентите, изходно включени в проучването, и при общо 82 (28,5%) от случаите, изследвани в динамика.

5.1.6.1. Автоантитела срещу C1q и хистологичният клас на ЛН.

Сред пациентите с I, II и III хистологични класове на ЛН не се установиха патологично повишени нива на anti-C1q. Нормализираните нива на anti-C1q са съответно: при пациентите с I хистологичен клас: $0,188 \pm 0,166$; при пациентите с II хистологичен клас: $0,229 \pm 0,240$; при пациентите с III хистологичен клас: $0,251 \pm 0,283$. При пациентите с IV хистологичен клас на ЛН повишени anti-C1q се установиха при 13 (34,2%) пациенти, като нормализираното ниво на anti-C1q е най-високо: $0,696 \pm 0,714$, а при пациентите с V хистологичен клас ЛН повишени anti-C1q се установиха при 4 (26,7%) пациенти, а нормализираното ниво на anti-C1q е $0,664 \pm 0,878$. Налице е само един пациент с ЛН VI хистологичен клас, при който нормализираното ниво на anti-C1q е 0,223. Установихме статистически значима зависимост на нивата на anti-C1q от хистологичния клас на ЛН (One-way ANOVA, $p=0,014$), като от този анализ изключихме пациента с VI хистологичен клас ЛН (Фигура 5.1.20).



Фигура 5.1.20. Нива на anti-C1q в зависимост от хистологичния клас на ЛН. Налице е статистически значима разлика в нивата на anti-C1q между пациентите с VI хистологичен клас, където нивото е по-високо, и пациентите с II хистологичен клас (Множествен сравнителен тест на Bonferroni, $p < 0,05$).

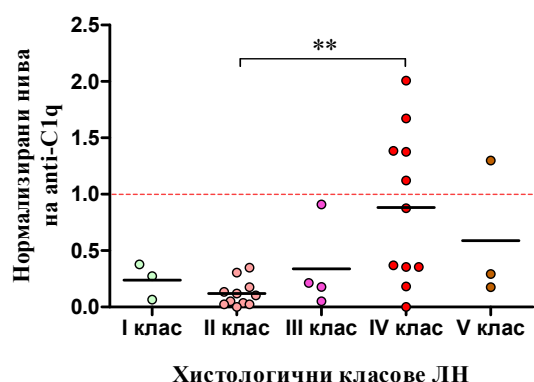
След приложение на множествен сравнителен тест на Bonferroni установихме статистически значима разлика в нивата на anti-C1q единствено между групите с IV и II хистологични класове на ЛН ($p < 0,05$) (Фигура 5.1.20 и Таблица 5.1.18).

Таблица 5.1.18. Множествен сравнителен тест на Bonferroni за изследване разликите в нивата на anti-C1q в отделните хистологични класове на ЛН.

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	p<0,05	95% CI of diff
I клас с II клас	-0,04172	0,1298	He (ns)	-0,9675 до 0,8841
I клас с III клас	-0,06351	0,1724	He (ns)	-1,124 до 0,9972
I клас с IV клас	-0,5087	1,609	He (ns)	-1,419 до 0,4018
I клас с V клас	-0,4765	1,408	He (ns)	-1,451 до 0,4981
II клас с III клас	-0,02179	0,09038	He (ns)	-0,7162 до 0,6726
II клас с IV клас	-0,4670	3,117	Да (*)	-0,8984 до -0,03562
II клас с V клас	-0,4348	2,259	He (ns)	-0,9890 до 0,1194
III клас с IV клас	-0,4452	1,903	He (ns)	-1,119 до 0,2286
III клас с V клас	-0,4130	1,568	He (ns)	-1,171 до 0,3453
IV клас с V клас	0,03218	0,1754	He (ns)	-0,4960 до 0,5603

С оглед по-голяма клинична надеждност на изводите, същите статистически изследвания приложихме и при пациентите с ЛН, при които времето между вземане на кръвните проби за изследване нивата на anti-C1q и провеждането на пункционна бъбречна биопсия е до 12 месеца. При това изследване установихме следното разпределение на данните: в групата с I хистологичен клас ЛН попадат 3 пациенти със средно нормализирано ниво на anti-C1q от $0,239 \pm 0,160$; в групата с II клас ЛН попадат

11 пациенти със средно нормализирано ниво на anti-C1q от $0,121 \pm 0,117$; в групата с III хистологичен клас ЛН попадат 4 пациенти със средно нормализирано ниво на anti-C1q от $0,339 \pm 0,387$. И тук, в тези три групи не установихме патологично повишени нива на anti-C1q. В групата с IV хистологичен клас ЛН попадат 11 пациенти, от които 5 (45,5%) са с патологично повишени нива на anti-C1q, а средното нормализирано ниво на anti-C1q в тази група е $0,882 \pm 0,673$. В групата с V хистологичен клас ЛН попадат 3 пациенти, от които 1 (33,3%) е с патологично повишено ниво на anti-C1q, а средното ниво на anti-C1q е $0,589 \pm 0,618$. На базата на това разпределение установихме, че е налице статистически значима зависимост между хистологичния клас на ЛН и нивата на anti-C1q (One-way ANOVA, $p=0,012$), като отново е налице статистически значима разлика единствено между нивата на anti-C1q при пациентите с IV и II хистологични класове на ЛН (Bonferroni's multiple comparison test, $p<0,05$, Фигура 5.1.21, Таблица 5.1.19)



Фигура 5.1.21. Нива на anti-C1q в зависимост от хистологичния клас на ЛН. Изследваните пациенти с ЛН са само тези, при които времето между изследването на anti-C1q и пункционната бъбречна биопсия е до 12 месеца. Налице е статистически значима разлика в нивата на anti-C1q между пациентите с VI хистологичен клас, където нивото е по-високо, и пациентите с II хистологичен клас (Множествен сравнителен тест на Bonferroni, $p<0,05$).

Таблица 5.1.19. Множествен сравнителен тест на Bonferroni за изследване разликите в нивата на anti-C1q в отделните хистологични класове на ЛН. Изследваните пациенти с ЛН са само тези, при които времето между изследването на anti-C1q и пункционната бъбречна биопсия е до 12 месеца.

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

При изследване връзката между наличието на патологично повишени anti-C1q и наличието на ЛН от IV хистологичен клас (Таблица 5.1.20) установихме, че в изследвана група пациенти с ЛН, патологично повишените нива на anti-C1q определят статистически значимо наличието на дифузна ЛН (IV хистологичен клас) (Fisher's exact test, $p=0,002$) с чувствителност от 34,2% (95% CI: 19,6-51,4), специфичност от 92,9% (95% CI: 82,7-98,0), позитивна предиктивна стойност от 76,5% (95% CI: 50,1-93,2) и негативна предиктивна стойност от 67,5% (95% CI: 55,9-77,8). Релативният риск за наличие на IV хистологичен клас ЛН при наличие на позитивни anti-C1q е 2,4.

Таблица 5.1.20. Разпределение на хистологично диагностицираните пациенти според наличието или липсата на IV хистологичен клас ЛН и серологичния статус по отношение на anti-C1q.

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

Сходни зависимости установихме и при изследване на връзката между наличието на повишени anti-C1q и наличието на ЛН сред всички проби от пациенти с ЛН, които са изследвани в динамика. Сред всички позитивни за anti-C1q 38 (58,5%) са с ЛН IV хистологичен клас, докато сред негативните за anti-C1q 162 (70,4%) са с хистологичен клас на ЛН, различен от IV. Въз основа на това разпределение установихме, че наличието на позитивен статус за anti-C1q статистически значимо определя наличието на ЛН от IV хистологичен клас (Fisher's exact test, $p<0,0001$) с чувствителност от 35,9%, специфичност от 85,7%, позитивна предиктивна стойност от 53,5% и негативна

предиктивна стойност от 70,4%. Релативният риск за наличие на ЛН от IV хистологичен клас при позитивни нива на anti-C1q е 2,0.

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

В настоящото проучване изследвахме зависимостите между нивата на anti-C1q и хистологични белези на активност (ендокапилярна пролиферация, гломерулна левкоцитна инфилтрация, субендотелни депозити („телени бримки”), фибриноидна некроза и/или кариорексис, клетъчни полулуния и интерстициална инфилтрация) и хистологични белези на хроничност (гломерулна склероза, фиброзни полулуния, тубулна атрофия и интерстициална фиброза), както и връзката между нивата на anti-C1q и индексите на активност и хроничност, определени на базата на горепосочените хистологични белези (Вижте “IV. Материали и методи”, Таблица 4.1). В анализите са включени само пациентите с ЛН, при които времето от вземане на пробата за изследване на anti-C1q до провеждане на пункционната бъбречна биопсия е било до 12 месеца (при 32 (34,0%) от хистологично диагностицираните пациенти, изходно включени в проучването).

Таблица 5.1.21. Сравнителен анализ между нивата на anti-C1q при наличие и липса на хистологични белези за активност и хроничност при пациентите с ЛН. Представени са средните нива $\pm$ стандартното отклонение (SD).

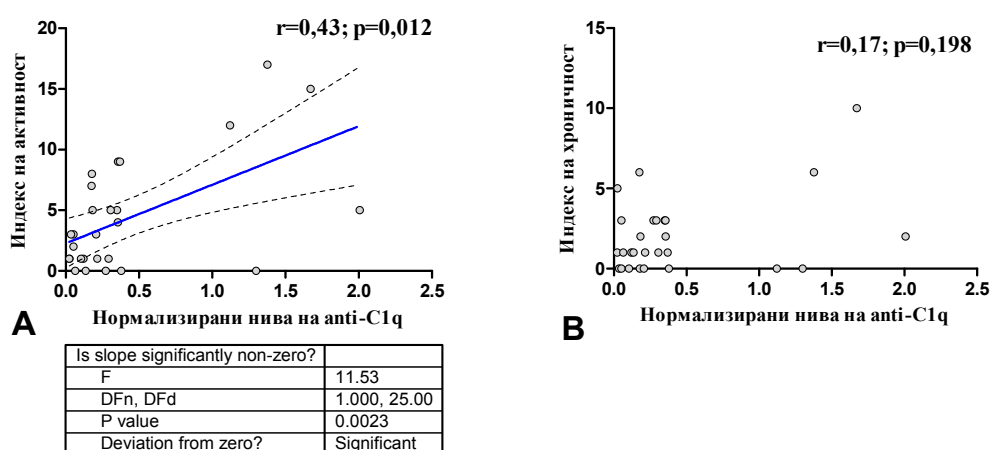
Хистологичен признак	Нормализирани нива на anti-C1q при:		p
	наличие на хистологичния признак	липса на хистологичния признак	
Ендокапилярна пролиферация	0,490 $\pm$ 0,587	0,374 $\pm$ 0,422	0,927
Гломерулна левкоцитна инфилтрация ¹	-	-	-
Субендотелни депозити, формиращи „телени бримки”	0,805 $\pm$ 0,764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

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

На Таблица 5.1.21 са показани данните от сравнителния анализ между нивата на anti-C1q в групите с и без съответните хистологични признаци за активност и

хроничност на ЛН. При пациентите с клетъчни полулуния са налице статистически значимо по-високи нива на anti-C1q в сравнение с пациентите без клетъчни полулуния (Mann-Whitney, $p=0,013$). При пациентите с фиброзни полулуния са налице значимо по-високи нива на anti-C1q в сравнение с пациентите без клетъчни полулуния (Mann-Whitney, $p=0,011$). При пациентите с наличие на хистологични признаци на активност, като ендокapилярна пролиферация, субендотелни депозити, формиращи „телени бримки“, фибриноидна некроза и интерстициално възпаление, средните нормализирани нива на anti-C1q са сравнително по-високи от нивата при пациентите без тези хистологични признаци, но разликите не са статистически значими. При пациентите с наличие на хистологични признаци на хроничност, като гломерулна склероза, тубулна атрофия и интерстициална фиброза, средните нормализирани нива на anti-C1q също са сравнително по-високи от нивата при пациентите без наличие на тези хистологични признаци, но разликите не са статистически значими.

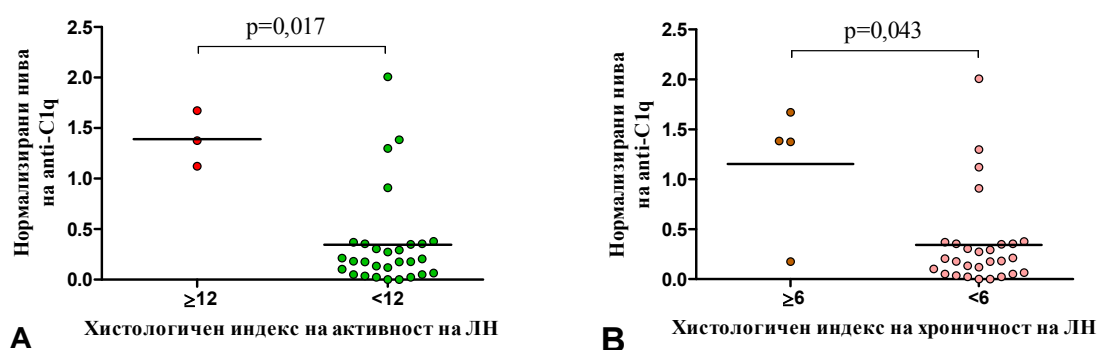
При изследване връзката между нивата на anti-C1q и хистологичния индекс на активност на ЛН установихме наличие на статистически значима средна по сила позитивна корелационна зависимост между нивата на anti-C1q и индекса на активност (Spearman, $r=0,43$; $p=0,012$). Тази връзка се потвърди и при прилагане на линеен регресионен анализ (Фигура 5.1.22 А). С повишаване нивата на anti-C1q се увеличава индекса на активност на ЛН.



Фигура 5.1.22. А. Корелационен (Spearman, $r=0,43$; $p=0,012$) и линеен регресионен анализ (графично в синьо, данните са показани в таблицата под графиката) на връзката между нивата на anti-C1q и хистологичния индекс на активност на ЛН. **В.** Корелационен анализ на връзката между нивата на anti-C1q и хистологичния индекс на хроничност (Spearman, $r=0,17$; $p=0,198$).

Не се установи статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-C1q и хистологичния индекс на хроничност на ЛН (Spearman, $r=0,17$; $p=0,198$) (Фигура 5.1.22 В).

Предвид диапазона от стойности на хистологичния индекс на активност на ЛН (от 0 до 24) и литературните данни (Вижте, „II. Литературен обзор“) установихме, че средното нормализирано ниво на anti-C1q при пациентите с индекс на активност на ЛН ≥ 12 ($1,390 \pm 0,275$), е статистически значимо по-високо от нивото при пациентите с индекс на активност на ЛН < 12 ($0,369 \pm 0,479$) (Mann-Whitney, $p=0,017$) (Фигура 5.1.23 А). Аналогично, нивото на anti-C1q при пациентите с хистологичен индекс на хроничност на ЛН ≥ 6 ($1,152 \pm 0,665$) е статистически значимо по-високо от това при пациентите с индекс на хроничност на ЛН < 6 (Mann-Whitney, $p=0,043$) (Фигура 5.1.23 В).



Фигура 5.1.23. Нормализирани нива на anti-C1q при пациенти с ЛН според хистологичните индекси на активност (А) и на хроничност (В).

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

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

Сред изследваните общо 301 проби от кръвни плазми на пациентите с ЛН в

динамика установихме патологично повишени нива на anti-C1q при 68 (22,6%) проби (Фигура 5.1.2). Изследвайки нивата на anti-C1q при проследените в динамика пациенти (с 2 и повече проби в хода на проучването), установихме, че при първите проби, патологично повишени anti-C1q има при 16 (26,2%) от пациентите, а след среден период на проследяване от 13 месеца, патологично повишени нива на anti-C1q установихме отново при 16 (26,2%) от пациентите, като при 5 от пациентите с първоначално повишени anti-C1q, последните намаляват до референтни стойности, а при 5 пациенти, изходно с референтни нива на anti-C1q се отбелязва повишаване на нивата до патологични стойности. Средното нормализирано ниво на anti-C1q при пациентите, позитивни за anti-C1q в началото, е 1,652 (от 1,108 до 2,727), докато след среден период от 13 месеца е 1,435 (от 1,039 до 2,033), като няма статистически значима разлика между тези нива (Wilcoxon signed rank test, $p=0,110$).

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

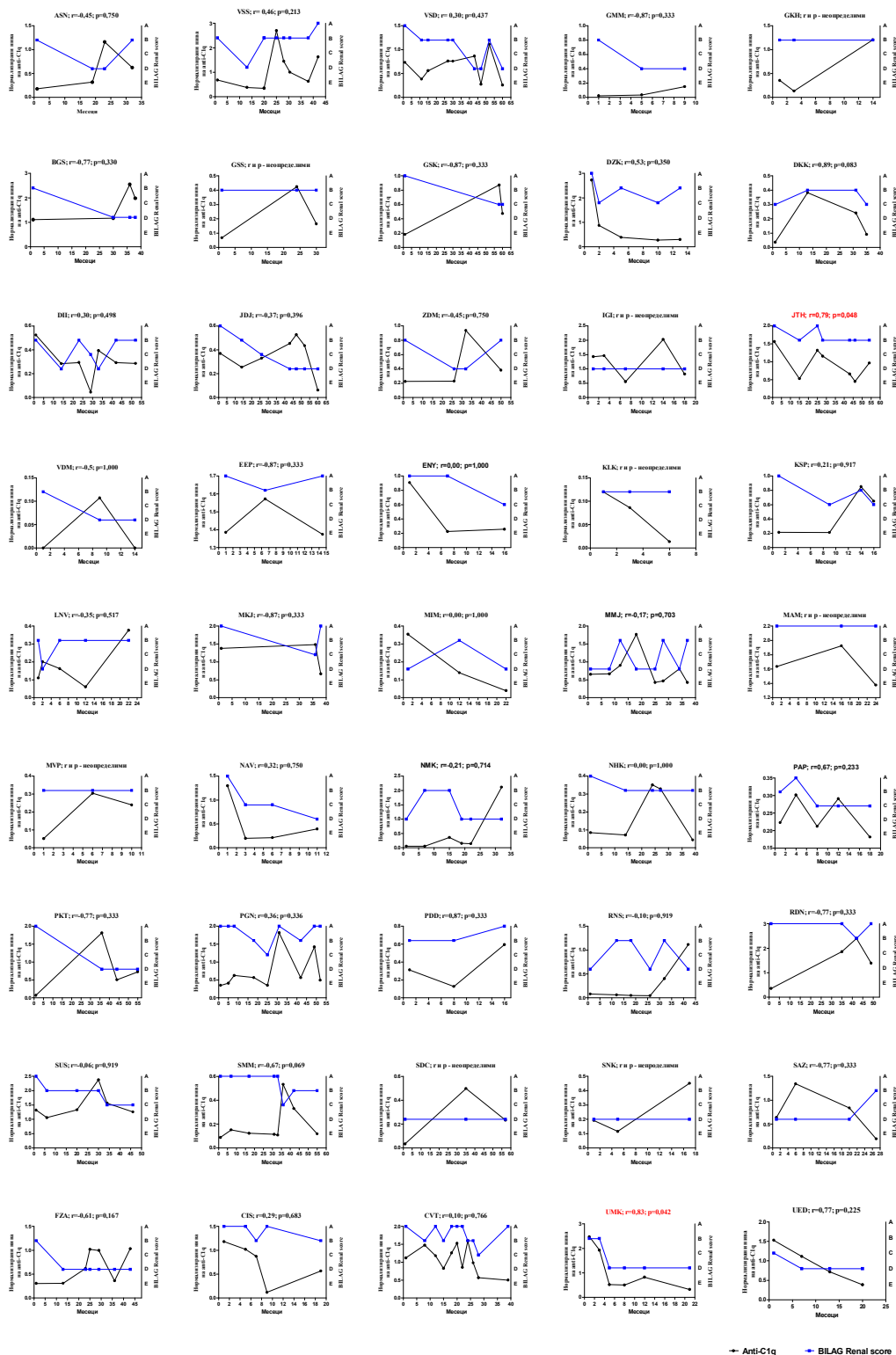
5.1.7.1. Прогностично значение на автоантителата срещу C1q.

При 45 (46,4%) от изходно включените в проучването пациенти с ЛН, при които са провеждани 3 или повече проби за anti-C1q в динамика, изследвахме връзките между нивата на anti-C1q и категорията по BILAG Renal score (Фигура 5.1.24) и нивата на anti-C1q и активността на ЛН, определена като активна, частична ремисия и пълна ремисия на нефропатията (Фигура 5.1.25). Патологично повишени нива на anti-C1q поне в една от пробите установихме при 25 (55,6%) от пациентите с ЛН.

Само при двама пациенти установихме статистически значима корелационна

зависимост между нивата на anti-C1q и категорията по BILAG (JTH, $r=0,79$; $p=0,048$ и UMK, $r=0,83$; $p=0,042$), както и само при двама – статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-C1q и активността на ЛН (PGN, $r=0,57$; $p=0,044$ и UMK, $r=0,83$; $p=0,021$) при прилагане на непараметричен корелационен анализ (Spearman).

Пациентите с ЛН, при които отчетохме в динамика повишение на нивата на anti-C1q до патологични стойности с последващо повишение на категорията по BILAG са 12 (26,7%). Това повишение на категорията по BILAG Renal score на ЛН се отчете в рамките на среден период от 5,55 (от 0,1 до 21) месеца след повишаване на нивата на anti-C1q до патологични стойности. Пациентите, при които не се отчете повишение на нивата на anti-C1q до патологични стойности и не се отчете повишение на категорията по BILAG Renal score са 22 (48,9%). Разпределението на пациентите с ЛН според наличието на повишение на anti-C1q до патологични стойности и според наличието на повишение на категорията на ЛН по BILAG Renal score е показано на Таблица 5.1.22.



Фигура 5.1.24. Динамика на нормализираните нива на anti-C1q (в черно, по лява ордината на графиките) и категорията по BILAG Renal score (в синьо, по дясна ордината на графиките) при пациентите, проследени с 3 и повече проби. Само при 2 пациенти (обозначени в червено) се установи статистически значима корелационна връзка между нивата на anti-C1q и категорията по BILAG Renal score.

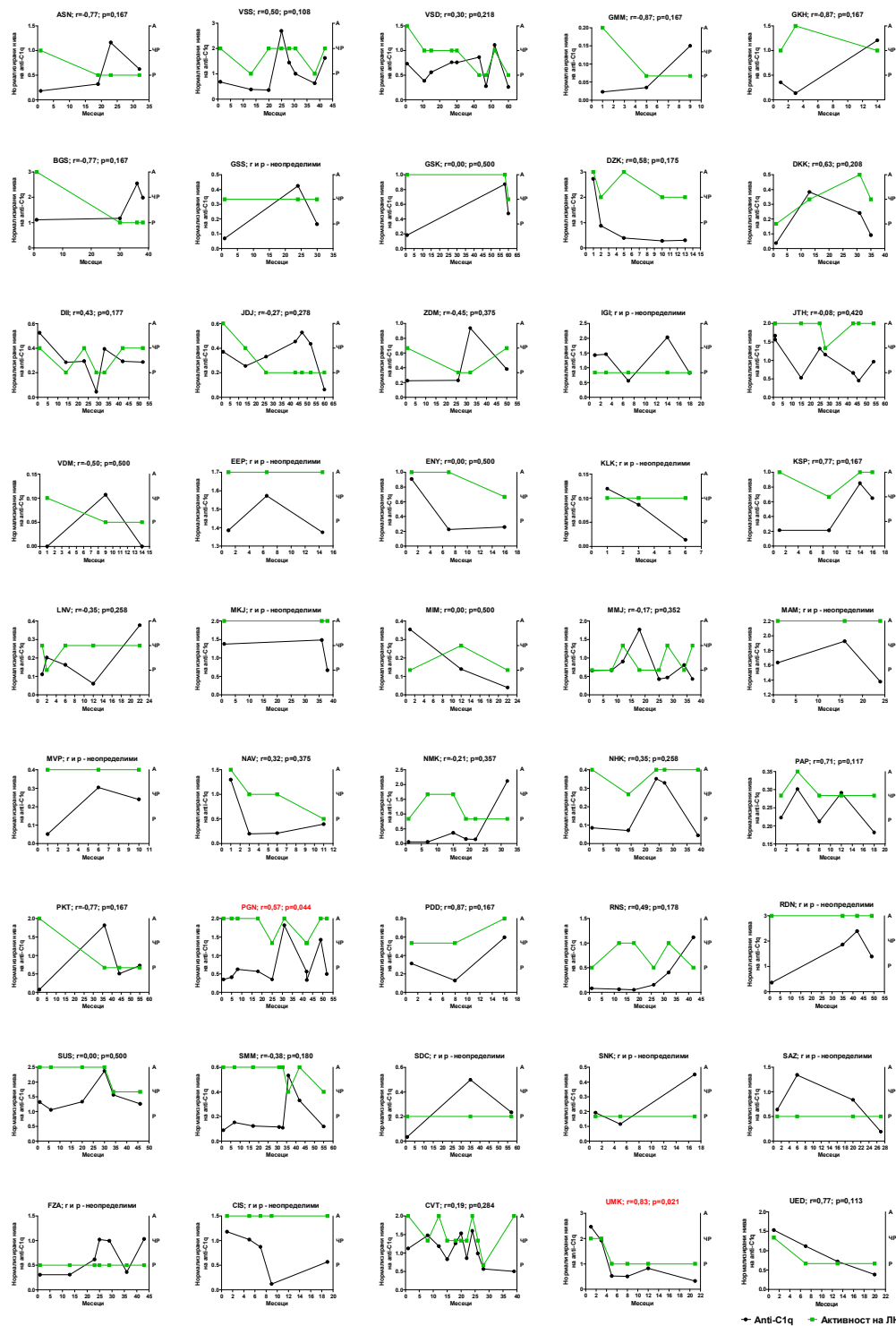
На базата на това разпределение установихме, че наличието на повишаване на нивата на anti-C1q до патологични стойности определя статистически значимо последващото повишаване на категорията на ЛН по BILAG Renal score в рамките на $5,6 \pm 6,5$ месеца след повишението на anti-C1q (Fisher's exact test,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

Таблица 5.1.22. Разпределение на пациентите с ЛН, проследявани в динамика с 3 и повече проби по време на проучването, според наличието или липсата на повишение на нивата на anti-C1q до патологични стойности и наличието или липсата на последващо повишение на категорията на ЛН по BILAG Renal score.

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

Пациентите, при които отчетохме патологично повишение на нивата на anti-C1q, което да е едномоментно или да предхожда повишаване на активността на ЛН, са 15 (33,3%). Пациентите, при които не установихме патологично повишени нива на anti-C1q и не се отчете активиране на ЛН са 15 (33,3%). Разпределението на пациентите с ЛН според наличието или липсата на повишение на нивата на anti-C1q до патологични стойности и според наличието или липсата на активиране на ЛН е показано на Таблица 5.1.23.

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



Фигура 5.1.25. Динамика на нормализираните нива на anti-C1q (в черно, по лява ордината на графиките) и активността на ЛН (активна ЛН - А, частична ремисия на ЛН – ЧР и пълна ремисия на ЛН – Р)(в зелено, по дясна ордината на графиките) при пациентите, проследени с 3 и повече проби. Само при 2 пациенти (обозначени в червено) се установи статистически значима корелационна връзка между нивата на anti-C1q и активността на ЛН.

Таблица 5.1.23. Разпределение на пациентите с ЛН, проследявани в динамика с 3 и повече проби по време на проучването, според наличието или липсата на повишение на нивата на anti-C1q до патологични стойности и наличието или липсата на активиране на ЛН.

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

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

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

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

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

5.1.7.2.1. Динамика на автоантителата срещу C1q и протеинурията.

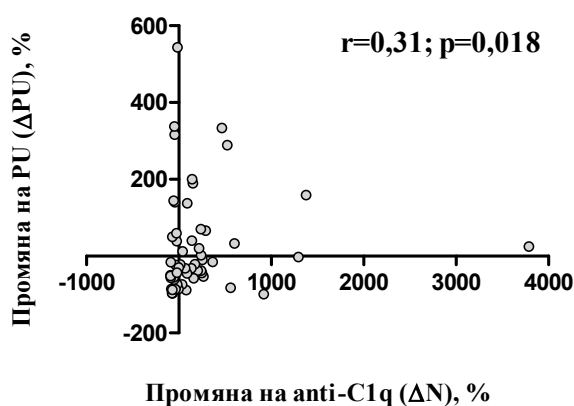
Динамиката на протеинурията за този период показва средно начално ниво от $1,79 \pm 3,07$ (от 0,02 до 15,72) g/d и средно ниво в края от $1,39 \pm 2,34$ (от 0,01 до 12,39) g/d, като разликата отново не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,059$).

Аналогично на горепосоченото, определихме и промяната на протеинурията (ΔPU) спрямо изходната протеинурия (PU_1 – протеинурията при първото изследване

(g/d); PU_x – протеинурия при последното изследване (g/d)):

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

Установихме статистически значима слаба до умерена по сила корелационна зависимост между промяната на нивата на anti-C1q и промяната на протеинурията (Spearman, $r=0,31$; $p=0,018$, Фигура 5.1.26).



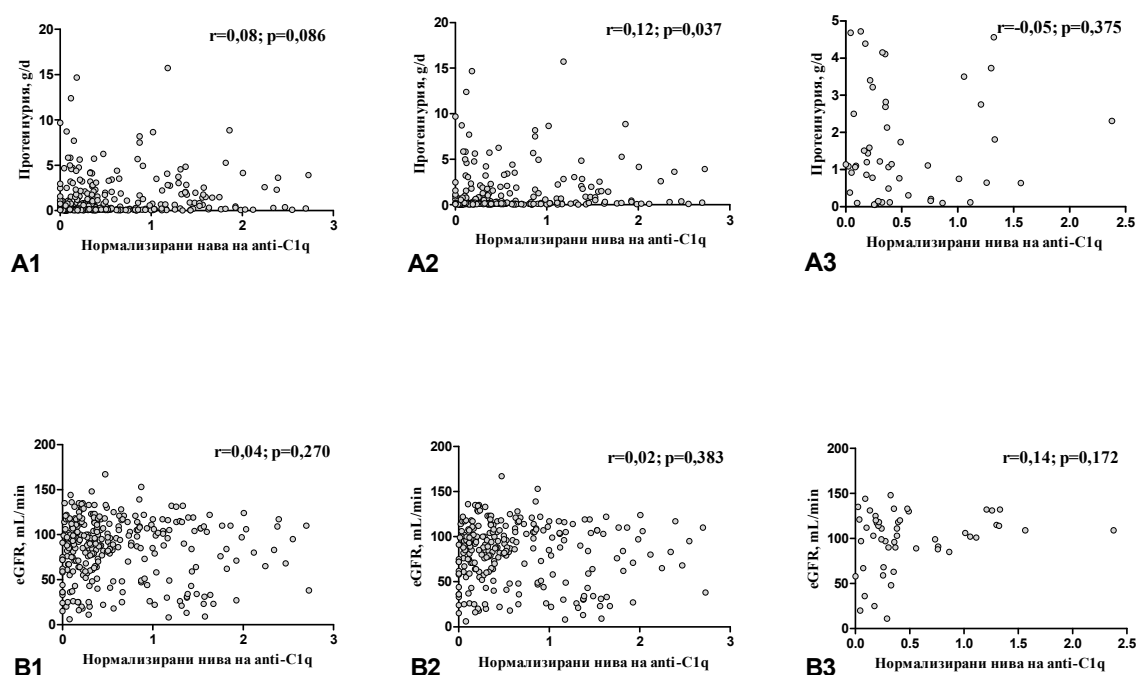
Фигура 5.1.26. Корелационна зависимост между промяната в нивата на anti-C1q (ΔN , %) и промяната в нивата на протеинурията (ΔPU , %) спрямо изходните стойности при пациентите с ЛН, проследявани в динамика (Spearman, $r=0,31$; $p=0,018$).

При пациентите, при които отчетохме повишаване на протеинурията спрямо изходната, в края на средния период от 13 месеца средното нормализирано ниво на anti-C1q е $0,686 \pm 0,595$, докато при пациентите, при които отчетохме намаление на протеинурията спрямо изходната това ниво е $0,614 \pm 0,539$, но разликата в нивата на anti-C1q при пациентите от двете групи не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,382$).

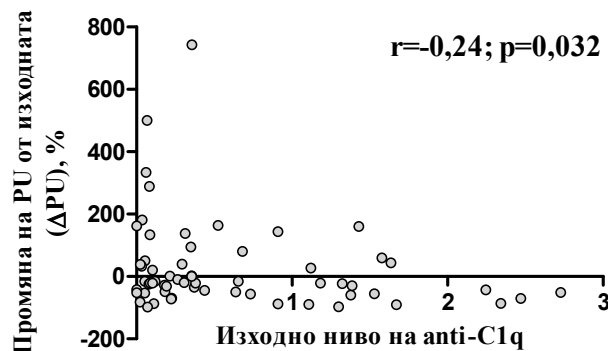
Не установихме статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-C1q и протеинурията при изследваните в динамика проби от пациентите с ЛН (Spearman, $r=0,08$; $p=0,086$, Фигура 5.1.27 A1). Сред всички проби от пациентите с ЛН, които някога са имали екстраренални прояви на СЛЕ, се установи слаба позитивна статистически значима корелация между нормализираните нива на Anti-C1q и протеинурията (Spearman, $r=0,12$; $p=0,037$, Фигура 5.1.27 A2). При пациентите с ЛН без

екстраренални прояви на СЛЕ не се установи статистически значима корелация между нивата на anti-C1q и протеинурията (Spearman, $r=-0,05$; $p=0,375$, Фигура 5.1.27 А3).

Установихме слаба обратна статистически значима корелационна зависимост между изходните нива на anti-C1q и промяната на протеинурията спрямо изходната ($\Delta PU\%$) (Spearman, one-tailed, $r=-0,24$; $p=0,032$), както е показано на Фигура 5.1.28.



Фигура 5.1.27. Корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C1q и протеинурията и anti-C1q и изчислената скорост на гломерулна филтрация (eGFR) при всички изследвани в динамика проби от пациенти с ЛН (**A1** и **B1**); при пробите, изследвани в динамика от пациенти с ЛН с екстраренални прояви на СЛЕ (**A2** и **B2**) и при всички изследвани проби от пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ (**A3** и **B3**). Статистически значима слаба корелация се установи единствено между anti-C1q и протеинурията при пациенти с ЛН и екстраренални прояви на СЛЕ (**A2**) (Spearman, $r=0,12$; $p=0,037$).



Фигура 5.1.28. Корелационна зависимост на изходното ниво на anti-C1q и промяната на протеинурията спрямо изходната ($\Delta PU\%$) за среден период от 13 месеца. Налице е статистически значима слаба отрицателна зависимост (Spearman, one-tailed, $r=-0,24$; $p=0,032$).

5.1.7.2.2. Динамика на автоантителата срещу C1q и бъбречната функция.

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

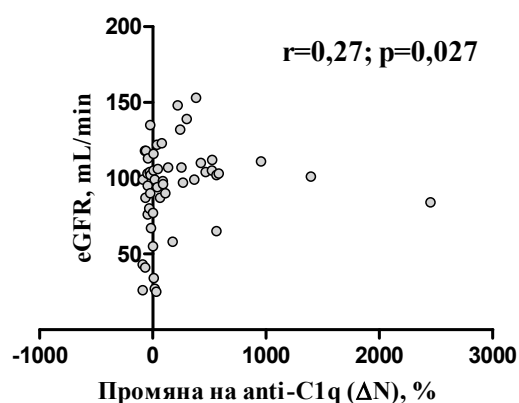
Аналогично на горепосоченото, определихме и промяната на eGFR (ΔGFR) спрямо изходната GFR ($GFR_1 - GFR$ при първото изследване (mL/min); $GFR_x - GFR$ при изследването след среден период на проследяване от 13 месеца (mL/min)):

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

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

Не се установи статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-C1q и eGFR при изследваните в динамика проби от пациентите с ЛН (Spearman, $r=0,04$; $p=0,270$, Фигура 5.1.27 B1). Сред всички проби от пациентите с ЛН, които някога са имали екстраренални прояви на СЛЕ не се установи корелация между нормализираните нива на Anti-C1q и eGFR (Spearman, $r=0,02$; $p=0,383$, Фигура 5.1.27 B2). При пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ не се установи

статистически значима корелация между нивата на anti-C1q и eGFR (Spearman, $r=0,14$; $p=0,172$, Фигура 5.1.27 B3).



Фигура 5.1.29. Корелационна зависимост между промяната на нормализираните нива на anti-C1q спрямо изходните за среден период на проследяване от 13 месеца и eGFR в края на този период (Spearman, $r=0,27$; $p=0,027$).

При изследване зависимостта между динамиката в нивата на anti-C1q и бъбречната функция установихме статистически значима слаба позитивна корелационна зависимост между промяната в нивата на anti-C1q спрямо изходните за среден период на проследяване от 13 месеца и eGFR в края на този период на проследяване (Spearman, $r=0,27$; $p=0,027$, Фигура 5.1.29).

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

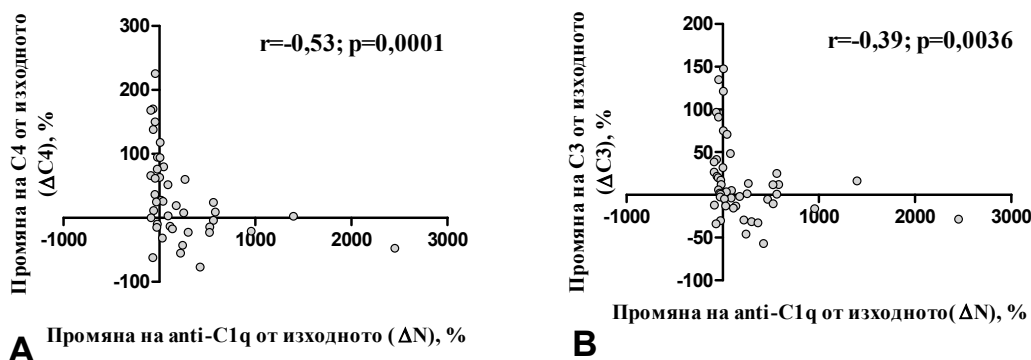
Динамиката на плазмената концентрация на C4 (g/L) за периода на проследяване и лечение на пациентите с ЛН показва средно начално ниво от $0,22 \pm 0,12$ (от 0,03 до 0,53) g/L и средно ниво в края от $0,24 \pm 0,12$ (от 0,04 до 0,60) g/L, като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank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

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

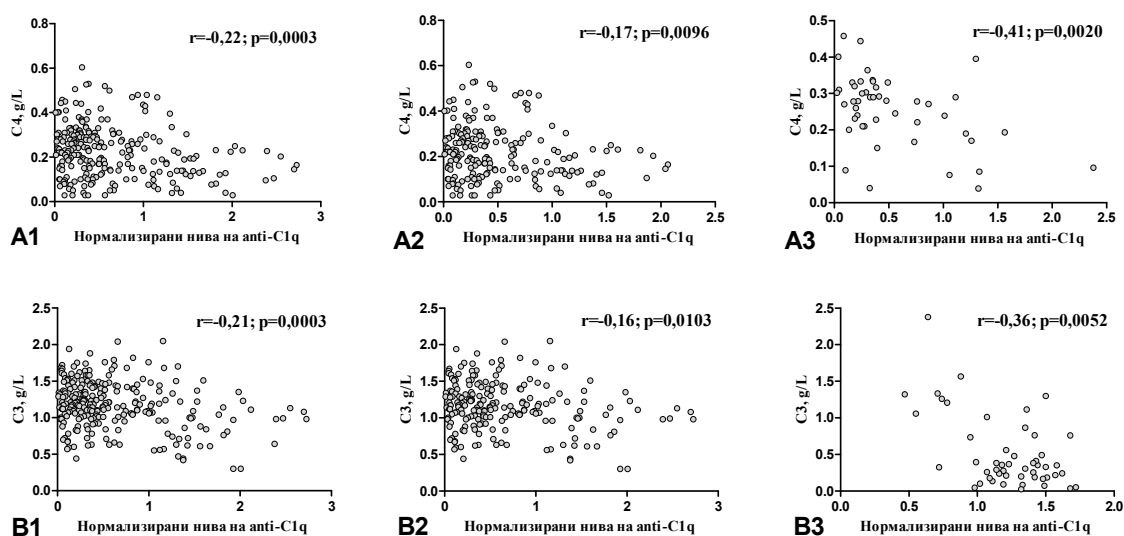
$$\Delta C = \frac{C_x - C_1}{C_1} \times 100\%.$$

Установихме статистически значима умерена отрицателна корелационна зависимост между промяната на нормализираните нива на anti-C1q спрямо изходните ($\Delta N\%$) и промяната на концентрацията на C4 спрямо изходната за среден период на проследяване на пациентите от 13 месеца (Spearman, $r=-0,53$; $p=0,0001$). Налице е и статистически значима умерена отрицателна корелационна зависимост между промяната на нормализираните нива на anti-C1q спрямо изходните ($\Delta N\%$) и промяната на концентрацията на C3 спрямо изходната за същия период на проследяване (Spearman, $r=-0,39$; $p=0,0036$) (Фигура 5.1.30 А и В).

Налице са статистически значими отрицателни корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C1q при всички пациенти с ЛН и, съответно, плазмената концентрация на C4 (Spearman, $r=-0,22$; $p=0,0003$) и плазмената концентрация на C3 (Spearman, $r=-0,21$; $p=0,0003$) (Фигура 5.1.31 А1 и В1). При изследване на аналогичните зависимости между anti-C1q и нивата на C4 и C3 при пациентите с нефропатия с екстраренални прояви на СЛЕ (Фигура 5.1.31 А2 и В2) и при пациентите с нефропатия без екстраренални прояви на СЛЕ (Фигура 5.1.31 А3 и В3), установихме отново статистически значими слаби до умерени отрицателни корелационни зависимости.



Фигура 5.1.30. Корелационна зависимост между промяната на нормализираните нива на anti-C1q спрямо изходните (%) за среден период на проследяване от 13 месеца при пациентите с ЛН и промяната на концентрацията на C4 спрямо изходната (%) (Spearman, $r=-0.53$; $p=0.0001$)(A); корелационна зависимост на промяната в нивата на anti-C1q и промяната на концентрацията на C3 спрямо изходната за същия период на проследяване (Spearman, $r=-0.39$; $p=0.0036$)(B).



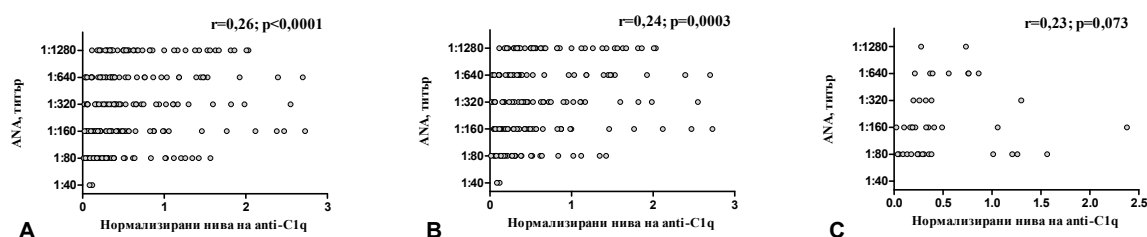
Фигура 5.1.31. Корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C1q, изследвани в динамика във всички проби от пациенти с ЛН и плазмените концентрации на C4 и C3 в тези проби. A1 и B1 При всички пациенти с ЛН; A2 и B2 При пациентите с ЛН с екстрааренални прояви на СЛЕ; A3 и B3 При пациентите с ЛН без екстрааренални прояви на СЛЕ. (Spearman, one-tailed).

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

Динамиката на титъра на ANA за периода на проследяване и лечение на

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

Установихме статистически значима слаба позитивна корелационна зависимост между нормализираното ниво на anti-C1q и титъра на ANA при изследване на всички проби, проведени в динамика на пациентите с ЛН (Spearman, $r=0,26$; $p<0,0001$), при които са изследвани едновременно ANA и anti-C1q (220 проби) (Фигура 5.1.32 А). При изследване на тази зависимост сред пробите от пациентите с ЛН и екстрааренални прояви на СЛЕ, проведени в динамика (178 проби) (Фигура 5.1.32 В), корелацията се потвърди (Spearman, $r=0,24$; $p=0,0003$). При изследване само на пробите в динамика от пациентите с ЛН, но без екстрааренални прояви на СЛЕ (42 проби), не се установи статистически значима корелационна зависимост (Spearman, $r=0,23$; $p=0,073$).



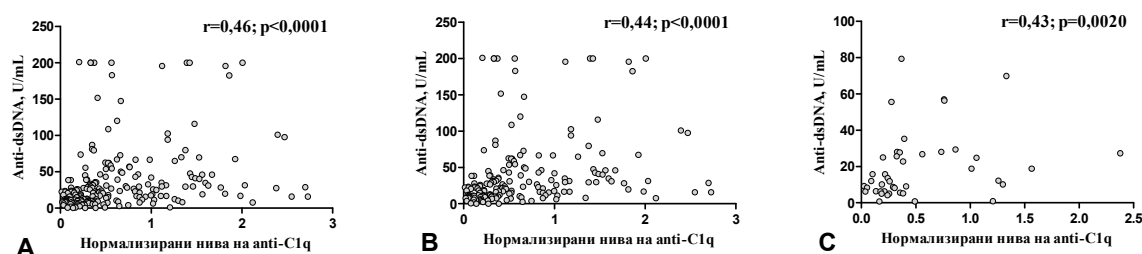
Фигура 5.1.32. Корелационна зависимост между нормализираните нива на anti-C1q и титъра на ANA (показан в логаритмичен мащаб): **А.** при всички проведени в динамика проби от пациентите с ЛН, при които са изследвани едновременно ANA и anti-C1q (Spearman, $r=0,26$; $p<0,0001$); **В.** при пациентите с ЛН и екстрааренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=0,24$; $p=0,0003$); **С.** при пациентите с ЛН без екстрааренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=0,23$; $p=0,073$).

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

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

Установихме статистически значима умерена позитивна корелационна

зависимост между нормализираното ниво на anti-C1q и нивото на anti-dsDNA при изследване на всички проби от пациентите с ЛН в динамика (Spearman, $r=0,45$; $p<0,0001$) (Фигура 5.1.33 А). При изследване на тази зависимост сред пробите от пациентите с ЛН и екстрааренални прояви на СЛЕ (Фигура 5.1.33 В), корелацията се потвърди (Spearman, $r=0,44$; $p<0,0001$). При изследване само на пробите от пациентите с ЛН без екстрааренални прояви на СЛЕ, също се установи статистически значима умерена позитивна корелационна зависимост (Spearman, $r=0,43$; $p=0,0020$) (Фигура 5.1.33 С).

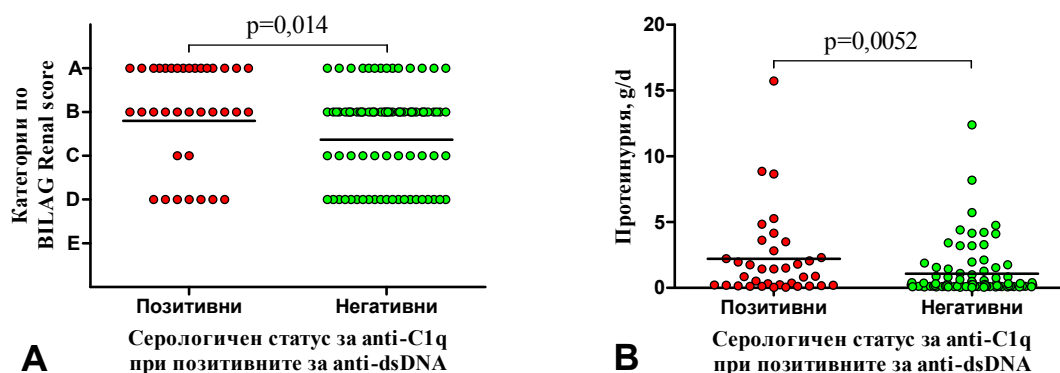


Фигура 5.1.33. Корелационна зависимост между нормализираните нива на anti-C1q и нивата на anti-dsDNA: **А.** при всички проведени в динамика проби при пациентите с ЛН, при които са изследвани едновременно anti-dsDNA и anti-C1q (Spearman, $r=0,45$; $p<0,0001$); **В.** при пациентите с ЛН и екстрааренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=0,44$; $p<0,0001$); **С.** при пациентите с ЛН без екстрааренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=0,43$; $p=0,0020$).

Независимо от серологичния статус по отношение на anti-C1q, при позитивните за anti-dsDNA проби от пациенти с ЛН, изследвани в динамика ($N=121$), средният ранг (median) на категорията по BILAG Renal score е В, докато при негативните за anti-dsDNA ($N=103$) средният ранг е С, като при сравнителен анализ установихме статистически значимо по-висока категория на ЛН по BILAG Renal score при пациентите, позитивни за anti-dsDNA, независимо от статуса им по отношение на anti-C1q (Mann-Whitney, $p=0,0003$). Средната протеинурия при всички изследвани в динамика пациентите с ЛН, позитивни за anti-dsDNA, е $1,42\pm 2,44$ g/d, статистически значимо по-висока от средната протеинурия при пациентите с ЛН, негативни за anti-dsDNA ($1,065\pm 2,025$ g/d) (Mann-Whitney, $p=0,040$).

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

значимо по-висок от този при пациентите позитивни за anti-dsDNA и негативни за anti-C1q (Mann-Whitney, $p=0,014$) (Фигура 5.1.34 А). При пациентите, изследвани в динамика, позитивни едновременно за anti-dsDNA и anti-C1q, средното ниво на протеинурията ($2,21\pm 3,21$ g/d) е статистически значимо по-високо от това при пациентите позитивни за anti-dsDNA и негативни за anti-C1q ($1,08\pm 1,96$ g/d) (Mann-Whitney, $p=0,0052$) (Фигура 5.1.34 В).



Фигура 5.1.34. А. Сравнителен анализ между категориите (ранговете) по BILAG Renal score при пациентите с ЛН, изследвани в динамика, позитивни за anti-dsDNA. При позитивните едновременно за anti-dsDNA и anti-C1q, средната категория на ЛН е статистически значимо по-висока от тази при пациентите позитивни за anti-dsDNA и негативни за anti-C1q (Mann-Whitney, $p=0,014$). **В.** Протеинурия при пациентите, позитивни за anti-dsDNA, в зависимост от статуса за anti-C1q (Mann-Whitney, $p=0,0052$).

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

При пациентите, изходно включени в проучването ($N=97$), според показанията е провеждано предходно имунопатогенетично лечение с: Кортикостероиди (CS) при 88 (90,7%) за средна продължителност от 46,7 месеца (от 15 дни до 270 месеца); Cyclophosphamide (CYC) при 82 (84,5%) за средна продължителност от 10,9 месеца (от 3 дни до 80 месеца); Azathioprine или Mycophenolate mofetil (AZA/MMF) при 38 (39,2%) за средна продължителност от 15,5 месеца (от 1 месец до 108 месеца); Cyclosporine A (CyA) при 21 (21,6%) за средна продължителност от 8,4 месеца (от 1 месец до 51 месеца); Immunovenin intact (IVIg) при 6 (6,2%) със среден брой на приложените

курсове 2 (от 1 до 3 курса) и плазмафереза (ПФ) при 31 (32,0%) със среден брой на сеансите 8 (от 1 до 96 сеанса).

Не се установи влияние на предходната терапия с CS върху наличието на anti-C1q антитела при пациентите с ЛН изходно включени в проучването (Fisher's exact test, $p=1,000$). Не се установи статистически значима разлика между нивата на anti-C1q при пациентите с предходно лечение с CS ($0,498\pm0,633$) и нивата на anti-C1q при пациентите без предходна CS-терапия ($0,717\pm0,791$) (Mann-Whitney, $p=0,385$), въпреки сравнително по-високите нива на anti-C1q при пациентите, при които не е било провеждано CS-лечение. Не се установи статистически значима корелационна зависимост между продължителността на предходно проведената терапия с CS и нивата на anti-C1q (Spearman, $r=-0,01$; $p=0,917$).

Не се установи влияние на предходната терапия с CYC върху наличието на anti-C1q антитела при пациентите с ЛН изходно включени в проучването (Fisher's exact test, $p=0,101$). Не се установи статистически значима разлика между нивата на anti-C1q при пациентите с предходно лечение с CYC ($0,657\pm0,799$) и нивата на anti-C1q при пациентите без предходна терапия с CYC ($0,453\pm0,560$) (Mann-Whitney, $p=0,563$). Не се установи статистически значима корелационна зависимост между продължителността на предходно проведената терапия с CYC и нивата на anti-C1q (Spearman, $r=0,11$; $p=0,326$).

Не се установи влияние на предходната терапия с AZA/MMF върху наличието на anti-C1q антитела при пациентите с ЛН изходно включени в проучването (Fisher's exact test, $p=0,780$). Не се установи статистически значима разлика между нивата на anti-C1q при пациентите с предходно лечение с AZA/MMF ($0,528\pm0,611$) и нивата на anti-C1q при пациентите без предходна терапия с AZA/MMF ($0,486\pm0,639$) (Mann-Whitney, $p=0,563$), въпреки сравнително по-високите нива на anti-C1q при пациентите, при които не е било провеждано лечение с AZA или MMF. Не се установи статистически значима корелационна зависимост между продължителността на предходно проведената терапия с AZA/MMF и нивата на anti-C1q (Spearman, $r=0,124$; $p=0,256$).

Не се установи влияние на предходната терапия с CyA върху наличието на anti-C1q антитела при пациентите с ЛН изходно включени в проучването (Fisher's exact test, $p=0,751$). Не се установи статистически значима разлика между нивата на anti-C1q при пациентите с предходно лечение с CyA ($0,507\pm0,693$) и нивата на anti-C1q при

пациентите без предходна терапия с CyA ($0,479 \pm 0,593$) (Mann-Whitney, $p=0,563$). Не се установи статистически значима корелационна зависимост между продължителността на предходно проведената терапия с CyA и нивата на anti-C1q (Spearman, $r=0,01$; $p=0,920$).

Не се установи влияние на предходната терапия с IVIG върху наличието на anti-C1q антитела при пациентите с ЛН изходно включени в проучването (Fisher's exact test, $p=0,317$). Не се установи статистически значима разлика между нивата на anti-C1q при пациентите с предходно лечение с IVIG ($0,907 \pm 1,027$) и нивата на anti-C1q при пациентите без предходна терапия с IVIG ($0,459 \pm 0,544$) (Mann-Whitney, $p=0,308$). Не се установи статистически значима корелационна зависимост между броя проведени курсове с IVIG и нивата на anti-C1q (Spearman, $r=-0,06$; $p=0,919$).

Не се установи влияние на предходната терапия с ПФ върху наличието на anti-C1q антитела при пациентите с ЛН изходно включени в проучването (Fisher's exact test, $p=1,000$). Не се установи статистически значима разлика между нивата на anti-C1q при пациентите с предходно лечение с ПФ ($0,421 \pm 0,464$) и нивата на anti-C1q при пациентите без предходна терапия с ПФ ($0,523 \pm 0,660$) (Mann-Whitney, $p=0,916$), въпреки относително по-високите нива на anti-C1q при пациентите, при които не е провеждано предходно лечение с ПФ. Не се установи статистически значима корелационна зависимост между броя проведени сеанси на ПФ и нивата на anti-C1q (Spearman, $r=-0,22$; $p=0,231$).

Сред проследените пациенти с ЛН в рамките на среден период от 13 месеца ($N=61$), при началните проби с категория А на ЛН по BILAG Renal score са били 23 (37,7%) от пациентите, с категория В – 20 (32,8%), с категория С – 6 (9,8%) и с категория D – 12 (19,7%). След среден период на проследяване от 13 месеца, през което е провеждано лечение според показанията, с категория А са били – 10 (16,4%), с категория В – 26 (42,6%), с категория С – 6 (9,8%) и с категория D – 19 (31,2%).

От пациентите с категория А на ЛН изходно ($N=23$), средното нормализирано ниво на anti-C1q е било 0,951 (от 0,052 до 2,727), с патологични нива на anti-C1q са били 11 пациенти, докато в края на периода се отчита намаляване на категорията по BILAG Renal score при 15 (65,2%), средното нормализирано ниво на anti-C1q е 0,823 (от 0,071 до 1,926), а с патологични нива на anti-C1q са били 9 пациенти. През този период при всички пациенти е проведено лечение с CS за среден период от 12 (между 7 и 16)

месеца, при 13 от пациентите с CYC за среден период от 2 (между 1 и 7) месеца, при 14 от пациентите с AZA или MMF за среден период от 3 (между 1 и 10) месеца, с CyA е проведено лечение при 2 пациенти, съответно за 9 и за 12 месеца и при 2 пациенти е проведено лечение с IVIG – съответно с 2 и с 3 курса за периода на проследяване. Проведени са 3 сеанса на ПФ при 1 пациент. Въпреки сравнително по-ниските нива на anti-C1q в края на периода, не се установи статистически значима разлика в сравнение с изходните нива на anti-C1q (Paired t-test, $p=0,487$).

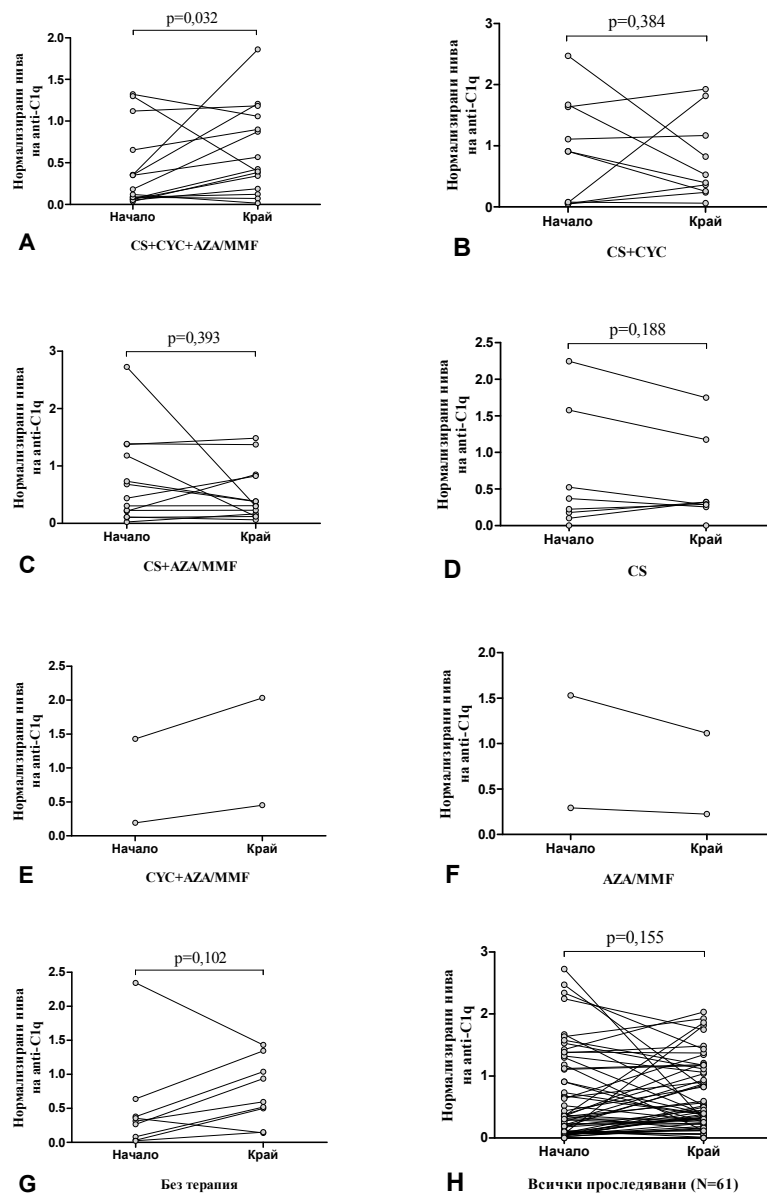
Средното ниво на anti-C1q при пациентите с подобрене на категорията на ЛН по BILAG (спадане на категорията на ЛН по BILAG от изходна А) след проведеното лечение е било 0,718 (от 0,071 до 1,815), докато средното ниво при пациентите без подобрене е било 1,020 (от 0,120 до 1,926). Въпреки сравнително по-високите нива на anti-C1q при пациентите без подобрене на категорията на ЛН, не се установи статистически значима разлика между тези нива (Mann-Whitney, $p=0,349$).

Средното спадане на нивата на anti-C1q от изходните при пациентите с подобрене на ЛН за този период е било с 20,05%, докато при пациентите без спадане на категорията на ЛН (персистираща А) средното ниво на anti-C1q е повишено средно с 2,38% от изходното. Въпреки тази динамика не се отчете статистически значима разлика в промяната на нивата на anti-C1q (Mann-Whitney, $p=0,923$).

В рамките на периода на проследяване от средно 13 месеца, върху намалението на нивата на anti-C1q: не се установи статистически значимо влияние от приложението на CS (Fisher's exact test, $p=0,534$), не се установи статистически значимо влияние от приложението на CYC (Fisher's exact test, $p=0,426$), не се установи статистически значимо влияние от приложението на AZA или MMF (Fisher's exact test, $p=0,790$), не се установи статистически значимо влияние от приложението на плазмафереза (Fisher's exact test, $p=0,644$), не се установи статистически значимо влияние от приложението на IVIG (Fisher's exact test, $p=0,551$).

За периода на проследяване средно от 13 (от 6 до 25) месеца, според вида на провежданото имунопатогенетично лечение при пациентите с ЛН ($N=61$) се обособиха осем групи: 15 пациенти, при които е провеждано лечение с CS (за период от 3 до 24 месеца) + CYC (за период от 0,2 до 7 месеца) +AZA или MMF (AZA/MMF) (за период от 2 до 24 месеца); 10 пациенти, при които е провеждано лечение с CS (за период от 1 до 15 месеца) + CYC (за период от 0,1 до 8 месеца); 13 пациенти, при които е

провеждано лечение с CS (за период от 3 до 13 месеца) + AZA/MMF (за период от 1 до 10 месеца); 8 пациенти, при които е провеждано лечение само с CS (за период от 2 до 14 месеца); 2 пациенти, при единия от които е проведено лечение с CYC за 0,6 месеца и с AZA за 7 месеца, а при другия – с CYC за 0,3 месеца и с AZA за 4 месеца; 2 пациенти, при които е проведено лечение само с CYC, съответно за 10 и за 0,2 месеца; 2 пациенти, при които е проведено само лечение с AZA при единия пациент за 3 месеца и с MMF при другия – за 7 месеца; 9 пациенти, при които не е провеждано имунопатогенетично лечение (Фигура 5.1.35 A, B, C, D, E, F, G). При анализ на нормализираните нива на anti-C1q в началото и в края на периода на проследяване и лечение, при пациентите от първата група (Фигура 5.1.35 A) медианата на нивата на anti-C1q в началото е 0,182, а медиана в края 0,424, като след прилагане на непараметричен рангов тест на Wilcoxon установихме статистически значима разлика между медианите – тази в началото е по-ниска от тази в края ($p=0,032$). За групата пациенти на лечение с CS+CYC (Фигура 5.1.35 B), въпреки по-високата медиана на нивата на anti-C1q в началото, в сравнение с тази в края, не се установи статистически значима разлика ($p=0,384$). При пациентите на лечение с CS+AZA/MMF също се отбелязва намаление на медианата на нивата на anti-C1q след периода на лечение, но разликата също не е статистически значима ($p=0,393$). При пациентите на лечение само с CS е налице незначимо повишение на медианата на нивата на anti-C1q (Фигура 5.1.35 D) след периода на лечение ($p=0,188$). При пациентите на лечение с CYC+AZA/MMF (Фигура 5.1.35 E) е налице повишаване на нивата на anti-C1q, но поради това, че са само двама, не е възможна статистическа оценка на достоверността на тенденцията. Същото е в сила и за двамата пациенти на лечение само с AZA/MMF, където отбелязахме спадане на нивата на anti-C1q (Фигура 5.1.35 F). При пациентите без имунопатогенетична терапия (Фигура 5.1.35 G) се отбеляза повишаване на медианата на нивата на anti-C1q в края на периода на проследяване, но това повишаване не е статистически значимо ($p=0,102$). При цялата проследявана група от пациенти с ЛН (Фигура 5.1.35 H) се отбеляза статистически незначимо повишение на медианата на нормализираните нива на anti-C1q в края на периода на проследяване и лечение ($p=0,155$).



Фигура 5.1.35. Нормализирани нива на anti-C1q при пациентите с ЛН в началото и в края на периода на проследяване (средно 13 месеца), през който при пациентите е провеждано имунопатогенетично лечение според индивидуални показания с: **А)** CS+CYC+AZA/MMF (медиана в началото 0,182; медиана в края 0,424; $p=0,032$); **В)** CS+CYC (медиана в началото 0,909; медиана в края 0,462; $p=0,384$); **С)** CS+AZA/MMF (медиана в началото 0,438; медиана в края 0,308; $p=0,393$); **Д)** CS (медиана в началото 0,297; медиана в края 0,305; $p=0,188$); **Е)** CYC+AZA/MMF (при 2 пациенти с повишаване на нивата на anti-C1q в края); **Ф)** AZA/MMF (при 2 пациенти с намаляване на нивата на anti-C1q в края); **Г)** При пациентите без имунопатогенетична терапия, поради липса на показания за такава (медиана в началото 0,312; медиана в края 0,596; $p=0,102$); **Н)** При всички проследявани пациенти ($N=61$) с или без терапия (медиана в началото 0,312; медиана в края 0,394; $p=0,155$). Установи се статистически значима разлика между медианите на нивата на anti-C1q в началото и в края (по-висока) на периода на проследяване само при пациентите, лекувани с CS+CYC+AZA/MMF (**А**) (Wilcoxon signed rank test).

ИЗВОДИ:

1. При изследваната група от пациенти с ЛН установихме патологично повишени anti-C1q при около 1/5 от пациентите.

2. Не установихме връзка на anti-C1q с: пола на пациентите, възрастта на пациентите, давността на ЛН.

3. При изследваните пациенти с ЛН е налице позитивна връзка на нивата на anti-C1q с лабораторни маркери за оценка на активността на ЛН, каквито са протеинурията и уринния седимент: при пациентите с патологично повишени anti-C1q (позитивните за anti-C1q пациенти) протеинурията е по-висока, а при пациентите с патологично активен уринен седимент нивата на anti-C1q са по-високи.

4. Въпреки липсата на категорична връзка между anti-C1q и бъбречната функция, определена чрез eGFR, установихме значимо влияние на наличието на патологично повишени anti-C1q върху вероятността за наличие на декомпенсирана бъбречна функция – както при първоначално изследваните пациенти, така и в динамиката на изследването.

5. При изследваните пациенти с ЛН са налице значими връзки между намалените концентрации на C4 и C3 (хипокомplementемия, развиваща се при активно имунно възпаление) и повишените нива на anti-C1q. Налице са и значими позитивни връзки на anti-C1q с имунологични маркери за наличие и активност на ЛН и СЛЕ, каквито са ANA и anti-dsDNA.

6. Налице е позитивна връзка между anti-C1q и хистологичния клас на ЛН, като при IV хистологичен клас ЛН честотата на патологично повишените anti-C1q и тяхното ниво са най-високи. Налице е и връзка между anti-C1q и агресивна хистологична активност, белег за каквато е екстракапилярната пролиферация. Налице е връзка между anti-C1q и индексите за хистологична активност и хроничност на ЛН, което е във връзка и с прогнозата.

7. При пациентите с комплексно оценена като активна ЛН се установяват по-високи нива на anti-C1q, а от своя страна патологичните нива на anti-C1q определят наличието на активна ЛН, което от своя страна определя и показанията за лечение.

8. Налице е динамична зависимост между нивото на anti-C1q и лабораторни маркери за активност на ЛН като протеинурията, нивата на C4 и C3 компоненти на комплемента и anti-dsDNA.

9. Налице е предиктивна роля на anti-C1q като маркер за последващо активиране на ЛН, определено като повишаване на категорията по BILAG Renal score на ЛН, както и динамична връзка между нивата на anti-C1q и появата на активна ЛН.

10. Въпреки липсата на категорични статистически зависимости сред изследваните в това проучване пациенти с ЛН, вероятно нивата на anti-C1q се повлияват от провеждането на имунопатогенетично лечение, като прилагането на дву- и трикомпонентно лечение най-вероятно е свързано с по-значимо намаление на нивата на anti-C1q в сравнение с прилагането на еднокомпонентни терапевтични схеми, но последното би следвало да бъде проверено в по-големи кохортни проучвания с по-продължителен период на проследяване.

11. На този етап anti-C1q би могло да се използва като допълващ останалите диагностичен, проследяващ и прогностичен маркер за комплексната оценка на ЛН.

5.2. АВТОАНТИТЕЛА СРЕЩУ C1r КОМПОНЕНТА НА КОМПЛЕМЕНТА.

Автоантитела срещу C1r (anti-C1r) са изследвани при 74 (76,3% от първоначално включените в проучването) пациенти, като в динамика са изследвани общо 266 проби на пациентите с ЛН. Anti-C1r са изследвани и при 61 (84,7% от изходните 72) здрави доброволци (контроли), без автоимунни и инфекциозни възпалителни заболявания, със запазена бъбречна, чернодробна и хемопоетична функции. При изследваните за anti-C1r в контролната група здрави доброволци се установиха плазмени нива на anti-C1r $0,195 \pm 0,067$ единици оптична плътност при дължина на вълната от 450 nm (OD 450 nm) на оптичния анализатор (Фигура 5.2.1).



Фигура 5.2.1. Нива на anti-C1r при изследваните здрави контроли (показана е средната със стандартното отклонение).

По аналогичен начин с anti-C1q, определихме граничната стойност (cut-off), над която нивата на anti-C1r при изследваните пациенти с ЛН приехме за патологично повишени, а именно:

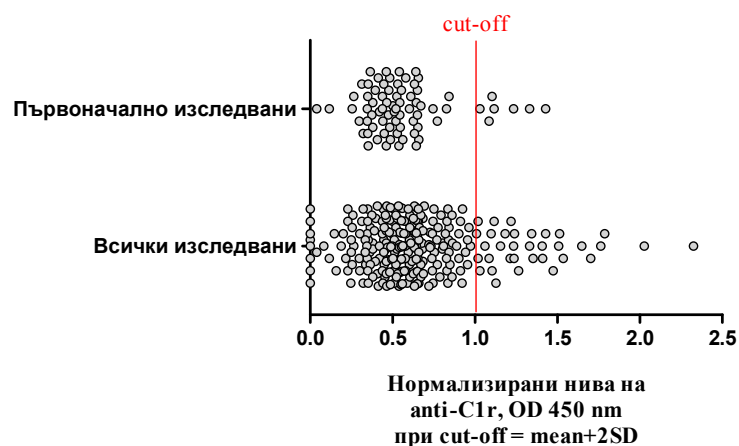
$$\text{Cut-off} = \text{mean (средна за контролната група здрави донори)} + 2 \times \text{SD}$$

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

При изследваните пациенти с ЛН определихме нива на anti-C1r, съответно на $0,212 \pm 0,116$ OD 450 nm при cut-off от 0,329 OD 450 nm (изследванията са проведени в Катедра „Биохимия, молекулна медицина и нутригеномика” на МУ-Варна и в Националната референтна лаборатория за изследване на белтъците от системата на

комплемента, при Европейската болница “Georges Pompidou”, Париж с еднакви гранични стойности). Изследванията в различните лаборатории са провеждани съгласно унифицирана методика. С оглед на изследванията в две различни лаборатории проведохме нормализиране на стойностите на нивата на anti-C1r в групите пациенти с ЛН, представяйки нивата на anti-C1r като съотношение на получените стойности за оптичната плътност към нивото на cut-off за лабораторията (Фигура 5.2.2). По този начин, за гранична стойност се приема 1,00, над която нормализираните нива на anti-C1r се приемат за повишени, а под която – за референтни. Не се установи статистически значима разлика (Mann-Whitney, $p=0,073$) между нивата на anti-C1r в контролната група здрави доброволци и тези при пациентите с ЛН.

Установихме патологично повишени титри на anti-C1r при 7 (9,5%) от изходно изследваните пациенти с ЛН. Сред изследваните общо 266 проби от кръвни плазми на пациентите с ЛН в динамика установихме патологично повишени нива на anti-C1r при 34 (12,8%) от пробите (Фигура 5.2.2).



Фигура 5.2.2. Разпределение на нивата на anti-C1r при изходната група първоначално изследвани пациентите с ЛН и при всички изследвани в динамика проби, след хомогенизиране на кохортата. Граничната стойност (cut-off) е представена като 1,00, над която нивата на anti-C1r се приемат за патологично повишени.

5.2.1. Автоантитела срещу C1r и пола на пациентите с ЛН.

При мъжете с ЛН (15 мъже (20,3%) от изследваните за anti-C1r пациенти) се установиха патологично повишени нива на anti-C1r при 3 (20,0%), докато при жените с ЛН (59 жени (79,7%) от изследваните за anti-C1r пациенти) – при 4 (6,8%), както е

показано на Таблица 5.2.1. Не се установи статистически значимо влияние на пола на пациентите с ЛН върху наличието на патологично повишени нива на anti-C1r (Fisher's exact test, $p=0,143$).

Таблица 5.2.1. Разпределение на патологично повишените нива на anti-C1r според пола на пациентите с ЛН.

Пациенти	Патологично повишени anti-C1r	Референтни anti-C1r	Общо
Мъже	3	12	15
Жени	4	55	59
Общо	7	67	74

При анализ на нормализираните нива на anti-C1r се установи, че при мъжете с ЛН средното ниво на anti-C1r е $0,665 \pm 0,312$, а при жените с ЛН – $0,532 \pm 0,233$. Не се установи статистически значима разлика в нивата на anti-C1r при двата пола на пациентите с ЛН (Mann-Whitney, $p=0,190$).

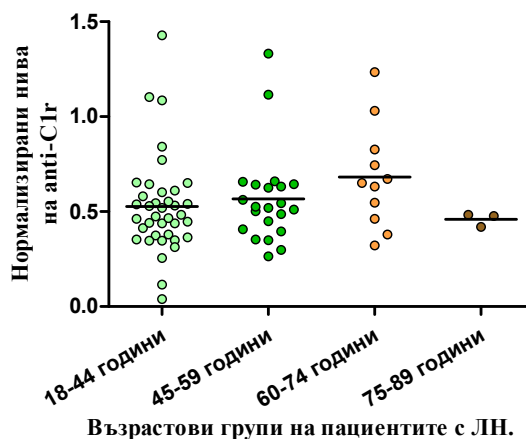
5.2.2. Автоантитела срещу C1r и възрастта на пациентите с ЛН.

Средната възраст на първоначално изследваните за anti-C1r пациенти с ЛН е $45,36 \pm 14,87$ години. Пациентите на възраст $\leq 45,3$ години са 41, а тези на възраст над 45,3 години са 33. При анализ на нормализираните нива на anti-C1r установихме, че при пациентите на възраст $\leq 45,3$ години средното нормализирано ниво на anti-C1r е $0,545 \pm 0,280$, а при пациентите на възраст над 45,3 години това ниво е $0,577 \pm 0,220$. Не се установи статистически значима разлика в нормализираните нива на anti-C1r при двете групи пациенти (Mann-Whitney, $p=0,265$).

Разпределението на пациентите с ЛН по брой във възрастовите групи по СЗО, при които са изследвани anti-C1r ($N=74$), е както следва: от 18 до 44 години – 38 (51,5%); от 45 до 59 години – 22 (29,7%); от 60 до 74 години – 11 (14,7%); от 75 до 89 години – 3 (4,1%).

Във възрастовата група от 18 до 44 години позитивни за anti-C1r са 3 (4,1%) пациенти; във възрастовата група от 45 до 59 години позитивни за anti-C1r са 2 (2,7%) пациенти; във възрастовата група от 60 до 74 години позитивни за anti-C1r са 2 (2,7%) пациенти; във възрастовата група от 75 до 89 години няма позитивни за anti-C1r.

Във възрастовите групи по СЗО, средните нормализирани нива на anti-C1r са както следва: в групата от 18 до 44 години: $0,527 \pm 0,258$; в групата от 45 до 59 години: $0,567 \pm 0,246$; в групата от 60 до 74 години: $0,682 \pm 0,272$ и в групата от 75 до 89 години: $0,460 \pm 0,035$. Данните за възрастовото разпределение на пациентите с ЛН и нормализираните нива на anti-C1r са представени на Фигура 5.2.3.



Фигура 5.2.3. Средни нива на anti-C1r в различните възрастови групи по СЗО при пациентите с ЛН.

Не се установи статистически значима зависимост на влиянието на възрастта като фактор върху нивата на anti-C1r (One-way ANOVA, $p=0,305$, Post test for linear trend, $p=0,853$). Не се установи статистически значима разлика в нормализираните нива на anti-C1r между различните възрастови групи пациенти с ЛН (Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$ между всички групи).

Не се установи статистически значима корелационна зависимост между възрастта на изходно изследваните пациенти с ЛН и нивата на anti-C1r (Spearman, $r=0,103$, $p=0,191$).

5.2.3. Автоантитела срещу C1r и давността на ЛН.

Средната давност на ЛН при проучваните пациенти е $10,30 \pm 9,51$ години (от 0,02 до 41,00 години).

При съпоставяне на нормализираните нива на anti-C1r при пациенти с давност на ЛН по-малка от 10,3 години и тези при пациентите с давност на ЛН над 10,3 години не се установи статистически значима разлика (Mann-Whitney, $p=0,353$).

Установи се слаба позитивна статистически незначима корелационна зависимост между anti-C1r и давността на ЛН – с увеличаване на давността на ЛН се увеличават нивата на anti-C1r (Spearman, $r=0,16$, $p=0,092$).

5.2.4. Автоантитела срещу C1r и основни клиничко-лабораторни параметри на ЛН.

Изследвахме връзките на нивата на anti-C1r с някои основни клиничко-лабораторни параметри на ЛН, каквито са: протеинурията, уринния седимент, бъбречната функция, клиничко-лабораторната активност на ЛН, както и с комплексната оценка на активността на ЛН по BILAG Renal Score (категорията по BILAG Renal score). Изследвахме и връзката на anti-C1r с наличието или липсата на извънбъбречни прояви на СЛЕ, като при пациентите с ЛН и екстраренални прояви на СЛЕ (60 (81,1%) пациенти) средното нормализирано ниво на anti-C1r е $0,557 \pm 0,270$, а при пациентите с ЛН без засягане на други органи и системи е $0,570 \pm 0,173$ и тази разлика е статистически незначима (Mann-Whitney, $p=0,396$). Липсата на статистически значимо влияние на anti-C1r върху проявите на екстраренални признаци на СЛЕ в изследваната група пациенти с ЛН потвърдихме и с екзактен тест на Fisher ($p=0,604$).

5.2.4.1. Автоантитела срещу C1r и протеинурия.

Сред изследваните пациенти в нашето проучване, патологично ниво на протеинурия се установи при 49 (66,2%), а протеинурия, по-ниска от 0,15 g/d (референтна по степен протеинурия) – при 25 (33,8%) пациенти. Сред всички изследвани уринни проби (общо 266) на пациентите с ЛН, при които са изследвани anti-C1r, в динамика за периода на проучването, патологична протеинурия бе установена при 174 (65,4%) от пробите. Изходно при пациентите с повишени нива на anti-C1r (7 пациенти) се установи протеинурия от 0,15 g/d и по-висока при 4 (57,1%) пациенти и по-ниска от 0,15 g/d – при 3 (42,9%) от тях. При пациентите с референтни нива на anti-

C1r (67 пациенти), протеинурия $\geq 0,15$ g/d се установи при 45 (67,2%) пациенти, а протеинурия $< 0,15$ g/d се установи при 22 (32,8%) пациенти. Въз основа на това разпределение установихме, че при изходно изследваните в нашето проучване пациенти с ЛН не се установи статистически значимо влияние на нивата на anti-C1r върху протеинурията (Fisher's exact test, $p=0,440$).

При изследване на зависимостта на протеинурията (g/d) от нормализираните нива на anti-C1r при проучваните пациенти с ЛН, не установихме статистически значима корелационна зависимост (Spearman, $r=-0,14$, $p=0,125$).

При пациентите, позитивни за anti-C1r, средното ниво на протеинурията е $4,994 \pm 7,109$ (от 0,05 до 15,72) g/d, докато при пациентите, негативни за anti-C1r – $1,34 \pm 1,95$ (от 0,02 до 8,73) g/d. Въпреки че при позитивните за anti-C1r пациенти нивото на протеинурията е по-високо от това при пациентите, негативни за anti-C1r, тази разлика не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,256$). Сред всички изследвани в динамика кръвни и уринни проби, средното ниво на протеинурията при пробите, позитивни за anti-C1r, е $2,37 \pm 4,12$ (от 0,01 до 15,72) g/d, а това при негативните за anti-C1r – $1,15 \pm 1,82$ (от 0,01 до 12,39) g/d, като и тук разликата не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,728$).

При пациентите с патологична протеинурия средното нормализирано ниво на anti-C1r е $0,544 \pm 0,263$ (от 0,040 до 1,429), при тези с референтна по степен протеинурия – $0,590 \pm 0,237$ (от 0,116 до 1,116), като тази разлика не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,211$).

5.2.4.2. Автоантитела срещу C1r и уринен седимент.

Уринен седимент е изследван при всички 74 пациенти, включени в проучването, като в динамика са проведени микроскопски изследвания на уринен седимент при общо 266 уринни проби. Сред първоначално включените в проучването пациенти, патологично активен уринен седимент се установи при 37 (50,0%) пациенти. При проследяване в динамика, патологично активен уринен седимент е установен при общо 128 (48,1%) от всички обработени уринни проби.

Сред пациентите с ЛН, първоначално включени в проучването с повишени нива

на anti-C1r, патологично активен уринен седимент се установи при 5 (71,4%) пациенти, а при 2 (28,6%) пациенти не се установи патологична находка в уринния седимент. Сред пациентите с ЛН с референтни нива на anti-C1r, патологично активен уринен седимент се установи при 32 (47,8%) пациенти, а при 35 (52,2%) пациенти не се установи патологична находка в уринния седимент. Това разпределение не установи статистически значимо влияние на нивата на anti-C1r върху наличието на патологично активен уринен седимент (Fisher's exact test, $p=0,430$).

Сред общо изследваните лабораторни проби, позитивни за anti-C1r, патологично активен уринен седимент се установи при 15 (44,1%) проби, докато пробите, позитивни за anti-C1r, без активен седимент са 19 (55,9%). Сред общо изследваните лабораторни проби, негативни за anti-C1r, патологично активен уринен седимент се установи при 113 (48,7%), докато пробите, негативни за anti-C1r, без патологичен седимент са 119 (51,3%). Това разпределение също показва, че липсва статистически значимо влияние на позитивния статус за anti-C1r върху наличието на патологично активен уринен седимент (Fisher's exact test, $p=0,714$).

Сред всички изследвани в динамика проби, тези при които не се детектира никакво ниво (налице е нулево ниво) на anti-C1r (в 8 от 266 проби), активен уринен седимент се установи в 1 (12,5%) от тези случаи, а 7 (87,5%) бяха с неактивен седимент. Пробите с установено никакво ниво на anti-C1r (258 проби), различно от нула, без значение патологично или референтно, с активен седимент са 127 (49,2%) от случаите, докато с неактивен седимент са 131 (50,8%) от пробите. Това разпределение показва, че наличието на нулево ниво на anti-Cr определя статистически значимо наличието на неактивен уринен седимент при пациентите с ЛН (Fisher's exact test, $p=0,042$) със съотношение на вероятностите (OR) от 6,79, ниска чувствителност от 5,1%, специфичност от 99,2%, позитивна предиктивна стойност от 87,5% и негативна предиктивна стойност от 49,2% (Таблица 5.2.2).

Таблица 5.2.2. Разпределение на всички изследвани в динамика проби при пациентите с ЛН с и без патологично активен уринен седимент в зависимост от статуса за anti-C1r.

Общо проби в проучването	Патологично активен уринен седимент	Без патологична находка в уринния седимент	Общо
Липса на ниво на anti-C1r	1	7	8
Установимо ниво на anti-C1r	127	131	258
Общо	128	138	266

При пациентите с патологично активен уринен седимент в началото на проучването, средното нормализирано ниво на anti-C1r е $0,568 \pm 0,313$ (от 0,040 до 1,429), докато при тези без патологично активен седимент сравнително по-ниско – $0,551 \pm 0,181$ (от 0,116 до 1,085), като разликата в нивата на anti-C1r не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,325$). При всички проби, изследвани в динамика, се потвърди липсата на разлика в нивата на anti-C1r. При пробите с патологично активен уринен седимент средното нормализирано ниво на anti-C1r е $0,632 \pm 0,327$ (от 0,000 до 1,763), а при пробите без активен уринен седимент това ниво е по-високо: $0,653 \pm 0,377$ (от 0,000 до 2,325), като разликата не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,335$).

5.2.4.3. Автоантитела срещу C1r и бъбречна функция.

При изследваните за anti-C1r пациенти с ЛН, първоначално включени в проучването, 60 (81,1%) са с изчислена скорост на гломерулната филтрация (eGFR) ≥ 60 mL/min, докато тези с eGFR < 60 mL/min са 14 (18,9%). Сред всички проведени в динамика на проучването проби, при 220 (82,7%) се установи eGFR ≥ 60 mL/min, а при 46 (17,3%) – eGFR < 60 mL/min.

Разпределението на пациентите с ЛН в групи според eGFR е както следва: с ≥ 90 mL/min – 40 (54,0%) от пациентите; с 89-60 mL/min – 20 (27,0%) от пациентите; с 59-30 mL/min – 8 (10,8%) от пациентите; с 29-15 mL/min – 4 (5,4%) от пациентите и с < 15 mL/min – 2 (2,7%) от пациентите.

Сред всички изследвани в динамика проби, от позитивните за anti-C1r 10 (29,4%) от пробите са с eGFR < 60 mL/min, а 24 (70,6%) от пробите са с eGFR ≥ 60 mL/min. Сред негативните за anti-C1r проби 36 (15,5%) от пробите са с eGFR < 60 mL/min, а 196 (84,5%) от пробите са с eGFR ≥ 60 mL/min (Таблица 5.2.3). Това разпределение на пробите в динамика показва, че наличието на патологично повишени нива на anti-C1r

статистически значимо определя наличието на декомпенсирана бъбречна функция (eGFR<60 mL/min) (Fisher's exact test, p=0,045).

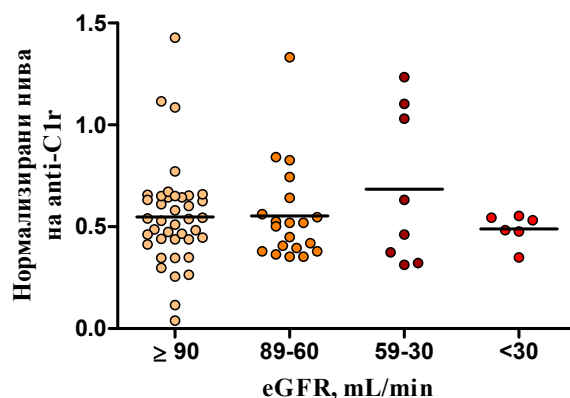
Таблица 5.2.3. Разпределение на всички проведени в динамика на проучването проби при пациентите с ЛН с eGFR <60 mL/min и eGFR ≥60 mL/min в зависимост от серологичния статус по отношение на anti-C1r.

Пациенти	eGFR <60 mL/min	eGFR ≥60 mL/min	Общо
Повишени anti-C1r	10	24	34
Референтни anti-C1r	36	196	232
Общо	46	220	266

При пациентите с eGFR <60 mL/min се установи средно нормализирано ниво на anti-C1r $0,601 \pm 0,300$ (от 0,313 до 1,234), докато при пациентите с eGFR ≥60 mL/min средното ниво на anti-C1r е $0,550 \pm 0,244$ (от 0,040 до 1,429). Въпреки относително по-високите нива в групата с декомпенсирана бъбречна функция, разликата в нивата на anti-C1r не е статистически значима (Mann-Whitney, p=1,000).

Не се установи корелационна зависимост между нивата на anti-C1r и eGFR нито сред първоначално изследваната група от 74 пациенти с ЛН (Spearman, $r=-0,04$, p=0,722), нито сред всички изследвани в динамика 266 проби (Spearman, $r=-0,06$, p=0,147).

В групата от пациенти с eGFR ≥90 mL/min средното нормализирано ниво на anti-C1r е $0,548 \pm 0,250$ (от 0,040 до 1,429); в групата пациенти с eGFR от 89 до 60 mL/min е $0,553 \pm 0,237$ (от 0,353 до 1,331); в групата пациенти с eGFR от 59 до 30 mL/min е $0,684 \pm 0,381$ (от 0,313 до 1,234) и в групата пациенти с eGFR под 30 mL/min е $0,490 \pm 0,076$ (от 0,350 до 0,553) (с eGFR<15 mL/min са само 2 пациенти, поради което, с оглед коректността на статистическия анализ обединихме групите с eGFR 29-15 и <15 mL/min в обща група). Не установихме статистически значима разлика между нивата на anti-C1r при отделните групи от пациенти с ЛН, обособени въз основа на eGFR, като липсва статистически значима зависимост между тези нива и поредността на отделните групи (One-way ANOVA, p=0,489; Bonferroni's multiple comparison test, p>0,05; Post test for linear trend, p>0,05) (Фигура 5.2.4). Тази тенденция се потвърди и при изследването на всички проби, проведени в динамика, разпределени в групите според eGFR (One-way ANOVA, p=0,276; Bonferroni's multiple comparison test, p<0,05).



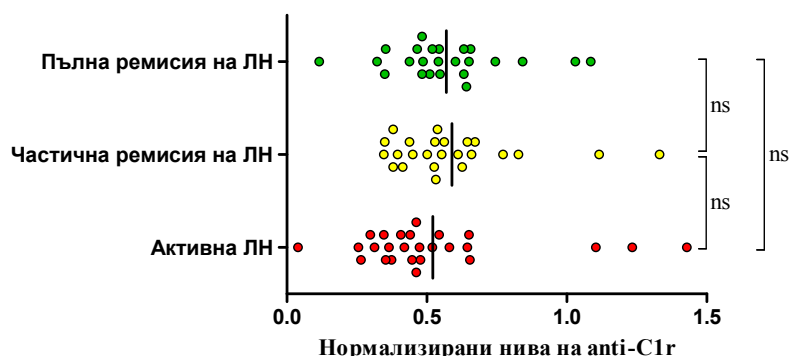
Фигура 5.2.4. Средни нива на anti-C1r в обособените според eGFR групи от пациенти с ЛН, първоначално изследвани в проучването.

При пациентите, позитивни за anti-C1r, средната eGFR е $82,1 \pm 38,3$ mL/min, сравнително по-ниска от средната eGFR при негативните за anti-C1r пациенти – $87,1 \pm 33,1$ mL/min, като разликата между двете не е статистически значима (Unpaired t-test, $p=0,711$).

5.2.4.4. Автоантитела срещу C1r и комплексната клиничко-лабораторна оценка на активността на ЛН.

Изследваните за anti-C1r пациенти са разпределени според клиничко-лабораторната активност на ЛН, както следва: в състояние на активна ЛН са 26 (35,2%) пациенти, в състояние на частична клиничко-лабораторна ремисия на ЛН са 24 (32,4%) пациенти и в състояние на пълна клиничко-лабораторна ремисия са 24 (32,4%) пациенти.

В групата с активна ЛН се установиха 3 (11,5%) пациенти, позитивни за anti-C1r, в групата с частична ремисия на ЛН позитивни за anti-C1r са 2 (8,3%) пациенти и в групата с пълна клиничко-лабораторна ремисия на ЛН позитивни за anti-C1r са 2 (8,3%) пациенти. Средните нормализирани нива на anti-C1r в трите групи пациенти с ЛН са както следва: в групата с активна ЛН – $0,521 \pm 0,306$ (от 0,040 до 1,429); в групата с частична ремисия на ЛН – $0,590 \pm 0,235$ (от 0,347 до 1,331); в групата с пълна клиничко-лабораторна ремисия на ЛН – $0,570 \pm 0,212$ (от 0,116 до 1,085), както е показано на Фигура 5.2.5.



Фигура 5.2.5. Разпределение на пациентите с ЛН в зависимост от комплексната клинично-лабораторна оценка активността на ЛН и средните нормализирани нива на anti-C1r.

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

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

При анализ на всички изследвани 266 проби, установихме, че от всички позитивни за anti-C1r, 11 (32,3%) от пробите са при пациенти в състояние на активна ЛН, 10 (29,4%) от пробите са при пациенти с частична клинично-лабораторна ремисия на ЛН и 13 (38,3%) от пробите са при пациенти в състояние на пълна клинично-лабораторна ремисия. Сред пробите с референтни нива на anti-C1r: 71 (30,6%) от пробите са при пациенти с активна ЛН, 82 (35,3%) от пробите са при пациенти с частична ремисия на ЛН и 79 (34,1%) от пробите са при пациенти с пълна ремисия на

ЛН. При отчитане на липсата на клиничко-лабораторна активност на ЛН (имайки предвид само състоянията на пълна клиничко-лабораторна ремисия на ЛН) и наличието на активност на ЛН (обединявайки групите с активна ЛН и частична ремисия на ЛН), установихме, че няма статистически значимо влияние на наличието на позитивни anti-C1r върху наличието на активност на ЛН (Fisher's exact test, $p=0,382$).

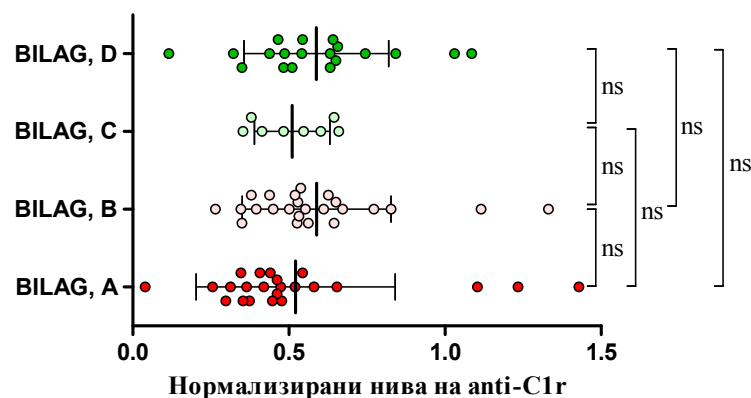
При пациентите с продължителност на пълната клиничко-лабораторна ремисия на ЛН ≥ 12 месеца се отчетоха сравнително по-ниски нива на anti-C1r ($0,550 \pm 0,226$) в сравнение с нивата на anti-C1r при продължителност на пълната клиничко-лабораторна ремисия под 12 месеца ($0,594 \pm 0,201$), макар тази разлика да не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,736$).

Независимо от състоянието на пациентите с ЛН към началния момент на включване в проучването, при съпоставяне на нормализираните нива на anti-C1r при тези с епизоди на ремисия в миналото ($0,576 \pm 0,230$) с нивата при пациентите без ремисия в миналото ($0,545 \pm 0,284$) също не се установи статистически значима разлика (Mann-Whitney, $p=0,375$).

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

Разпределението на пациентите с ЛН, изследвани за anti-C1r, според категориите на ЛН по BILAG Renal score е както следва: с категория А са 23 (31,1%) от пациентите; с категория В – 24 (32,4%); с категория С – 8 (10,8%) и с категория D – 19 (25,7%).

При пациентите с ЛН от категория А по BILAG Renal score (наличие на активно заболяване, налагащо провеждане на модифициращо хода на болестта имунопатогенетично лечение) позитивните за anti-C1r са 3 (13,0%); при пациентите от категория В позитивни за anti-C1r са 2 (8,3%); при пациентите от категория С няма позитивни за anti-C1r и 2 (10,5%) от пациентите от категория D са позитивни за anti-C1r. Средните нормализирани нива на anti-C1r при различните категории пациенти с ЛН по BILAG Renal score са както следва: при категория А: $0,522 \pm 0,319$ (от 0,040 до 1,429; Median – 0,447); при категория В: $0,589 \pm 0,238$ (от 0,264 до 1,331; Median – 0,535); при категория С: $0,510 \pm 0,121$ (от 0,353 до 0,660; Median – 0,515) и при категория D: $0,588 \pm 0,232$ (от 0,116 до 1,085; Median – 0,544), както е показано на Фигура 5.2.6.

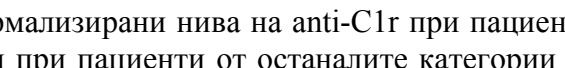


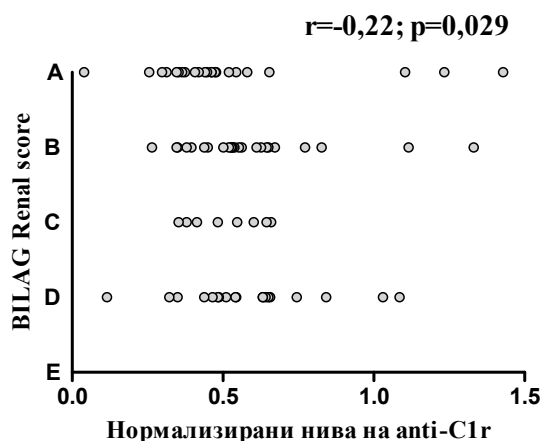
Фигура 5.2.6. Разпределение на пациентите с ЛН в зависимост от комплексната клинично-лабораторна оценка активността на ЛН по BILAG Renal score. Представени са средните нормализирани нива на anti-C1r в отделните категории.

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

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

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





Фигура 5.2.8. Корелационна зависимост между нормализираните нива на anti-C1r и категорията по BILAG Renal score (Spearman, $r=-0,22$; $p=0,029$).

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

С оглед диагностиката и оценката на имунологичната активност на ЛН при изследваните пациенти са определени плазмените нива на C4 компонента на комплемента, C3 компонента на комплемента, титрите на антинуклеарните антитела (ANA) и нивата на антителата срещу двойноверижна ДНК (anti-dsDNA).

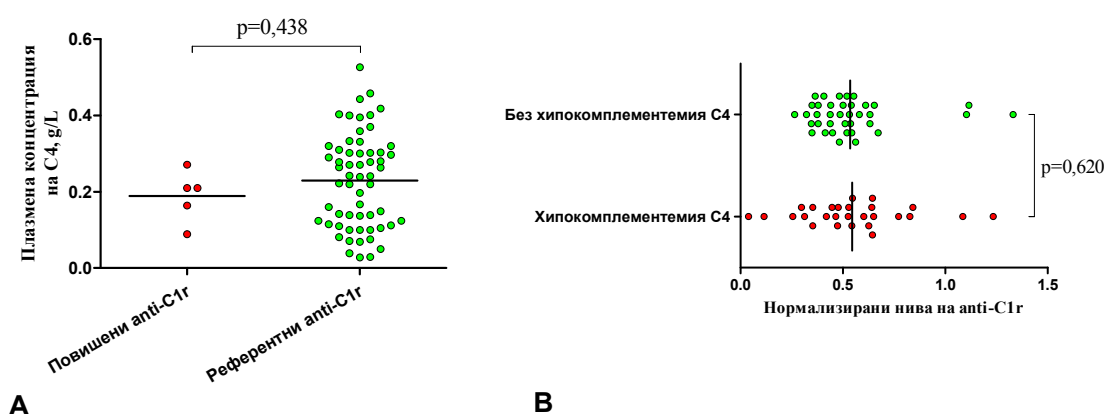
5.2.5.1. Автоантитела срещу C1r и нива на комплемента C4 и C3.

Сред пациентите с ЛН, включени в проучването ($N=74$), плазмените концентрации на C4 са изследвани при 64 (86,5%) пациенти, а плазмените концентрации на C3 – при 69 (93,2%) пациенти. Едновременно нивата на C4 и C3 са изследвани при 64 (86,5%) от пациентите с ЛН изходно включени в проучването.

Пациентите с ЛН, изследвани за anti-C1r с хипокомplementемия C4 са 27 (42,2%) от всички ($N=64$), при които са изследвани нивата на C4 изходно при включване в проучването, а пациентите с ЛН с хипокомplementемия C3 – 13 (18,8%) от всички ($N=69$), при които са изследвани нивата на C3 изходно при включване в проучването. Пациентите с хипокомplementемия едновременно за C4 и C3 са 12 (18,8%) от тези при които са изследвани едновременно C3 и C4.

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

Средната плазмена концентрация на C4 при пациентите с повишени anti-C1r е $0,189 \pm 0,068$ g/L и не е статистически значимо различаваща се от плазмената концентрация на C4 при пациентите с референтни нива на anti-C1r, която е $0,229 \pm 0,124$ g/L (Mann-Whitney, $p=0,438$), както е показано на Фигура 5.2.9 А. Средното нормализирано ниво на anti-C1r при пациентите с хипокомplementемия C4 е $0,545 \pm 0,262$ и не е статистически значимо различаващо се от средното нормализирано ниво на anti-C1r при пациентите без хипокомplementемия C4, което е $0,536 \pm 0,221$ (Mann-Whitney, $p=0,620$), както е показано на Фигура 5.2.9 В.

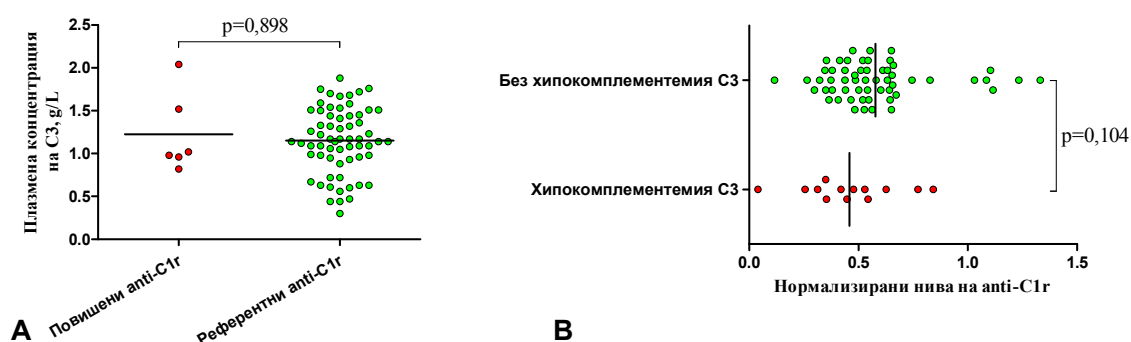


Фигура 5.2.9. А. Плазмени концентрации на C4 при пациентите с ЛН в зависимост от серологичния статус по отношение на anti-C1r. **В.** Нормализирани плазмени нива на anti-C1r при пациенти с ЛН в зависимост от наличието на хипокомplementемия C4.

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

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

Плазмената концентрация на C3 при пациентите с повишени anti-C1r е $1,223 \pm 0,466$ g/L и не е статистически значимо различаваща се от плазмената концентрация на C3 при пациентите с референтни нива на anti-C1r, която е $1,151 \pm 0,381$ g/L (Mann-Whitney, $p=0,898$), както е показано на Фигура 5.2.10 А. Средното нормализирано ниво на anti-C1r при пациентите с хипокомplementемия C3 е $0,459 \pm 0,214$ и не е статистически значимо различаващо се от средното нормализирано ниво на anti-C1r при пациентите без хипокомplementемия C3, което е $0,577 \pm 0,240$ (Mann-Whitney, $p=0,104$), както е показано на Фигура 5.2.10 В.



Фигура 5.2.10. А. Плазмени концентрации на C3 при пациентите с ЛН в зависимост от серологичния статус по отношение на anti-C1r. **В.** Нормализирани плазмени нива на anti-C1r при пациенти с ЛН в зависимост от наличието на хипокомplementемия C3.

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

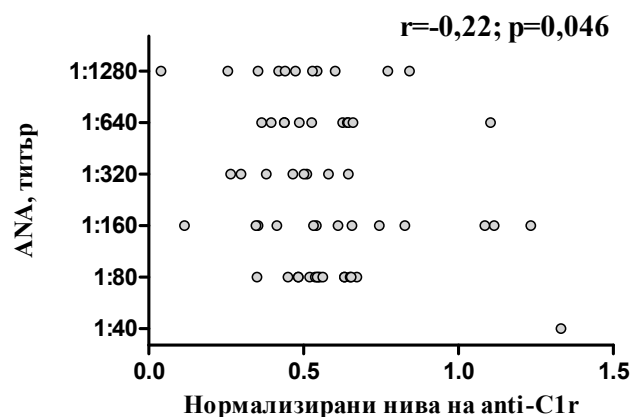
5.2.5.2. Автоантитела срещу C1r и антинуклеарни автоантитела (ANA).

Сред пациентите с ЛН, които са изследвани за anti-C1r, изходно включени в нашето проучване, ANA са изследвани при 59 (79,7%) и в общо 220 (82,7%) от всички изследвани проби. Патологично повишени титри на ANA ($>1:80$) установихме при 43 (72,9%) от първоначално изследваните за ANA и anti-C1r пациенти с ЛН и при 176 (80,0%) от всички изследвани за ANA и anti-C1r проби от пациенти с ЛН в динамика.

Сред всички изследвани в динамика по време на проучването пациенти с ЛН, пробите с повишени нива на anti-C1r и повишени титри на ANA са 22 (81,5% от всички проби с повишени нива на anti-C1r, изследвани за ANA), а пробите с повишени anti-C1r и референтни титри на ANA са 5 (18,5% от всички проби с повишени anti-C1r, изследвани за ANA). Пробите с референтни нива на anti-C1r и повишени титри на ANA са 154 (79,8% от всички проби с референтни нива на anti-C1r, изследвани за ANA), а тези с референтни нива на anti-C1r и референтни титри на ANA са 39 (20,2% от всички проби с референтни нива на anti-C1r, изследвани за ANA). Въз основа на това разпределение установихме, че липсва статистически значимо влияние на наличието на повишени нива на anti-C1r върху наличието на повишени титри на ANA (Fisher's exact test, $p=1,000$).

Средното нормализирано ниво на anti-C1r при изходно изследваните пациенти с ЛН с патологично повишени титри на ANA е $0,554 \pm 0,252$, сравнително по-ниско от нивото на anti-C1r при пациентите с референтни титри на ANA, което е $0,600 \pm 0,213$. Не се установи статистически значима разлика между нивата на anti-C1r при пациентите с повишени ANA и тези с референтни титри на ANA (Mann-Whitney, $p=0,260$).

Установихме статистически значима слаба негативна корелационна зависимост между нормализираните нива на anti-C1r и титъра на ANA (Spearman, $r=-0,22$; $p=0,046$).



Фигура 5.2.11. Корелационна зависимост между нормализираните нива на anti-C1r и титъра на ANA (Spearman, $r=-0,22$; $p=0,046$).

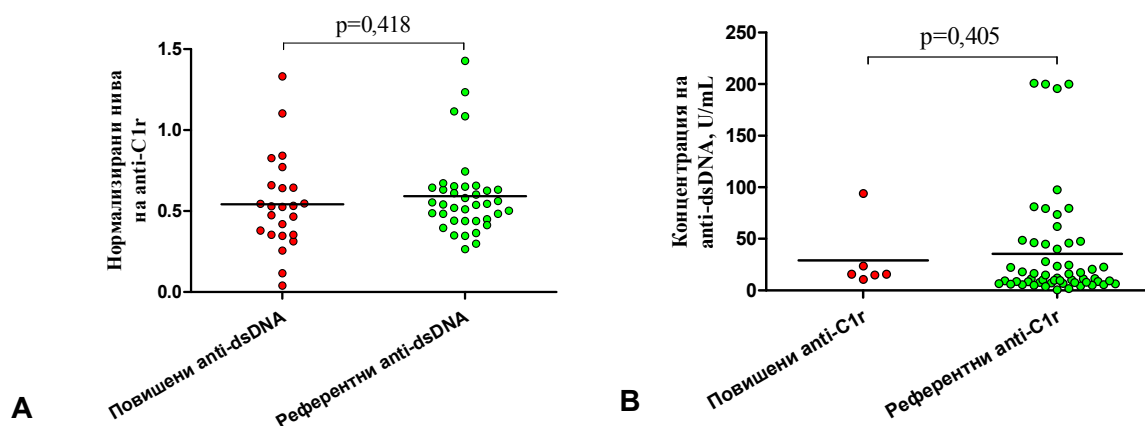
5.2.5.3. Автоантитела срещу C1r и автоантитела срещу двойноверижна ДНК (anti-dsDNA).

Сред пациентите с ЛН, изходно включени в нашето проучване и изследвани за anti-C1r, anti-dsDNA са изследвани при 62 (83,8%) и в общо 224 (84,2%) от всички в динамика изследвани проби. Патологично повишени нива на anti-dsDNA (≥ 20 U/mL) установихме при 24 (38,7%) от първоначално изследваните за anti-dsDNA и anti-C1r пациенти с ЛН и при 121 (54,0%) от всички изследвани за anti-dsDNA и anti-C1r проби в динамика. Пациентите, позитивни за anti-C1r с патологично повишени anti-dsDNA са 2 (28,6% позитивните за anti-C1r пациенти, при които са изследвани и anti-dsDNA), а пациентите, негативни за anti-C1r и позитивни за anti-dsDNA са 22 (39,3% от негативните за anti-C1r, при които са изследвани и anti-dsDNA). Въз основа на това разпределение установихме, че липсва статистически значимо влияние на наличието на патологично повишени anti-C1r върху наличието на патологично повишени anti-dsDNA (Fisher's exact test, $p=1,000$).

Средното нормализирано ниво на anti-C1r при изходно изследваните пациенти с ЛН с патологично повишени нива на anti-dsDNA е $0,542 \pm 0,290$, докато нивото на anti-C1r при пациентите с референтни нива на anti-dsDNA е $0,592 \pm 0,248$. Установихме, че нивото на anti-C1r е сравнително по-високо при пациентите с референтни концентрации на anti-dsDNA, но разликата в нивата на anti-C1r в двете групи не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,418$) (Фигура 5.2.12 А). При пациентите с повишени anti-C1r средната концентрация на anti-dsDNA е $29,15 \pm 32,09$ U/mL,

сравнително по-ниска от средната концентрация на anti-dsDNA при пациентите с референтни нива на anti-C1r, която е $35,46 \pm 51,43$ U/mL, но статистически значима разлика между тези концентрации не се установи (Mann-Whitney, $p=0,405$) (Фигура 5.2.12 В).

Липсата на статистически значима връзка на нивата на anti-C1r с тези на anti-dsDNA потвърдихме и с корелационен анализ, който показва липсваща корелационна зависимост между двете (Spearman, $r=-0,05$; $p=0,363$).



Фигура 5.2.12. А. Нормализирани нива на anti-C1r при пациенти с повишени и при такива с референтни нива на anti-dsDNA. В. Нива на anti-dsDNA при пациенти с патологично повишени и с референтни anti-C1r.

5.2.6. Автоантитела срещу C1r и някои хистологични признаци на ЛН.

Пациентите с ЛН, са диагностицирани с провеждане на пункционна бъбречна биопсия, като хистологична диагноза е налична при 71 (95,9%) от изходно включените в проучването пациенти, при които са изследвани anti-C1r и при 260 (97,7%) от всички обработени в проучването проби. Определени са хистологичните класове на ЛН, съгласно критериите на International Society of Nephrology (ISN) и Renal Pathology Society (RPS), като разпределението на пациентите е както следва: в I хистологичен клас – 4 (5,6%) пациенти; във II – 23 (32,4%); в III – 7 (9,9%); в IV – 25 (35,2%); в V – 11 (15,5%) и в VI – 1 (1,4%) пациент. Отчетени са хистологичните индекси на активност и хроничност, съгласно критериите на National Institutes of Health (NIH). И тук, с оглед

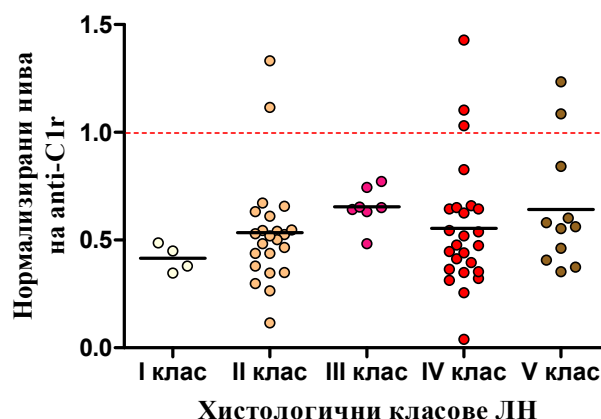
клинична достоверност на изследваните зависимости, когато са изследвани връзки, касаещи белези на хистологична активност на ЛН, при статистическите анализи са отчитани само случаите, при които времето между вземането на кръвните проби за изследване на anti-C1r и провеждането на пункционната бъбречна биопсия е било до 12 месеца. Това условие е изпълнено при 27 (38,0%) от пациентите, изходно включени в проучването, и при общо 75 (28,8%) от пробите, изследвани в динамика.

5.2.6.1. Автоантитела срещу C1r и хистологичният клас на ЛН.

При пациентите с I и III хистологични класове ЛН не се установиха патологично повишени anti-C1r (Фигура 5.2.13). При тези с II хистологичен клас, позитивни за anti-C1r са 2 (8,7%) пациенти; при пациентите с IV клас – 3 (12,0%); при пациентите с V клас – 2 (18,2%). Средните нормализираните нива на anti-C1r са съответно: при пациентите с I хистологичен клас: $0,416 \pm 0,064$; при пациентите с II хистологичен клас: $0,535 \pm 0,257$; при пациентите с III хистологичен клас: $0,654 \pm 0,093$; при пациентите с IV хистологичен клас: $0,554 \pm 0,294$; при пациентите с V хистологичен клас: $0,641 \pm 0,292$ и нормализираното ниво при пациента с VI хистологичен клас е 0,532.

Не се установи статистически значима разлика между нивата при различните класове ЛН, както и не се установи зависимост на нивата на anti-C1r от хистологичния клас на ЛН (One-way ANOVA, $p=0,499$; Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$), като от този анализ изключихме пациента с VI хистологичен клас ЛН (Фигура 5.2.13).

Сред пациентите, позитивни за anti-C1r, такива с IV клас ЛН са 3 (37,5% от позитивните за anti-C1r с хистологична диагноза). При пациентите, негативни за anti-C1r, такива с IV клас ЛН са 22 (34,4% от негативните за anti-C1r с хистологична диагноза). При изследване връзката между наличието на патологично повишени anti-C1r и наличието на ЛН от IV хистологичен клас установихме, че патологично повишените нива на anti-C1r не определят статистически значимо наличие на дифузна ЛН (IV хистологичен клас) (Fisher's exact test, $p=0,691$).



Фигура 5.2.13. Нива на anti-C1r в зависимост от хистологичния клас на ЛН. Не се установиха статистически значима зависимост между нивата на anti-C1r и класа ЛН, както и разлика между нивата на anti-C1r при различните класове ЛН (One-way ANOVA, $p=0,499$; Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$).

5.2.6.2. Автоантитела срещу C1r и основни хистологични лезии за активност и хроничност на ЛН.

В настоящото проучване изследвахме зависимостите между нивата на anti-C1r и хистологични белези на активност (ендокапилярна пролиферация, гломерулна левкоцитна инфилтрация, субендотелни депозити („телени бримки”), фибриноидна некроза и/или кариорексис, клетъчни полулуния и интерстициална инфилтрация) и хистологични белези на хроничност (гломерулна склероза, фиброзни полулуния, тубулна атрофия и интерстициална фиброза), както и връзката между нивата на anti-C1r и индексите на активност и хроничност, определени на базата на горепосочените хистологични белези (Вижте “IV. Материали и методи”, Таблица 4.1). В анализите са включени само пациентите с ЛН, при които времето от вземане на пробата за изследване на anti-C1r до провеждане на пункционната бъбречна биопсия е било до 12 месеца (при 27 (38,0%) от хистологично диагностицираните пациенти, изследвани за anti-C1r).

Таблица 5.2.4. Сравнителен анализ между нивата на anti-C1r при наличие и липса на хистологични белези за активност и хроничност при пациентите с ЛН. Представени са средните нива $\pm$ стандартното отклонение (SD).

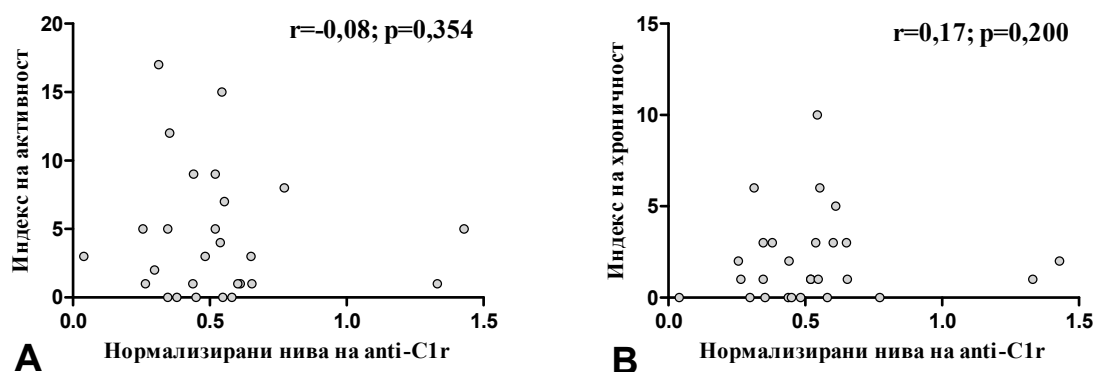
Хистологичен признак	Нормализирани нива на anti-C1r при:		p
	наличие на хистологичния признак	липса на хистологичния признак	
Ендокапилярна пролиферация	0,540 $\pm$ 0,337	0,494 $\pm$ 0,102	0,698
Гломерулна левкоцитна инфилтрация ¹	-	-	-
Субендотелни депозити, формиращи „телени бримки“	0,574 $\pm$ 0,488	0,518 $\pm$ 0,241	0,417
Фибриноидна некроза и/или кариорексис	0,517 $\pm$ 0,134	0,535 $\pm$ 0,356	0,581
Клетъчни полулуния	0,404 $\pm$ 0,137	0,556 $\pm$ 0,310	0,248
Интерстициално възпаление	0,556 $\pm$ 0,364	0,512 $\pm$ 0,248	0,744
Гломерулна склероза	0,475 $\pm$ 0,142	0,595 $\pm$ 0,406	0,884
Фиброзни полулуния	0,454 $\pm$ 0,157	0,545 $\pm$ 0,313	0,731
Тубулна атрофия	0,587 $\pm$ 0,287	0,494 $\pm$ 0,295	0,228
Интерстициална фиброза	0,582 $\pm$ 0,338	0,501 $\pm$ 0,269	0,662

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

На Таблица 5.2.4 са показани данните от сравнителния анализ между нивата на anti-C1r в групите с и без съответните хистологични признаци за активност и хроничност на ЛН. При пациентите с наличие на хистологични признаци на активност, като ендокапилярна пролиферация, субендотелни депозити, формиращи „телени бримки“ и с интерстициално възпаление, средните нормализирани нива на anti-C1r са сравнително по-високи от нивата при пациентите без тези хистологични признаци, но разликите не са статистически значими. При пациентите с наличие на хистологични признаци на активност, като фибриноидна некроза (и/или кариорексис) и клетъчни полулуния, средните нормализирани нива на anti-C1r са сравнително по-ниски от нивата при пациентите без тези хистологични признаци, но разликите отново не са статистически значими. При пациентите с наличие на хистологични признаци на хроничност, като гломерулна склероза и фиброзни полулуния, средните нормализирани нива на anti-C1r са сравнително по-ниски от нивата при пациентите без тези хистологични признаци, но разликите не са статистически значими. При пациентите с наличие на тубулна атрофия и интерстициална фиброза, средните нормализирани нива на anti-C1r са сравнително по-високи от нивата при пациентите без тези признаци, но отново разликите не са статистически значими.

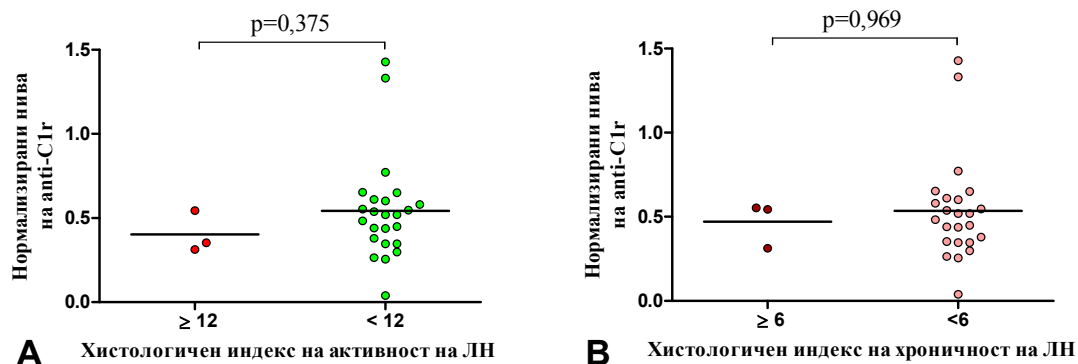
При изследване връзката между нивата на anti-C1r и хистологичния индекс на активност на ЛН не се установи наличие на статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-C1r и хистологичния индекс на активност на ЛН (Spearman, $r=-0,08$; $p=0,354$) (Фигура 5.2.14 А). Не се установи и статистически значима

корелационна зависимост между нормализираните нива на anti-C1r и хистологичния индекс на хроничност при пациентите с ЛН (Spearman, $r=0,17$; $p=0,200$) (Фигура 5.2.14 В).



Фигура 5.2.14. А. Корелационен анализ на връзката между нормализираните нива на anti-C1r и хистологичния индекс на активност при пациентите с ЛН. Липсва статистически значима корелационна зависимост (Spearman, $r=-0,08$; $p=0,354$). **В.** Корелационен анализ на връзката между нормализираните нива на anti-C1r и хистологичния индекс на хроничност при пациентите с ЛН. Липсва статистически значима корелационна зависимост (Spearman, $r=0,17$; $p=0,200$).

Установихме, че средното нормализирано ниво на anti-C1r при пациентите с индекс на активност на ЛН ≥ 12 ($0,403 \pm 0,124$), е сравнително по-ниско от това при пациентите с индекс на активност под 12 ($0,544 \pm 0,303$), но липсва статистически значима разлика между нивата в двете групи пациенти с ЛН (Mann-Whitney, $p=0,375$) (Фигура 5.2.15 А). Аналогично, средното нормализирано ниво на anti-C1r при пациентите с хистологичен индекс на хроничност на ЛН ≥ 6 ($0,470 \pm 0,136$) е сравнително по-ниско от това при пациентите с индекс на хроничност на ЛН < 6 ($0,535 \pm 0,305$), но отново липсва статистически значима разлика между нивата в двете групи пациенти с ЛН (Mann-Whitney, $p=0,969$) (Фигура 5.2.15 В).



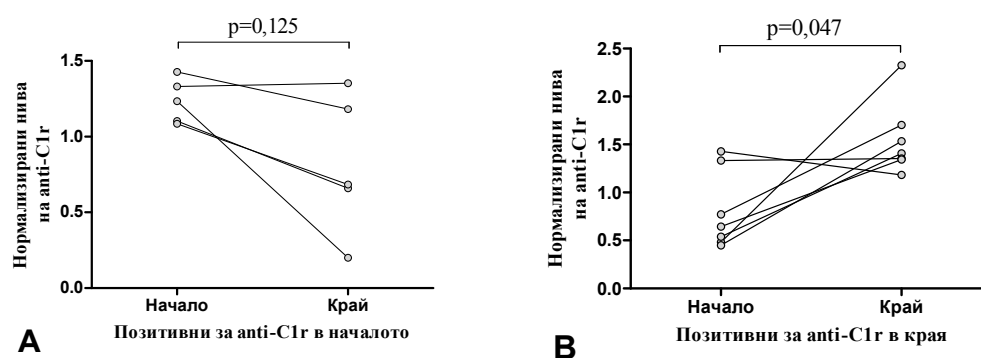
Фигура 5.2.15. Нормализирани нива на anti-C1r при пациенти с ЛН според хистологичните индекси на активност (A) и на хроничност (B).

5.2.7. Прогностично значение и динамика на промените в нивата на автоантителата срещу C1r.

При 52 (70,3%) от пациентите с ЛН, е налице проследяване за период от средно 13,0 (от 6,0 до 25,0) месеца, с между 2 и 11 проби, при които са определяни нивата на anti-C1r и останалите клинично-лабораторни и имунологични параметри на ЛН.

Сред изследваните общо 266 проби от кръвни плазми на пациентите с ЛН установихме патологично повишени нива на anti-C1r при 34 (12,8%) проби (Фигура 5.2.2). Изследвайки нивата на anti-C1r при проследените в динамика пациенти (с 2 и повече проби в хода на проучването), установихме, че при първите проби, патологично повишени anti-C1r има при 5 (9,6%) от пациентите, докато след среден период на проследяване от 13 месеца, патологично повишени нива на anti-C1r установихме при 7 (13,5%) от пациентите, като при 3 от тези пациенти с първоначално повишени anti-C1r, последните намаляват до референтни стойности, а при 2 от тези пациенти нивата се задържат в патологични граници. От пациентите с патологични anti-C1r на 13 месец от проследяването, при 2 нивата са били патологични от началото, а при 5 нарастват от изходно референтни. Средното нормализирано ниво на anti-C1r при пациентите, позитивни за anti-C1r в началото, е $1,236 \pm 0,147$ (от 1,085 до 1,429), докато след среден период от 13 месеца е $0,816 \pm 0,459$ (от 0,201 до 1,353), като няма статистически значима разлика между тези две нива (Wilcoxon signed rank test, $p=0,125$) (Фигура 5.2.16 A). Средното нормализирано ниво на anti-C1r при позитивните в края на периода на проследяване пациенти с ЛН е $1,550 \pm 0,379$ (от 1,182 до 2,325), статистически значимо по-високо от средното ниво на anti-C1r на същите тези пациенти в началото на

проследяването, когато е било $0,807 \pm 0,407$ (от 0,450 до 1,429) (Wilcoxon signed rank test, $p=0,047$) (Фигура 5.2.16 В).



Фигура 5.2.16. Динамика на нивата на anti-C1r при позитивните в началото на периода на проследяване (А) и при позитивните в края на периода на проследяване (В) пациенти с ЛН.

Сред проследяваните с повече от 1 проба пациенти с ЛН, при първото изследване с активна ЛН са били 21 (40,4%), в състояние на частична ремисия на ЛН са били 15 (28,8%) и в състояние на пълна ремисия на ЛН са били 16 (30,8%). В края на проследяването с активна ЛН са били 14 (27,0%), в състояние на частична ремисия на ЛН са били 19 (36,5%) и в състояние на пълна ремисия на ЛН са били 19 (36,5%). При първото изследване, с категория А на ЛН по BILAG Renal score са били 18 (34,6%), с категория В – 18 (34,6%), с категория С – 4 (7,7%) и с категория D – 12 (23,1%). В края, разпределението на пациентите в категории на ЛН по BILAG Renal score е следното: с категория А – 6 (11,5%), с категория В – 24 (46,2%), с категория С – 5 (9,6%) и с категория D – 17 (32,7%).

5.2.7.1. Прогностично значение на автоантителата срещу C1r.

При 42 (56,8%) от изходно включените в проучването пациенти с ЛН, при които са провеждани 3 или повече проби за anti-C1r в динамика, изследвахме връзките между нивата на anti-C1r и категорията по BILAG Renal score (Фигура 5.2.17) и нивата на anti-C1r и активността на ЛН, определена като активна, частична ремисия и пълна ремисия на нефропатията (Фигура 5.2.18). Повишаване на anti-C1r до патологични нива поне в

една от пробите установихме при 19 (45,2%) от пациентите.

Само при трима пациенти установихме статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-C1r и категорията по BILAG (ASN, $r=0,89$; $p=0,042$; UMK, $r=0,83$; $p=0,021$ и PGN, $r=-0,81$; $p=0,005$), както и само при трима – статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-C1r и активността на ЛН (JDJ, $r=-0,76$; $p=0,033$; PGN, $r=-0,80$; $p=0,003$ и UMK, $r=0,83$; $p=0,021$) при прилагане на непараметричен корелационен анализ (Spearman).

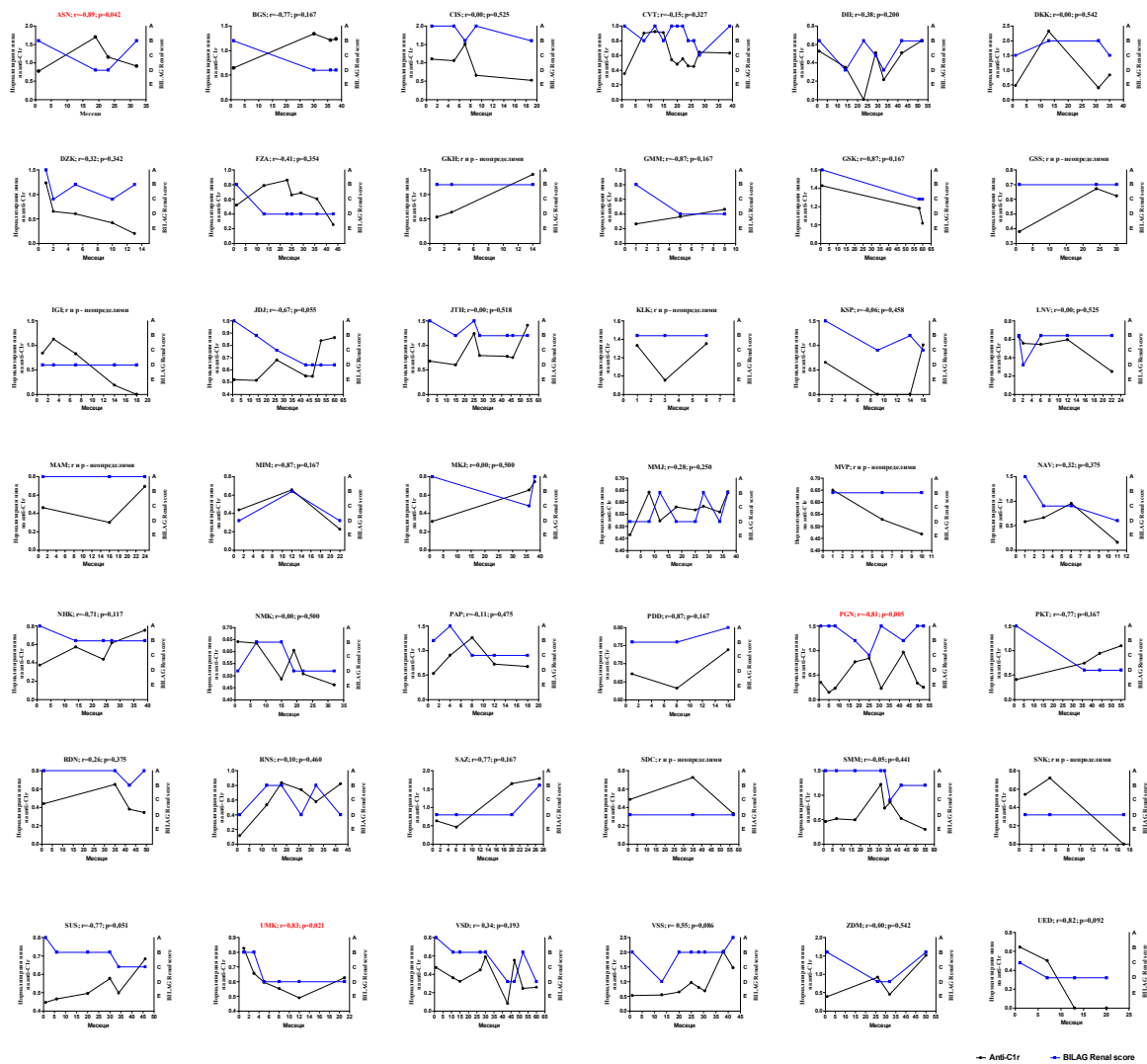
Пациентите с ЛН, при които отчетохме в динамика повишение на нивата на anti-C1r до патологични стойности с последващо повишение на категорията по BILAG са 8 (53,3% от всички, при които се установи в динамика повишаване на anti-C1r до патологични стойности). Това повишение на категорията по BILAG Renal score на ЛН се отчете в рамките на среден период от 1,6 (от 0,0 до 7,0) месеца след повишаване на нивата на anti-C1r до патологични стойности. Пациентите, при които не се отчете повишаване на нивата на anti-C1r до патологични стойности и не се отчете повишение на категорията по BILAG Renal score са 22 (81,5% от всички, при които не се отчете повишаване на anti-C1r до патологични нива). Разпределението на пациентите с ЛН според наличието или липсата на повишение на нивата на anti-C1r до патологични стойности и според наличието или липсата на повишение на категорията на ЛН по BILAG Renal score е показано на Таблица 5.2.5.

На базата на това разпределение установихме, че наличието на повишение на anti-C1r до патологични нива статистически значимо определя наличието на повишаване на категорията на ЛН по BILAG Renal score в рамките на среден период от $1,6 \pm 2,6$ месеца (от 0,0 до 7,0 месеца) (Fisher's exact test, $p=0,035$) с чувствителност от 61,5%, специфичност от 75,8%, позитивна предиктивна стойност от 53,3% и негативна предиктивна стойност от 81,5%. Относителният риск (RR) за повишаване категорията на ЛН по BILAG Renal score след повишаване на нивата на anti-C1r до патологични стойности определихме на 2,9.

Таблица 5.2.5. Разпределение на пациентите с ЛН, проследявани в динамика с 3 и повече проби по време на проучването, според наличието или липсата на повишение на нивата на anti-C1r до патологични стойности и наличието или липсата на последващо повишение на категорията на ЛН по BILAG Renal score.

Пациенти с ЛН	С повишение на категорията на ЛН по BILAG	Без повишение на категорията на ЛН по BILAG	Общо
С повишаване на anti-C1r до патологични нива	8	7	15
Без повишаване на anti-C1r до патологични нива	5	22	27
Общо	13	29	42

Пациентите, при които в динамика anti-C1r нарастват до патологични нива, заедно с последващо активиране на ЛН са 5 (31,2% от всички, при които се установи в динамика повишаване на anti-C1r до патологични стойности). Пациентите, при които не се отчете повишаване на нивата на anti-C1r до патологични стойности и не се отчете активиране на ЛН (преминаване от пълна в частична ремисия или от частична ремисия в активна ЛН) са 22 (84,6% от всички, при които не се отчете повишаване на anti-C1r до патологични нива). Разпределението на пациентите с ЛН според наличието или липсата на повишение на нивата на anti-C1r до патологични стойности и според наличието или липсата на активиране на ЛН е показано на Таблица 5.2.6.

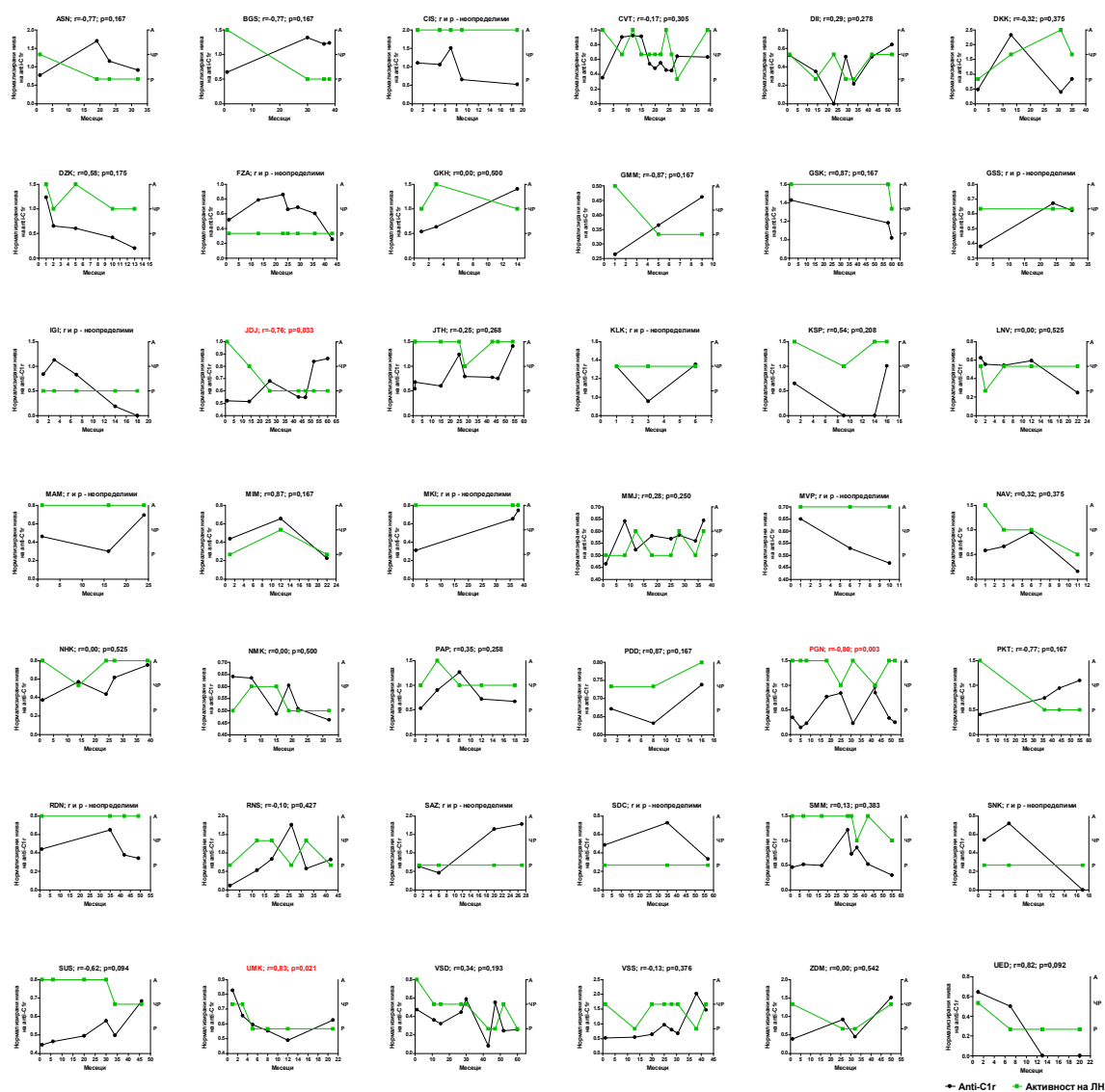


Фигура 5.2.17. Динамика на нормализираните нива на anti-C1r (в черно, по лява ордината на графиките) и категорията по BILAG Renal score (в синьо, по дясна ордината на графиките) при пациентите, проследени с 3 и повече проби. Само при 3 пациенти (обозначени в червено) се установи статистически значима корелационна връзка между нивата на anti-C1r и категорията по BILAG Renal score.

Таблица 5.2.6. Разпределение на пациентите с ЛН, проследявани в динамика с 3 и повече проби по време на проучването, според наличието или липсата на повишение на нивата на anti-C1r до патологични стойности и наличието или липсата на активиране на ЛН.

Пациенти с ЛН	Активиране на ЛН	Без активиране на ЛН	Общо
С повишаване на anti-C1r до патологични нива	5	11	16
Без повишаване на anti-C1r до патологични нива	4	22	26
Общо	9	33	42

На базата на това разпределение установихме, че липсва статистически значимо повлияване на повишението на anti-C1r до патологични нива върху повишаването на активността на ЛН, отчетено съгласно критериите за активна ЛН, частична ремисия и пълна ремисия на ЛН (Fisher's exact test, $p=0,265$).



Фигура 5.2.18. Динамика на нормализираните нива на anti-C1r (в черно, по лява ордината на графиките) и активността на ЛН (активна ЛН - А, частична ремисия на ЛН – ЧР и пълна ремисия на ЛН – Р) (в зелено, по дясна ордината на графиките) при пациентите, проследени с 3 и повече проби. Само при 3 пациенти (обозначени в червено) се установи статистически значима корелационна връзка между нивата на anti-C1r и активността на ЛН.

5.2.7.2. Динамика на автоантителата срещу C1r във връзка с някои лабораторни и имунологични показатели при пациентите с ЛН.

Средното нормализирано ниво на anti-C1r при пациенти с ЛН в началото на периода на проследяване е $0,583 \pm 0,259$ (от 0,116 до 1,429) докато в края на среден период от 13 месеца на проследяването и лечение е $0,668 \pm 0,429$ (от 0,000 до 2,325), като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,229$).

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

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

5.2.7.2.1. Динамика на автоантителата срещу C1r и протеинурията.

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

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

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

След прилагане на непараметричен корелационен анализ, не установихме статистически значима зависимост между промяната на нивата на anti-C1r ($\Delta N\%$) и промяната на протеинурията ($\Delta PU\%$) (Spearman, $r=-0,03$; $p=0,403$).

При пациентите с нарастване на протеинурията спрямо изходната, средното нормализирано ниво на anti-C1r в края на периода на проследяване е $0,658 \pm 0,506$, статистически незначимо различаващо се от нивото на anti-C1r при пациентите, при които отчетохме намаление на протеинурията от изходната, което е $0,675 \pm 0,388$ (Mann-Whitney, $p=0,946$).

Липсва статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-C1r и протеинурията при всички изследваните в динамика проби от пациентите с ЛН (Spearman, $r=-0,03$; $p=0,327$, Фигура 5.2.19 A1). Сред всички проби от пациентите с ЛН, които някога са имали екстраренални прояви на СЛЕ, също не установихме статистически значима корелация между нормализираните нива на anti-C1r и протеинурията (Spearman, $r=-0,05$; $p=0,254$, Фигура 5.2.19 A2). При пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ, обаче установихме статистически значима слаба позитивна корелационна зависимост между нивата на anti-C1r и протеинурията (Spearman, $r=0,26$; $p=0,034$, Фигура 5.2.19 A3).

5.2.7.2.2. Динамика на автоантителата срещу C1r и бъбречната функция.

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

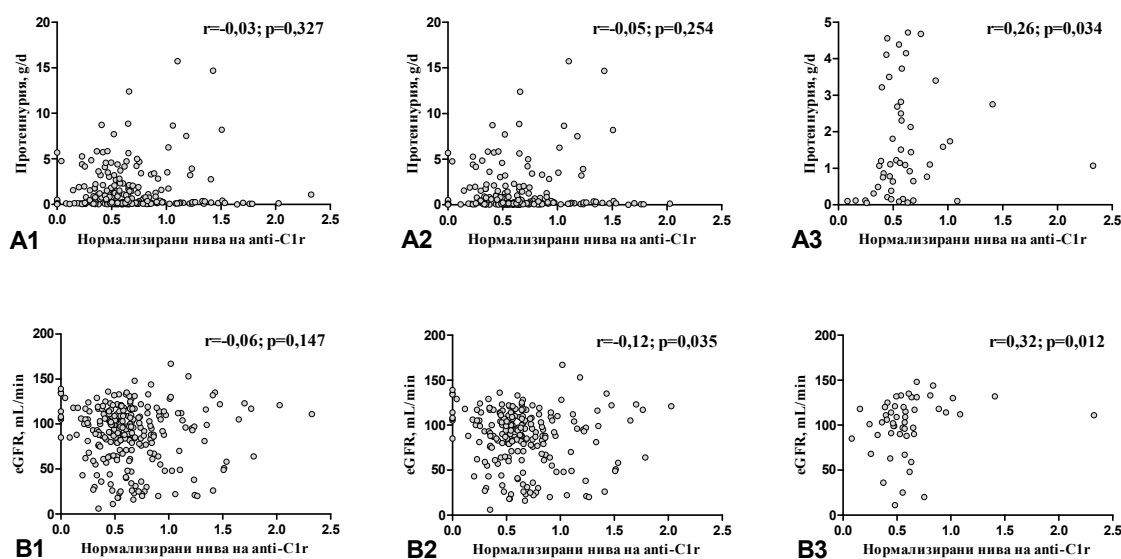
Аналогично на горепосоченото, определихме промяната на eGFR (Δ GFR) спрямо изходната GFR при пациентите, изследвани за anti-C1r (GFR_1 – GFR при първото изследване (mL/min); GFR_x – GFR при изследването след среден период на проследяване от 13 месеца (mL/min)):

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

Не установихме статистически значима корелационна зависимост между промяната на нормализираното ниво на anti-C1r спрямо изходното ($\Delta N\%$) и промяната на eGFR спрямо изходната (Δ eGFR) за среден период от 13 месеца при пациентите с ЛН (Spearman, $r=-0,11$; $p=0,215$).

При пациентите с нарастване на eGFR спрямо изходната, средното нормализирано ниво на anti-C1r в края на периода на проследяване е $0,591 \pm 0,377$, което е статистически незначимо по-ниско от средното ниво при пациентите, при които eGFR намалява в края на периода на проследяване, което е $0,775 \pm 0,492$ (Mann-Whitney, $p=0,411$).

Липсва статистически значима корелация между нивата на anti-C1r и eGFR при всички изследвани в динамика проби от пациентите с ЛН (Spearman, $r=-0,06$; $p=0,147$, Фигура 5.2.19 B1). Сред всички проби от пациентите с ЛН, които някога са имали екстраренални прояви на СЛЕ установихме статистически значима слаба отрицателна корелация между нормализираните нива на anti-C1r и eGFR (Spearman, $r=-0,12$; $p=0,035$, Фигура 5.2.19 B2). При пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ също установихме статистически значима, умерена, но позитивна корелация между нивата на anti-C1r и eGFR (Spearman, $r=0,32$; $p=0,012$, Фигура 5.2.19 B3).



Фигура 5.2.19. Корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C1r и протеинурията и anti-C1r и изчислената скорост на гломерулна филтрация (eGFR) при всички изследвани в динамика проби от пациенти с ЛН (A1 и B1); при пробите, изследвани в динамика от пациенти с ЛН с екстраренални прояви на СЛЕ (A2 и B2) и при всички изследвани проби от пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ (A3 и B3) (Spearman, one-tailed).

5.2.7.2.3. Динамика на автоантителата срещу C1r и компонентите на комплемента C4 и C3.

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

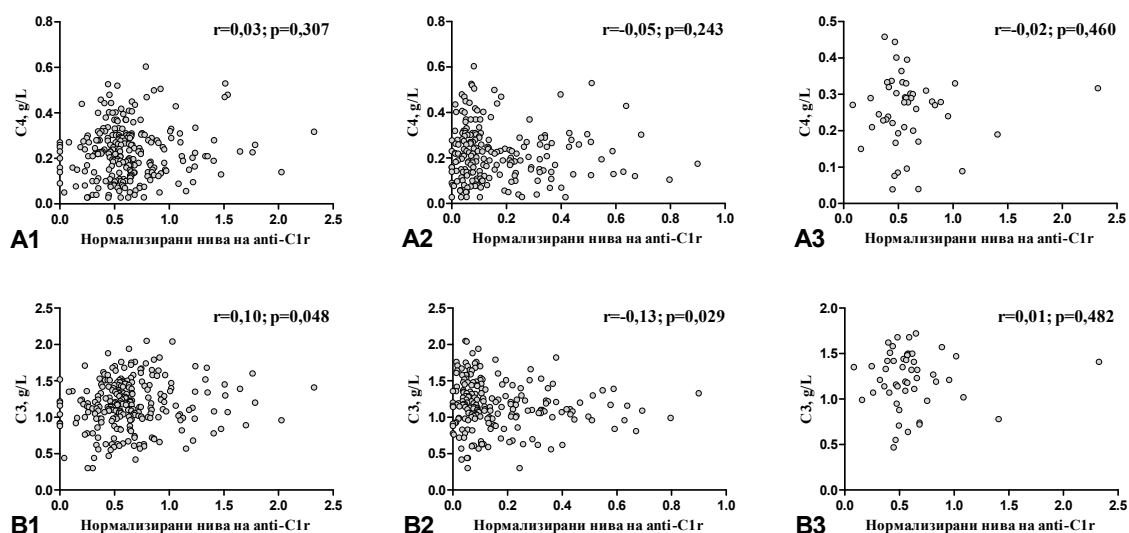
Аналогично, определихме и промените на C4 и C3 ($\Delta C4$ и $\Delta C3$) спрямо съответните изходни нива на C4 и C3 при изследването в началото (C_1 – съответното ниво на комплемента (C4 и C3) (g/L) в началото; C_x – съответното ниво на комплемента (C4 и C3) (g/L) в края на периода на проследяване):

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

Установихме, че няма статистически значима корелационна зависимост между промяната на нормализираните нива на anti-C1r спрямо изходните ($\Delta N\%$) и промяната на концентрацията на C4 спрямо изходната ($\Delta C4$) за периода на проследяване (Spearman, $r=-0,01$; $p=0,465$), а също така и че няма статистически значима корелационна зависимост между промяната на нормализираните нива на anti-C1r спрямо изходните ($\Delta N\%$) и промяната на концентрацията на C3 спрямо изходната ($\Delta C3$) за същия период на проследяване (Spearman, $r=0,12$; $p=0,207$).

При изследване на зависимостите между нивата на anti-C1r и плазмените концентрации на C4 и C3 при пациентите с ЛН установихме, че липсва статистически значима корелационна зависимост между нивото на anti-C1r и плазмената концентрация на C4 (Spearman, $r=0,03$; $p=0,307$, Фигура 5.2.20 A1), като е налице статистически значима слаба позитивна корелация между нивата на anti-C1r и концентрацията на C3 (Spearman, $r=0,10$; $p=0,048$, Фигура 5.2.20 B1). При изследване на аналогичните зависимости сред пациентите с ЛН с екстраренални прояви на СЛЕ установихме, че липсва статистически значима корелационна зависимост между anti-C1r и концентрацията на C4 (Spearman, $r=-0,05$; $p=0,243$, Фигура 5.2.20 A2) и е налице значима слаба отрицателна корелация между нивата на anti-C1r и концентрацията на C3

(Spearman, $r=-0,13$; $p=0,029$, Фигура 5.2.20 В2). Сред пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ не установихме статистически значими корелационни зависимости между нивата на anti-C1r и плазмените концентрации на C4 и C3 (Фигура 5.2.20 А3 и В3).



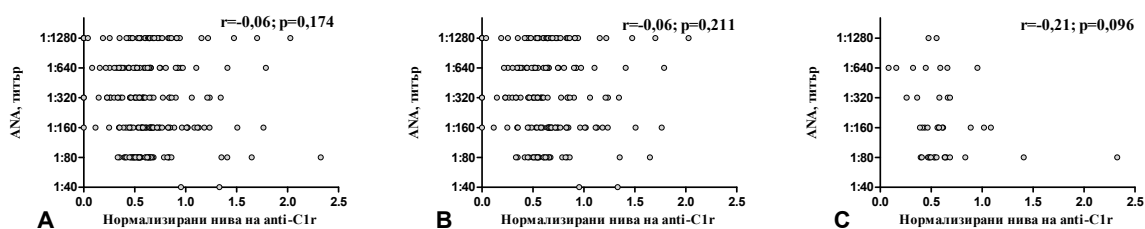
Фигура 5.2.20. Корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C1r, изследвани в динамика във всички проби от пациенти с ЛН и плазмените концентрации на C4 и C3 в тези проби. (A1 и B1) При всички пациенти с ЛН; (A2 и B2) При пациентите с ЛН с екстраренални прояви на СЛЕ; (A3 и B3) При пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ. (Spearman, one-tailed).

5.2.7.2.4. Динамика на автоантителата срещу C1r и антинуклеарните автоантитела (ANA).

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

Проучвайки зависимостите между нивото на anti-C1r и титъра на ANA сред всички пациенти с ЛН, изследвани в динамика (при които са изследвани едновременно anti-C1r и ANA, $N=220$ проби) установихме, че липсва статистически значима корелационна зависимост между нормализираното ниво на anti-C1r и титъра на ANA (Spearman, $r=-0,06$; $p=0,174$, Фигура 5.2.21 А). При изследвания сред групите от

пациентите с ЛН с екстрааренални прояви на СЛЕ и пациенти с ЛН без екстрааренални прояви на СЛЕ също не установихме статистически значими корелационни зависимости (съответно, Spearman, $r=-0,06$; $p=0,211$ и Spearman, $r=-0,21$; $p=0,096$) (Фигура 5.2.21 В и С).

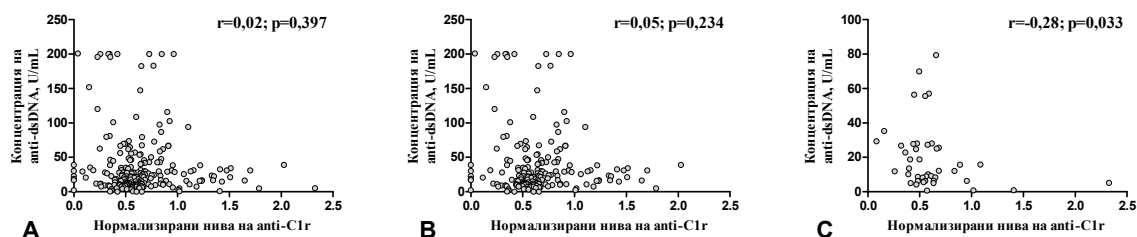


Фигура 5.2.21. Липсват статистически значими корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C1g и титрите на ANA (показани в логаритмичен мащаб по ординатите): **А.** При всички проведени в динамика проби от пациентите с ЛН (Spearman, $r=-0,06$; $p=0,174$); **В.** При пациентите с ЛН и екстрааренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=-0,06$; $p=0,211$); **С.** При пациентите с ЛН без екстрааренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=-0,21$; $p=0,096$).

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

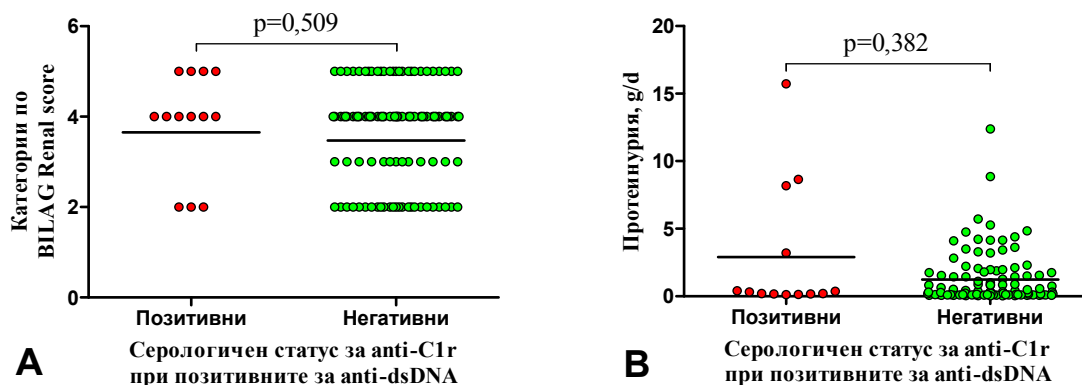
Динамиката на концентрацията на anti-dsDNA (U/mL) за периода на проследяване и лечение на пациентите с ЛН показва средно начално ниво от $32,6 \pm 37,0$ (от 5,6 до 195,8) U/mL и средно ниво в края от $33,2 \pm 43,8$ (от 0,1 до 183, 0) U/mL, като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank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

Проучвайки зависимостите между нивото на anti-C1g и концентрацията на anti-dsDNA (U/mL) сред всички пациенти с ЛН, изследвани в динамика (при които са изследвани едновременно anti-C1g и anti-dsDNA, $N=224$ проби), установихме, че липсва статистически значима корелационна зависимост между нормализираното ниво на anti-C1g и концентрацията на anti-dsDNA (Spearman, $r=0,02$; $p=0,397$, Фигура 5.2.22 А). При пациентите с ЛН с екстрааренални прояви на СЛЕ също не установихме статистически значима корелационна зависимост (Spearman, $r=0,05$; $p=0,234$, Фигура 5.2.22 В). Единствено при пациентите с ЛН без екстрааренални прояви на СЛЕ установихме статистически значима слаба отрицателна корелационна зависимост (Spearman, $r=-0,28$; $p=0,033$, Фигура 5.2.22 С).



Фигура 5.2.22. Липсват статистически значими корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C1r и концентрациите на anti-dsDNA (U/mL) при: **A.** Всички пациентите с ЛН, изследвани в динамика (Spearman, $r=0,02$; $p=0,397$) и **B.** При пациентите с ЛН с екстраренални прояви на СЛЕ, изследвани в динамика (Spearman, $r=0,05$; $p=0,234$). **C.** Статистически значима слаба отрицателна корелационна зависимост при динамично изследваните пациенти с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=-0,28$; $p=0,033$).

При пациентите, изследвани в динамика, позитивни едновременно за anti-dsDNA и anti-C1r, средният ранг (категория на ЛН) на BILAG Renal score е сравнително по-висок от този при пациентите позитивни за anti-dsDNA и негативни за anti-C1r, макар тази разлика да не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,509$) (Фигура 5.2.23 A). При пациентите, изследвани в динамика, позитивни едновременно за anti-dsDNA и anti-C1r, средното ниво на протеинурията ($2,92 \pm 4,91$ g/d) е сравнително, но статистически незначимо по-високо от това при пациентите позитивни за anti-dsDNA и негативни за anti-C1r ($1,23 \pm 1,92$ g/d) (Mann-Whitney, $p=0,382$) (Фигура 5.2.23 B).



Фигура 5.2.23. А. Сравнителен анализ между категориите (ранговете) по BILAG Renal score при пациентите с ЛН, изследвани в динамика, позитивни за anti-dsDNA. При позитивните едновременно за anti-dsDNA и anti-C1r, средната категория на ЛН е сравнително, но статистически незначимо по-висока от тази при пациентите позитивни за anti-dsDNA и негативни за anti-C1r (Mann-Whitney, $p=0,509$). **Б.** Протеинурия при позитивните за anti-dsDNA пациенти с ЛН в зависимост от статуса за anti-C1r (Mann-Whitney, $p=0,382$).

5.2.8. Автоантитела срещу C1r и някои аспекти на лечението при пациентите с ЛН.

При пациентите, изследвани за anti-C1r, включени в проучването ($N=74$), според показанията е провеждано предходно имунопатогенетично лечение с: Кортикостероиди (CS) при 70 (94,6%) за средна продължителност от 47,9 месеца (от 15 дни до 270 месеца); Cyclophosphamide (CYC) при 64 (86,5%) за средна продължителност от 9,0 месеца (от 3 дни до 36 месеца); Azathioprine или Mycophenolate mofetil (AZA/MMF) при 34 (45,9%) за средна продължителност от 16,3 месеца (от 1 до 108 месеца); Cyclosporine A (CyA) при 17 (23,0%) за средна продължителност от 9,1 месеца (от 1 до 51 месеца); Immunovenin intact (IVIg) при 6 (8,1%) със среден брой на приложените курсове 2 (от 1 до 3 курса) и плазмафереза (ПФ) при 22 (32,0%) със среден брой на сеансите 5 (от 1 до 10 сеанса).

При проследените за среден период от 13 месеца (от 6 до 25 месеца) пациенти с ЛН ($N=52$) по време на нашето проучване при 40 (76,9%) пациенти е проведена имунопатогенетична терапия с CS за среден период от 9,0 (от 1 до 24) месеца; при 25 (48,1%) пациенти – с CYC за среден период от 2 месеца (от 3 дни до 8 месеца); при 31 (59,6%) пациенти – с AZA/MMF за среден период от 5,6 (от 1 до 24) месеца; при 3 (5,8%) пациенти – с CyA за среден период от 8,0 (от 3 до 12) месеца; при 2 (3,8%)

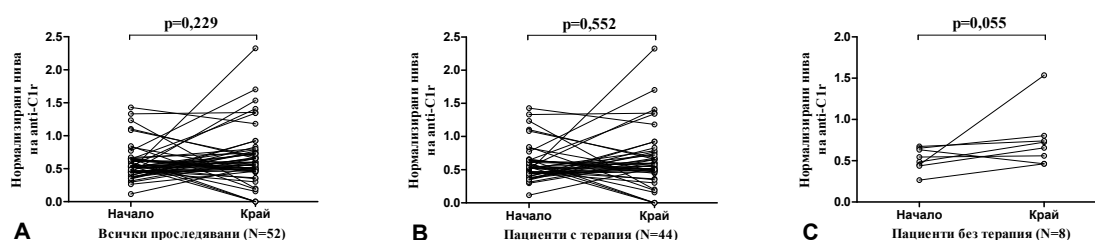
пациенти – с IVIG, като при единият е продан един курс а при вторият пациент – 3 курса и при 7 (13,5%) пациенти – с плазмафереза със среден брой на проведените сеанси 3 (от 2 до 5).

При всички проследявани пациенти в началния момент средното нормализирано ниво на anti-C1r е $0,583 \pm 0,259$ (от 0,116 до 1,429), а в края на периода на проследяване – $0,668 \pm 0,429$ (от 0,000 до 2,325), като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,229$, Фигура 5.2.24 А). При пациентите с проведена имунопатогенетична терапия в рамките на периода на проследяване, средното нормализирано ниво на anti-C1r в началото е $0,595 \pm 0,275$ (от 0,116 до 1,429), а в края – $0,655 \pm 0,445$ (от 0,000 до 2,325), като и в тази група не установихме статистически значима разлика между началното и крайното ниво (Wilcoxon signed rank test, $p=0,229$, Фигура 5.2.24 В). В групата пациенти, при които не е провеждана имунопатогенетична терапия, средното нормализирано ниво на anti-C1r в началото е $0,517 \pm 0,137$ (от 0,264 до 0,672), а в края – $0,743 \pm 0,344$ (от 0,462 до 1,535), без да е налице статистически значима разлика между тези нива (Wilcoxon signed rank test, $p=0,055$, Фигура 5.2.24 С).

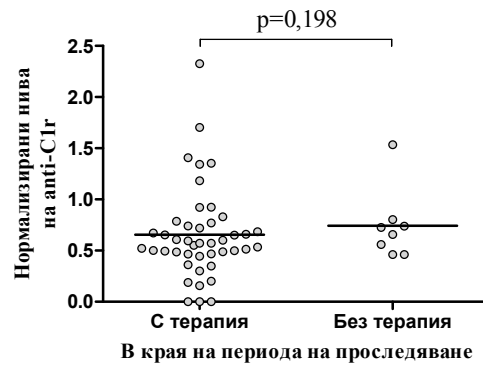
При прилагане на непараметричен сравнителен анализ установихме, че макар и нивото на anti-C1r в края на периода на проследяване да е сравнително по-високо при пациентите, при които не е провеждана имунопатогенетична терапия в сравнение с нивото при пациентите с терапия, тази разлика не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,197$) (Фигура 5.2.25).

С оглед вида на проведеното имунопатогенетично лечение, сред пациентите, при които е провеждано такова, обособихме основно 6 групи: 15 (34,1%) пациенти, при което е провеждано комбинирано лечение с CS+CYC+AZA/MMF; 8 (18,2%) пациенти, при които е провеждано комбинирано лечение с CS+CYC; 12 (27,3%) пациенти, при които е провеждано комбинирано лечение с CS+AZA или CS+MMF; 5 (11,4%) пациенти, при които е провеждана монотерапия с CS; 2 (4,5%) пациенти, при които е провеждано комбинирано лечение с CYC и AZA и 2 (4,5%) пациенти, при които е провеждана монотерапия: с AZA при единия и с MMF при другия. При сравнителен анализ на нивата на anti-C1r в началото и в края на проведеното лечение при различните групи пациенти установихме следното: в групата на терапия с CS+CYC+AZA/MMF средното нормализирано ниво на anti-C1r в началото е $0,572 \pm 0,342$ (от 0,298 до 1,429), а в края – $0,837 \pm 0,140$ (от 0,158 до 2,325), като

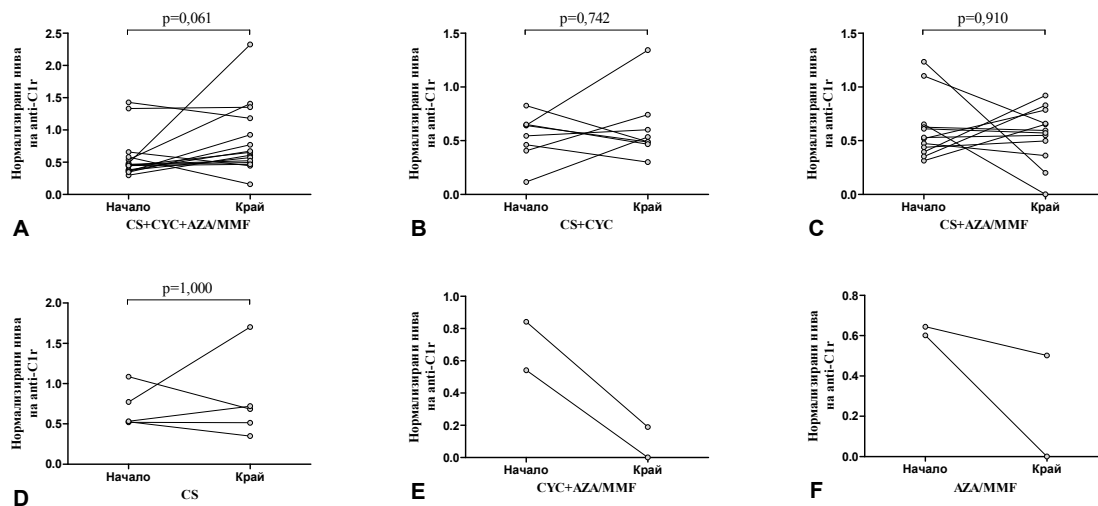
разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,061$, Фигура 5.2.26 А); в групата на лечение с CS+CYC средното ниво в началото е $0,537\pm0,214$ (от 0,116 до 0,827), а в края – $0,621\pm0,318$ (от 0,301 до 1,343), като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,742$, Фигура 5.2.26 В); в групата на лечение с CS+AZA/MMF средното ниво в началото е $0,604\pm0,286$ (от 0,313 до 1,234), а в края – $0,552\pm0,263$ (от 0,000 до 0,921), като в тази група средното ниво на anti-C1g намалява, но разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,910$, Фигура 5.2.26 С); в групата на монотерапия с CS средното ниво в началото е $0,687\pm0,247$ (от 0,520 до 1,085), а в края – $0,794\pm0,529$ (от 0,350 до 1,702), като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=1,000$, Фигура 5.2.26 D); в групите на лечение с CYC+AZA и AZA/MMF попадат по 2 пациенти, като от Фигура 5.2.26 Е и F се вижда намаляване на нивата и при четиримата пациенти, като поради малкия брой на пациентите статистически анализ в тези две групи не е коректен.



Фигура 5.2.24. Крайни и начални нива на anti-C1g при: **А.** Всички проследявани пациенти (N=52); **В.** Пациентите, при които е провеждана имунопатогенетична терапия (N=44) и **С.** Пациентите, при които не е провеждана имунопатогенетична терапия през периода на проследяване (N=8). Налице е сравнително повишаване на средните нива на anti-C1g, без да има статистически значими разлики между началните и крайните средни нива при трите групи пациенти (Wilcoxon signed rank test).



Фигура 5.2.25. Средни нормализирани нива на anti-C1g в края на периода на проследяване при пациентите с ЛН с имунопатогенетична терапия и без такава. Липсва статистически значима разлика между тези нива (Mann-Whitney, $p=0,197$).



Фигура 5.2.26. Нормализирани нива на anti-C1g в началото и в края на период на проследяване при пациенти, при които е провеждана терапия с: **A.** CS+CYC+AZA/MMF – средното ниво на anti-C1g се повишава в края, но разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,061$); **B.** CS+CYC – средното ниво на anti-C1g се повишава в края, но разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,742$); **C.** CS+AZA/MMF – средното ниво на anti-C1g намалява в края, но разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,910$); **D.** CS – средното ниво на anti-C1g се повишава в края, но разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=1,000$). **E.** CYC+AZA – двама пациенти, при които нивата на anti-C1g намаляват в края; **F.** MMF при един пациент и AZA при един пациент, като нивата на anti-C1g намаляват в края.

ИЗВОДИ:

1. При изследваната група пациенти с ЛН установихме патологично повишени anti-C1r в сравнително малък процент (9,5%), като при проследяване в динамика anti-C1r се позитивират в около 45,2% от пациентите – резултат, който би следвало да бъде потвърден в по-големи кохортни проучвания и вероятно определя anti-C1r като динамична популация от автоантитела.

2. Не установихме връзка на anti-C1r с: пола на пациентите, възрастта на пациентите, давността на ЛН.

3. Не установихме съществени връзки между anti-C1r и лабораторни маркери за оценка активността на ЛН като протеинурията, уринния седимент, eGFR.

4. Не установихме съществени връзки между anti-C1r и имунологичните маркери за активност, каквито са C3, C4, anti-dsDNA.

5. Не установихме съществени връзки между anti-C1r и хистологичните характеристики на ЛН.

6. Не установихме съществени връзки между anti-C1r и комплексната оценка на активността на ЛН.

7. Не установихме съществени динамични зависимости между anti-C1r и маркерите за лабораторна и имунологична оценка на ЛН, което прави anti-C1r ненадежден маркер за проследяване на ЛН.

8. Установихме известно предиктивно значение на anti-C1r като маркер за последващо активиране на ЛН (повишаване на категорията на активност на ЛН по BILAG Renal score), но предвид факта, че тази роля на anti-C1r не се потвърди при използване за оценка на активността критериите за пълна ремисия, частична ремисия и активна ЛН, предиктивната роля на anti-C1r подлежи на допълнителни изследвания в по-големи кохортни проучвания.

9. Не установихме съществено повлияване на нивата на anti-C1r в хода на имунопатогенетичната терапия при изследваните пациенти.

10. На този етап anti-C1g не би могло да бъде използвано като надежден маркер за диагностична оценка на активността на ЛН, като динамичен маркер за проследяване на ЛН, както и като предиктор за тласък на ЛН.

5.3. АВТОАНТИТЕЛА СРЕЩУ C1s КОМПОНЕНТА НА КОМПЛЕМЕНТА.

Автоантитела срещу C1s (anti-C1s) са изследвани при 74 (76,3% от първоначално включените в проучването) пациенти, като в динамика са изследвани общо 266 проби на пациентите с ЛН. Anti-C1s са изследвани и при 60 (83,3% от изходните 72) здрави доброволци (контроли), без автоимунни и инфекциозни възпалителни заболявания, със запазена бъбречна, чернодробна и хемопоетична функции. При изследваните за anti-C1s в контролната група здрави доброволци се установиха плазмени нива на anti-C1s $0,091 \pm 0,069$ единици оптична плътност при дължина на вълната от 450 nm (OD 450 nm) на оптичния анализатор (Фигура 5.3.1).



Фигура 5.3.1. Нива на anti-C1s при изследваните здрави контроли (показана е средната със стандартното отклонение).

По аналогичен начин с anti-C1q, определихме граничната стойност (cut-off), над която нивата на anti-C1s при изследваните пациенти с ЛН приехме за патологично повишени, а именно:

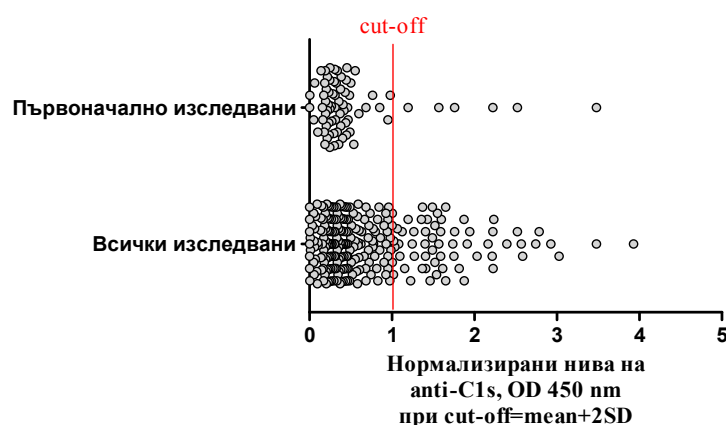
$$\text{Cut-off} = \text{mean (средна за контролната група здрави донори)} + 2 \times \text{SD}$$

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

При изследваните пациенти с ЛН определихме средно ниво на anti-C1s, съответно на $0,163 \pm 0,156$ OD 450 nm при cut-off от 0,229 OD 450 nm (изследванията са проведени в Катедра „Биохимия, молекулна медицина и нутригеномика” на МУ-Варна и в Националната референтна лаборатория за изследване на белтъците от системата на комплемента, при Европейската болница “Georges Pompidou”, Париж с еднакви гранични стойности). Изследванията в различните лаборатории са провеждани

съгласно унифицирана методика. С оглед на изследванията в две различни лаборатории проведохме нормализиране на стойностите на нивата на anti-C1s в групите пациенти с ЛН, представяйки нормализираните нива на anti-C1s като съотношение на получените стойности за оптичната плътност към нивото на cut-off за лабораторията (Фигура 5.3.2). По този начин, за гранична стойност се приема 1,00, над която нормализираните нива на anti-C1s се приемат за повишени, а под която – за референтни. Не се установи статистически значима разлика (Mann-Whitney, $p=0,500$) между нивата на anti-C1s в контролната група здрави доброволци и тези при пациентите с ЛН.

Установихме патологично повишени титри на anti-C1s при 6 (8,1%) от изходно изследваните пациенти с ЛН. Сред изследваните общо 266 проби от кръвни плазми на пациентите с ЛН в динамика установихме патологично повишени нива на anti-C1s при 63 (23,7%) от пробите (Фигура 5.3.2).



Фигура 5.3.2. Разпределение на нивата на anti-C1s при изходната група първоначално изследвани пациентите с ЛН и при всички изследвани в динамика проби от пациенти, след хомогенизиране на кохортата. Граничната стойност (cut-off) е представена като 1,00, над която нивата на anti-C1s се приемат за патологично повишени.

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

При мъжете с ЛН (структурата по пол на изследваните пациенти е описана в „5.2.1 Автоантитела срещу C1r и пола на пациентите“) се установиха патологично повишени нива на anti-C1s при 1 (6,7%), докато при жените с ЛН – при 5 (8,5%), както е показано на Таблица 5.3.1. Не се установи статистически значимо влияние на пола на

пациентите с ЛН върху наличието на патологично повишени нива на anti-C1s (Fisher's exact test, $p=0,649$).

Таблица 5.3.1. Разпределение на патологично повишените нива на anti-C1s според пола на пациентите с ЛН.

Пациенти	Патологично повишени anti-C1s	Референтни anti-C1s	Общо
Мъже	1	14	15
Жени	5	54	59
Общо	6	68	74

При анализ на нормализираните нива на anti-C1s се установи, че при мъжете с ЛН средното ниво на anti-C1s е $0,365 \pm 0,410$, а при жените с ЛН – $0,512 \pm 0,600$. Не се установи статистически значима разлика в нивата на anti-C1s при двата пола на пациентите с ЛН (Mann-Whitney, $p=0,113$).

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

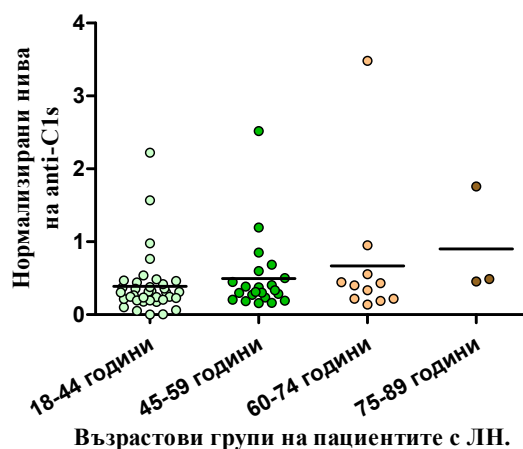
Структурата по възраст на групата изследвани за anti-C1s пациенти с ЛН е описана в „5.2.2. Автоантитела срещу C1r и възрастта на пациентите с ЛН.”

Средната възраст на изследваната група пациенти с ЛН е 45,36 години. При анализ на нормализираните нива на anti-C1s установихме, че при пациентите на възраст $\leq 45,3$ години средното нормализирано ниво на anti-C1s е $0,385 \pm 0,400$, а при пациентите на възраст над 45,3 години това ниво е $0,603 \pm 0,712$. Не се установи статистически значима разлика в нормализираните нива на anti-C1s при двете групи пациенти (Mann-Whitney, $p=0,073$).

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

Във възрастовите групи по СЗО, средните нормализирани нива на anti-C1s са както следва: в групата от 18 до 44 години: $0,387 \pm 0,413$; в групата от 45 до 59 години: $0,496 \pm 0,516$; в групата от 60 до 74 години: $0,670 \pm 0,959$ и в групата от 75 до 89 години: $0,901 \pm 0,744$. Данните за възрастовото разпределение на пациентите с ЛН и

нормализираните нива на anti-C1s са представени на Фигура 5.3.3.



Фигура 5.3.3. Средни нива на anti-C1s в различните възрастови групи по СЗО при пациентите с ЛН.

Въпреки постепенното нарастване на средните нормализирани нива на anti-C1s с възрастта (Фигура 5.3.3), не установихме статистически значима зависимост на влиянието на възрастта като фактор върху нивата на anti-C1s (One-way ANOVA, $p=0,273$; Post test for linear trend, $p=0,102$). Не се установи статистически значима разлика в нормализираните нива на anti-C1s между различните възрастови групи пациенти с ЛН (Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$ между всички групи).

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

5.3.3. Автоантитела срещу C1s и давността на ЛН.

Средната давност на ЛН при изследваната група пациенти е 10,3 години. При съпоставяне на нормализираните нива на anti-C1s при пациенти с давност на ЛН по-малка от 10,3 години ($0,431\pm0,389$) и тези при пациентите с давност на ЛН над 10,3 години ($0,545\pm0,733$) не установихме статистически значима разлика (Mann-Whitney, $p=0,617$).

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

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

Изследвахме връзките на нивата на anti-C1s с някои основни клиничко-лабораторни параметри на ЛН, каквито са: протеинурията, уринния седимент, бъбречната функция, клиничко-лабораторната активност на ЛН, както и с комплексната оценка на активността на ЛН по BILAG Renal Score (категорията по BILAG Renal score). Изследвахме и връзката на anti-C1s с наличието или липсата на извънбъбречни прояви на СЛЕ, като при пациентите с ЛН и екстраренални прояви на СЛЕ (60 (81,1%) пациенти) средното нормализирано ниво на anti-C1s е $0,466\pm0,596$, а при пациентите с ЛН без засягане на други органи и системи е $0,552\pm0,437$ и тази разлика не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,140$). Пациентите, позитивни за anti-C1s с екстраренални прояви на СЛЕ са 5 (83,3%) от позитивните, а пациентите, негативни за anti-C1s без екстраренални прояви са 13 (19,1%) от негативните. На базата на това разпределение установихме липса на статистически значимо влияние на позитивния серологичен статус за anti-C1s върху екстрареналните прояви на СЛЕ (Fisher's exact test, $p=0,683$).

5.3.4.1. Автоантитела срещу C1s и протеинурия.

Сред изследваните пациенти в нашето проучване, патологично ниво на протеинурия се установи при 49 (66,2%), а протеинурия под 0,15 g/d (референтна по степен протеинурия) – при 25 (33,8%) пациенти. Сред всички изследвани уринни проби (общо 266) на пациентите с ЛН, при които са изследвани anti-C1s, в динамика за периода на проучването, патологична протеинурия бе установена при 174 (65,4%) от пробите. При пациентите с повишени нива на anti-C1s (6 пациенти) се установи протеинурия от 0,15 g/d и по-висока при 4 (66,7%) пациенти и по-ниска от 0,15 g/d – при 2 (33,3%) от тях. При пациентите с референтни нива на anti-C1s (68 пациенти), протеинурия $\geq 0,15$ g/d се установи при 45 (66,2%) пациенти, а протеинурия $< 0,15$ g/d се установи при 23 (33,8%) пациенти. Въз основа на това разпределение установихме, че

при изходно изследваните в нашето проучване пациенти с ЛН не се установи статистически значимо влияние на нивата на anti-C1s върху протеинурията (Fisher's exact test, $p=0,676$).

При изследване на зависимостта на протеинурията (g/d) от нормализираните нива на anti-C1s при проучваните пациенти с ЛН, не установихме статистически значима корелационна зависимост (Spearman, $r=0,07$, $p=0,280$).

При пациентите, позитивни за anti-C1s, средното ниво на протеинурията е $3,09\pm 6,25$ (от 0,02 до 15,72) g/d, докато при пациентите, негативни за anti-C1s – $1,57\pm 2,53$ (от 0,02 до 14,67) g/d. Въпреки че при позитивните за anti-C1s пациенти нивото на протеинурията е по-високо от това при пациентите, негативни за anti-C1s, тази разлика не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,600$). Сред всички изследвани в динамика кръвни и уринни проби, средното ниво на протеинурията при пробите, позитивни за anti-C1s, е $1,42\pm 2,71$ (от 0,01 до 15,72) g/d, а това при негативните за anti-C1s – $1,28\pm 2,13$ (от 0,01 до 14,67) g/d, като и тук разликата не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,517$).

При пациентите с патологична протеинурия средното нормализирано ниво на anti-C1s е $0,496\pm 0,595$ (от 0,061 до 3,480), а при тези с референтна по степен протеинурия – $0,455\pm 0,519$ (от 0,000 до 2,520), като тази разлика не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,545$).

5.3.4.2. Автоантитела срещу C1s и уринен седимент.

Сред първоначално включените в проучването пациенти, патологично активен уринен седимент се установи при 37 (50,0%) пациенти. При проследяване в динамика, патологично активен уринен седимент е установен при общо 128 (48,1%) от всички обработени уринни проби.

Сред пациентите с ЛН, първоначално включени в проучването с повишени нива на anti-C1s, патологично активен уринен седимент се установи при 3 (50,0%) пациенти, като при 3 (50,0%) пациенти не се установи патологична находка в уринния седимент. Сред пациентите с ЛН с референтни нива на anti-C1s, патологично активен уринен седимент се установи при 34 (50,0%) пациенти, като при 34 (50,0%) пациенти не се

установи патологична находка в уринния седимент. Това разпределение показва липса на влияние на патологично повишените нива на anti-C1s върху наличието на патологично активен уринен седимент (Fisher's exact test, $p=1,000$).

Сред изследваните в динамика лабораторни проби от пациенти с ЛН, които са позитивни за anti-C1s, патологично активен уринен седимент се установи при 37 (58,7%) от пробите, докато пробите, негативни за anti-C1s, без активен седимент са 112 (55,2%). Това разпределение също показва, че липсва статистически значимо влияние на позитивния серологичен статус за anti-C1s върху наличието на патологично активен уринен седимент (Fisher's exact test, $p=0,061$).

При пациентите с патологично активен уринен седимент, средното нормализирано ниво на anti-C1s е $0,508 \pm 0,643$ (от 0,052 до 3,480), докато при тези без патологично активен седимент това ниво е сравнително по-ниско – $0,456 \pm 0,487$ (от 0,000 до 2,520), като разликата в нивата на anti-C1s не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,677$). При пробите от пациенти с ЛН, изследвани в динамика, които са с патологично активен уринен седимент, се установи средно нормализирано ниво на anti-C1s $0,792 \pm 0,765$ (от 0,000 до 3,903), а при пробите без активен уринен седимент това ниво е сравнително по-ниско: $0,637 \pm 0,587$ (от 0,000 до 3,026), като разликата не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,214$).

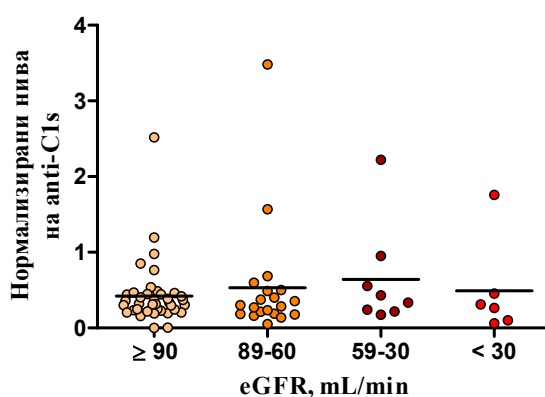
5.3.4.3. Автоантитела срещу C1s и бъбречна функция.

Разпределението на пациентите с ЛН в групи според eGFR, при които са изследвани anti-C1s, е описано в „5.2.4.3. Автоантитела срещу C1g и бъбречна функция.”.

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

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

В групата от пациенти с $eGFR \geq 90$ mL/min с позитивни anti-C1s са 2 (5,0%) пациенти, а средното нормализирано ниво на anti-C1s е $0,423 \pm 0,413$ (от 0,000 до 2,520); в групата пациенти с $eGFR$ от 89 до 60 mL/min с позитивни anti-C1s са 2 (10,0%) пациенти, а средното нормализирано ниво на anti-C1s е $0,533 \pm 0,765$ (от 0,052 до 3,480); в групата пациенти с $eGFR$ от 59 до 30 mL/min с позитивни anti-C1s е 1 (12,5%) пациент, а средното нормализирано ниво на anti-C1s е $0,641 \pm 0,687$ (от 0,175 до 2,223) и в групата пациенти с $eGFR$ под 30 mL/min с позитивни anti-C1s е 1 (16,7%) пациент, а средното нормализирано ниво на anti-C1s е $0,492 \pm 0,638$ (от 0,061 до 1,760) (с $eGFR < 15$ mL/min са само 2 пациенти, поради което, с оглед коректността на статистическия анализ обединихме групите с $eGFR$ 29-15 и < 15 mL/min в обща група). Не установихме статистически значима разлика между нивата на anti-C1s при отделните групи от пациенти с ЛН, обособени въз основа на $eGFR$, като липсва статистически значима зависимост между тези нива и поредността на отделните групи (One-way ANOVA, $p=0,755$; Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$; Post test for linear trend, $p=0,693$) (Фигура 5.3.4). Тази тенденция се потвърди и при изследването на всички проби, проведени в динамика, разпределени в групите според $eGFR$ (One-way ANOVA, $p=0,945$; Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$; Post test for linear trend, $p=0,993$).



Фигура 5.3.4. Средни нива на anti-C1s в обособените според $eGFR$ групи от пациенти с ЛН, първоначално изследвани в проучването.

При пациентите, позитивни за anti-C1s, средната $eGFR$ е $70,2 \pm 35,7$ mL/min,

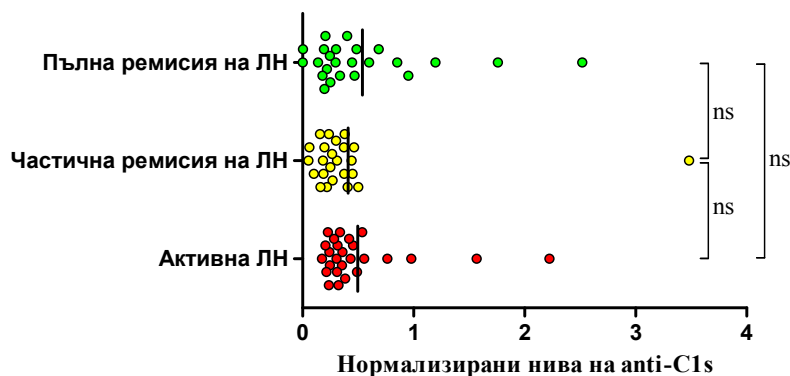
сравнително по-ниска от средната eGFR при негативните за anti-C1s пациенти – $88,1 \pm 33,0$ mL/min, като разликата между двете не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,243$).

Пациентите с ЛН, позитивни за anti-C1s, при които установихме $eGFR < 60$ mL/min са 2 (33,3%) от позитивните, а пациентите, негативни за anti-C1s, при които установихме $eGFR \geq 60$ mL/min са 56 (82,4%) от негативните за anti-C1s. Въз основа на това разпределение установихме, че липсва статистически значимо влияние на позитивния серологичен статус за anti-C1s върху наличието на декомпенсирана бъбречна функция при изследваната група пациенти с ЛН (Fisher's exact test, $p=0,317$).

5.3.4.4. Автоантитела срещу C1s и комплексната клинично-лабораторна оценка на активността на ЛН.

Разпределението на изследваните за anti-C1s пациенти въз основа на клинично-лабораторната активност на ЛН е описано в „5.2.4.4. Автоантитела срещу C1r и комплексната клинично-лабораторна оценка на активността на ЛН.”.

В групата с активна ЛН 2 (7,7%) пациенти са позитивни за anti-C1s, в групата с частична ремисия на ЛН позитивен за anti-C1s е 1 (4,2%) пациент и в групата с пълна клинично-лабораторна ремисия на ЛН позитивни за anti-C1s са 3 (12,5%) пациенти. Средните нормализирани нива на anti-C1s в трите групи пациенти с ЛН са както следва: в групата с активна ЛН – $0,497 \pm 0,458$ (от 0,175 до 2,223); в групата с частична ремисия на ЛН – $0,409 \pm 0,667$ (от 0,052 до 3,480); в групата с пълна клинично-лабораторна ремисия на ЛН – $0,539 \pm 0,583$ (от 0,000 до 2,520), както е показано на Фигура 5.3.5.



Фигура 5.3.5. Разпределение на пациентите с ЛН в зависимост от комплексната клинично-лабораторна оценка на активността на ЛН и нормализираните нива на anti-C1s. Представени са средните нормализирани нива на anti-C1s в трите групи.

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

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

При анализ на всички изследвани 266 проби, установихме, че от всички позитивни за anti-C1s, 19 (30,2%) от пробите са при пациенти в състояние на активна ЛН, 25 (39,6%) от пробите са при пациенти с частична клинично-лабораторна ремисия на ЛН и 19 (30,2%) от пробите са при пациенти в състояние на пълна клинично-лабораторна ремисия. Сред пробите с референтни нива на anti-C1s: 63 (31,0%) от пробите са при пациенти с активна ЛН, 67 (33,0%) от пробите са при пациенти с

частична ремисия на ЛН и 73 (36,0%) от пробите са при пациенти с пълна ремисия на ЛН. При отчитане на липсата на клинично-лабораторна активност на ЛН (имайки предвид само състоянията на пълна клинично-лабораторна ремисия на ЛН) и наличието на активност на ЛН (обединявайки групите с активна ЛН и частична ремисия на ЛН), установихме, че няма статистически значимо влияние на наличието на позитивни anti-C1s върху наличието на активност на ЛН (Fisher's exact test, $p=0,450$).

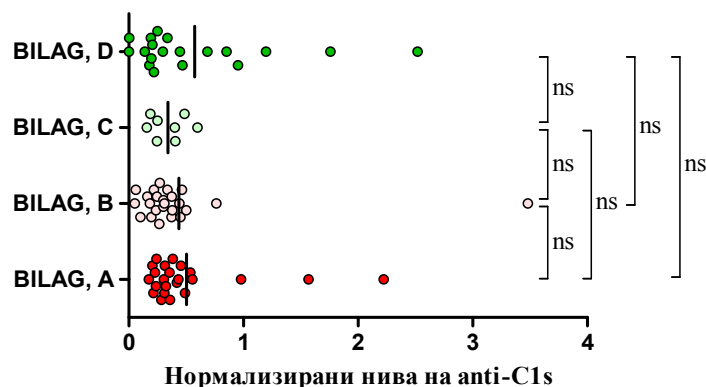
При пациентите с продължителност на пълната клинично-лабораторна ремисия на ЛН ≥ 12 месеца се отчете средно нормализирано ниво на anti-C1s от $0,611 \pm 0,700$, а нивото на anti-C1s при продължителност на пълната клинично-лабораторна ремисия под 12 месеца е $0,391 \pm 0,184$, като тази разлика не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,878$).

Независимо от състоянието на пациентите с ЛН към началния момент на включване в проучването, при съпоставяне на средните нормализирани нива на anti-C1s при тези с епизоди на ремисия в миналото ($0,545 \pm 0,673$) с нивата при пациентите без ремисия в миналото ($0,417 \pm 0,411$) също не се установи статистически значима разлика (Mann-Whitney, $p=0,662$).

5.3.4.5. Автоантитела срещу C1s и комплексната оценка на ЛН (категориите) по BILAG Renal score.

Разпределението на пациентите с ЛН, изследвани за anti-C1s, според категориите на ЛН по BILAG Renal score е описано в „5.2.4.5. Автоантитела срещу C1r и комплексната оценка на ЛН (категориите) по BILAG Renal score.”

При пациентите с ЛН от категория А по BILAG Renal score позитивните за anti-C1s са 3 (8,7%); при пациентите от категория В позитивен за anti-C1s е 1 (4,2%); при пациентите от категория С няма позитивни за anti-C1s и при пациентите от категория D позитивни за anti-C1s са 3 (15,8%). Средните нормализирани нива на anti-C1s при пациентите с различни категории по BILAG Renal score на ЛН са както следва: при категория А: $0,504 \pm 0,481$ (от 0,175 до 2,223); при категория В: $0,436 \pm 0,667$ (от 0,052 до 3,480); при категория С: $0,341 \pm 0,156$ (от 0,157 до 0,598) и при категория D: $0,573 \pm 0,651$ (от 0,000 до 2,520), както е показано на Фигура 5.3.6.



Фигура 5.3.6. Разпределение на пациентите с ЛН в зависимост от комплексната клинично-лабораторна оценка активността на ЛН по BILAG Renal score и нормализираните нива на anti-C1s. Представени са средните нормализирани нива на anti-C1s в отделните категории.

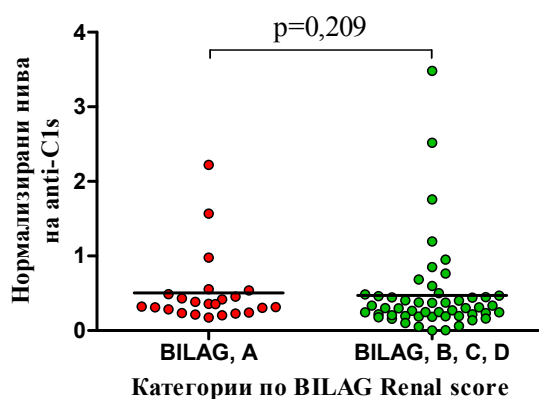
Въпреки известното намаляване на средните нормализирани нива на anti-C1s с намаляване на активността на ЛН по BILAG Renal score, не установихме статистически значима разлика между нивата на anti-C1s при отделните групи от пациенти с ЛН, като също така липсва и статистически значима зависимост между тези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

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

Сред всички изследвани в динамика проби от пациентите с ЛН, които са позитивни за anti-C1s (63 проби), пробите на пациенти от категория А по BILAG Renal score са 15 (23,8%), пробите на пациенти от категория В са 25 (39,7%), пробите на пациенти от категория С са 7 (11,1%), пробите на пациенти от категория D са 16 (25,4%). Сред негативните за anti-C1s, пробите на пациенти от категория А по BILAG Renal score са 37 (18,2%), пробите на пациенти от категория В са 77 (37,9%), пробите на

пациенти от категория С са 26 (12,8%), пробите на пациенти от категория D са 63 (31,0%). Отново не установихме статистически значимо влияние на наличието на позитивния за anti-C1s серологичен статус върху наличието на активна ЛН от категория А по BILAG Renal score (Fisher's exact test, $p=0,364$).

Средното нормализирано ниво на anti-C1s при пациентите от категория А по BILAG Renal score е $0,504 \pm 0,481$ (от 0,175 до 2,223), а средното нормализирано ниво на anti-C1s при всички останали пациенти с ЛН (от категории В, С и D) е $0,472 \pm 0,607$ (от 0,000 до 3,480). Сравнявайки нивата на anti-C1s от групата пациенти от категория А с нивата при останалите пациенти с ЛН (Фигура 5.3.7) установихме, че средното нормализирано ниво на anti-C1s при пациентите от категория А е сравнително по-високо от средното нормализирано ниво на anti-C1s при пациентите от останалите категории по BILAG Renal score, но тази разлика не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,209$).



Фигура 5.3.7. Нормализирани нива на anti-C1s при пациенти с ЛН с категория А по BILAG Renal score и при пациенти от останалите категории по BILAG Renal score. Налице е сравнително по-високо средно ниво на anti-C1s при пациентите с категория А, но неразличаващо се статистически значимо от нивото при пациентите с останалите категории (Mann-Whitney, $p=0,209$).

При изследване на зависимостта между нормализираните нива на anti-C1s и категорията по BILAG Renal score (след квантифициране на категориите: категория А – 5; категория В – 4; категория С – 3; категория D – 2 и категория Е – 1 (в последната категория Е липсват пациенти) установихме липса на значима корелационна

зависимост между нивата на anti-C1s и категорията по BILAG Renal score (Spearman, $r=0,09$; $p=0,217$).

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

С оглед диагностиката и оценката на имунологичната активност на ЛН при изследваните пациенти са определени плазмените нива на C4 компонента на комплемента, C3 компонента на комплемента, титрите на антинуклеарните антитела (ANA) и нивата на антителата срещу двойноверижна ДНК (anti-dsDNA).

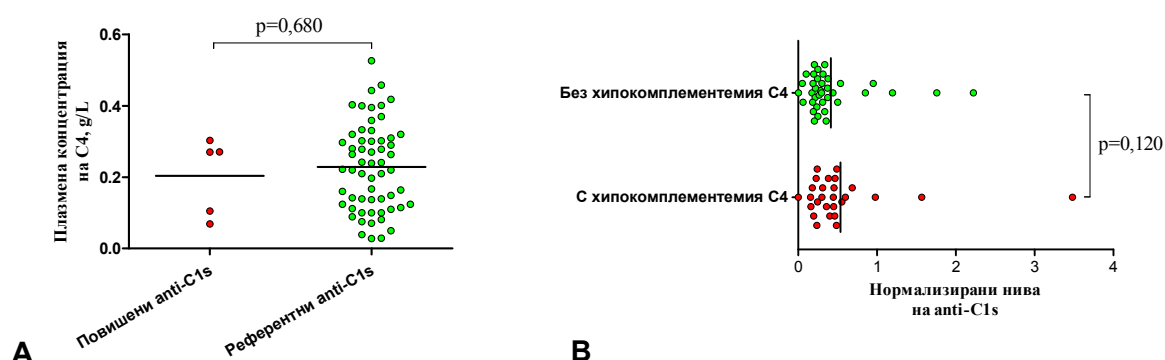
5.3.5.1. Автоантитела срещу C1s и нива на комплемента C4 и C3.

Сред пациентите с ЛН, включени в проучването ($N=74$), плазмените концентрации на C4 са изследвани при 64 (86,5%) пациенти, а плазмените концентрации на C3 – при 69 (93,2%) пациенти. Едновременно нивата на C4 и C3 са изследвани при 64 (86,5%) от пациентите с ЛН изходно включени в проучването.

Пациентите с ЛН, изследвани за anti-C1s с хипокомплементемия C4 са 27 (42,2%) от всички ($N=64$), при които са изследвани нивата на C4 изходно при включване в проучването, а пациентите с ЛН с хипокомплементемия C3 – 13 (18,8%) от всички ($N=69$), при които са изследвани нивата на C3 изходно при включване в проучването. Пациентите с хипокомплементемия едновременно за C4 и C3 са 12 (18,8%) от тези при които са изследвани едновременно C3 и C4.

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

Средната плазмена концентрация на C4 при пациентите с повишени anti-C1s е $0,204 \pm 0,108$ g/L, която е сравнително по-ниска от тази при пациентите с референтни нива на anti-C1s – $0,228 \pm 0,122$, но разликата не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,680$), както е показано на Фигура 5.3.8 А. Средното нормализирано ниво на anti-C1s при пациентите с хипокомplementемия C4 е $0,538 \pm 0,661$, което е сравнително по-високо от средното нормализирано ниво на anti-C1s при пациентите без хипокомplementемия C4 – $0,415 \pm 0,452$ (Mann-Whitney, $p=0,120$), както е показано на Фигура 5.3.8 В.

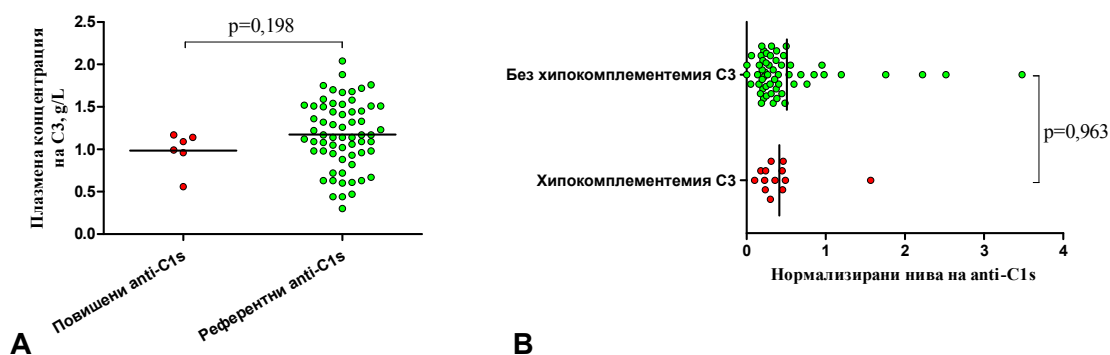


Фигура 5.3.8. А. Плазмени концентрации на C4 при пациентите с ЛН в зависимост от серологичния статус по отношение на anti-C1s. В. Нормализирани плазмени нива на anti-C1s при пациенти с ЛН в зависимост от наличието на хипокомplementемия C4.

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

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

Средната плазмената концентрация на C3 при пациентите с повишени anti-C1s е $0,985 \pm 0,224$ g/L, която е сравнително по-ниска от тази при пациентите с референтни нива на anti-C1s – $1,151 \pm 0,381$ g/L, но разликата не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,198$), както е показано на Фигура 5.3.9 А. Средното нормализирано ниво на anti-C1s при пациентите с хипокомplementемия C3 е $0,414 \pm 0,367$, което е сравнително по-ниско, но без да се различава статистически значимо от средното ниво на anti-C1s при пациентите без хипокомplementемия C3 – $0,510 \pm 0,628$ (Mann-Whitney, $p=0,104$), както е показано на Фигура 5.3.9 В.



Фигура 5.3.9. А. Плазмени концентрации на C3 при пациентите с ЛН в зависимост от серологичния статус по отношение на anti-C1s. **В.** Нормализирани плазмени нива на anti-C1s при пациенти с ЛН в зависимост от наличието на хипокомplementемия C3.

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

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

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

Сред всички изследвани в динамика по време на проучването пациенти с ЛН,

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

Средното нормализирано ниво на anti-C1s при изходно изследваните пациенти с ЛН с патологично повишени титри на ANA е $0,541 \pm 0,691$, сравнително по-високо от нивото на anti-C1s при пациентите с референтни титри на ANA, което е $0,488 \pm 0,420$. Не се установи статистически значима разлика между нивата на anti-C1s при пациентите с повишени ANA и тези с референтни титри на ANA (Mann-Whitney, $p=0,727$).

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

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

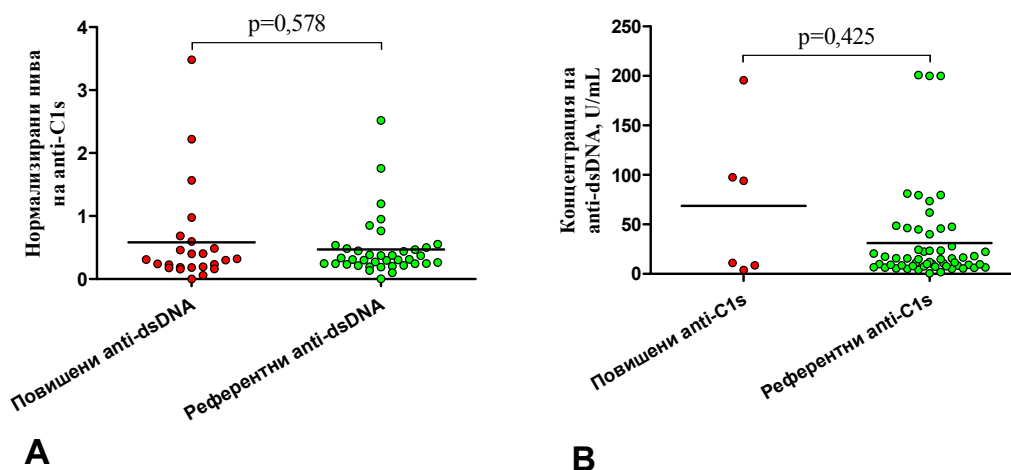
Сред пациентите с ЛН, изходно включени в нашето проучване и изследвани за anti-C1s, anti-dsDNA са изследвани при 62 (83,8%) и в общо 224 (84,2%) от всички в динамика изследвани проби. Патологично повишени нива на anti-dsDNA (≥ 20 U/mL) установихме при 24 (38,7%) от първоначално изследваните за anti-dsDNA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

Пациентите, позитивни за anti-C1s с патологично повишени anti-dsDNA са 3 (50,0% от позитивните за anti-C1s пациенти, при които са изследвани anti-dsDNA), а пациентите, негативни за anti-C1s и позитивни за anti-dsDNA са 21 (37,5% от негативните за anti-C1s, при които са изследвани и anti-dsDNA). Въз основа на това разпределение установихме, че липсва статистически значимо влияние на наличието на

патологично повишени anti-C1s върху наличието на патологично повишени anti-dsDNA (Fisher's exact test, $p=0,669$). При изследване на тази зависимост сред всички изследвани в динамика проби от пациентите с ЛН установихме, че позитивните за anti-C1s с повишени концентрации на anti-dsDNA проби от пациенти са 36 (66,7% от всички случаи, които са позитивни за anti-C1s, при които са изследвани и anti-dsDNA), а негативните за anti-C1s, които са с повишени концентрации на anti-dsDNA са 85 (50,0% от всички негативни за anti-C1s, при които са изследвани anti-dsDNA). Въз основа на това разпределение установихме наличие на статистически значимо повлияване на наличието на позитивни нива на anti-C1s върху наличието на патологично повишени концентрации на anti-dsDNA сред всички, изследвани за anti-C1s и anti-dsDNA проби от пациенти с ЛН в динамика (Fisher's exact test, $p=0,041$).

Средното нормализирано ниво на anti-C1s при изходно изследваните пациенти с ЛН с патологично повишени концентрации на anti-dsDNA е $0,586 \pm 0,794$, докато нивото на anti-C1s при пациентите с референтни концентрации на anti-dsDNA е $0,471 \pm 0,471$. Установихме, че нивото на anti-C1s е сравнително по-високо при пациентите с патологично повишени концентрации на anti-dsDNA, но разликата в нивата на anti-C1s в двете групи не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,578$) (Фигура 5.3.10 А). При пациентите с повишени anti-C1s средната концентрация на anti-dsDNA е $68,55 \pm 75,82$ U/mL, сравнително по-висока от средната концентрация на anti-dsDNA при пациентите с референтни нива на anti-C1s, която е $31,24 \pm 45,64$ U/mL, но статистически значима разлика между тези концентрации не се установи (Mann-Whitney, $p=0,425$) (Фигура 5.3.10 В).

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



Фигура 5.3.10. А. Нормализирани нива на anti-C1s при пациенти с повишени и при такива с референтни концентрации на на anti-dsDNA. **В.** Концентрации на anti-dsDNA при пациенти с патологично повишени и с референтни anti-C1s.

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

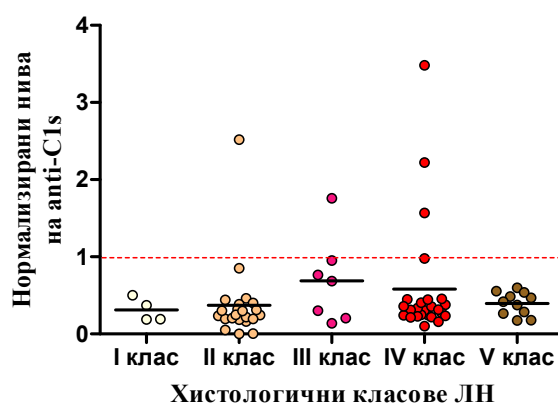
Пациентите с ЛН, са диагностицирани с провеждане на пункционна бъбречна биопсия, като хистологична диагноза е налична при 71 (95,9%) от включените в проучването пациенти, при които са изследвани anti-C1s. Разпределението на пациентите въз основа на хистологичния клас на ЛН е показано в „5.2.6. Автоантитела срещу C1r и някои хистологични признаци на ЛН.” И тук, с оглед клинична достоверност на изследваните зависимости, когато са изследвани връзки, касаещи белези на хистологична активност на ЛН, при статистическите анализи са отчитани само случаите, при които времето между вземането на кръвните проби за изследване на anti-C1s и провеждането на пункционната бъбречна биопсия е било до 12 месеца. Това условие е изпълнено при 27 (38,0%) от пациентите, включени в проучването.

5.3.6.1. Автоантитела срещу C1s и хистологичният клас на ЛН.

При пациентите с I, V и VI хистологични класове ЛН не се установиха патологично повишени anti-C1s (Фигура 5.3.11). При тези с II хистологичен клас позитивен за anti-C1s е 1 (4,3%) пациент; при пациентите с III хистологичен клас – 1 (14,3%); при пациентите с IV клас – 3 (12,3%). Пациентът с VI хистологичен клас на ЛН е с референтно ниво на anti-C1s, а при 1 пациент с патологично повишено ниво на anti-

C1s не е провеждано хистологично уточняване. Средните нормализираните нива на anti-C1s са съответно: при пациентите с I хистологичен клас: $0,313 \pm 0,152$; при пациентите с II хистологичен клас: $0,373 \pm 0,500$; при пациентите с III хистологичен клас: $0,687 \pm 0,564$; при пациентите с IV хистологичен клас: $0,581 \pm 0,766$; при пациентите с V хистологичен клас: $0,395 \pm 0,150$ и нормализираното ниво при пациента с VI хистологичен клас е 0,061.

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



Фигура 5.3.11. Нива на anti-C1s в зависимост от хистологичния клас на ЛН. Не се установиха статистически значима зависимост между нивата на anti-C1s и класа ЛН, както и разлика между нивата на anti-C1s при различните класове ЛН (One-way ANOVA, $p=0,560$; Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$; Post test for linear trend, $p=0,597$).

Сред пациентите, позитивни за anti-C1s, такива с IV клас ЛН са 3 (60,0% от позитивните за anti-C1s с хистологична диагноза (5 пациенти)). При пациентите, негативни за anti-C1s, такива с IV клас ЛН са 22 (33,3% от негативните за anti-C1s с хистологична диагноза (66 пациенти)). При изследване връзката между наличието на патологично повишени anti-C1s и наличието на ЛН от IV хистологичен клас

установихме, че патологично повишените нива на anti-C1s не определят статистически значимо наличие на дифузна ЛН (IV хистологичен клас) (Fisher's exact test, $p=0,337$).

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

В настоящото проучване изследвахме зависимостите между нивата на anti-C1s и хистологични белези на активност (ендокапилярна пролиферация, гломерулна левкоцитна инфилтрация, субендотелни депозити („телени бримки”), фибриноидна некроза и/или кариорексис, клетъчни полулуния и интерстициална инфилтрация) и хистологични белези на хроничност (гломерулна склероза, фиброзни полулуния, тубулна атрофия и интерстициална фиброза), както и връзката между нивата на anti-C1s и хистологичните индекси на активност и хроничност, определени на базата на горепосочените хистологични белези (Вижте “IV. Материали и методи”, Таблица 4.1). В анализите са включени само пациентите с ЛН, при които времето между вземане на пробата за изследване на anti-C1s и провеждане на пункционната бъбречна биопсия е било до 12 месеца (при 27 (38,0%) от хистологично диагностицираните пациенти, изследвани за anti-C1s).

Таблица 5.3.2. Сравнителен анализ между нивата на anti-C1s при наличие и липса на хистологични белези за активност и хроничност при пациентите с ЛН. Представени са средните нива $\pm$ стандартното отклонение (SD).

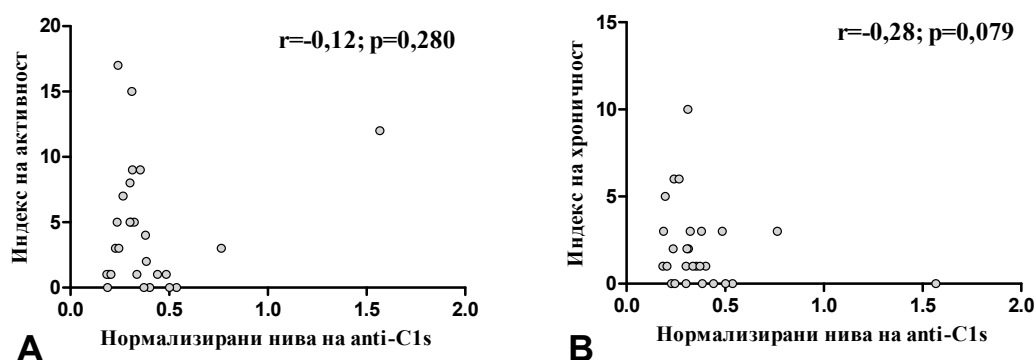
Хистологичен признак	Нормализирани нива на anti-C1s при:		p
	наличие на хистологичния признак	липса на хистологичния признак	
Ендокапилярна пролиферация	0,381 $\pm$ 0,306	0,393 $\pm$ 0,129	0,194
Гломерулна левкоцитна инфилтрация ¹	-	-	-
Субендотелни депозити, формиращи „телени бримки”	0,541 $\pm$ 0,576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

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

На Таблица 5.3.2 са показани данните от сравнителния анализ между нивата на

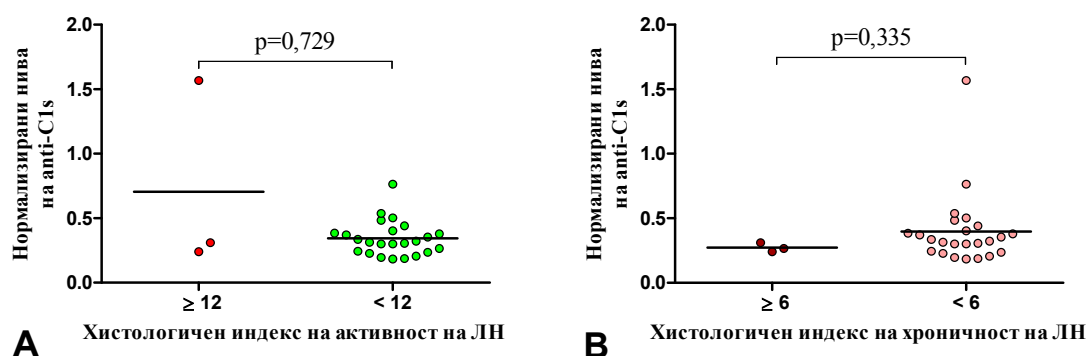
anti-C1s в групите с и без съответните хистологични признаци за активност и хроничност на ЛН. При пациентите с наличие на хистологични признаци на активност, като ендокapилярна пролиферация и интерстициално възпаление, средните нормализирани нива на anti-C1s са по-ниски в сравнение със средните нормализирани нива при пациентите, при които липсват тези хистологични признаци, но няма статистически значима разлика. При пациентите с хистологични признаци като субендотелни депозити, формиращи телени бримки, фибриноидна некроза и клетъчни полулуния, средните нормализирани нива на anti-C1s са по-високи в сравнение с пациентите, при които тези хистологични признаци липсват, но разликите отново не са статистически значими. При пациентите с хистологични белези на хроничност, средните нормализирани нива на anti-C1s са сравнително по-ниски от нивата при липса на хистологични признаци за хроничност, но не се установява статистически значима разлика.

При изследване връзката между нивата на anti-C1s и хистологичния индекс на активност на ЛН не се установи наличие на значима корелационна зависимост (Spearman, $r=-0,12$; $p=0,280$) (Фигура 5.3.12 А). Не се установи и значима корелационна зависимост между нормализираните нива на anti-C1s и хистологичния индекс на хроничност при пациентите с ЛН (Spearman, $r=-0,28$; $p=0,079$) (Фигура 5.3.12 В).



Фигура 5.3.12. А. Корелационен анализ на връзката между нормализираните нива на anti-C1s и хистологичния индекс на активност при пациентите с ЛН. Липсва статистически значима корелационна зависимост (Spearman, $r=-0,12$; $p=0,280$). **В.** Корелационен анализ на връзката между нормализираните нива на anti-C1s и хистологичния индекс на хроничност при пациентите с ЛН. Липсва статистически значима корелационна зависимост (Spearman, $r=-0,28$; $p=0,079$).

Установихме, че средното нормализирано ниво на anti-C1s при пациентите с хистологичен индекс на активност на ЛН ≥ 12 ($0,706 \pm 0,747$), е сравнително по-високо от това при пациентите с хистологичен индекс на активност под 12 ($0,344 \pm 0,134$), но липсва статистически значима разлика между нивата в двете групи пациенти с ЛН (Mann-Whitney, $p=0,729$) (Фигура 5.3.13 А). Аналогично, средното нормализирано ниво на anti-C1s при пациентите с хистологичен индекс на хроничност на ЛН ≥ 6 ($0,272 \pm 0,035$) е сравнително по-ниско от това при пациентите с индекс на хроничност на ЛН < 6 ($0,398 \pm 0,283$), но отново липсва статистически значима разлика между нивата в двете групи пациенти с ЛН (Mann-Whitney, $p=0,335$) (Фигура 5.3.13 В).



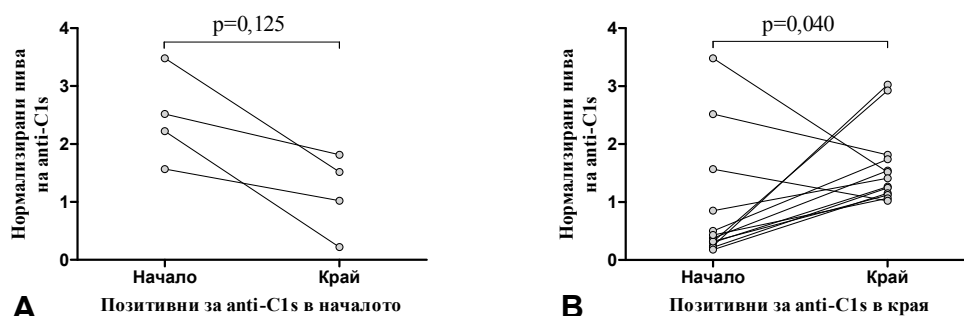
Фигура 5.3.13. Нормализирани нива на anti-C1s при пациенти с ЛН според хистологичните индекси на активност (А) и на хроничност (В).

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

При 52 (70,3%) от пациентите с ЛН, е налице проследяване за период от средно 13,0 (от 6,0 до 25,0) месеца, с между 2 и 11 проби, при които са определяни нивата на anti-C1s и останалите клинично-лабораторни и имунологични параметри на ЛН.

Сред изследваните в динамика общо 266 проби от кръвни плазми на пациентите с ЛН установихме патологично повишени нива на anti-C1s при 63 (23,7%) проби (Фигура 5.3.2). Изследвайки нивата на anti-C1s при проследените в динамика пациенти (с 2 и повече проби в хода на проучването), установихме, че при първите проби, патологично повишени anti-C1s има при 4 (7,7%) от пациентите, докато след среден период на проследяване от 13 месеца, патологично повишени нива на anti-C1s установихме при 13

(25,0%) от пациентите. При 1 от пациентите с първоначално повишени anti-C1s, последните намаляват до референтни стойности, а при 3 от тези пациенти нивата се задържат в патологични граници. От пациентите с патологични anti-C1s на 13 месец от проследяването, при 3 нивата са били патологични от началото, а при 10 нарастват от изходно референтни. Средното нормализирано ниво на anti-C1s при пациентите, позитивни за anti-C1s в началото, е $2,448 \pm 0,795$ (от 1,568 до 3,480), докато след среден период от 13 месеца е $1,145 \pm 0,697$ (от 0,223 до 1,817), като няма статистически значима разлика между тези две нива (Wilcoxon signed rank test, $p=0,125$) (Фигура 5.3.14 А). Средното нормализирано ниво на anti-C1s при позитивните в края на периода на проследяване пациенти с ЛН е $1,604 \pm 0,658$ (от 1,022 до 3,026), статистически значимо по-високо от средното ниво на anti-C1s на същите тези пациенти в началото на проследяването, когато е било $0,870 \pm 1,033$ (от 0,179 до 3,480) (Wilcoxon signed rank test, $p=0,040$) (Фигура 5.3.14 В).



Фигура 5.3.14. Динамика на нивата на anti-C1s при позитивните в началото на периода на проследяване (А) и при позитивните в края на периода на проследяване (В) пациенти с ЛН.

Сред проследяваните с повече от 1 проба пациенти с ЛН, при първото изследване с активна ЛН са били 21 (40,4%), в състояние на частична ремисия на ЛН са били 15 (28,8%) и в състояние на пълна ремисия на ЛН са били 16 (30,8%). В края на проследяването с активна ЛН са били 14 (27,0%), в състояние на частична ремисия на ЛН са били 19 (36,5%) и в състояние на пълна ремисия на ЛН са били 19 (36,5%). При първото изследване, с категория А на ЛН по BILAG Renal score са били 18 (34,6%), с категория В – 18 (34,6%), с категория С – 4 (7,7%) и с категория D – 12 (23,1%). В края, разпределението на пациентите в категории на ЛН по BILAG Renal score е следното: с

категория А – 6 (11,5%), с категория В – 24 (46,2%), с категория С – 5 (9,6%) и с категория D – 17 (32,7%).

5.3.7.1. Прогностично значение на автоантителата срещу C1s.

При 42 (56,8%) от изходно включените в проучването пациенти с ЛН, при които са провеждани 3 или повече проби за anti-C1s в динамика, изследвахме връзките между нивата на anti-C1s и категорията по BILAG Renal score (Фигура 5.3.15) и нивата на anti-C1s и активността на ЛН, определена като активна, частична ремисия и пълна ремисия на нефропатията (Фигура 5.3.16). Патологични нива на anti-C1s поне в една от пробите установихме при 23 (54,8%) от пациентите.

Само при 4 пациенти установихме статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-C1s и категорията по BILAG (JDJ, $r=-0,87$; $p=0,006$; UMK, $r=0,83$; $p=0,021$; VSD, $r=0,61$; $p=0,039$ и VSS, $r=0,65$; $p=0,039$), както и само при 4 – статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-C1s и активността на ЛН (JDJ, $r=-0,76$; $p=0,024$; CVT, $r=-0,55$; $p=0,040$ и UMK, $r=0,83$; $p=0,021$ и VSD, $r=0,61$; $p=0,039$) при прилагане на непараметричен корелационен анализ (Spearman).

Пациентите с ЛН, при които отчетохме в динамика повишение на нивата на anti-C1s до патологични стойности с последващо повишение на категорията по BILAG са 10 (45,5% от всички, при които се установи повишаване на anti-C1s до патологични стойности в динамика). Това повишение на категорията по BILAG Renal score на ЛН се отчете в рамките на среден период от 5,0 (от 0,0 до 18,0) месеца след повишаване на нивата на anti-C1s до патологични стойности. Пациентите, при които не се отчете повишаване на нивата на anti-C1s до патологични стойности и не се отчете повишение на категорията по BILAG Renal score са 19 (95,0% от всички, при които не се отчете повишаване на anti-C1s до патологични нива). Разпределението на пациентите с ЛН според наличието или липсата на повишение на нивата на anti-C1s до патологични стойности и според наличието или липсата на повишение на категорията на ЛН по BILAG Renal score е показано на Таблица 5.3.3.

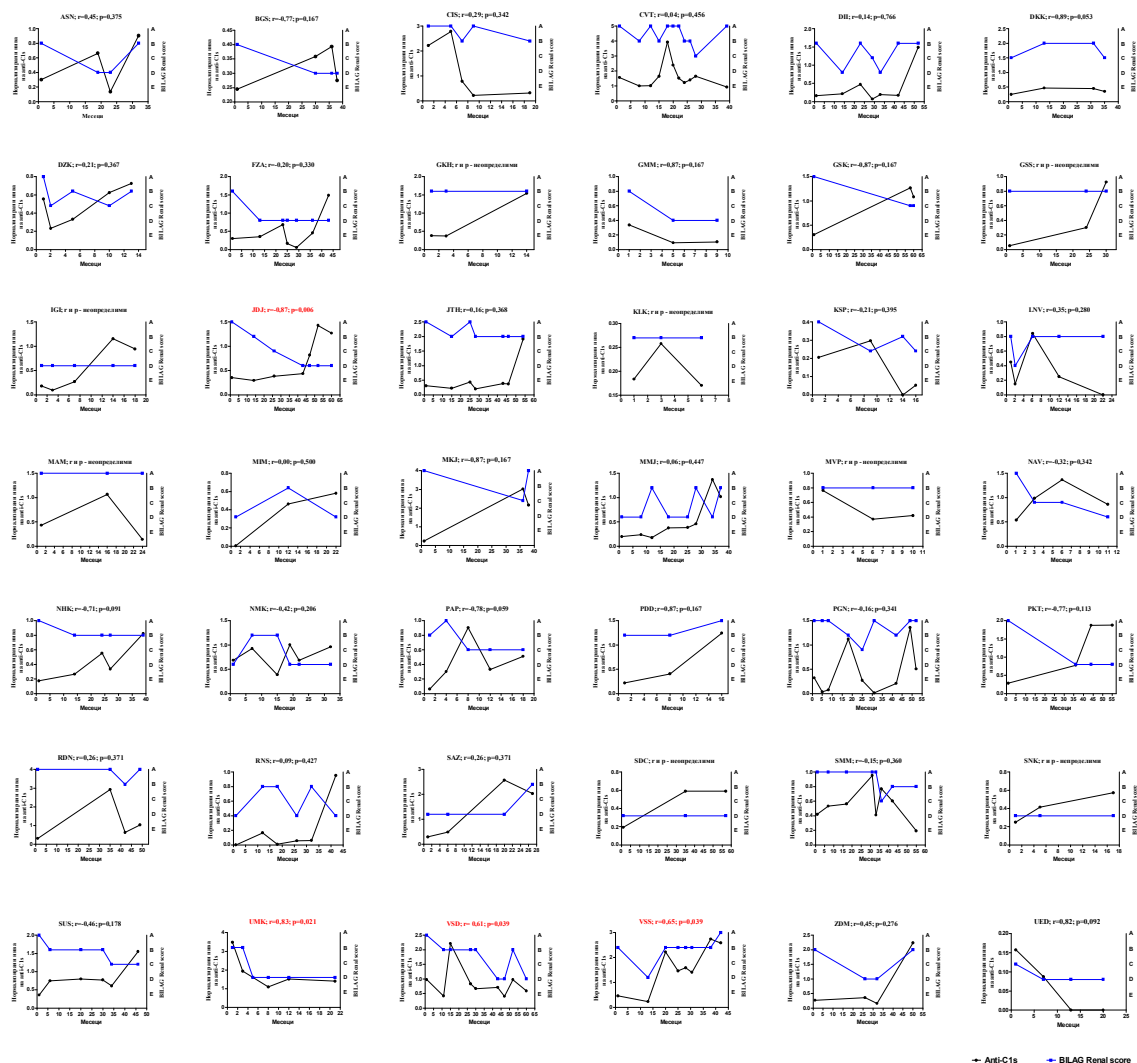
На базата на това разпределение установихме, че наличието на повишение на anti-C1s до патологични нива статистически значимо определя наличието на последващо

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

Таблица 5.3.3. Разпределение на пациентите с ЛН, проследявани в динамика с 3 и повече проби по време на проучването, според наличието или липсата на повишение на нивата на anti-C1s до патологични стойности и наличието или липсата на последващо повишение на категорията на ЛН по BILAG Renal score.

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

Пациентите, при които в динамика anti-C1s нарастват до патологични нива, заедно с последващо активиране на ЛН са 12 (54,5% от всички, при които се установи в динамика повишаване на anti-C1s до патологични стойности). Пациентите, при които не се отчете повишаване на нивата на anti-C1s до патологични стойности и не се отчете активиране на ЛН (преминаване от пълна в частична ремисия или от частична ремисия в активна ЛН) са 16 (84,2% от всички, при които не се отчете повишаване на anti-C1s до патологични нива). Разпределението на пациентите с ЛН според наличието или липсата на повишение на нивата на anti-C1s до патологични стойности и според наличието или липсата на активиране на ЛН е показано на Таблица 5.3.4.



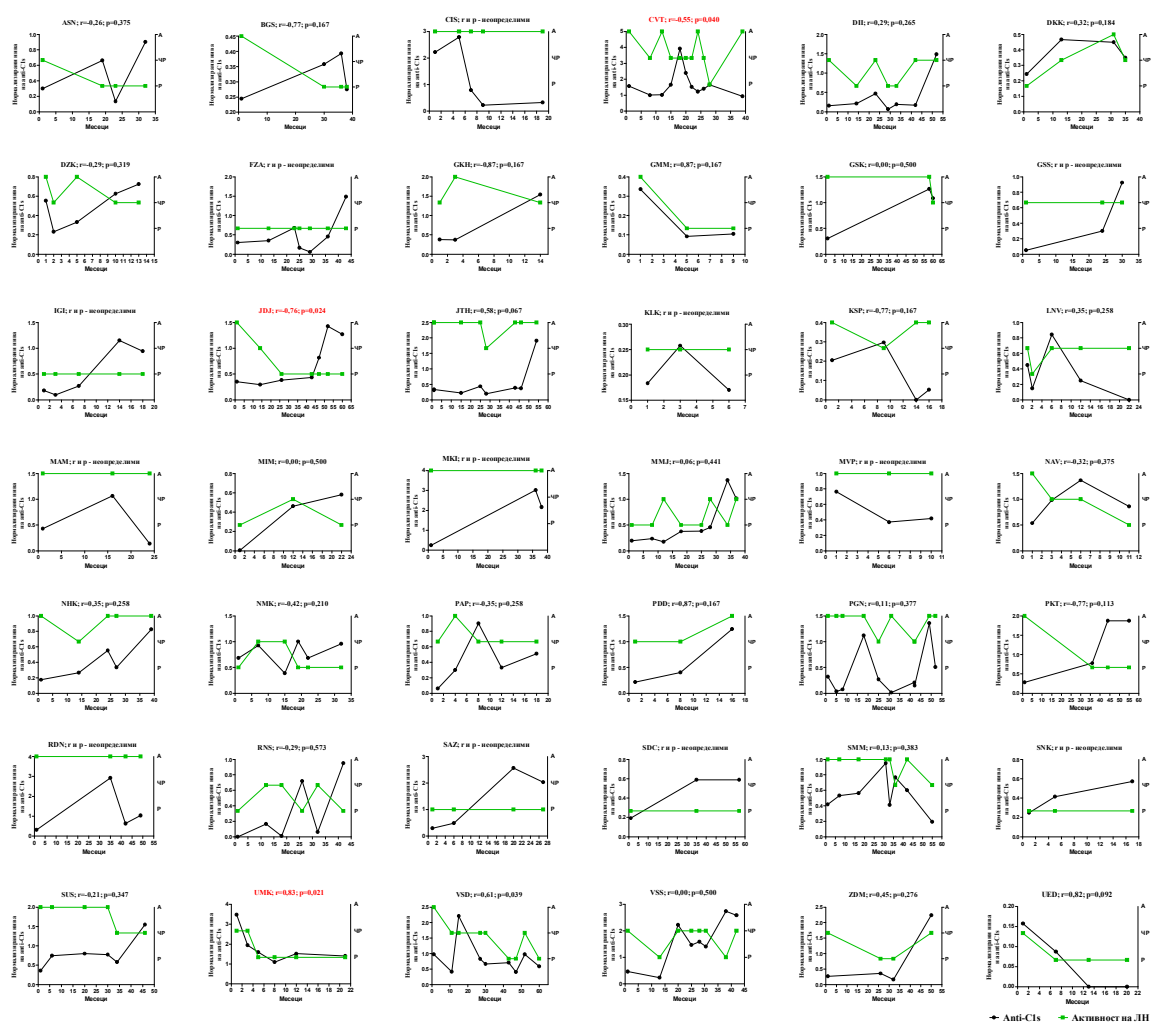
Фигура 5.3.15. Динамика на нормализираните нива на anti-C1s (в черно, по лява ордината на графиките) и категорията по BILAG Renal score (в синьо, по дясна ордината на графиките) при пациентите, проследени с 3 и повече проби. Само при 4 пациенти (обозначени в червено) се установи статистически значима корелационна връзка между нивата на anti-C1s и категорията по BILAG Renal score.

Таблица 5.3.4. Разпределение на пациентите с ЛН, проследявани в динамика с 3 и повече проби по време на проучването, според наличието или липсата на повишение на нивата на anti-C1s до патологични стойности и наличието или липсата на активиране на ЛН.

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

На базата на това разпределение установихме, че повишението на anti-C1s до

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



Фигура 5.3.16. Динамика на нормализираните нива на anti-C1s (в черно, по лява ордината на графиките) и активността на ЛН (активна ЛН - А, частична ремисия на ЛН – ЧР и пълна ремисия на ЛН – Р) (в зелено, по дясна ордината на графиките) при пациентите, проследени с 3 и повече проби. Само при 4 пациенти (обозначени в червено) се установи статистически значима корелационна връзка между нивата на anti-C1s и активността на ЛН.

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

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

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

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

5.3.7.2.1. Динамика на автоантителата срещу C1s и протеинурията.

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

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

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

След прилагане на непараметричен корелационен анализ, не установихме статистически значима зависимост между промяната на нивата на anti-C1s ($\Delta N\%$) и промяната на протеинурията ($\Delta PU\%$) (Spearman, $r=0,19$; $p=0,088$).

При пациентите с нарастване на протеинурията спрямо изходната, средното нормализирано ниво на anti-C1s в края на периода на проследяване е $0,802 \pm 0,713$, статистически незначимо по-високо от нивото на anti-C1s при пациентите, при които отчетохме намаление на протеинурията от изходната, което е $0,637 \pm 0,612$ (Mann-Whitney, $p=0,359$).

Липсва статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-C1s и протеинурията при всички изследваните в динамика проби от пациентите с ЛН (Spearman, $r=0,05$; $p=0,225$, Фигура 5.3.17 A1). Сред всички проби от пациентите с ЛН, които някога са имали екстраренални прояви на СЛЕ, също не установихме статистически значима корелация между нормализираните нива на anti-C1s и протеинурията (Spearman, $r=0,07$; $p=0,161$, Фигура 5.3.17 A2). При пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ също установихме липса на статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-C1s и протеинурията (Spearman, $r=-0,23$; $p=0,051$, Фигура 5.3.17 A3).

5.3.7.2.2. Динамика на автоантителата срещу C1s и бъбречната функция.

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

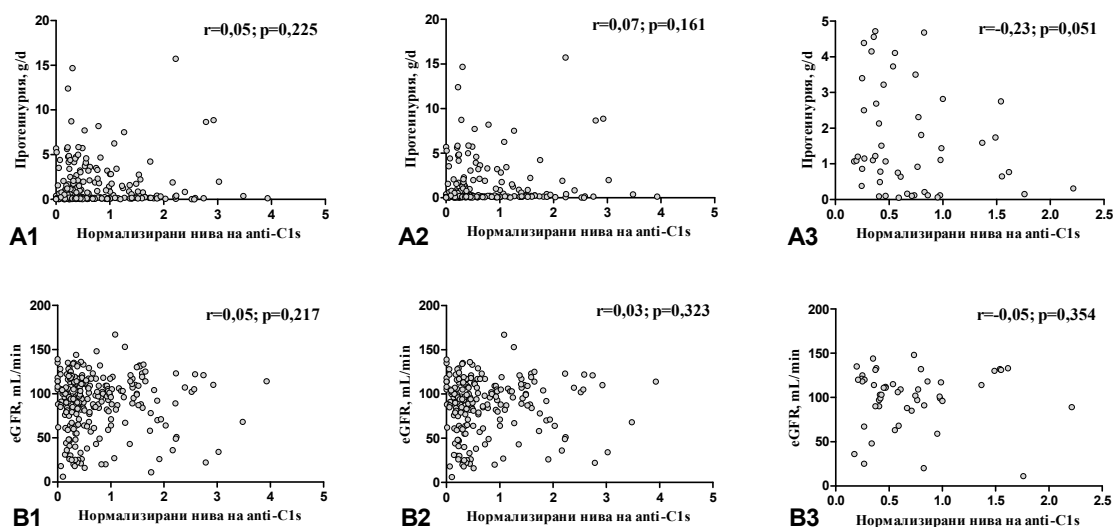
Аналогично на горепосоченото, определихме промяната на eGFR (Δ GFR) спрямо изходната GFR при пациентите, изследвани за anti-C1s (GFR_1 – GFR при първото изследване (mL/min); GFR_x – GFR при изследването след среден период на проследяване от 13 месеца (mL/min)):

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

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

При пациентите с нарастване на eGFR спрямо изходната, средното нормализирано ниво на anti-C1s в края на периода на проследяване е $0,680 \pm 0,635$, което е статистически незначимо по-ниско от средното ниво при пациентите, при които eGFR намалява в края на периода на проследяване, което е $0,694 \pm 0,682$ (Mann-Whitney, $p=0,992$).

Не установихме статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-C1s и eGFR при всички изследвани в динамика проби от пациентите с ЛН (Spearman, $r=0,05$; $p=0,217$, Фигура 5.3.17 B1). Сред всички проби от пациентите с ЛН, които някога са имали екстраренални прояви на СЛЕ, също не установихме значима корелация между нормализираните нива на anti-C1s и eGFR (Spearman, $r=0,03$; $p=0,323$, Фигура 5.3.17 B2). При пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ също не установихме значима корелация между нивата на anti-C1s и eGFR (Spearman, $r=-0,05$; $p=0,354$, Фигура 5.3.17 B3).



Фигура 5.3.17. Корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C1s и протеинурията и anti-C1s и изчислената скорост на гломерулна филтрация (eGFR) при всички изследвани в динамика проби от пациенти с ЛН (**A1** и **B1**); при пробите, изследвани в динамика от пациенти с ЛН с екстраренални прояви на СЛЕ (**A2** и **B2**) и при всички изследвани проби от пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ (**A3** и **B3**). Липсва статистически значима корелационна зависимост между нормализираните нива на anti-C1s и протеинурията и между anti-C1s и eGFR при различните групи пациенти с ЛН (Spearman).

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

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

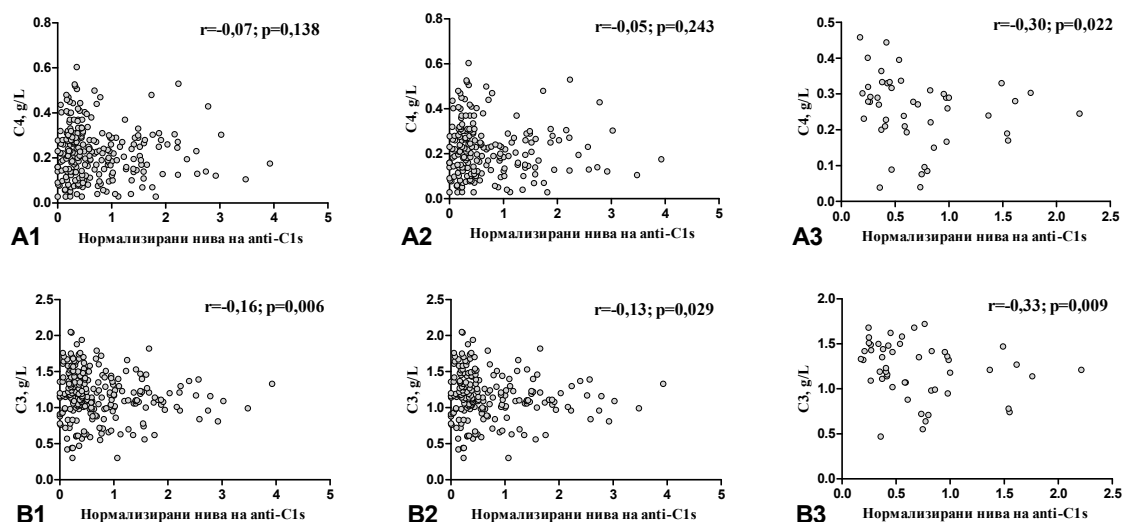
Аналогично, определихме и промените на C4 и C3 ($\Delta C4$ и $\Delta C3$) спрямо съответните изходни нива на C4 и C3 при изследването в началото (C_1 – съответното ниво на комплемента (C4 и C3) (g/L) в началото; C_x – съответното ниво на комплемента (C4 и C3) (g/L) в края на периода на проследяване):

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

Установихме, статистически значима умерена отрицателна корелационна зависимост между промяната на нормализираните нива на anti-C1s спрямо изходните ($\Delta N\%$) и промяната на концентрацията на C4 спрямо изходната ($\Delta C4$) за периода на проследяване (Spearman, $r=-0,32$; $p=0,022$), а също така и че няма статистически значима корелационна зависимост между промяната на нормализираните нива на anti-C1s спрямо изходните ($\Delta N\%$) и промяната на концентрацията на C3 спрямо изходната ($\Delta C3$) за същия период на проследяване (Spearman, $r=-0,09$; $p=0,281$).

При изследване на зависимостите между нивата на anti-C1s и плазмените концентрации на C4 и C3 установихме, че сред всички пациенти с ЛН и сред пациентите с ЛН и екстраренални прояви на СЛЕ липсва статистически значима корелационна зависимост между нивото на anti-C1s и плазмената концентрация на C4 (Spearman, съответно: $r=-0,07$; $p=0,138$ и $r=-0,05$; $p=0,243$) (Фигура 5.3.18 A1 и A2), като е налице статистически значима слаба отрицателна корелация между нивата на anti-C1s и концентрацията на C4 само сред пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=-0,30$; $p=0,022$, Фигура 5.3.18 A3). Установихме статистически значими слаби отрицателни корелационни зависимости между нивата на anti-C1s и концентрациите на C3 сред всички пациентите с ЛН и сред тези с ЛН и екстраренални

прояви на СЛЕ (Spearman, съответно: $r=-0,16$; $p=0,006$ и $r=-0,13$; $p=0,029$) (Фигура 5.3.18 В1 и В2), като е налице и статистически значима умерена отрицателна корелация между нивото на anti-C1s и концентрацията на C3 при пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=-0,33$; $p=0,009$) (Фигура 5.3.18 В3).



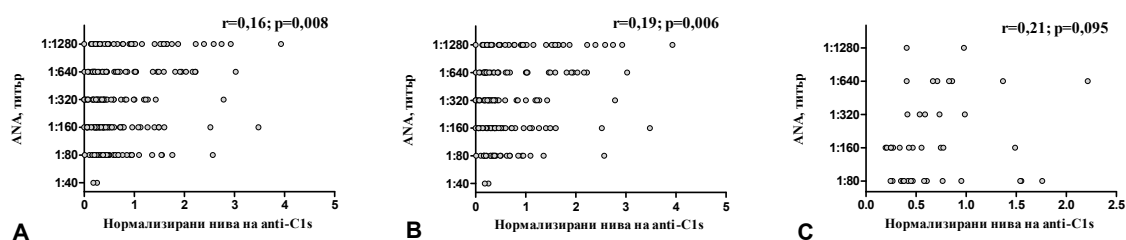
Фигура 5.3.18. Корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C1s, изследвани в динамика от пациентите с ЛН и плазмените концентрации на C4 (A) и C3 (B) в тези проби. (A1 и B1) При всички пациенти с ЛН; (A2 и B2) При пациентите с ЛН с екстраренални прояви на СЛЕ; (A3 и B3) При пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ. (Spearman, one-tailed).

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

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

Проучвайки зависимостите между нивото на anti-C1s и титъра на ANA сред всички пациенти с ЛН, изследвани в динамика (при които са изследвани едновременно anti-C1s и ANA, N=220 проби), установихме, че е налице статистически значима слаба позитивна корелационна зависимост между нормализираното ниво на anti-C1s и титъра на ANA (Spearman, $r=0,16$; $p=0,008$) (Фигура 5.3.19 A). При изследвания сред групите

от пациентите с ЛН с екстрааренални прояви на СЛЕ също установихме статистически значима слаба позитивна корелация (Spearman, $r=0,19$; $p=0,006$) (Фигура 5.3.19 В), докато при пациенти с ЛН без екстрааренални прояви на СЛЕ не установихме статистически значима корелационна зависимост (Spearman, $r=0,21$; $p=0,095$) (Фигура 5.3.19 С).



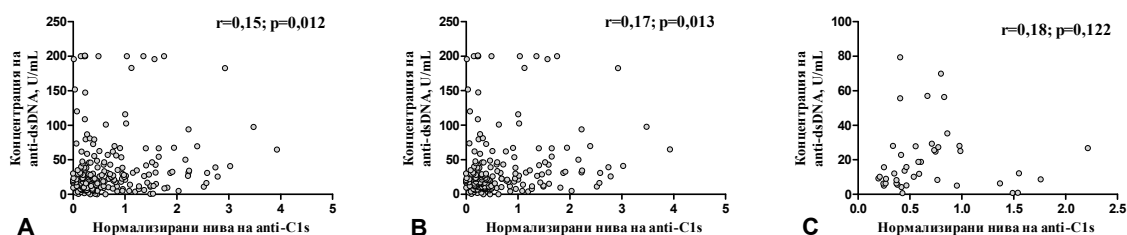
Фигура 5.3.19. Корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C1s и титрите на ANA (показани в логаритмичен мащаб по ординатите): **А.** При всички проведени в динамика проби от пациентите с ЛН (Spearman, $r=0,16$; $p=0,008$); **В.** При пациентите с ЛН и екстрааренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=0,19$; $p=0,006$); **С.** При пациентите с ЛН без екстрааренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=0,21$; $p=0,095$).

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

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

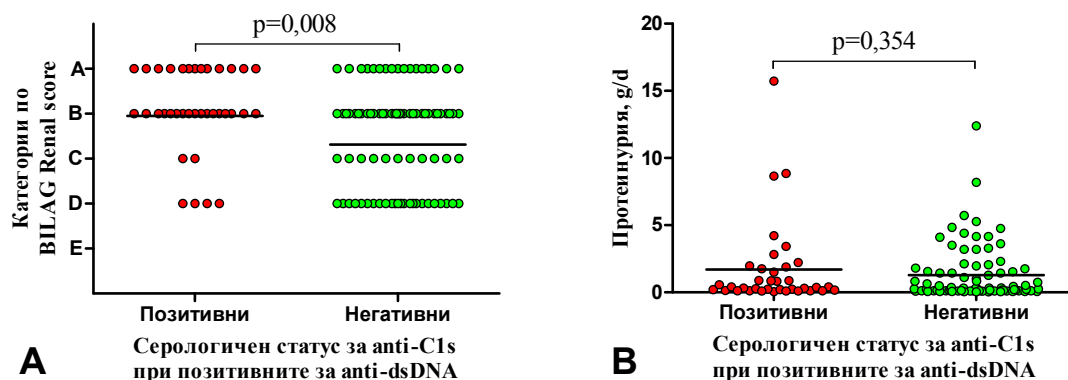
Проучвайки зависимостите между нивото на anti-C1s и концентрацията на anti-dsDNA (U/mL) сред всички пациенти с ЛН, изследвани в динамика (при които са изследвани едновременно anti-C1s и anti-dsDNA, $N=224$ проби), установихме наличие на статистически значима слаба позитивна корелационна зависимост между нормализираното ниво на anti-C1s и концентрацията на anti-dsDNA (Spearman, $r=0,15$; $p=0,012$, Фигура 5.3.20 А). При пациентите с ЛН с екстрааренални прояви на СЛЕ също установихме статистически значима слаба позитивна корелационна зависимост (Spearman, $r=0,17$; $p=0,013$, Фигура 5.3.20 В). Единствено при пациентите с ЛН без екстрааренални прояви на СЛЕ установихме липса на статистически значима

корелационна зависимост (Spearman, $r=0,18$; $p=0,122$, Фигура 5.3.20 С).



Фигура 5.3.20. Корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C1s и концентрациите на anti-dsDNA (U/mL) при: **А.** Всички пациентите с ЛН, изследвани в динамика (Spearman, $r=0,15$; $p=0,012$) и **В.** При пациентите с ЛН с екстраренални прояви на СЛЕ, изследвани в динамика (Spearman, $r=0,17$; $p=0,013$). **С.** При пациенти с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=0,18$; $p=0,122$).

При пациентите, изследвани в динамика, позитивни едновременно за anti-dsDNA и anti-C1s, средният ранг (категория на ЛН) на BILAG Renal score е статистически значимо по-висок от този при пациентите, позитивни за anti-dsDNA и негативни за anti-C1s (Mann-Whitney, $p=0,008$) (Фигура 5.3.21 А). При пациентите, изследвани в динамика, позитивни едновременно за anti-dsDNA и anti-C1s, средното ниво на протеинурията ($1,70 \pm 3,19$ g/d) е сравнително, но статистически незначимо по-високо от това при пациентите, позитивни за anti-dsDNA и негативни за anti-C1s ($1,29 \pm 2,06$ g/d) (Mann-Whitney, $p=0,354$) (Фигура 5.3.21 В).



Фигура 5.3.21. А. Сравнителен анализ между категориите (ранговете) по BILAG Renal score при пациентите с ЛН, изследвани в динамика, позитивни за anti-dsDNA. При позитивните едновременно за anti-dsDNA и anti-C1s, средната категория на ЛН е статистически значимо по-висока от тази при пациентите позитивни за anti-dsDNA и негативни за anti-C1s (Mann-Whitney, $p=0,008$). **В.** Протеинурия при позитивните за anti-dsDNA пациенти с ЛН в зависимост от статуса за anti-C1s (Mann-Whitney, $p=0,354$).

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

При пациентите, изследвани за anti-C1s, включени в проучването ($N=74$), според показанията е провеждано предходно имунопатогенетично лечение с: Кортикостероиди (CS) при 70 (94,6%) за средна продължителност от 47,9 месеца (от 15 дни до 270 месеца); Cyclophosphamide (CYC) при 64 (86,5%) за средна продължителност от 9,0 месеца (от 3 дни до 36 месеца); Azathioprine или Mycophenolate mofetil (AZA/MMF) при 34 (45,9%) за средна продължителност от 16,3 месеца (от 1 до 108 месеца); Cyclosporine A (CyA) при 17 (23,0%) за средна продължителност от 9,1 месеца (от 1 до 51 месеца); Immunovenin intact (IVIg) при 6 (8,1%) със среден брой на приложените курсове 2 (от 1 до 3 курса) и плазмафереза (ПФ) при 22 (32,0%) със среден брой на сеансите 5 (от 1 до 10 сеанса).

При проследените за среден период от 13 месеца (от 6 до 25 месеца) пациенти с ЛН ($N=52$) по време на нашето проучване при 40 (76,9%) пациенти е проведена имунопатогенетична терапия с CS за среден период от 9,0 (от 1 до 24) месеца; при 25 (48,1%) пациенти – с CYC за среден период от 2 месеца (от 3 дни до 8 месеца); при 31 (59,6%) пациенти – с AZA/MMF за среден период от 5,6 (от 1 до 24) месеца; при 3 (5,8%) пациенти – с CyA за среден период от 8,0 (от 3 до 12) месеца; при 2 (3,8%) пациенти – с IVIg, като при единия е проведен един курс а при втория пациент – 3

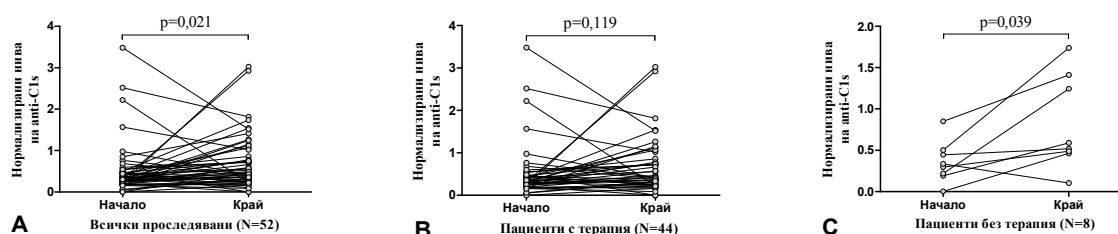
курса и при 7 (13,5%) пациенти – с плазмафереза със среден брой на проведените сеанси 3 (от 2 до 5).

При всички проследявани пациенти в началния момент средното нормализирано ниво на anti-C1s е $0,507 \pm 0,629$ (от 0,000 до 3,480), а в края на периода на проследяване – $0,697 \pm 0,646$ (от 0,000 до 3,026), като разликата е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,021$) (Фигура 5.3.21 А). При пациентите с проведена имунопатогенетична терапия в рамките на периода на проследяване, средното нормализирано ниво на anti-C1s в началото е $0,534 \pm 0,673$ (от 0,000 до 3,480), а в края – $0,674 \pm 0,663$ (от 0,000 до 3,026), като в тази група не установихме статистически значима разлика между началното и крайното ниво (Wilcoxon signed rank test, $p=0,119$) (Фигура 5.3.21 В). В групата пациенти, при които не е провеждана имунопатогенетична терапия, средното нормализирано ниво на anti-C1s в началото е $0,356 \pm 0,253$ (от 0,004 до 0,852), а в края – $0,820 \pm 0,569$ (от 0,105 до 1,738), като е налице статистически значима разлика между тези нива (Wilcoxon signed rank test, $p=0,039$) (Фигура 5.3.21 С).

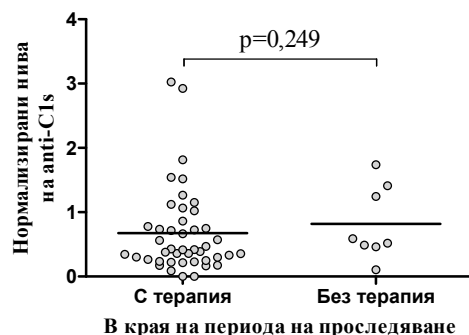
При прилагане на непараметричен сравнителен анализ установихме, че макар и статистически незначимо, нивото на anti-C1s в края на периода на проследяване е сравнително по-високо при пациентите, при които не е провеждана имунопатогенетична терапия в сравнение с нивото при пациентите с терапия (Mann-Whitney, $p=0,249$) (Фигура 5.3.22).

С оглед вида на проведеното имунопатогенетично лечение, сред пациентите, при които е провеждано такова, обособихме основно 6 групи: 15 (34,1%) пациенти, при което е провеждано комбинирано лечение с CS+CYC+AZA/MMF; 8 (18,2%) пациенти, при които е провеждано комбинирано лечение с CS+CYC; 12 (27,3%) пациенти, при които е провеждано комбинирано лечение с CS+AZA или CS+MMF; 5 (11,4%) пациенти, при които е провеждана монотерапия с CS; 2 (4,5%) пациенти, при които е провеждано комбинирано лечение с CYC и AZA и 2 (4,5%) пациенти, при които е провеждана монотерапия: с AZA при единия и с MMF при другия. При сравнителен анализ на нивата на anti-C1s в началото и в края на проведеното лечение при различните групи пациенти установихме следното: в групата на терапия с CS+CYC+AZA/MMF средното нормализирано ниво на anti-C1s в началото е $0,531 \pm 0,651$ (от 0,052 до 2,520), а в края – $0,906 \pm 0,756$ (от 0,170 до 2,926), като в тази група нивото се увеличава, но разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed

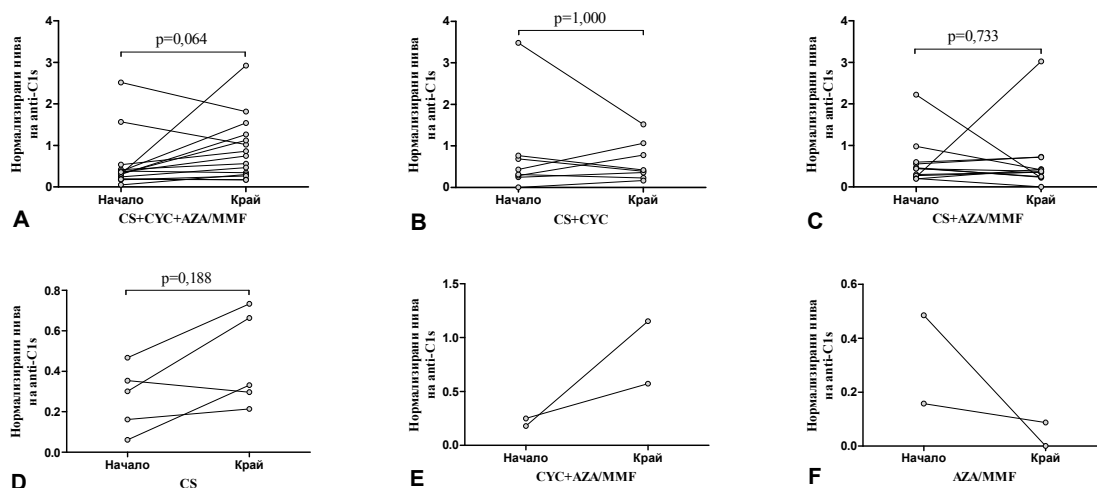
rank test, $p=0,064$) (Фигура 5.3.23 А); в групата на лечение с CS+CYC средното ниво в началото е $0,775\pm 1,120$ (от 0,000 до 3,480), а в края – $0,615\pm 0,471$ (от 0,166 до 1,520), като в тази група средното ниво намалява, но разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=1,000$, Фигура 5.3.23 В); в групата на лечение с CS+AZA/MMF средното ниво в началото е $0,577\pm 0,563$ (от 0,197 до 2,223), а в края – $0,592\pm 0,792$ (от 0,000 до 3,026), като в тази група средното ниво се увеличава, но разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,733$) (Фигура 5.3.23 С); в групата на монотерапия с CS средното ниво в началото е $0,269\pm 0,160$ (от 0,061 до 0,467), а в края – $0,448\pm 0,234$ (от 0,214 до 0,733), като средното ниво в групата се увеличава, но разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,188$) (Фигура 5.3.23 D); в групите на лечение с CYC+AZA и AZA/MMF попадат по 2 пациенти, като от Фигура 5.3.23 Е и F се вижда увеличаване на нивата на anti-C1s в групата на терапия с CYC+AZA и намаляване на нивата в групата на терапия с AZA/MMF, но поради малкия брой на пациентите статистическият анализ в тези две групи не е коректен.



Фигура 5.3.21. Крайни и начални нива на anti-C1s при: **А.** Всички проследявани пациенти (N=52), при които се отчита статистически значимо нарастване на средното нормализирано ниво ($p=0,021$); **В.** Пациентите, при които е провеждана имунопатогенетична терапия (N=44), при които нивото нараства, но не статистически значимо ($p=0,119$) и **С.** Пациентите, при които не е провеждана имунопатогенетична терапия през периода на проследяване (N=8), при които се отчита статистически значимо нарастване на нивото ($p=0,039$) (Wilcoxon signed rank test).



Фигура 5.3.22. Средни нормализирани нива на anti-C1s в края на периода на проследяване при пациентите с ЛН с имунопатогенетична терапия и без такава. Липсва статистически значима разлика между тези нива (Mann-Whitney, $p=0,249$).



Фигура 5.3.23. Нормализирани нива на anti-C1s в началото и в края на период на проследяване при пациенти, при които е провеждана терапия с: **A.** CS+CYC+AZA/MMF – средното ниво на anti-C1s се повишава в края, но разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,064$); **B.** CS+CYC – средното ниво на anti-C1s намалява в края, но разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=1,000$); **C.** CS+AZA/MMF – средното ниво на anti-C1s леко нараства в края, но разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,733$); **D.** CS – средното ниво на anti-C1s се повишава в края, но разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,188$). **E.** CYC+AZA – двама пациенти, при които нивата на anti-C1s нарастват в края; **F.** MMF при един пациент и AZA при един пациент, като нивата на anti-C1s намаляват в края.

ИЗВОДИ:

1. При изследваната група пациенти с ЛН установихме патологично повишени anti-C1s в сравнително малък процент от пациентите (8,1%), като при проследяване в динамика anti-C1s се позитивират в около 54,8% от пациентите, резултат, който би следвало да бъде потвърден в по-големи кохортни проучвания и вероятно определя anti-C1s като динамична популация от автоантитела.

2. Не установихме връзка на anti-C1s с: пола на пациентите, възрастта на пациентите, давността на ЛН, въпреки че с нарастване на възрастта и давността на ЛН, нивата на anti-C1s имат тенденция за повишаване.

3. Не установихме съществени връзки между anti-C1s и лабораторни маркери за оценка активността на ЛН като протеинурията, уринния седимент, eGFR, въпреки че нивата на anti-C1s са сравнително по-високи при пациентите с патологична протеинурия, активен уринен седимент и декомпенсирана бъбречна функция.

4. Не установихме съществени връзки между anti-C1s и имунологичните маркери за активност, каквито са C3, C4, anti-dsDNA, въпреки че по-високи нива на anti-C1s установихме при пациенти с хипокомplementемия C4 и с патологично повишени anti-dsDNA.

5. Не установихме съществени връзки между anti-C1s и хистологичните характеристики на ЛН.

6. Не установихме съществени връзки между anti-C1s и комплексната оценка на активността на ЛН.

7. Не установихме съществени динамични зависимости между anti-C1s и маркерите за лабораторна оценка на ЛН, което прави anti-C1s ненадежден маркер за клинично проследяване на ЛН.

8. Установихме динамични зависимости между нивата на anti-C1s и нивата на C3 компонента на complementa, а така също и между нивата на anti-C1s и anti-dsDNA, като хипокомplementемията е свързана с по-високи нива на anti-C1s, а патологично повишените anti-dsDNA – с по-високи нива на anti-C1s, което вероятно би могло да определи anti-C1s като динамичен маркер за оценка на имунологичната активност при пациентите с ЛН.

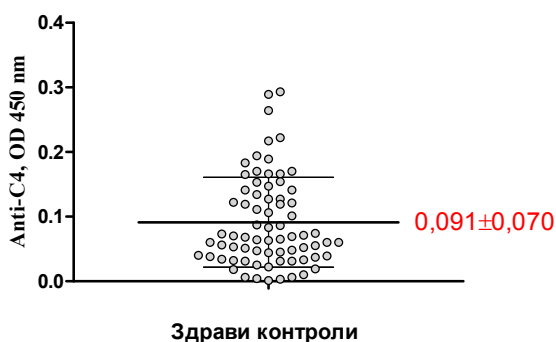
9. Установихме предиктивна роля на anti-C1s като маркер за последващо активиране на ЛН (повишаване на категорията на активност на ЛН по BILAG Renal score и повишаване на активността на ЛН, определена с критериите за активна, частична ремисия и пълна ремисия на ЛН), но тази роля подлежи на допълнителни изследвания в по-големи кохортни проучвания.

10. Не установихме съществено повлияване на нивата на anti-C1s в хода на имунопатогенетичната терапия при изследваните пациенти.

11. На този етап anti-C1s не би могло да бъде използвано като надежден маркер за диагностична оценка на активността на ЛН, както и като самостоятелен динамичен маркер за проследяване на пациентите с ЛН.

5.4. АВТОАНТИТЕЛА СРЕЩУ C4 КОМПОНЕНТА НА КОМПЛЕМЕНТА.

Автоантитела срещу C4 (anti-C4) са изследвани при 74 (76,3% от първоначално включените в проучването) пациенти, като в динамика са изследвани общо 266 проби на пациентите с ЛН. Anti-C4 са изследвани и при 72 здрави доброволци (контроли), без автоимунни и инфекциозни възпалителни заболявания, със запазена бъбречна, чернодробна и хемопоеична функции. При изследваните за anti-C4 в контролната група здрави доброволци се установиха плазмени нива на anti-C4 $0,091 \pm 0,070$ единици оптична плътност при дължина на вълната от 450 nm (OD 450 nm) на оптичния анализатор (Фигура 5.4.1).



Фигура 5.4.1. Нива на anti-C4 при изследваните здрави контроли (показана е средната със стандартното отклонение).

По аналогичен начин с anti-C1q, определихме граничната стойност (cut-off), над която нивата на anti-C4 при изследваните пациенти с ЛН приехме за патологично повишени, а именно:

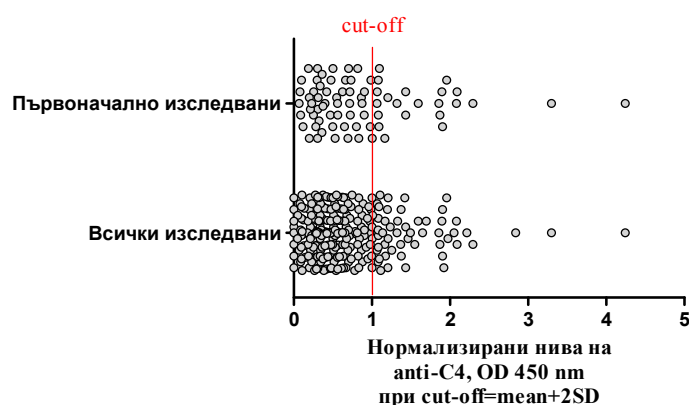
$$\text{Cut-off} = \text{mean (средна за контролната група здрави донори)} + 2 \times \text{SD}$$

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

При изследваните пациенти с ЛН определихме средно ниво на anti-C4, съответно на $0,199 \pm 0,172$ OD 450 nm при cut-off от 0,231 OD 450 nm (изследванията са проведени в Катедра „Биохимия, молекулна медицина и нутригеномика” на МУ-Варна и в Националната референтна лаборатория за изследване на белтъците от системата на комплемента, при Европейската болница “Georges Pompidou”, Париж с еднакви гранични стойности). Изследванията в различните лаборатории са провеждани

съгласно унифицирана методика. С оглед на изследванията в две различни лаборатории проведохме нормализиране на стойностите на нивата на anti-C4 в групите пациенти с ЛН, представяйки нормализираните нива на anti-C4 като съотношение на получените стойности за оптичната плътност към нивото на cut-off за лабораторията (Фигура 5.4.2). По този начин, за гранична стойност се приема 1,00, над която нормализираните нива на anti-C4 се приемат за повишени, а под която – за референтни. Установихме статистически значима разлика между нивата на anti-C4 в контролната група здрави доброволци и тези при пациентите с ЛН (Mann-Whitney, $p < 0,0001$).

Установихме патологично повишени титри на anti-C4 при 23 (31,1%) от изходно изследваните пациенти с ЛН. Сред изследваните общо 266 проби от кръвни плазми на пациентите с ЛН в динамика установихме патологично повишени нива на anti-C4 при 56 (21,1%) от пробите (Фигура 5.4.2).



Фигура 5.4.2. Разпределение на нивата на anti-C4 при изходната група първоначално изследвани пациентите с ЛН и при всички изследвани в динамика проби от пациенти, след хомогенизиране на кохортата. Граничната стойност (cut-off) е представена като 1,00, над която нивата на anti-C4 се приемат за патологично повишени.

5.4.1. Автоантитела срещу C4 и пола на пациентите с ЛН.

При мъжете с ЛН (структурата по пол на изследваните пациенти е описана в „5.2.1 Автоантитела срещу C1g и пола на пациентите“) се установиха патологично повишени нива на anti-C4 при 3 (20,0%), докато при жените с ЛН – при 20 (33,9%), както е показано на Таблица 5.4.1. Не установихме статистически значимо влияние на

пола на пациентите с ЛН върху наличието на патологично повишени нива на anti-C4 (Fisher's exact test, $p=0,365$).

Таблица 5.4.1. Разпределение на патологично повишените нива на anti-C4 според пола на пациентите с ЛН.

Пациенти	Патологично повишени anti-C4	Референтни anti-C4	Общо
Мъже	3	12	15
Жени	20	39	59
Общо	23	51	74

При анализ на нормализираните нива на anti-C4 установихме, че при мъжете с ЛН средното нормализирано ниво на anti-C4 е $0,757 \pm 0,858$, а при жените с ЛН – $0,889 \pm 0,718$. Не установихме статистически значима разлика в нивата на anti-C4 при двата пола на пациентите с ЛН (Mann-Whitney, $p=0,162$).

5.4.2. Автоантитела срещу C4 и възрастта на пациентите с ЛН.

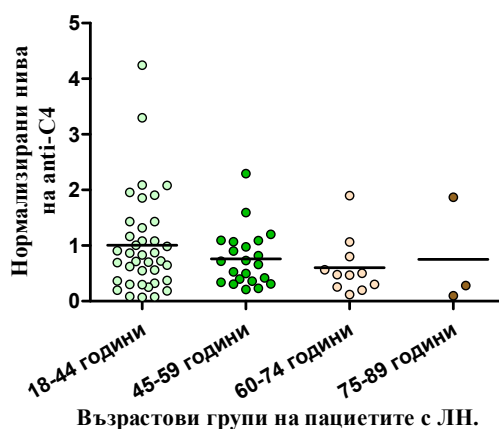
Структурата по възраст на групата изследвани за anti-C4 пациенти с ЛН е описана в „5.2.2. Автоантитела срещу C1g и възрастта на пациентите с ЛН.”

Средната възраст на изследваната група пациенти с ЛН е 45,36 години. При анализ на нормализираните нива на anti-C4 установихме, че при пациентите на възраст $\leq 45,3$ години средното нормализирано ниво на anti-C4 е $0,972 \pm 0,859$, а при пациентите на възраст над 45,3 години това ниво е $0,726 \pm 0,554$. Не установихме статистически значима разлика между нормализираните нива на anti-C4 при двете групи пациенти (Mann-Whitney, $p=0,263$).

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

Във възрастовите групи по C3O, средните нормализирани нива на anti-C4 са както следва: в групата от 18 до 44 години: $1,004 \pm 0,883$; в групата от 45 до 59 години: $0,762 \pm 0,504$; в групата от 60 до 74 години: $0,604 \pm 0,508$ и в групата от 75 до 89 години: $0,750 \pm 0,974$. Данните за възрастовото разпределение на пациентите с ЛН и

нормализираните нива на anti-C4 са представени на Фигура 5.4.3.



Фигура 5.4.3. Средни нива на anti-C4 в различните възрастови групи по СЗО при пациентите с ЛН.

Въпреки постепенното намаляване на средните нормализирани нива на anti-C4 с възрастта (Фигура 5.4.3) (изключвайки възрастовата група от 75-89 години), не установихме статистически значима зависимост на влиянието на възрастта като фактор върху нивата на anti-C4 (One-way ANOVA, $p=0,371$; Post test for linear trend, $p=0,503$). Не установихме статистически значима разлика в нормализираните нива на anti-C4 между различните възрастови групи пациенти с ЛН (Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$ между всички групи).

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

5.4.3. Автоантитела срещу C4 и давността на ЛН.

Средната давност на ЛН при изследваната група пациенти е 10,3 години. При съпоставяне на нормализираните нива на anti-C4 при пациенти с давност на ЛН по-малка от 10,3 години ($0,925\pm0,849$) и тези при пациентите с давност на ЛН над 10,3 години ($0,784\pm0,594$) не установихме статистически значима разлика (Mann-Whitney, $p=0,617$).

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

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

Изследвахме връзките на нивата на anti-C4 с някои основни клиничко-лабораторни параметри на ЛН, каквито са: протеинурията, уринния седимент, бъбречната функция, клиничко-лабораторната активност на ЛН, както и с комплексната оценка на активността на ЛН по BILAG Renal Score (категорията по BILAG Renal score). Изследвахме и връзката на anti-C4 с наличието или липсата на извънбъбречни прояви на СЛЕ, като при пациентите с ЛН и екстраренални прояви на СЛЕ (60 (81,1%) пациенти) средното нормализирано ниво на anti-C4 е $0,863 \pm 0,724$, а при пациентите с ЛН без засягане на други органи и системи е $0,860 \pm 0,856$ и тази разлика не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,669$). Пациентите, позитивни за anti-C4 с екстраренални прояви на СЛЕ са 18 (78,3%) от позитивните, а пациентите, негативни за anti-C4 без екстраренални прояви са 9 (17,6%) от негативните. На базата на това разпределение установихме липса на статистически значимо влияние на позитивния серологичен статус за anti-C4 върху екстрареналните прояви на СЛЕ (Fisher's exact test, $p=0,752$).

5.4.4.1. Автоантитела срещу C4 и протеинурия.

Сред изследваните пациенти в нашето проучване, патологично ниво на протеинурия се установи при 49 (66,2%), а протеинурия под $0,15 \text{ g/d}$ (референтна по степен протеинурия) – при 25 (33,8%) пациенти. Сред всички изследвани уринни проби (общо 266) на пациентите с ЛН, при които са изследвани anti-C4, в динамика за периода на проучването, патологична протеинурия бе установена при 174 (65,4%) от пробите. При пациентите с повишени нива на anti-C4 (23 пациенти) се установи протеинурия от $0,15 \text{ g/d}$ и по-висока при 13 (56,5%) пациенти и по-ниска от $0,15 \text{ g/d}$ – при 10 (43,5%) от тях. При пациентите с референтни нива на anti-C4 (51 пациенти), протеинурия $\geq 0,15 \text{ g/d}$ се установи при 36 (70,6%) пациенти, а протеинурия $< 0,15 \text{ g/d}$ се установи при 15 (29,4%) пациенти. Въз основа на това разпределение установихме, че при изходно

изследваните в нашето проучване пациенти с ЛН не се установи статистически значимо влияние на патологичните нива на anti-C4 върху протеинурията (Fisher's exact test, $p=0,292$).

При изследване на зависимостта на протеинурията (g/d) от нормализираните нива на anti-C4 при проучваните пациенти с ЛН, не установихме статистически значима корелационна зависимост (Spearman, $r=-0,06$, $p=0,303$).

При пациентите, позитивни за anti-C4, средното ниво на протеинурията е $2,51\pm 4,43$ (от 0,02 до 15,72) g/d, докато при пациентите, негативни за anti-C4 – $1,32\pm 1,92$ (от 0,03 до 8,73) g/d. Въпреки че при позитивните за anti-C4 пациенти нивото на протеинурията е сравнително по-високо от това при пациентите, негативни за anti-C4, тази разлика не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,744$). Сред всички изследвани в динамика кръвни и уринни проби, средното ниво на протеинурията при пробите от пациентите, позитивни за anti-C4, е $1,97\pm 3,34$ (от 0,02 до 15,72) g/d, а това при негативните за anti-C4 – $1,13\pm 1,86$ (от 0,01 до 12,39) g/d, като и тук разликата не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,565$).

При пациентите с патологична протеинурия, средното нормализирано ниво на anti-C4 е $0,802\pm 0,738$ (от 0,069 до 4,242), а при тези с референтна по степен протеинурия – $0,981\pm 0,759$ (от 0,117 до 3,299), като тази разлика не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,219$).

5.4.4.2. Автоантитела срещу C4 и уринен седимент.

Сред първоначално включените в проучването пациенти, патологично активен уринен седимент се установи при 37 (50,0%) пациенти. При проследяване в динамика, патологично активен уринен седимент е установен при общо 128 (48,1%) от всички обработени уринни проби.

Сред пациентите с ЛН, първоначално включени в проучването с повишени нива на anti-C4, патологично активен уринен седимент се установи при 13 (56,5%) пациенти, като при 10 (43,5%) пациенти не се установи патологична находка в уринния седимент. Сред пациентите с ЛН с референтни нива на anti-C4, патологично активен уринен седимент се установи при 24 (47,1%) пациенти, като при 27 (52,9%) пациенти не се

установи патологична находка в уринния седимент. Това разпределение показва липса на влияние на патологично повишените нива на anti-C4 върху наличието на патологично активен уринен седимент при пациентите с ЛН (Fisher's exact test, $p=0,616$).

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

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

5.4.4.3. Автоантитела срещу C4 и бъбречна функция.

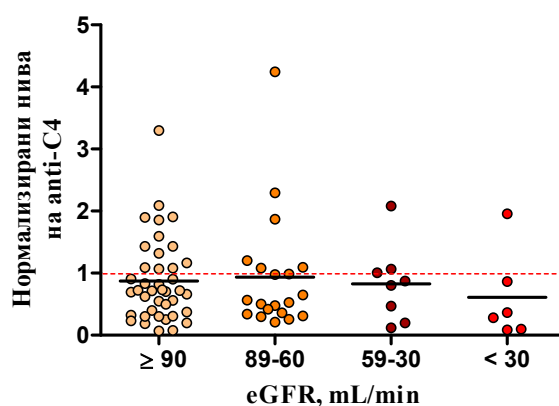
Разпределението на пациентите с ЛН в групи според eGFR, при които са изследвани anti-C4, е описано в „5.2.4.3. Автоантитела срещу C1r и бъбречна функция.”.

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

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

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

Не установихме статистически значима разлика между нивата на anti-C4 при отделните групи от пациенти с ЛН, обособени въз основа на eGFR, като липсва статистически значима зависимост между тези нива и поредността на отделните групи (One-way ANOVA, $p=0,831$; Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$; Post test for linear trend, $p=0,392$) (Фигура 5.4.4). Тази тенденция се потвърди и при изследването на всички проби, проведени в динамика, разпределени в групите според eGFR (One-way ANOVA, $p=0,353$; Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$; Post test for linear trend, $p=0,555$).



Фигура 5.4.4. Средни нива на anti-C4 в обособените според eGFR групи от пациенти с ЛН, първоначално изследвани в проучването.

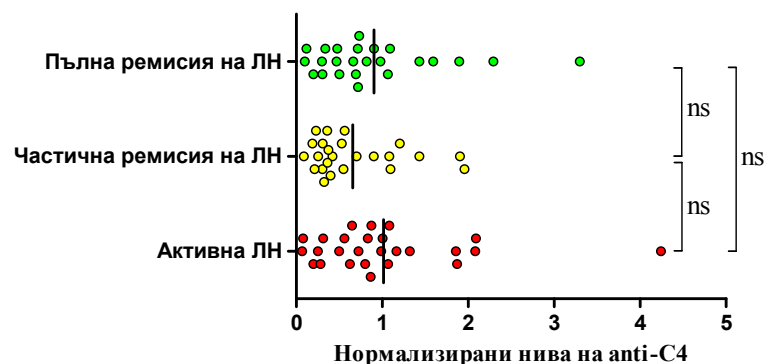
При пациентите, позитивни за anti-C4, средната eGFR е $88,4 \pm 29,5$ mL/min, сравнително по-висока от средната eGFR при негативните за anti-C4 пациенти – $85,8 \pm 35,1$ mL/min, като разликата между двете не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,912$).

Пациентите с ЛН позитивни за anti-C4, при които установихме eGFR <60 mL/min са 4 (17,4%) от позитивните, а пациентите негативни за anti-C4, при които установихме eGFR ≥ 60 mL/min са 41 (80,4%) от негативните за anti-C4. Въз основа на това разпределение установихме, че липсва статистически значимо влияние на позитивния серологичен статус за anti-C4 върху наличието на декомпенсирана бъбречна функция при изследваната група пациенти с ЛН (Fisher's exact test, $p=1,000$).

5.4.4.4. Автоантитела срещу C4 и комплексната клинично-лабораторна оценка на активността на ЛН.

Разпределението на изследваните за anti-C4 пациенти въз основа на клинично-лабораторната активност на ЛН е описано в „5.2.4.4. Автоантитела срещу C1r и комплексната клинично-лабораторна оценка на активността на ЛН.”.

В групата с активна ЛН 10 (38,5%) пациенти са позитивни за anti-C4, в групата с частична ремисия на ЛН позитивни за anti-C4 са 6 (25,0%) пациенти и в групата с пълна клинично-лабораторна ремисия на ЛН позитивни за anti-C4 са 7 (29,2%) пациенти. Средните нормализирани нива на anti-C4 в трите групи пациенти с ЛН са както следва: в групата с активна ЛН – $1,015 \pm 0,879$ (от 0,069 до 4,242); в групата с частична ремисия на ЛН – $0,656 \pm 0,529$ (от 0,087 до 1,957); в групата с пълна клинично-лабораторна ремисия на ЛН – $0,904 \pm 0,753$ (от 0,100 до 3,299), както е показано на Фигура 5.4.5.



Фигура 5.4.5. Разпределение на пациентите с ЛН в зависимост от комплексната клинично-лабораторна оценка на активността на ЛН и нормализираните нива на anti-C4. Представени са средните нормализирани нива на anti-C4 в трите групи.

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

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

При анализ на всички изследвани 266 проби установихме, че от всички позитивни за anti-C4, 24 (42,8%) от пробите са при пациенти в състояние на активна ЛН, 16 (28,6%) от пробите са при пациенти с частична клинично-лабораторна ремисия на ЛН и 16 (28,6%) от пробите са при пациенти в състояние на пълна клинично-лабораторна ремисия. Сред пробите с референтни нива на anti-C4: 58 (27,6%) от пробите са при пациенти с активна ЛН, 76 (36,2%) от пробите са при пациенти с частична ремисия на ЛН и 76 (36,2%) от пробите са при пациенти с пълна ремисия на ЛН. При отчитане на

липсата на клинико-лабораторна активност на ЛН (имайки предвид само състоянията на пълна клинико-лабораторна ремисия на ЛН) и наличието на активност на ЛН (обединявайки групите с активна ЛН и частична ремисия на ЛН), установихме, че няма статистически значимо влияние на наличието на позитивни anti-C4 върху наличието на активност на ЛН (Fisher's exact test, $p=0,344$).

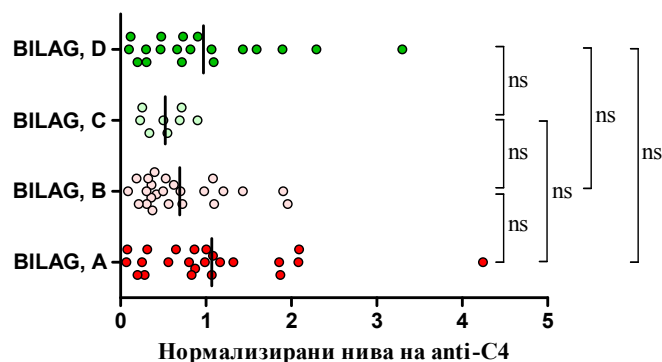
При пациентите с продължителност на пълната клинико-лабораторна ремисия на ЛН ≥ 12 месеца се отчете средно нормализирано ниво на anti-C4 от $0,964 \pm 0,812$, а нивото на anti-C4 при продължителност на пълната клинико-лабораторна ремисия под 12 месеца е $0,798 \pm 0,658$, като тази разлика не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,736$).

Независимо от състоянието на пациентите с ЛН към началния момент на включване в проучването, при съпоставяне на средните нормализирани нива на anti-C4 при тези с епизоди на ремисия в миналото ($0,779 \pm 0,673$) с нивата при пациентите без ремисия в миналото ($0,979 \pm 0,826$) също не се установи статистически значима разлика (Mann-Whitney, $p=0,221$).

5.4.4.5. Автоантитела срещу C4 и комплексната оценка на ЛН (категиите) по BILAG Renal score.

Разпределението на пациентите с ЛН, изследвани за anti-C4, според категориите на ЛН по BILAG Renal score е описано в „5.2.4.5. Автоантитела срещу C1r и комплексната оценка на ЛН (категиите) по BILAG Renal score.”

При пациентите с ЛН от категория А по BILAG Renal score позитивните за anti-C4 са 10 (43,5%); при пациентите от категория В позитивни за anti-C4 са 6 (25,0%); при пациентите от категория С няма позитивни за anti-C4 и при пациентите от категория D позитивни за anti-C4 са 7 (36,8%). Средните нормализирани нива на anti-C4 при пациентите с различни категории по BILAG Renal score на ЛН са както следва: при категория А: $1,067 \pm 0,923$ (от 0,069 до 4,242); при категория В: $0,693 \pm 0,516$ (от 0,087 до 1,957); при категория С: $0,523 \pm 0,239$ (от 0,229 до 0,900) и при категория D: $0,972 \pm 0,829$ (от 0,100 до 3,299), както е показано на Фигура 5.4.6.



Фигура 5.4.6. Разпределение на пациентите с ЛН в зависимост от комплексната клиничко-лабораторна оценка на активността на ЛН по BILAG Renal score и нормализираните нива на anti-C4. Представени са средните нормализирани нива на anti-C4 в отделните категории.

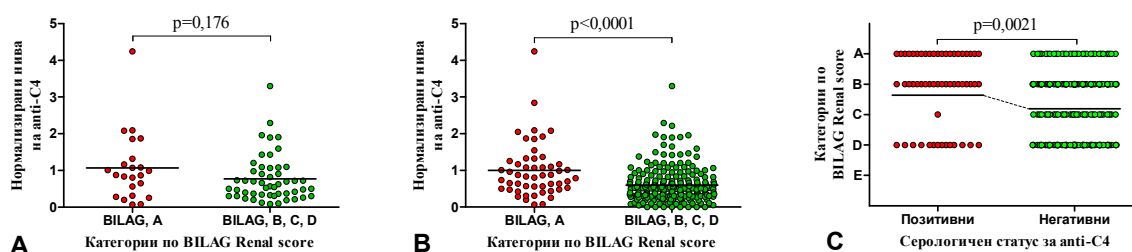
Въпреки известното намаляване на средните нормализирани нива на anti-C4 с намаляване на активността на ЛН по BILAG Renal score (в категориите от А до С), не установихме статистически значима разлика между нивата на anti-C4 при отделните групи от пациенти с ЛН, като също така липсва и статистически значима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

Сред пациентите, позитивни за anti-C4, с категория А по BILAG Renal score са 10 (43,5%), а пациентите с категории В и D са 13 (56,5%), като няма пациенти с категория С, докато при пациентите негативни за anti-C4, с категория А са 13 (25,5%), а тези с по-ниска категория (В, С и D) – 38 (74,5%). Въз основа на това разпределение установихме, че наличието на позитивни нива на anti-C4 няма статистически значимо влияние върху наличието на ЛН с категория А по BILAG Renal score (Fisher's exact test, $p=0,175$).

Сред всички изследвани в динамика проби от пациентите с ЛН, които са позитивни за anti-C4, пробите на пациенти от категория А по BILAG Renal score са 21 (37,5%), пробите на пациенти от категория В са 20 (35,7%), 1 (1,8%) е пробата от пациент с категория С, пробите на пациенти от категория D са 14 (25,0%). Сред негативните за anti-C4, пробите на пациенти от категория А по BILAG Renal score са 31 (14,8%), пробите на пациенти от категория В са 82 (39,0%), пробите на пациенти от категория С са 32 (15,2%), пробите на пациенти от категория D са 65 (31,0%). Въз основа на това разпределение установихме, че позитивният за anti-C4 серологичен

статус при пациентите с ЛН определя статистически значимо наличието на категория А по BILAG Renal score при изследваната група пациенти (Fisher's exact test, $p=0,0005$) с чувствителност от 40,4%, специфичност от 83,6%, позитивна предиктивна стойност от 37,5% и негативна предиктивна стойност от 85,2%. Релативният риск за наличие на ЛН от категория А по BILAG е 2,5.

Средното нормализирано ниво на anti-C4 при пациентите от категория А по BILAG Renal score е $1,067 \pm 0,923$ (от 0,069 до 4,242), а средното нормализирано ниво на anti-C4 при всички останали пациенти с ЛН (от категории В, С и D) е $0,770 \pm 0,637$ (от 0,087 до 3,299). Макар нивото на anti-C4 при пациентите от категория А да е сравнително по-високо от това при останалите пациенти (Фигура 5.4.7 А), тази разлика не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,176$). При сравнителен анализ на средните нормализирани нива на anti-C4 между всички изследвани в динамика проби от пациенти с категория А по BILAG Renal score ($0,997 \pm 0,746$ (от 0,069 до 4,242)) и тези с категории В, С и D ($0,602 \pm 0,484$ (от 0,000 до 3,299)) установихме статистически значимо по-високо ниво на anti-C4 в пробите от пациенти с категория А на ЛН (Mann-Whitney, $p<0,0001$) (Фигура 5.4.7 В). При сравнителен рангов анализ между пациентите позитивни за anti-C4 и пациентите негативните за anti-C4 (сред всички изследвани в динамика проби) установихме статистически по-висока средна и геометрична средна на ранговете (категиите по BILAG Renal score) при пациентите, позитивни за anti-C4 в сравнение със средната и геометричната средна на ранговете при пациентите, негативни за anti-C4 (Mann-Whitney, $p=0,0021$) (Фигура 5.4.7 С).



Фигура 5.4.7. Нормализирани нива на anti-C4 при пациенти с ЛН с категория А на ЛН по BILAG Renal score и при пациенти от останалите категории. **А.** При първоначално включените в проучването пациенти (Mann-Whitney, $p=0,176$). **В.** При всички изследвани в динамика проби. **С.** Категории на ЛН по BILAG Renal score при пациентите, в зависимост от статуса за anti-C4 (Mann-Whitney, $p=0,0021$).

При изследване на зависимостта между нормализираните нива на anti-C4 и категорията по BILAG Renal score (след квантифициране на категориите: категория А – 5; категория В – 4; категория С – 3; категория D – 2 и категория Е – 1 (в последната категория Е липсват пациенти) установихме липса на значима корелационна зависимост между нивата на anti-C4 и категорията по BILAG Renal score (Spearman, $r=0,08$; $p=0,251$).

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

С оглед диагностиката и оценката на имунологичната активност на ЛН при изследваните пациенти са определени плазмените нива на C4 компонента на комплемента, C3 компонента на комплемента, титрите на антинуклеарните антитела (ANA) и нивата на антителата срещу двойноверижна ДНК (anti-dsDNA).

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

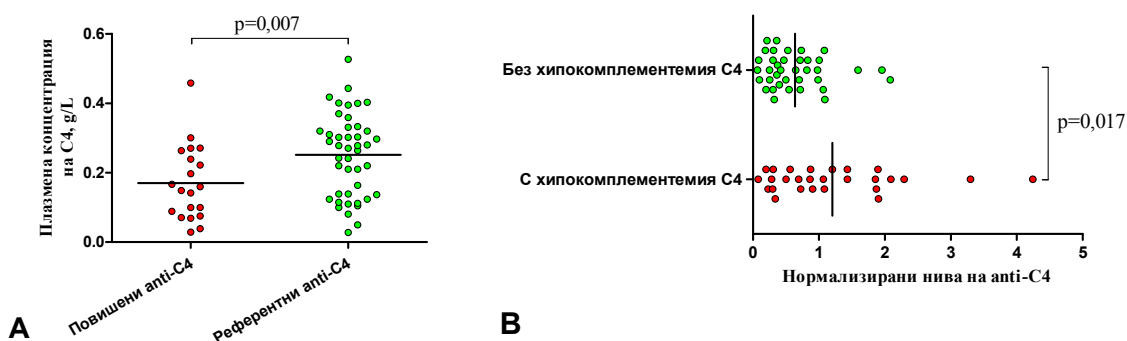
Сред пациентите с ЛН, включени в проучването ($N=74$), плазмените концентрации на C4 са изследвани при 64 (86,5%) пациенти, а плазмените концентрации на C3 – при 69 (93,2%) пациенти. Едновременно нивата на C4 и C3 са изследвани при 64 (86,5%) от пациентите с ЛН изходно включени в проучването.

Пациентите с ЛН, изследвани за anti-C4 с хипокомплементемия C4 са 27 (42,2%) от всички ($N=64$), при които са изследвани нивата на C4 изходно при включване в проучването, а пациентите с ЛН с хипокомплементемия C3 – 13 (18,8%) от всички ($N=69$), при които са изследвани нивата на C3 изходно при включване в проучването. Пациентите с хипокомплементемия едновременно за C4 и C3 са 12 (18,8%) от тези при които са изследвани едновременно C3 и C4.

Сред пациентите с ЛН с повишени нива на anti-C4, плазмени концентрации на C4 са изследвани при 20 (86,9%), като хипокомплементемия C4 установихме при 13 (65,0%) от тези 20 пациенти. Сред пациентите с референтни нива на anti-C4, плазмени концентрации на C4 са изследвани при 44 (86,3%), като хипокомплементемия C4 установихме при 14 (31,8%) от тези 44 пациенти. Въз основа на това разпределение

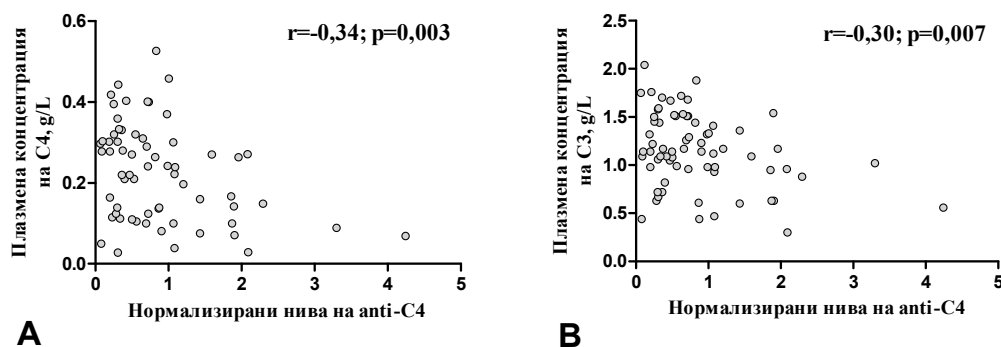
установихме статистически значимо влияние на наличието на позитивни anti-C4 върху наличието на хипокомплементемия C4 (Fisher's exact test, $p=0,016$).

Средната плазмена концентрация на C4 при пациентите с повишени anti-C4 е $0,171 \pm 0,108$ g/L, която е статистически значимо по-ниска от тази при пациентите с референтни нива на anti-C4 – $0,252 \pm 0,118$ g/L (Mann-Whitney, $p=0,007$), както е показано на Фигура 5.4.8 А. Средното нормализирано ниво на anti-C4 при пациентите с хипокомплементемия C4 е $1,205 \pm 0,995$, което е статистически значимо по-високо от средното нормализирано ниво на anti-C4 при пациентите без хипокомплементемия C4 – $0,637 \pm 0,483$ (Mann-Whitney, $p=0,017$), както е показано на Фигура 5.4.8 В.



Фигура 5.4.8. А. Плазмени концентрации на C4 при пациентите с ЛН в зависимост от серологичния статус по отношение на anti-C4: налице е статистически значимо по-ниска плазмена концентрация на C4 при пациентите с ЛН, позитивни за anti-C4 в сравнение с плазмената концентрация на C4 при пациентите с референтни нива на anti-C4 (Mann-Whitney, $p=0,007$). **В.** Нормализирани плазмени нива на anti-C4 при пациенти с ЛН в зависимост от наличието на хипокомплементемия C4: налице е статистически значимо по-високо ниво на anti-C4 при пациентите с хипокомплементемия C4 в сравнение с нивото при пациентите без хипокомплементемия C4 (Mann-Whitney, $p=0,017$).

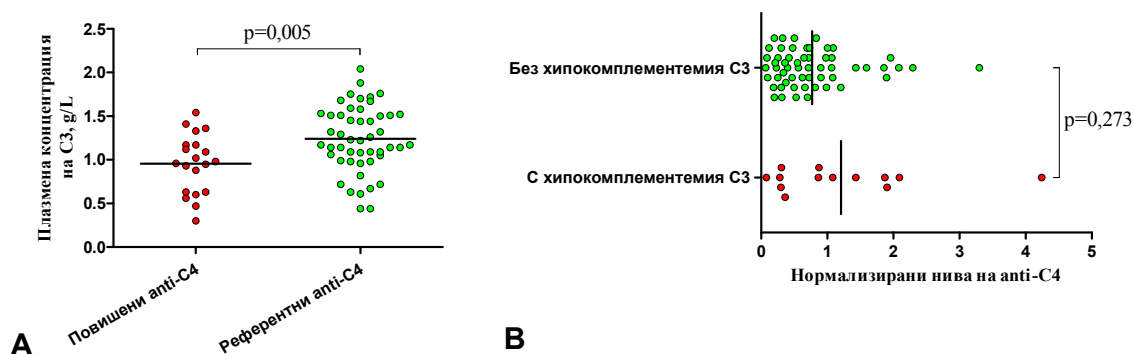
Зависимостта на хипокомплементемията за C4 от плазмените нива на anti-C4 потвърдихме и с корелационен анализ – налице е статистически значима отрицателна умерена по сила зависимост между нормализираните нива на anti-C4 и плазмените концентрации на C4 (Spearman, $r=-0,34$; $p=0,003$) (Фигура 5.4.9 А).



Фигура 5.4.9. А. Корелационна зависимост между нормализираното ниво на anti-C4 и плазмената концентрация на C4 (g/L) (Spearman, $r=-0,34$; $p=0,003$). **В.** Корелационна зависимост между нормализираното ниво на anti-C4 и плазмената концентрация на C3 (g/L) (Spearman, $r=-0,30$; $p=0,007$).

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

Средната плазмената концентрация на C3 при пациентите с повишени anti-C4 е $0,955 \pm 0,337$ g/L, която е статистически значимо по-ниска от тази при пациентите с референтни нива на anti-C4 – $1,240 \pm 0,377$ g/L (Mann-Whitney, $p=0,005$), както е показано на Фигура 5.4.10 А. Средното нормализирано ниво на anti-C4 при пациентите с хипокомplementемия C3 е $1,207 \pm 1,144$, което е сравнително по-високо, но без да се различава статистически значимо от средното ниво на anti-C4 при пациентите без хипокомplementемия C3 – $0,771 \pm 0,637$ (Mann-Whitney, $p=0,273$), както е показано на Фигура 5.4.10 В.



Фигура 5.4.10. А. Плазмени концентрации на C3 при пациентите с ЛН в зависимост от серологичния статус по отношение на anti-C4: налице е статистически значимо по-ниска плазмена концентрация на C3 при пациентите с ЛН, позитивни за anti-C4 в сравнение с плазмената концентрация на C3 при пациентите с референтни нива на anti-C4 (Mann-Whitney, $p=0,005$). **В.** Нормализирани плазмени нива на anti-C4 при пациенти с ЛН в зависимост от наличието на хипокомplementемия C3: налице е сравнително по-високо ниво на anti-C4 при пациентите с хипокомplementемия C3 в сравнение с нивото при пациентите без хипокомplementемия C3, макар и тази разлика да не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,273$).

Зависимостта на хипокомplementемията за C3 от плазмените нива на anti-C4 потвърдихме и с корелационен анализ – налице е статистически значима отрицателна слаба по сила зависимост между нормализираните нива на anti-C4 и плазмените концентрации на C3 (Spearman, $r=-0,30$; $p=0,007$) (Фигура 5.4.9 В).

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

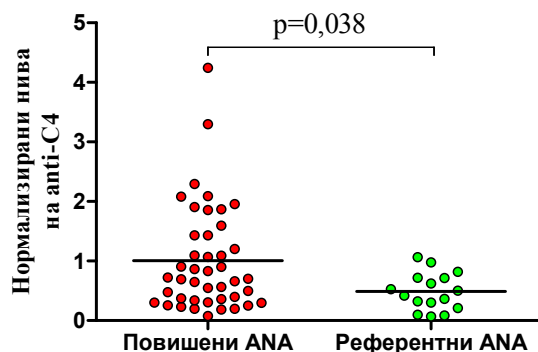
Сред пациентите с ЛН, които са изследвани за anti-C4, изходно включени в нашето проучване, ANA са изследвани при 59 (79,7%) и в общо 220 (82,7%) от всички изследвани проби. Патологично повишени титри на ANA ($>1:80$) установихме при 43 (72,9%) от първоначално изследваните за ANA и anti-C4 пациенти с ЛН и при 176 (80,0%) от всички изследвани за ANA и anti-C4 проби от пациенти с ЛН в динамика.

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

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

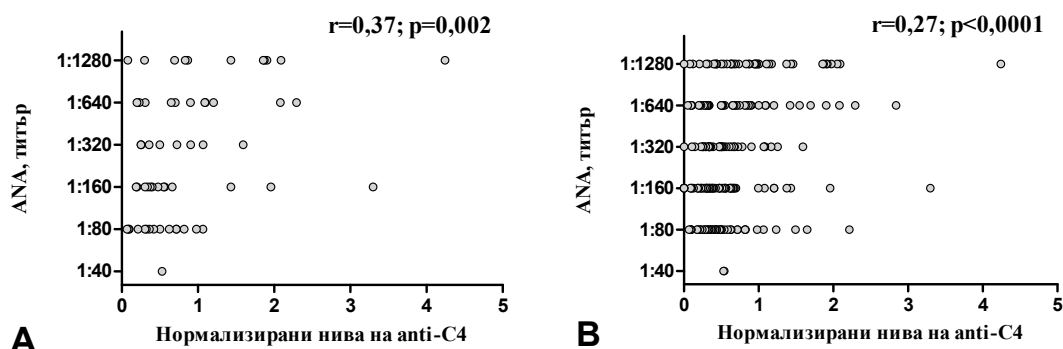
Сред всички изследвани в динамика по време на проучването пациенти с ЛН, пробите с повишени нива на anti-C4 и повишени титри на ANA са 40 (88,9% от всички проби с повишени нива на anti-C4, изследвани за ANA), а пробите с негативни anti-C4 и референтни титри на ANA са 39 (22,3% от всички негативни проби за anti-C4, изследвани за ANA). Въз основа на това разпределение установихме, че липсва статистически значимо влияние на наличието на повишени нива на anti-C4 върху наличието на повишени титри на ANA сред проследената в динамика група от пациенти с ЛН (Fisher's exact test, $p=0,142$).

Средното нормализирано ниво на anti-C4 при изходно изследваните пациенти с ЛН с патологично повишени титри на ANA е $1,007 \pm 0,885$ – статистически значимо по-високо от нивото на anti-C4 при пациентите с референтни титри на ANA, което е $0,489 \pm 0,311$ (Mann-Whitney, $p=0,038$) (Фигура 5.4.11).



Фигура 5.4.11. Нормализирани нива на anti-C4 при пациентите с патологично повишени титри на ANA и при тези с референтни титри на ANA. Налице е статистически значима разлика (Mann-Whitney, $p=0,038$).

Установихме наличие на статистически значима позитивна умерена по сила корелационна зависимост между нормализираното ниво на anti-C4 и титъра на ANA сред първоначално включените в проучването пациенти (Spearman, $r=0,37$; $p=0,002$) (Фигура 5.4.12 А) и на статистически значима позитивна слаба по сила корелационна зависимост между нормализираното ниво на anti-C4 и титъра на ANA сред всички изследвани в динамика пациенти (Spearman, $r=0,27$; $p<0,0001$) (Фигура 5.4.12 В).



Фигура 5.4.12. Корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C4 и титрите на ANA (Spearman, $r=0,37$; $p=0,002$) при изходно включените в проучването пациенти с ЛН (A) и при всички проследени в динамика пациенти с ЛН (Spearman, $r=0,27$; $p<0,0001$) (B).

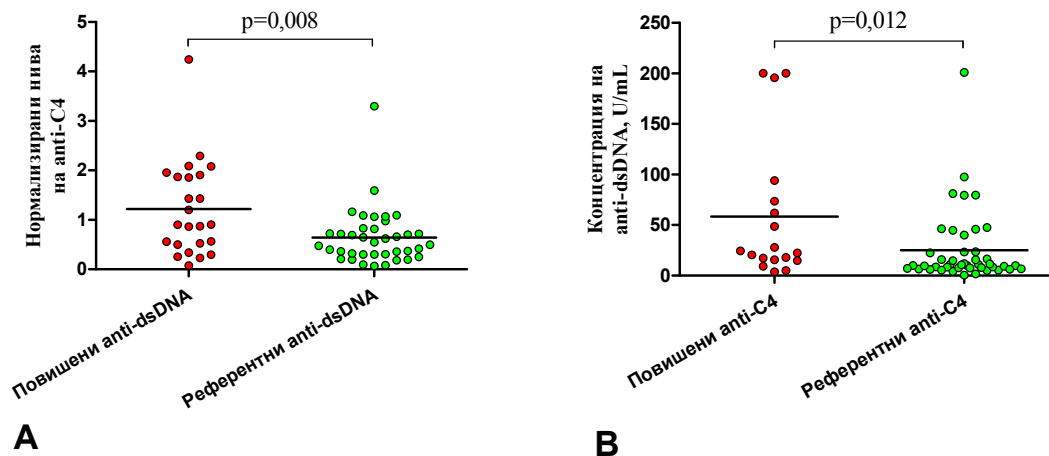
5.4.5.3. Автоантитела срещу C4 и автоантитела срещу двойноверижна ДНК (anti-dsDNA).

Сред пациентите с ЛН, изходно включени в нашето проучване и изследвани за anti-C4, anti-dsDNA са изследвани при 62 (83,8%) и в общо 224 (84,2%) от всички в динамика изследвани проби от пациенти с ЛН. Патологично повишени концентрации на anti-dsDNA (≥ 20 U/mL) установихме при 24 (38,7%) от първоначално изследваните за anti-dsDNA и anti-C4 пациенти с ЛН и при 121 (54,0%) от всички изследвани за anti-dsDNA и anti-C4 проби от пациенти с ЛН, проследени в динамика.

Пациентите, позитивни за anti-C4 с патологично повишени концентрации на anti-dsDNA са 11 (61,1% от позитивните за anti-C4 пациенти, при които са изследвани anti-dsDNA), а пациентите, негативни за anti-C4 и с референтни концентрации на anti-dsDNA са 31 (70,5% от негативните за anti-C4, при които са изследвани и anti-dsDNA). Въз основа на това разпределение установихме, статистически значимо влияние на наличието на патологично повишени нива на anti-C4 върху наличието на патологично повишени концентрации на anti-dsDNA (Fisher's exact test, $p=0,043$). При изследване на тази зависимост сред всички проследени в динамика проби от пациентите с ЛН установихме, че позитивните за anti-C4 с патологично повишени концентрации на anti-dsDNA проби от пациенти са 34 (73,9% от всички случаи, които са позитивни за anti-C4, при които са изследвани и anti-dsDNA), а негативните за anti-C4, които са с

референтни концентрации на anti-dsDNA са 91 (51,1% от всички негативни за anti-C4, при които са изследвани и anti-dsDNA). Въз основа на това разпределение установихме статистически значимо влияние на наличието на повишени нива на anti-C4 върху наличието на патологично повишени концентрации на anti-dsDNA сред всички, изследвани в динамика за anti-C4 и anti-dsDNA проби от пациенти с ЛН (Fisher's exact test, $p=0,003$).

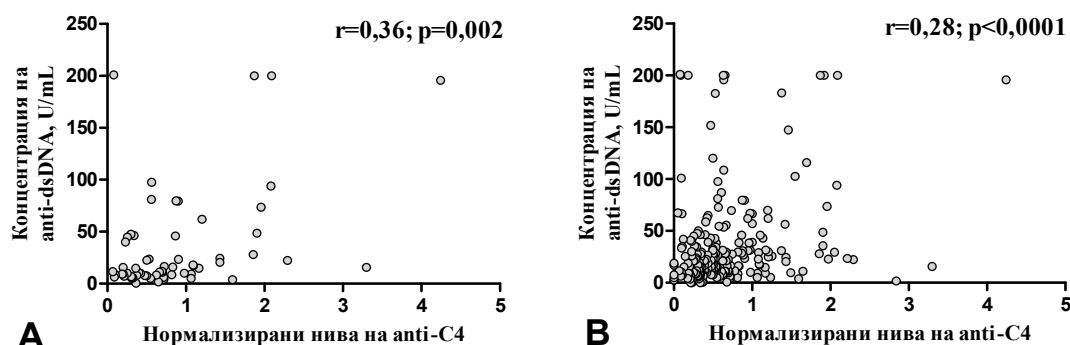
Средното нормализирано ниво на anti-C4 при изходно изследваните пациенти с ЛН с патологично повишени концентрации на anti-dsDNA е $1,219 \pm 0,953$, което е статистически значимо по-високо от средното ниво на anti-C4 при пациентите с референтни концентрации на anti-dsDNA, което е $0,644 \pm 0,568$ (Mann-Whitney, $p=0,008$) (Фигура 5.4.13 А). При пациентите с патологично повишени нива на anti-C4, средната концентрация на anti-dsDNA е $58,54 \pm 68,89$ U/mL, която е статистически значимо по-висока от средната концентрация на anti-dsDNA при пациентите с референтни нива на anti-C4 ($25,16 \pm 36,07$ U/mL) (Mann-Whitney, $p=0,012$) (Фигура 5.4.13 В).



Фигура 5.4.13. А. Нормализирани нива на anti-C4 при пациенти с повишени и при такива с референтни концентрации на anti-dsDNA, налице е статистически значима разлика в нивата (Mann-Whitney, $p=0,008$). **В.** Концентрации на anti-dsDNA при пациенти с патологично повишени и с референтни нива на anti-C4, налице е статистически значима разлика (Mann-Whitney, $p=0,012$).

Статистически значимата връзка между нивата на anti-C4 и концентрациите на anti-dsDNA потвърдихме и с корелационен анализ, който показва наличие на позитивна

умерена по сила корелационна зависимост между двете при пациентите с ЛН първоначално включени в проучването (Spearman, $r=0,36$; $p=0,002$), а така също и позитивна слаба корелационна зависимост при всички проследени в динамика проби от пациенти с ЛН (Spearman, $r=0,28$; $p<0,0001$) (Фигура 5.4.14 А и В).



Фигура 5.4.14. А. Корелационна зависимост между нормализираното ниво на anti-C4 и концентрацията на anti-dsDNA (U/mL) при изходно включените в проучването пациенти с ЛН (Spearman, $r=0,36$; $p=0,002$). **В.** Корелационна зависимост между нормализираното ниво на anti-C4 и концентрацията на anti-dsDNA (U/mL) при всички проби от пациенти с ЛН, проследени в динамика (Spearman, $r=0,28$; $p<0,0001$).

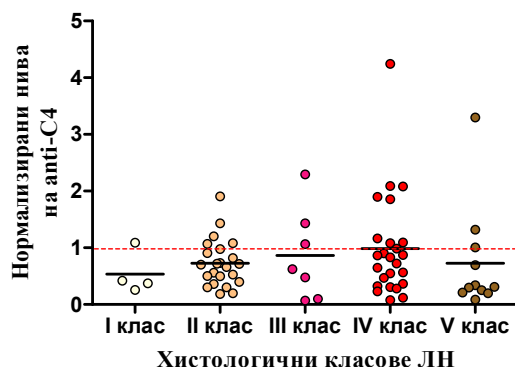
5.4.6. Автоантитела срещу C4 и някои хистологични признаци на ЛН.

Пациентите с ЛН, са диагностицирани с провеждане на пункционна бъбречна биопсия, като хистологична диагноза е налична при 71 (95,9%) от включените в проучването пациенти, при които са изследвани anti-C4. Разпределението на пациентите въз основа на хистологичния клас на ЛН е показано в „5.2.6. Автоантитела срещу C1g и някои хистологични признаци на ЛН.“. И тук, с оглед клинична достоверност на изследваните зависимости, когато са изследвани връзки, касаещи белези на хистологична активност на ЛН, при статистическите анализи са отчитани само случаите, при които времето между вземането на кръвните проби за изследване на anti-C4 и провеждането на пункционната бъбречна биопсия е било до 12 месеца. Това условие е изпълнено при 27 (38,0%) от пациентите с ЛН, включени в проучването.

5.4.6.1. Автоантитела срещу C4 и хистологичният клас на ЛН.

При пациентите с I хистологичен клас ЛН позитивен за anti-C4 е 1 (25,0%) пациент; при тези с II хистологичен клас ЛН позитивни са 5 (21,7%) пациенти; при тези с III хистологичен клас ЛН позитивни са 3 (42,9%) пациенти; при тези с IV хистологичен клас ЛН позитивни са 8 (32,0%) пациенти; при тези с V хистологичен клас ЛН позитивни са 3 (27,3%) пациенти; пациентът с VI хистологичен клас ЛН е позитивен; при останалите 3 пациенти, при които не е провеждано хистологично уточняване на ЛН 2 са позитивни и 1 е с референтно ниво на anti-C4. Средните нормализирани нива на anti-C4 са съответно (Фигура 5.4.15): при пациентите с I хистологичен клас: $0,535 \pm 0,377$; при пациентите с II хистологичен клас: $0,729 \pm 0,416$; при пациентите с III хистологичен клас: $0,866 \pm 0,799$; при пациентите с IV хистологичен клас: $0,985 \pm 0,901$; при пациентите с V хистологичен клас: $0,726 \pm 0,934$ и нормализираното ниво при пациента с VI хистологичен клас е 1,957 (не е отразен на Фигура 5.4.15).

Не установихме статистически значима разлика между нивата на anti-C4 при отделните хистологични класове ЛН, въпреки че най-високите нива са при III и IV хистологичен клас, като също така липсва и статистически значима зависимост между тези нива и поредността на отделните хистологични класове ЛН, въпреки че с нарастване на хистологичния клас от I до IV нараства и средното ниво на anti-C4 (One-way ANOVA, $p=0,675$; Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$; Post test for linear trend, $p=0,476$).



Фигура 5.4.15. Нива на anti-C4 в зависимост от хистологичния клас на ЛН. Не се установиха статистически значима зависимост между нивата на anti-C4 и класа ЛН, както и разлика между нивата на anti-C4 при различните класове ЛН (One-way ANOVA, $p=0,675$; Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$; Post test for linear trend, $p=0,476$).

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

5.4.6.2. Автоантитела срещу C4 и основни хистологични лезии за активност и хроничност на ЛН.

В настоящото проучване изследвахме зависимостите между нивата на anti-C4 и хистологични белези на активност (ендокапилярна пролиферация, гломерулна левкоцитна инфилтрация, субендотелни депозити („телени бримки”), фибриноидна некроза и/или кариорексис, клетъчни полулуния и интерстициална инфилтрация) и хистологични белези на хроничност (гломерулна склероза, фиброзни полулуния, тубулна атрофия и интерстициална фиброза), както и връзката между нивата на anti-C4 и хистологичните индекси на активност и хроничност, определени на базата на горепосочените хистологични белези (Вижте “IV. Материали и методи”, Таблица 4.1). В анализите са включени само пациентите с ЛН, при които времето между вземане на

пробата за изследване на anti-C4 и провеждане на пункционната бъбречна биопсия е било до 12 месеца (при 27 (38,0%) от хистологично диагностицираните пациенти, изследвани за anti-C4).

Таблица 5.4.2. Сравнителен анализ между нивата на anti-C4 при наличие и липса на хистологични белези за активност и хроничност при пациентите с ЛН. Представени са средните нива $\pm$ стандартното отклонение (SD).

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

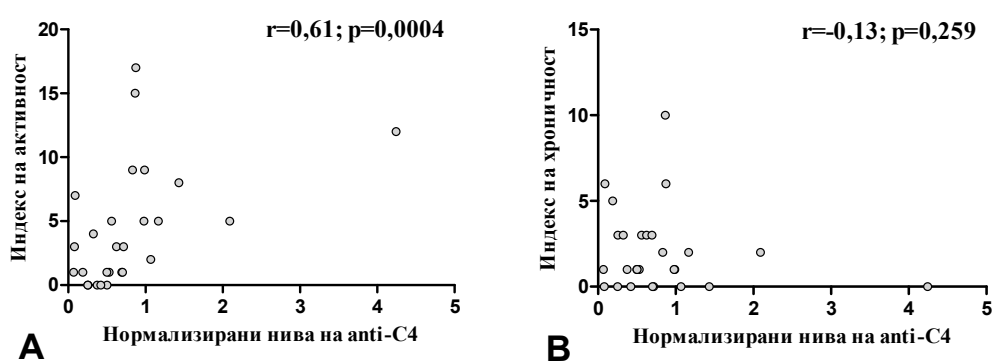
¹ В групата с гломерулна левкоцитна инфилтрация попадат само 2 пациенти и данните от статистическия анализ не са достоверни.

На Таблица 5.4.2 са показани данните от сравнителния анализ между нивата на anti-C4 в групите с и без съответните хистологични признаци за активност и хроничност на ЛН. При пациентите с наличие на хистологични признаци за активност на ЛН, като ендокапилярна пролиферация и субендотелни депозити, формиращи телени бримки, нивата на anti-C4 при наличие на тези признаци са статистически значимо по-високи от нивата при липса на признаците (Mann-Whitney, съответно $p=0,025$ и $p=0,0025$). При наличие на фибриноидна некроза и клетъчни полулуния нивата на anti-C4 са сравнително по-високи в сравнение с нивата при отсъствие на тези белези за активност, но разликите не са статистически значими. При наличие на интерстициална инфилтрация нивото на anti-C4 е сравнително по-ниско от нивото при отсъствие на този признак, но разликата не е статистически значима. При пациентите с наличие на хистологични признаци за хроничност на ЛН, като гломерулна склероза, тубулна атрофия и интерстициална фиброза, нивата на anti-C4 са сравнително по-ниски в сравнение с нивата при отсъствие на тези белези, но разликите не са статистически значими. При пациентите с наличие на фиброзни полулуния нивата на anti-C4 са сравнително по-високи от нивата при отсъствие на този белег, но разликата не е

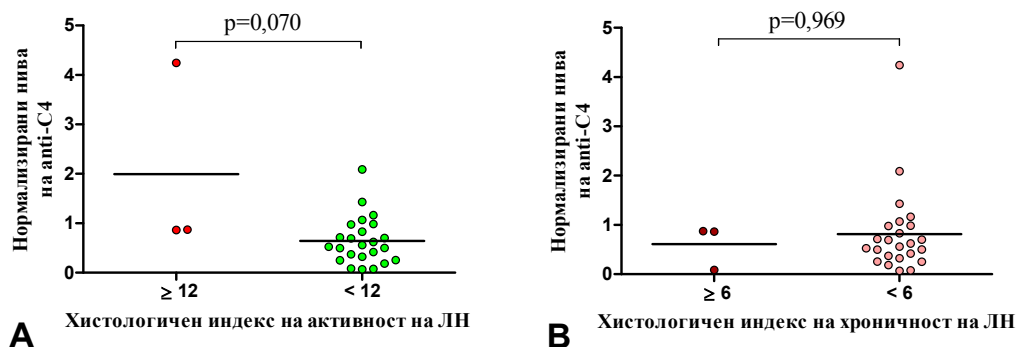
статистически значима. При двамата пациенти с наличие на гломерулна левкоцитна инфилтрация нормализираните нива на anti-C4 са съответно 4,242 и 1,433 (позитивни за anti-C4).

При изследване връзката между нивата на anti-C4 и хистологичния индекс на активност на ЛН установихме наличие на статистически значима позитивна умерено силна корелационна зависимост (Spearman, $r=0,61$; $p=0,0004$) (Фигура 5.4.16 А). Не се установи значима корелационна зависимост между нормализираните нива на anti-C4 и хистологичния индекс на хроничност при пациентите с ЛН (Spearman, $r=-0,13$; $p=0,259$) (Фигура 5.4.16 В).

Установихме, че средното нормализирано ниво на anti-C4 при пациентите с хистологичен индекс на активност на ЛН ≥ 12 ($1,994 \pm 1,947$), е сравнително по-високо от това при пациентите с хистологичен индекс на активност под 12 ($0,642 \pm 0,476$), но липсва статистически значима разлика между нивата в двете групи пациенти с ЛН (Mann-Whitney, $p=0,070$) (Фигура 5.4.17 А). Средното нормализирано ниво на anti-C4 при пациентите с хистологичен индекс на хроничност на ЛН ≥ 6 ($0,609 \pm 0,452$) е сравнително по-ниско от това при пациентите с индекс на хроничност на ЛН < 6 ($0,816 \pm 0,863$), но отново липсва статистически значима разлика между нивата в двете групи пациенти с ЛН (Mann-Whitney, $p=0,969$) (Фигура 5.4.17 В).



Фигура 5.4.16. А. Корелационен анализ на връзката между нормализираните нива на anti-C4 и хистологичния индекс на активност при пациентите с ЛН. Налице е статистически значима позитивна умерена по сила корелационна зависимост (Spearman, $r=0,61$; $p=0,0004$). **В.** Корелационен анализ на връзката между нормализираните нива на anti-C4 и хистологичния индекс на хроничност при пациентите с ЛН. Липсва статистически значима корелационна зависимост (Spearman, $r=-0,13$; $p=0,259$).



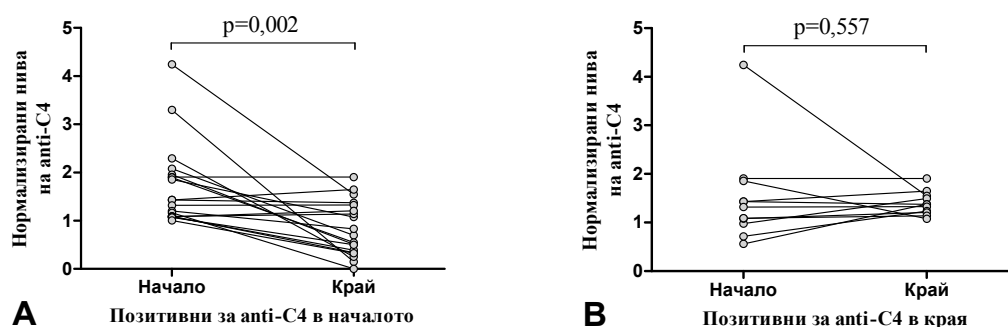
Фигура 5.4.17. Нормализирани нива на anti-C4 при пациенти с ЛН според хистологичните индекси на активност (A) и на хроничност (B).

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

При 52 (70,3%) от пациентите с ЛН, е налице проследяване за период от средно 13,0 (от 6,0 до 25,0) месеца, с между 2 и 11 проби, при които са определяни нивата на anti-C4 и останалите клинично-лабораторни и имунологични параметри на ЛН.

Сред изследваните в динамика общо 266 проби от кръвни плазми на пациентите с ЛН установихме патологично повишени нива на anti-C4 при 56 (21,1%) от пробите (Фигура 5.4.2). Изследвайки нивата на anti-C4 при проследените в динамика пациенти (с 2 и повече проби в хода на проучването при 52 пациенти с ЛН), установихме, че при първите проби, патологично повишени anti-C4 има при 19 (36,5%) от пациентите, докато след среден период на проследяване от 13 месеца, патологично повишени нива на anti-C4 са налице при 11 (21,2%) от пациентите. При 11 (57,9%) от пациентите с първоначално повишени нива на anti-C4, последните намаляват до референтни стойности, а при 8 (42,1%) от тези пациенти нивата се задържат в патологични граници. Сред пациентите с патологични anti-C4 на 13 месец от проследяването, при 8 (72,7%) нивата са били патологични от началото, а при 3 (27,3%) нарастват от изходно референтни. Средното нормализирано ниво на anti-C4 при пациентите, позитивни за anti-C4 в началото, е $1,711 \pm 0,846$ (от 1,004 до 4,242), докато след среден период от 13 месеца е $0,830 \pm 0,561$ (от 0,000 до 1,905), като е налице статистически значима разлика между тези две нива (Wilcoxon signed rank test, $p=0,002$) (Фигура 5.4.18 A). Средното нормализирано ниво на anti-C4 при позитивните в края на периода на проследяване

пациенти с ЛН е $1,394 \pm 0,243$ (от 1,078 до 1,905), статистически незначимо по-ниско от средното ниво на anti-C4 на същите тези пациенти в началото на проследяването, когато то е било $1,510 \pm 0,999$ (от 0,558 до 4,242) (Wilcoxon signed rank test, $p=0,557$) (Фигура 5.4.18 В).



Фигура 5.4.18. Динамика на нивата на anti-C4 при позитивните в началото на периода на проследяване (А) и при позитивните в края на периода на проследяване (В) пациенти с ЛН. (Wilcoxon signed rank test).

Сред проследяваните с повече от 1 проба пациенти с ЛН, при които са изследвани anti-C4, при първото изследване с активна ЛН са били 21 (40,4%), в състояние на частична ремисия на ЛН са били 15 (28,8%) и в състояние на пълна ремисия на ЛН са били 16 (30,8%). В края на проследяването с активна ЛН са били 14 (27,0%), в състояние на частична ремисия на ЛН са били 19 (36,5%) и в състояние на пълна ремисия на ЛН са били 19 (36,5%). При първото изследване, с категория А на ЛН по BILAG Renal score са били 18 (34,6%), с категория В – 18 (34,6%), с категория С – 4 (7,7%) и с категория D – 12 (23,1%). В края, разпределението на пациентите в категории на ЛН по BILAG Renal score е следното: с категория А – 6 (11,5%), с категория В – 24 (46,2%), с категория С – 5 (9,6%) и с категория D – 17 (32,7%).

5.4.7.1. Прогностично значение на автоантителата срещу C4.

При 42 (56,8%) от изходно включените в проучването пациенти с ЛН, при които са провеждани 3 или повече проби за anti-C4 в динамика, изследвахме връзките между нивата на anti-C4 и категорията по BILAG Renal score (Фигура 5.4.19) и нивата на anti-C4 и активността на ЛН, определена като активна, частична ремисия и пълна ремисия

на нефропатията (Фигура 5.4.20). Повишаване на anti-C4 до патологични нива поне в една от пробите установихме при 25 (59,5%) от пациентите.

Само при 6 пациенти установихме статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-C4 и категорията по BILAG (CIS, $r=0,87$; $p=0,042$; GSK, $r=1,00$; $p<0,0001$; JDJ, $r=0,79$; $p=0,018$; JTH, $r=0,79$; $p=0,017$; SMM, $r=0,65$; $p=0,042$; VSD, $r=0,75$; $p=0,011$), както и само при 1 – статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-C4 и активността на ЛН (VSD, $r=0,75$; $p=0,011$) при прилагане на непараметричен корелационен анализ (Spearman, one-tailed).

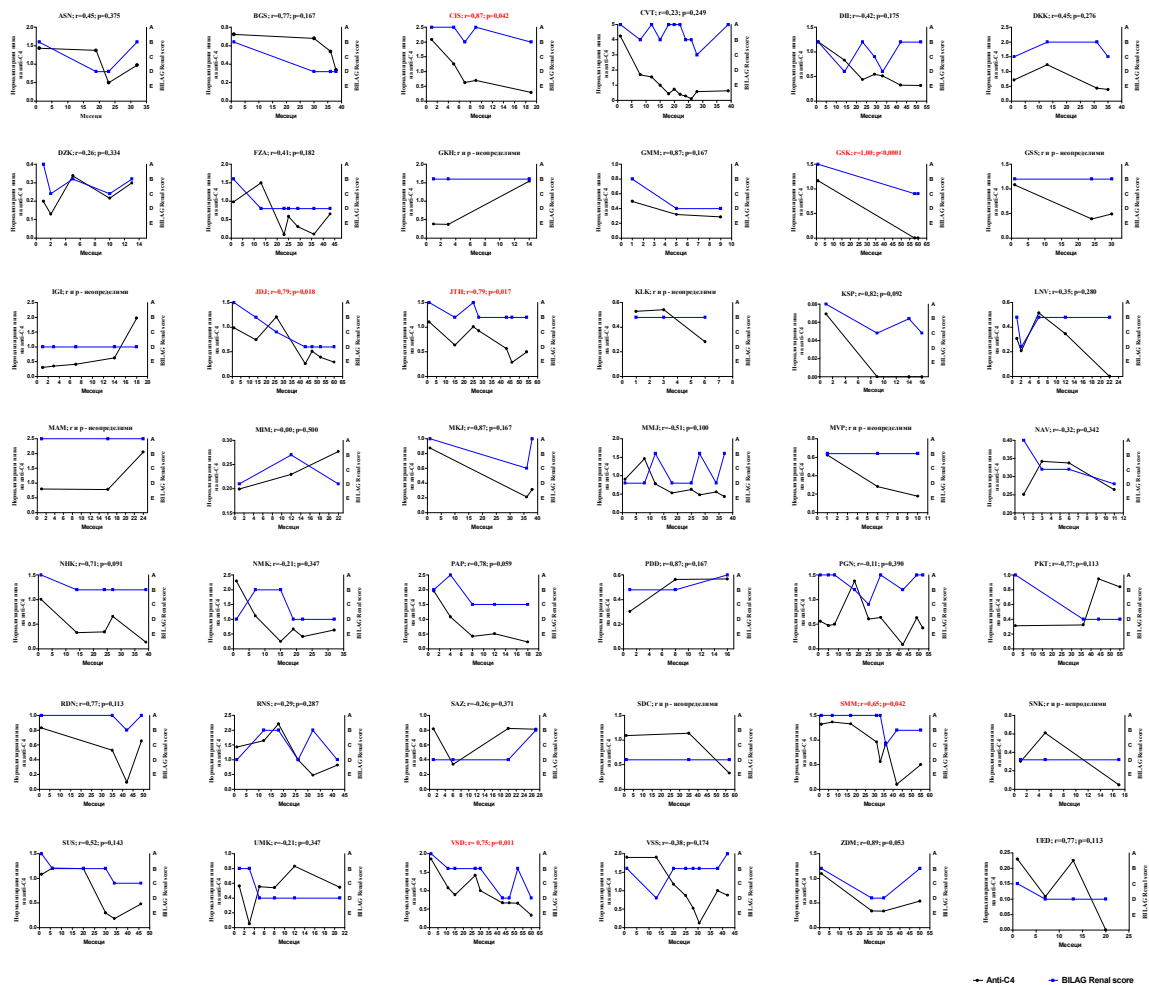
Пациентите с ЛН, при които отчетохме в динамика повишение на нивата на anti-C4 до патологични стойности с последващо повишение на категорията по BILAG са 13 (68,4% от всички, при които се установи повишаване на anti-C4 до патологични стойности в динамика). Това повишение на категорията по BILAG Renal score на ЛН се отчете в рамките на среден период от 3,4 (от 0,0 до 13,0) месеца след повишаване на нивата на anti-C4 до патологични стойности. Пациентите, при които не се отчете повишаване на нивата на anti-C4 до патологични стойности и не се отчете повишение на категорията по BILAG Renal score са 18 (78,3% от всички, при които не се отчете повишаване на anti-C4 до патологични нива). Разпределението на пациентите с ЛН според наличието или липсата на повишение на нивата на anti-C4 до патологични стойности и според наличието или липсата на повишение на категорията на ЛН по BILAG Renal score е показано на Таблица 5.4.3.

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

Таблица 5.4.3. Разпределение на пациентите с ЛН, проследявани в динамика с 3 и повече проби по време на проучването, според наличието или липсата на повишение на нивата на anti-C4 до патологични стойности и наличието или липсата на последващо повишение на категорията на ЛН по BILAG Renal score.

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

Пациентите, при които в динамика anti-C4 нарастват до патологични нива, заедно с последващо активиране на ЛН са 13 (72,2% от всички, при които се установи в динамика повишаване на anti-C4 до патологични стойности). Пациентите, при които не се отчете повишаване на нивата на anti-C4 до патологични стойности и не се отчете активиране на ЛН (преминаване от пълна в частична ремисия или от частична ремисия в активна ЛН) са 14 (58,3% от всички, при които не се отчете повишаване на anti-C4 до патологични нива). Разпределението на пациентите с ЛН според наличието или липсата на повишение на нивата на anti-C4 до патологични стойности и според наличието или липсата на активиране на ЛН е показано на Таблица 5.4.4.



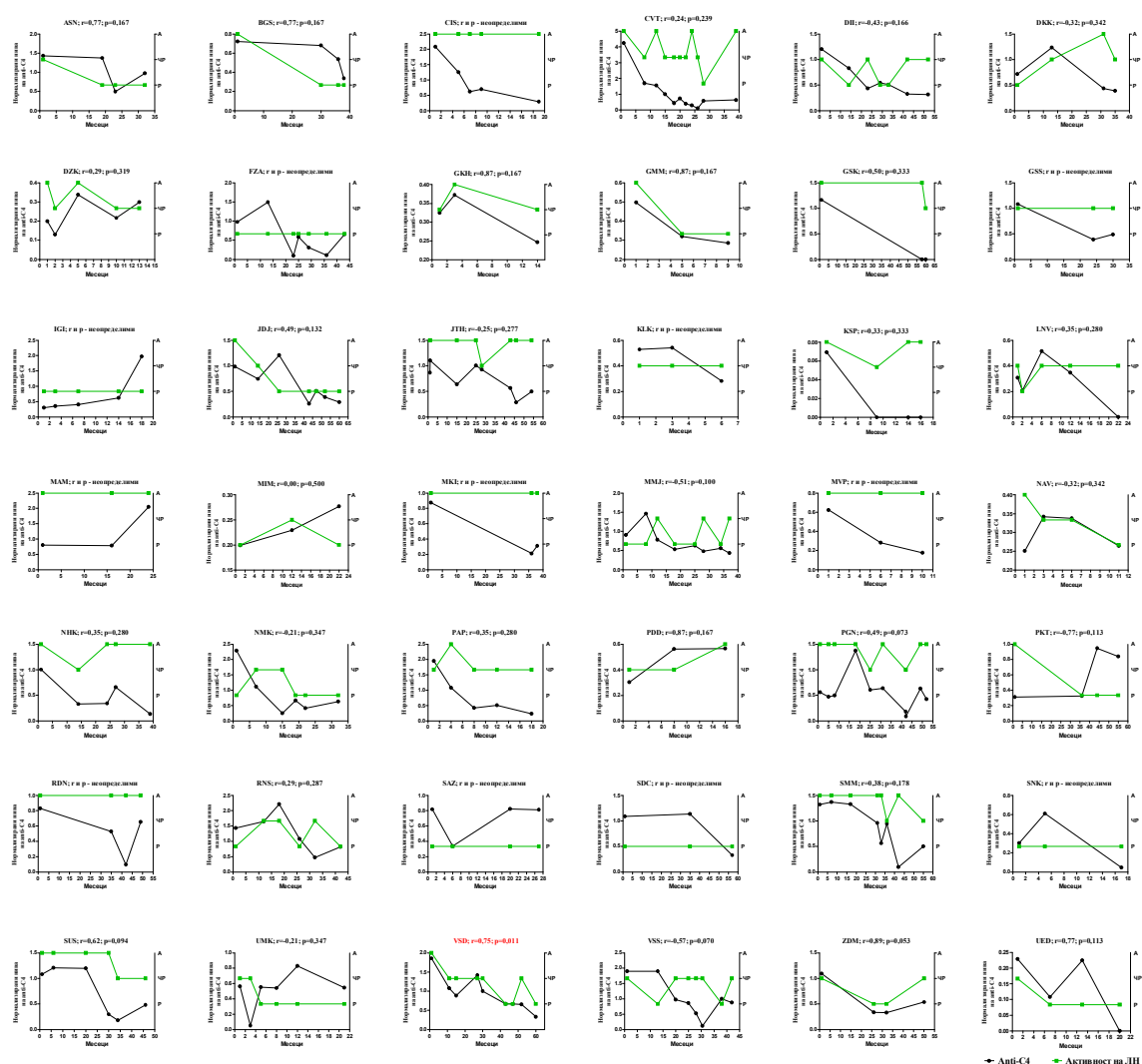
Фигура 5.4.19. Динамика на нормализираните нива на anti-C4 (в черно, по лява ордината на графиките) и категорията по BILAG Renal score (в синьо, по дясна ордината на графиките) при пациентите, проследени с 3 и повече проби. Само при 6 пациенти (обозначени в червено) се установи статистически значима корелационна връзка (Spearman, one-tailed) между нивата на anti-C4 и категорията по BILAG Renal score.

Таблица 5.4.4. Разпределение на пациентите с ЛН, проследявани в динамика с 3 и повече проби по време на проучването, според наличието или липсата на повишение на нивата на anti-C4 до патологични стойности и наличието или липсата на активиране на ЛН.

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

Въз основа на това разпределение установихме, че повишението на anti-C4 до

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



Фигура 5.4.20. Динамика на нормализираните нива на anti-C4 (в черно, по лява ордината на графиките) и активността на ЛН (активна ЛН - А, частична ремисия на ЛН – ЧР и пълна ремисия на ЛН – Р) (в зелено, по дясна ордината на графиките) при пациентите, проследени с 3 и повече проби. Само при 1 пациент (обозначен в червено) се установи статистически значима корелационна връзка между нивата на anti-C4 и активността на ЛН.

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

Средното нормализирано ниво на anti-C4 при пациенти с ЛН в началото на периода на проследяване е $0,967 \pm 0,789$ (от 0,069 до 4,242) докато в края на среден период от 13 месеца на проследяването и лечение е $0,615 \pm 0,471$ (от 0,000 до 1,905), като разликата е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,002$).

С оглед динамичното проследяване на нивата на anti-C4 във връзка с основните клиничко-лабораторни и имунологични показатели при пациентите с ЛН определихме промяната на нивата на anti-C4 като процент ($\Delta N\%$) спрямо изходното ниво при първото изследване, по долупосочената формула (аналогично на изследването за anti-C1q, anti-C1r и anti-C1s), където: N_1 е нормализираното ниво на anti-C4 при първата проба на пациента в началото на проучването; N_x е нормализираното ниво на anti-C4 в крайното изследване (след среден период от 13 месеца на проследяване и лечение):

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

5.4.7.2.1. Динамика на автоантителата срещу C4 и протеинурията.

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

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

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

След прилагане на непараметричен корелационен анализ, не установихме статистически значима зависимост между промяната на нивата на anti-C4 ($\Delta N\%$) и промяната на протеинурията ($\Delta PU\%$) (Spearman, $r=0,05$; $p=0,359$).

При пациентите с нарастване на протеинурията спрямо изходната, средното нормализирано ниво на anti-C4 в края на периода на проследяване е $0,676 \pm 0,525$, статистически незначимо по-високо от нивото на anti-C4 при пациентите, при които отчетохме намаление на протеинурията спрямо изходната, което е $0,588 \pm 0,440$ (Mann-Whitney, $p=0,537$).

Липсва статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-C4 и протеинурията при всички изследваните в динамика проби от пациентите с ЛН (Spearman, $r=-0,04$; $p=0,256$, Фигура 5.4.21 A1). Сред всички проби от пациентите с ЛН, които някога са имали екстраренални прояви на СЛЕ, също не установихме статистически значима корелация между нормализираните нива на anti-C4 и протеинурията (Spearman, $r=0,01$; $p=0,449$, Фигура 5.4.21 A2). При пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ също установихме липса на статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-C4 и протеинурията (Spearman, $r=-0,19$; $p=0,093$, Фигура 5.4.21 A3).

5.4.7.2.2. Динамика на автоантителата срещу C4 и бъбречната функция.

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

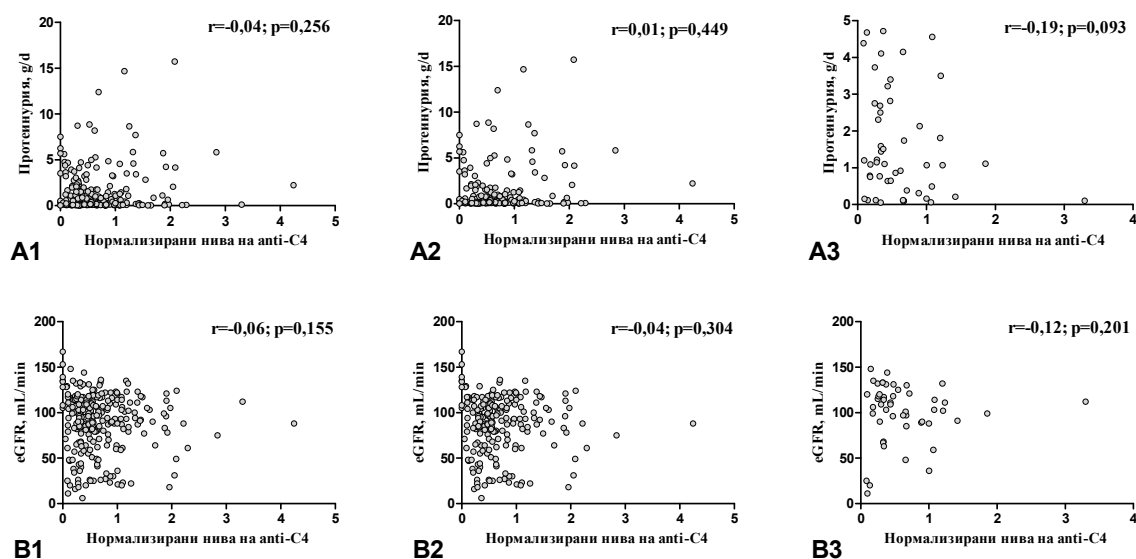
Аналогично на горепосоченото, определихме промяната на eGFR (Δ GFR) спрямо изходната GFR при пациентите, изследвани за anti-C4 (GFR_1 – GFR при първото изследване (mL/min); GFR_x – GFR при изследването след среден период на проследяване от 13 месеца (mL/min)):

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

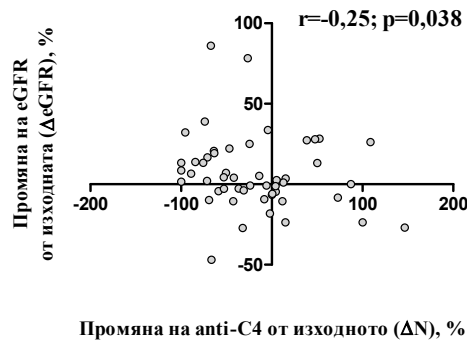
Установихме статистически значима отрицателна слаба корелационна зависимост между промяната на нормализираното ниво на anti-C4 спрямо изходното ($\Delta N\%$) и промяната на eGFR спрямо изходната (Δ eGFR) за среден период от 13 месеца при пациентите с ЛН (Spearman, $r=-0,25$; $p=0,038$) (Фигура 5.4.22).

При пациентите с нарастване на eGFR спрямо изходната, средното нормализирано ниво на anti-C4 в края на периода на проследяване е $0,506 \pm 0,421$, което е статистически незначимо по-ниско от средното ниво при пациентите, при които eGFR намалява в края на периода на проследяване, което е $0,773 \pm 0,513$ (Mann-Whitney, $p=0,051$).

Не установихме статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-C4 и eGFR при всички изследвани в динамика проби от пациентите с ЛН (Spearman, $r=-0,06$; $p=0,155$, Фигура 5.4.21 B1). Сред всички проби от пациентите с ЛН, които някога са имали екстраренални прояви на СЛЕ, също не установихме значима корелация между нормализираните нива на anti-C4 и eGFR (Spearman, $r=-0,04$; $p=0,304$, Фигура 5.4.21 B2). При пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ също не установихме значима корелация между нивата на anti-C4 и eGFR (Spearman, $r=-0,12$; $p=0,201$, Фигура 5.4.21 B3).



Фигура 5.4.21. Липса на статистически значими корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C4 и протеинурията и anti-C4 и изчислената скорост на гломерулна филтрация (eGFR) при всички изследвани в динамика проби от пациенти с ЛН (A1 и B1); при пробите, изследвани в динамика от пациенти с ЛН с екстраренални прояви на СЛЕ (A2 и B2) и при всички изследвани проби от пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ (A3 и B3) (Spearman, one-tailed).



Фигура 5.4.22. Корелационна зависимост между промяната на anti-C4 ($\Delta N\%$) и промяната на eGFR за среден период на проследяване от 13 месеца при пациентите с ЛН (Spearman, $r=-0,25$; $p=0,038$).

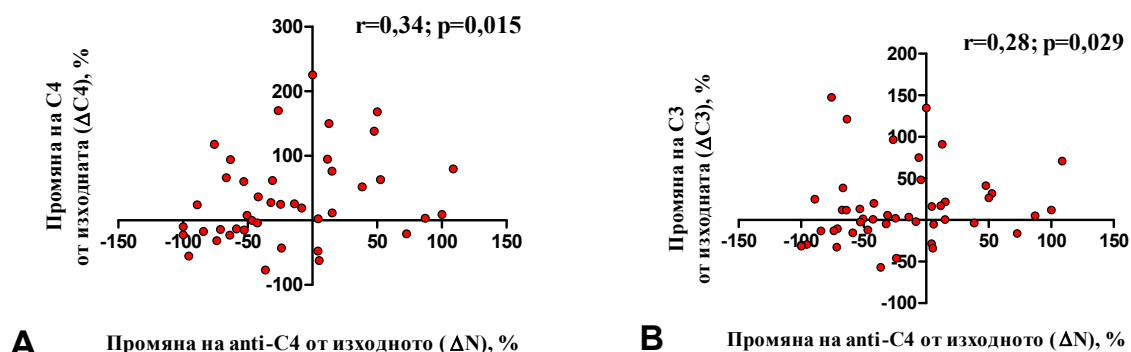
5.4.7.2.3. Динамика на автоантителата срещу C4 и компонентите на комплемента C4 и C3.

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

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

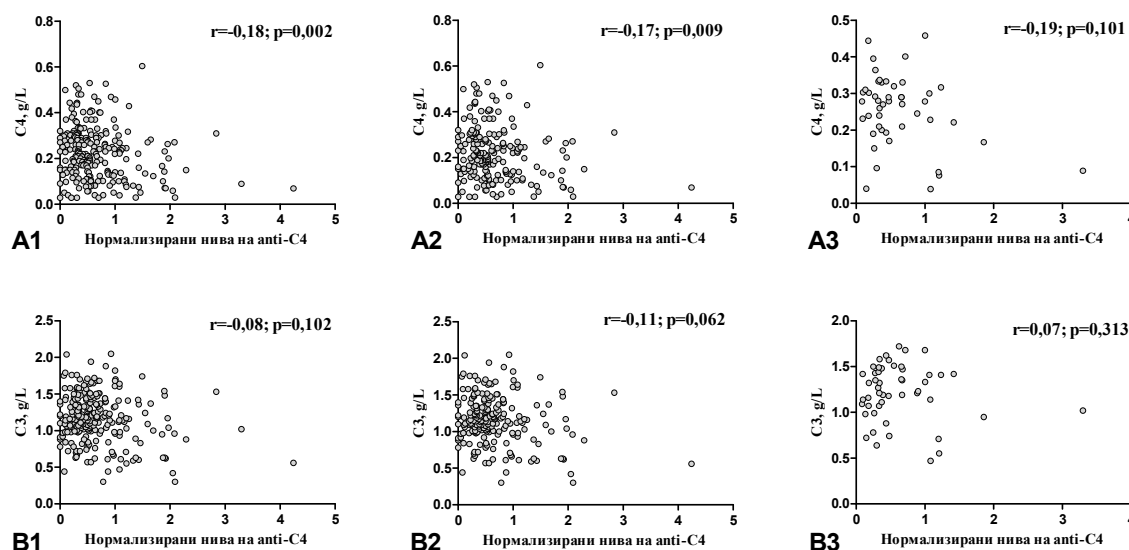
$$\Delta C = \frac{C_x - C_1}{C_1} \times 100\%.$$

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



Фигура 5.4.23. **A.** Корелационна зависимост между промяната на нормализираното ниво на anti-C4 ($\Delta N\%$) и промяната на плазмената концентрация на С4 ($\Delta C4\%$) за период от 13 месеца при пациентите с ЛН (Spearman, $r=0,34$; $p=0,015$). **B.** Корелационна зависимост между промяната на нормализираното ниво на anti-C4 ($\Delta N\%$) и промяната на плазмената концентрация на С3 ($\Delta C3\%$) за период от 13 месеца при пациентите с ЛН (Spearman, $r=0,28$; $p=0,029$).

При изследване на зависимостите между нивата на anti-C4 и плазмените концентрации на С4 и С3 установихме, че сред всички пациенти с ЛН, изследвани в динамика и сред пациентите с ЛН и екстраренални прояви на СЛЕ съществува статистически значима отрицателна слаба корелационна зависимост между нивото на anti-C4 и плазмената концентрация на С4 (Spearman, съответно: $r=-0,18$; $p=0,002$ и $r=-0,17$; $p=0,009$) (Фигура 5.4.24 A1 и A2), като липсва статистически значима корелация между нивата на anti-C4 и концентрацията на С4 само сред пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=-0,19$; $p=0,101$, Фигура 5.4.24 A3). Установихме липса на корелационни зависимости между нивата на anti-C4 и концентрациите на С3 сред всички пациентите с ЛН, сред тези с ЛН и екстраренални прояви на СЛЕ и сред пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, съответно: $r=-0,08$, $p=0,102$; $r=-0,11$, $p=0,062$; $r=0,07$; $p=0,313$) (Фигура 5.4.24 B1, B2 и B3).

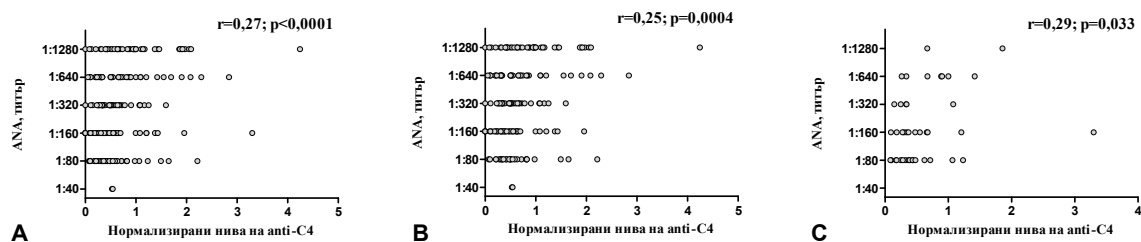


Фигура 5.4.24. Корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C4, изследвани в динамика при пациентите с ЛН и плазмените концентрации на C4 (A) и C3 (B) в тези проби. (A1 и B1) При всички пациенти с ЛН; (A2 и B2) При пациентите с ЛН с екстраренални прояви на СЛЕ; (A3 и B3) При пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ. (Spearman, one-tailed).

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

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

Проучвайки динамичните зависимости между нивата на anti-C4 и титрите на ANA сред всички пациенти с ЛН, изследвани в динамика (при които са изследвани едновременно anti-C4 и ANA, $N=220$ проби), установихме, че е налице статистически значима слаба позитивна корелационна зависимост между нормализираното ниво на anti-C4 и титъра на ANA (Spearman, $r=0,27$; $p<0,0001$) (Фигура 5.4.25 A). При изследвания сред групите от пациентите с ЛН с екстраренални прояви на СЛЕ и при пациенти с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ също установихме статистически значими слаби позитивни корелационни зависимости (Spearman, съответно: $r=0,25$; $p=0,0004$ и $r=0,29$; $p=0,033$) (Фигура 5.4.25 B и C).

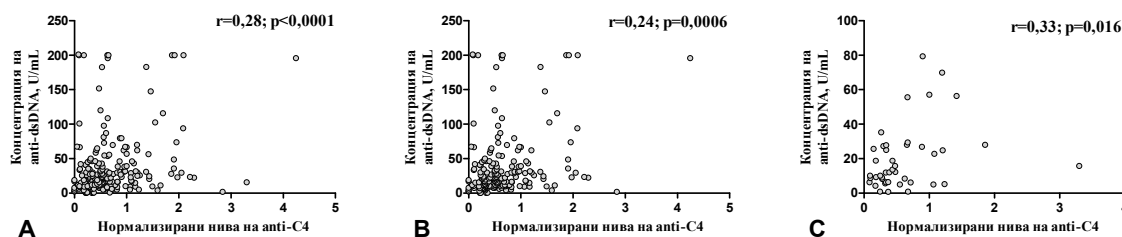


Фигура 5.4.25. Корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C4 и титрите на ANA (показани в логаритмичен мащаб по ординатите): **А.** При всички проведени в динамика проби от пациентите с ЛН (Spearman, $r=0,27$; $p<0,0001$); **В.** При пациентите с ЛН и екстраренални прояви на СЛЕ, изследвани в динамика (Spearman, $r=0,25$; $p=0,0004$); **С.** При пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ, изследвани в динамика (Spearman, $r=0,29$; $p=0,033$).

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

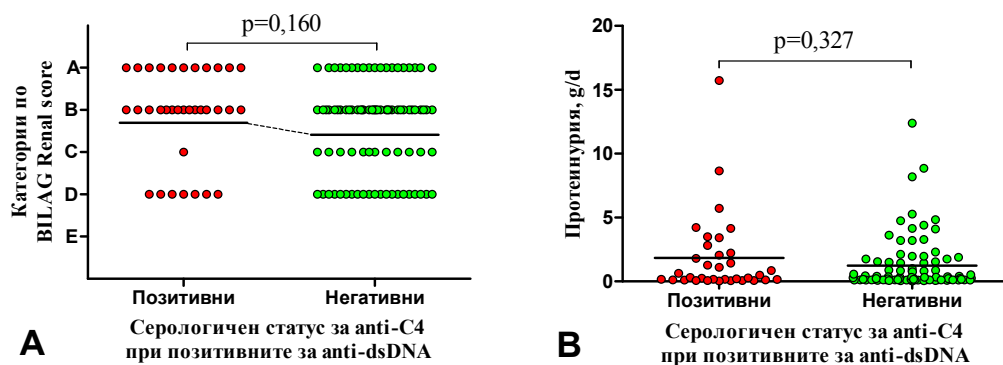
Динамиката на концентрацията на anti-dsDNA (U/mL) за периода на проследяване и лечение на пациентите с ЛН показва средно начално ниво от $32,6 \pm 37,0$ (от 5,6 до 195,8) U/mL и средно ниво в края от $33,2 \pm 43,8$ (от 0,1 до 183, 0) U/mL, като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank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

Проучвайки зависимостите между нивото на anti-C4 и концентрацията на anti-dsDNA (U/mL) сред всички пациенти с ЛН, изследвани в динамика (при които са изследвани едновременно anti-C4 и anti-dsDNA, $N=224$ проби), установихме наличие на статистически значима слаба позитивна корелационна зависимост между нормализираното ниво на anti-C4 и концентрацията на anti-dsDNA (Spearman, $r=0,28$; $p<0,0001$, Фигура 5.4.26 А). При пациентите с ЛН с екстраренални прояви на СЛЕ и при пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ също установихме наличие на статистически значими позитивни корелационни зависимости (Spearman, съответно: $r=0,24$; $p=0,0006$ и $r=0,33$; $p=0,016$) (Фигура 5.4.26 В и С).



Фигура 5.4.26. Корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C4 и концентрациите на anti-dsDNA (U/mL) при: **A.** Всички пациентите с ЛН, изследвани в динамика (Spearman, $r=0.28$; $p<0.0001$); **B.** При пациентите с ЛН с екстраренални прояви на СЛЕ, изследвани в динамика (Spearman, $r=0.24$; $p=0.0006$); **C.** При пациенти с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ, изследвани в динамика (Spearman, $r=0.33$; $p=0.016$).

При сравнителен анализ сред всички изследвани в динамика проби от пациенти, позитивни за anti-dsDNA ($N=121$), установихме, че при позитивните едновременно за anti-dsDNA и anti-C4 пациенти с ЛН средната и геометричната средна на ранговете (категиите по BILAG Renal score) са сравнително по-високи от средната и геометричната средна при пациентите, които са позитивни за anti-dsDNA и негативни за anti-C4 (Mann-Whitney, $p=0.160$) (Фигура 5.4.27 A), макар и тази разлика да не е статистически значима. Установихме сравнително по-висока протеинурия при пациентите едновременно позитивни за anti-dsDNA и anti-C4 (1.84 ± 3.14 g/d) в сравнение с протеинурията при пациентите, позитивни за anti-dsDNA, но негативни за anti-C4 (1.25 ± 2.11 g/d), въпреки че разликата не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0.327$) (Фигура 5.4.27 B).



Фигура 5.4.27. А. Сравнителен анализ между категориите на ЛН по BILAG Renal score при позитивните за anti-dsDNA пациенти с ЛН, изследвани в динамика, разделени въз основа на серологичния статус по отношение на anti-C4. (Mann-Whitney, $p=0,160$). **В.** Сравнителен анализ между средните нива на протеинурия (g/d) при пациентите, позитивни едновременно за anti-dsDNA и anti-C4, и тези позитивни за anti-dsDNA и негативни за anti-C4. (Mann-Whitney, $p=0,327$).

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

При пациентите, изследвани за anti-C4, включени в проучването ($N=74$), според показанията е провеждано предходно имунопатогенетично лечение с: Кортикостероиди (CS) (Methylprednisolone; Prednisone; Prednisolone) при 70 (94,6%) за средна продължителност от 47,9 месеца (от 15 дни до 270 месеца); Cyclophosphamide (CYC) при 64 (86,5%) за средна продължителност от 9,0 месеца (от 3 дни до 36 месеца); Azathioprine или Mycophenolate mofetil (AZA/MMF) при 34 (45,9%) за средна продължителност от 16,3 месеца (от 1 до 108 месеца); Cyclosporine A (CyA) при 17 (23,0%) за средна продължителност от 9,1 месеца (от 1 до 51 месеца); Immunovenin intact (IVIG) при 6 (8,1%) със среден брой на приложените курсове 2 (от 1 до 3 курса) и плазмафереза (ПФ) при 22 (32,0%) със среден брой на сеансите 5 (от 1 до 10 сеанса).

При проследените за среден период от 13 месеца (от 6 до 25 месеца) пациенти с ЛН ($N=52$) по време на нашето проучване при 40 (76,9%) пациенти е проведена имунопатогенетична терапия с CS за среден период от 9,0 (от 1 до 24) месеца; при 25 (48,1%) пациенти – с CYC за среден период от 2 месеца (от 3 дни до 8 месеца); при 31 (59,6%) пациенти – с AZA/MMF за среден период от 5,6 (от 1 до 24) месеца; при 3 (5,8%) пациенти – с CyA за среден период от 8,0 (от 3 до 12) месеца; при 2 (3,8%) пациенти – с IVIG, като при единия е проведен един курс а при втория пациент – 3

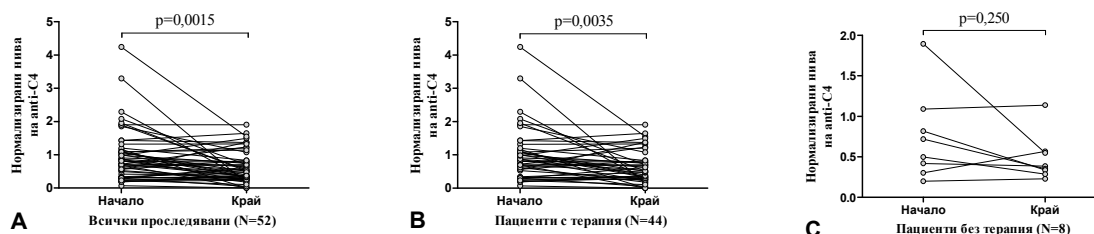
курса и при 7 (13,5%) пациенти – с плазмафереза със среден брой на проведените сеанси 3 (от 2 до 5).

При всички проследявани пациенти, в началния момент средното нормализирано ниво на anti-C4 е $0,967 \pm 0,789$ (от 0,069 до 4,242), а в края на периода на проследяване – $0,615 \pm 0,471$ (от 0,000 до 1,905), като разликата е статистически значима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,0015$) (Фигура 5.4.28 А). При пациентите с проведена имунопатогенетична терапия в рамките на периода на проследяване, средното нормализирано ниво на anti-C4 в началото е $1,008 \pm 0,823$ (от 0,069 до 4,242), а в края – $0,639 \pm 0,495$ (от 0,000 до 1,905), като в тази група отново установихме статистически значима разлика между началното и крайното ниво (Wilcoxon signed rank test, $p=0,0035$) (Фигура 5.4.28 В). В групата пациенти, при които не е провеждана имунопатогенетична терапия, средното нормализирано ниво на anti-C4 в началото е $0,743 \pm 0,549$ (от 0,199 до 1,896), а в края – $0,481 \pm 0,291$ (от 0,229 до 1,139), като в тази група липсва статистически значима разлика между началното и крайното ниво (Wilcoxon signed rank test, $p=0,250$) (Фигура 5.4.28 С).

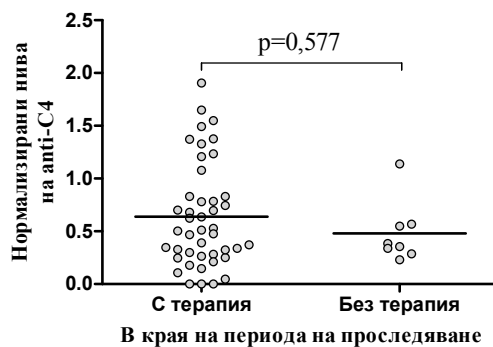
При прилагане на непараметричен сравнителен анализ установихме, че липсва статистически значима разлика между средните нормализирани нива на anti-C4 в края на периода на проследяване при пациентите, при които е провеждана имунопатогенетична терапия ($0,639 \pm 0,495$), и при пациентите без терапия ($0,481 \pm 0,291$) (Mann-Whitney, $p=0,577$) (Фигура 5.4.29).

С оглед вида на проведеното имунопатогенетично лечение, сред пациентите, при които е провеждано такова, обособихме основно 6 групи: 15 (34,1%) пациенти, при което е провеждано комбинирано лечение с CS+CYC+AZA/MMF; 8 (18,2%) пациенти, при които е провеждано комбинирано лечение с CS+CYC; 12 (27,3%) пациенти, при които е провеждано комбинирано лечение с CS+AZA или CS+MMF; 5 (11,4%) пациенти, при които е провеждана монотерапия с CS; 2 (4,5%) пациенти, при които е провеждано комбинирано лечение с CYC и AZA и 2 (4,5%) пациенти, при които е провеждана монотерапия: с AZA при единия и с MMF при другия. При сравнителен анализ на нивата на anti-C4 в началото и в края на проведеното лечение при различните групи пациенти установихме следното: в групата на терапия с CS+CYC+AZA/MMF средното нормализирано ниво на anti-C4 в началото е $1,049 \pm 0,937$ (от 0,251 до 4,242), а в края – $0,715 \pm 0,499$ (от 0,000 до 1,550), като в тази група нивото спада, но

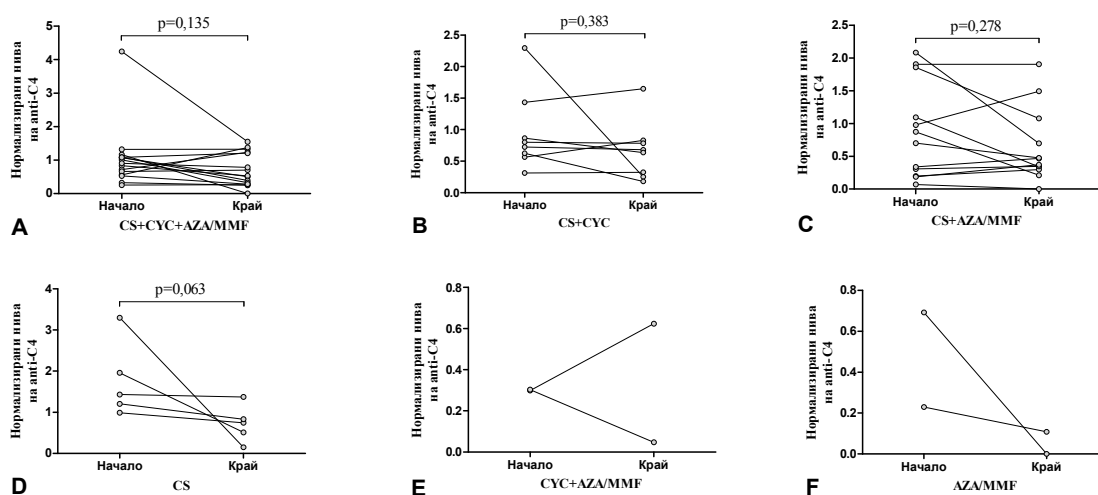
статистически незначимо (Wilcoxon signed rank test, $p=0,135$) (Фигура 5.4.30 А); в групата на лечение с CS+CYC средното ниво в началото е $0,952\pm0,631$ (от 0,312 до 2,294), а в края – $0,667\pm0,469$ (от 0,178 до 1,649), като в тази група средното ниво също намалява, но статистически незначимо (Wilcoxon signed rank test, $p=0,383$) (Фигура 5.4.30 В); в групата на лечение с CS+AZA/MMF средното ниво в началото е $0,883\pm0,724$ (от 0,069 до 2,082), а в края – $0,640\pm0,567$ (от 0,000 до 1,905), като в тази група средното ниво също намалява, но статистически незначимо (Wilcoxon signed rank test, $p=0,278$) (Фигура 5.4.30 С); в групата на монотерапия с CS средното ниво в началото е $1,776\pm0,925$ (от 0,987 до 3,299), а в края – $0,721\pm0,450$ (от 0,147 до 1,372), като средното ниво в тази група също намалява, но статистически незначимо (Wilcoxon signed rank test, $p=0,063$) (Фигура 5.4.30 D); в групите на лечение с CYC+AZA и AZA/MMF попадат по 2 пациенти, като от Фигура 5.4.30 Е и F се вижда увеличаване на средното ниво на anti-C4 в групата на терапия с CYC+AZA и намаляване на средното ниво в групата на терапия с AZA/MMF, но поради малкия брой на пациентите статистическия анализ в тези две групи не е коректен.



Фигура 5.4.28. Крайни и начални нива на anti-C4 при: **А.** Всички проследявани пациенти ($N=52$), при които се отчита статистически значимо намаляване на средното нормализирано ниво ($p=0,0015$); **В.** Пациентите, при които е провеждана имунопатогенетична терапия ($N=44$), при които нивото също статистически значимо намалява в края ($p=0,0035$) и **С.** Пациентите, при които не е провеждана имунопатогенетична терапия през периода на проследяване ($N=8$), при които се отчита статистически незначимо намаляване на нивото ($p=0,250$) (Wilcoxon signed rank test).



Фигура 5.4.29. Средни нормализирани нива на anti-C4 в края на периода на проследяване при пациентите с ЛН с имунопатогенетична терапия и без такава. Липсва статистически значима разлика между тези нива (Mann-Whitney, $p=0,577$).



Фигура 5.4.30. Нормализирани нива на anti-C4 в началото и в края на период на проследяване при пациенти, при които е провеждана терапия с: **A.** CS+CYC+AZA/MMF – средното ниво на anti-C4 намалява статистически незначимо в края (Wilcoxon signed rank test, $p=0,135$); **B.** CS+CYC – средното ниво на anti-C4 намалява статистически незначимо в края (Wilcoxon signed rank test, $p=0,383$); **C.** CS+AZA/MMF – средното ниво на anti-C4 намалява статистически незначимо в края (Wilcoxon signed rank test, $p=0,278$); **D.** CS – средното ниво на anti-C4 намалява статистически незначимо в края (Wilcoxon signed rank test, $p=0,063$). **E.** CYC+AZA – двама пациенти, при единия нивото нараства, а при другия намалява, като средното ниво като цяло леко нараства в края; **F.** MMF при един пациент и AZA при един пациент, като нивата на anti-C4 намаляват в края.

ИЗВОДИ:

1. При изследваната група пациенти с ЛН установихме патологично повишени anti-C4 в значим процент от пациентите (31,1%), като при проследяване в динамика anti-C4 се позитивират в около 59,5% от пациентите, резултат, който би следвало да бъде потвърден в по-големи кохортни проучвания.

2. Не установихме връзка на anti-C4 с: пола на пациентите, възрастта на пациентите, давността на ЛН, въпреки че с нарастване на възрастта и давността на ЛН, нивата на anti-C4 имат тенденция за спадане.

3. Не установихме съществени връзки между anti-C4 и лабораторни маркери за оценка активността на ЛН като протеинурията, уринния седимент, eGFR, въпреки че сравнително по-високостепенна протеинурия се наблюдава при позитивните за anti-C4 пациенти и пациентите с патологичен уринен седимент са със сравнително по-високи нива на anti-C4.

4. Установихме съществени връзки между anti-C4 и имунологичните маркери за активност: връзка на anti-C4 с хипокомплементемия C4 и с хипокомплементемия C3; както и категорична връзка на anti-C4 с anti-dsDNA, като пациентите с ЛН, позитивни едновременно за anti-dsDNA и anti-C4, имат сравнително по-високостепенна протеинурия и сравнително по-висока категория на ЛН по BILAG Renal score в сравнение с тези, които са позитивни за anti-dsDNA, но негативни за anti-C4.

5. Не установихме пряко влияние на anti-C4 върху хистологичния клас на ЛН, въпреки че сравнително най-високи нива на anti-C4 се установяват при дифузна ЛН (IV клас). Налице е значима връзка на anti-C4 с хистологични лезии на активност, каквито са ендокапилярната пролиферация и субендотелните депозити, както и значима връзка на anti-C4 с хистологичния индекс на активност.

6. Установихме съществени връзки между anti-C4 и комплексната оценка на активността на ЛН: пациентите с повишени anti-C4 са с по-висока категория на ЛН по BILAG Renal score, определят наличието на категория А по BILAG Renal score, а така също и сравнително най-високите нива на anti-C4 се установяват при пациенти с активна ЛН.

7. Не установихме съществени динамични зависимости между anti-C4 и маркерите за лабораторна оценка на ЛН.

8. Установихме динамични зависимости между нивата на anti-C4 и нивата на C4 компонента на комплемента, а така също и между нивата на anti-C4 и anti-dsDNA, като хипокомплементемията и патологично повишените anti-dsDNA са свързани с по-високи нива на anti-C4, което вероятно би могло да определи anti-C4 като динамичен маркер за оценка на имунологичната активност при пациентите с ЛН.

9. Установихме предиктивна роля на anti-C4 като маркер за последващо активиране на ЛН (повишаване на категорията на ЛН по BILAG Renal score и повишаване на активността на ЛН, определена с критериите за активна, частична ремисия и пълна ремисия на ЛН), но тази роля подлежи на допълнителни изследвания в по-големи кохортни проучвания.

10. Не установихме разлики в повлияване на нивата на anti-C4 от вида на проведеното имунопатогенетично лечение при изследваните пациенти. Установихме, обаче значимо повлияване на нивата на anti-C4 в хода на проведена имунопатогенетична терапия.

11. На този етап anti-C4 не би могло да бъде използвано като надежден маркер за диагностична оценка на активността на ЛН и като самостоятелен динамичен маркер за проследяване на пациентите с ЛН, а само в комбинация с другите показатели, които би могло да допълни.

5.5. АВТОАНТИТЕЛА СРЕЩУ C3 КОМПОНЕНТА НА КОМПЛЕМЕНТА.

Автоантитела срещу C3 (anti-C3) са изследвани при 74 (76,3% от първоначално включените в проучването) пациенти, като в динамика са изследвани общо 266 проби на пациентите с ЛН. Anti-C3 са изследвани и при 72 здрави доброволци (контроли), без автоимунни и инфекциозни възпалителни заболявания, със запазена бъбречна, чернодробна и хемопоетична функции. При изследваните за anti-C3 в контролната група здрави доброволци се установиха плазмени нива на anti-C3 $0,053 \pm 0,040$ единици оптична плътност при дължина на вълната от 450 nm (OD 450 nm) на оптичния анализатор (Фигура 5.5.1).



Фигура 5.5.1. Нива на anti-C3 при изследваните здрави контроли (показана е средната със стандартното отклонение).

По аналогичен начин с anti-C1q, определихме граничната стойност (cut-off), над която нивата на anti-C3 при изследваните пациенти с ЛН приехме за патологично повишени, а именно:

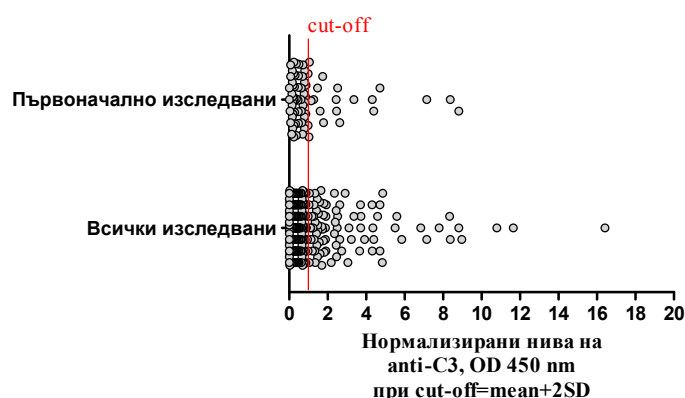
$$\text{Cut-off} = \text{mean (средна за контролната група здрави донори)} + 2 \times \text{SD}$$

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

При изследваните пациенти с ЛН определихме средно ниво на anti-C3, съответно на $0,154 \pm 0,235$ OD 450 nm при cut-off от 0,133 OD 450 nm (изследванията са проведени в Катедра „Биохимия, молекулна медицина и нутригеномика” на МУ-Варна и в Националната референтна лаборатория за изследване на белтъците от системата на комплемента, при Европейската болница “Georges Pompidou”, Париж с еднакви гранични стойности). Изследванията в различните лаборатории са провеждани

съгласно унифицирана методика. С оглед на изследванията в две различни лаборатории проведохме нормализиране на стойностите на нивата на anti-C3 в групите пациенти с ЛН, представяйки нормализираните нива на anti-C3 като съотношение на получените стойности за оптичната плътност към нивото на cut-off за лабораторията (Фигура 5.5.2). По този начин, за гранична стойност се приема 1,00, над която нормализираните нива на anti-C3 се приемат за повишени, а под която – за референтни. Установихме статистически значима разлика между нивата на anti-C3 в контролната група здрави доброволци и тези при пациентите с ЛН (Mann-Whitney, $p=0,0014$).

Установихме патологично повишени титри на anti-C3 при 19 (25,7%) от изходно изследваните пациенти с ЛН. Сред изследваните общо 266 проби от кръвни плазми на пациентите с ЛН в динамика установихме патологично повишени нива на anti-C3 при 84 (31,6%) от пробите (Фигура 5.5.2).



Фигура 5.5.2. Разпределение на нивата на anti-C3 при изходната група първоначално изследвани пациентите с ЛН и при всички изследвани в динамика проби от пациенти, след хомогенизиране на кохортата. Граничната стойност (cut-off) е представена като 1,00, над която нивата на anti-C3 се приемат за патологично повишени.

5.5.1. Автоантитела срещу C3 и пола на пациентите с ЛН.

При мъжете с ЛН (структурата по пол на изследваните пациенти е описана в „5.2.1 Автоантитела срещу C1r и пола на пациентите“) се установиха патологично повишени нива на anti-C3 при 4 (26,7%), докато при жените с ЛН – при 15 (25,4%), както е показано на Таблица 5.5.1. Не установихме статистически значимо влияние на пола на пациентите с ЛН върху наличието на патологично повишени нива на anti-C3

(Fisher's exact test, $p=1,000$).

Таблица 5.5.1. Разпределение на патологично повишените нива на anti-C3 според пола на пациентите с ЛН.

Пациенти	Патологично повишени anti-C3	Референтни anti-C3	Общо
Мъже	4	11	15
Жени	15	44	59
Общо	19	55	74

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

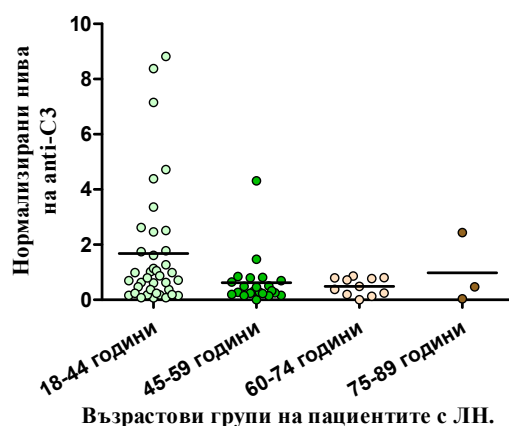
5.5.2. Автоантитела срещу C3 и възрастта на пациентите с ЛН.

Структурата на групата изследвани за anti-C4 пациенти с ЛН по възраст е описана в „5.2.2. Автоантитела срещу C1r и възрастта на пациентите с ЛН.”

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

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

Във възрастовите групи по C3O средните нормализирани нива на anti-C3 са както следва: в групата от 18 до 44 години: $1,678 \pm 2,233$; в групата от 45 до 59 години: $0,619 \pm 0,890$; в групата от 60 до 74 години: $0,492 \pm 0,315$ и в групата от 75 до 89 години: $0,983 \pm 1,278$. Данните за възрастовото разпределение на пациентите с ЛН и нормализираните нива на anti-C3 са представени на Фигура 5.5.3.



Фигура 5.5.3. Средни нива на anti-C3 в различните възрастови групи по СЗО при пациентите с ЛН.

Въпреки постепенното намаляване на средните нормализирани нива на anti-C3 с възрастта (Фигура 5.5.3) (изключвайки възрастовата група от 75-89 години), не установихме статистически значима зависимост на влиянието на възрастта като фактор върху нивата на anti-C3 (One-way ANOVA, $p=0,070$; Post test for linear trend, $p=0,484$). Не установихме статистически значима разлика в нормализираните нива на anti-C3 между различните възрастови групи пациенти с ЛН (Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$ между всички групи).

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

5.5.3. Автоантитела срещу C3 и давността на ЛН.

Средната давност на ЛН при изследваната група пациенти е 10,3 години. При съпоставяне на нормализираните нива на anti-C3 при пациенти с давност на ЛН по-малка от 10,3 години ($1,473\pm 2,215$) и тези при пациентите с давност на ЛН над 10,3

години ($0,768 \pm 0,822$) не установихме статистически значима разлика (Mann-Whitney, $p=0,740$).

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

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

Изследвахме връзките на нивата на anti-C3 с някои основни клиничко-лабораторни параметри на ЛН, каквито са: протеинурията, уринния седимент, бъбречната функция, клиничко-лабораторната активност на ЛН, както и с комплексната оценка на активността на ЛН по BILAG Renal Score (категорията по BILAG Renal score). Изследвахме и връзката на anti-C3 с наличието или липсата на извънбъбречни прояви на СЛЕ, като при пациентите с ЛН и екстраренални прояви на СЛЕ (60 (81,1%) пациенти) средното нормализирано ниво на anti-C3 е $1,219 \pm 1,872$, а при пациентите с ЛН без засягане на други органи и системи е $0,898 \pm 1,206$ и тази разлика не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,408$). Пациентите, позитивни за anti-C3 с екстраренални прояви на СЛЕ са 15 (78,9%) от позитивните, а пациентите, негативни за anti-C3 без екстраренални прояви са 10 (18,2%) от негативните. На базата на това разпределение установихме липса на статистически значимо влияние на позитивния серологичен статус за anti-C3 върху екстрареналните прояви на СЛЕ (Fisher's exact test, $p=0,746$).

5.5.4.1. Автоантитела срещу C3 и протеинурия.

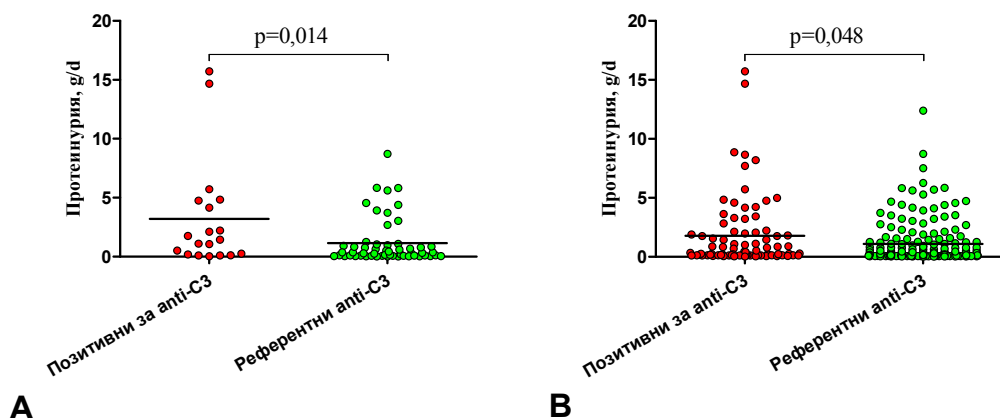
Сред изследваните пациенти в нашето проучване, патологично ниво на протеинурия се установи при 49 (66,2%), а протеинурия под $0,15 \text{ g/d}$ (референтна по степен протеинурия) – при 25 (33,8%) пациенти. Сред всички изследвани уринни проби (общо 266) на пациентите с ЛН, при които са изследвани anti-C3, в динамика за периода на проучването, патологична протеинурия бе установена при 174 (65,4%) от пробите. При пациентите с повишени нива на anti-C3 (19 пациенти) се установи протеинурия от $0,15 \text{ g/d}$ и по-висока при 15 (78,9%) пациенти и по-ниска от $0,15 \text{ g/d}$ – при 4 (21,1%) от

тях. При пациентите с референтни нива на anti-C3 (55 пациенти), протеинурия $\geq 0,15$ g/d се установи при 34 (61,8%) пациенти, а протеинурия $< 0,15$ g/d се установи при 21 (38,2%) пациенти. Въз основа на това разпределение установихме, че при изходно изследваните в нашето проучване пациенти с ЛН не се установи статистически значимо влияние на патологичните нива на anti-C3 върху протеинурията (Fisher's exact test, $p=0,261$).

При изследване на зависимостта на протеинурията (g/d) от нормализираното ниво на anti-C3 при проучваните пациенти с ЛН, не установихме статистически значима корелационна зависимост (Spearman, $r=0,11$, $p=0,361$).

При пациентите, позитивни за anti-C3, средното ниво на протеинурията е $3,21 \pm 4,60$ (от 0,04 до 15,72) g/d, докато при пациентите, негативни за anti-C3 – $1,16 \pm 1,92$ (от 0,02 до 8,73) g/d. Налице е статистически значима разлика между нивата на протеинурията в двете групи пациенти (Mann-Whitney, $p=0,014$) (Фигура 5.5.4 А). Сред всички изследвани в динамика кръвни и уринни проби от пациентите с ЛН, средното ниво на протеинурията при пробите от пациентите, позитивни за anti-C3, е $1,78 \pm 2,98$ (от 0,02 до 15,72) g/d, а това при негативните за anti-C3 – $1,09 \pm 1,82$ (от 0,01 до 12,39) g/d, като и тук разликата е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,048$) (Фигура 5.5.4 В).

При пациентите с патологична протеинурия, средното нормализирано ниво на anti-C3 е $1,285 \pm 1,929$ (от 0,008 до 8,820), което е сравнително, но статистически незначимо по-високо от нивото на anti-C3 при пациентите с референтна по степен протеинурия – $0,911 \pm 1,384$ (от 0,128 до 7,150) (Mann-Whitney, $p=0,702$).



Фигура 5.5.4. А. Нива на протеинурията според серологичния статус за anti-C3 при пациентите с ЛН, изходно включени в проучването (Mann-Whitney, $p=0,014$). **В.** Нива на протеинурията според серологичния статус за anti-C3 при всички проби от пациентите с ЛН, динамично проследени в хода на проучването (Mann-Whitney, $p=0,048$).

5.5.4.2. Автоантитела срещу C3 и уринен седимент.

Сред първоначално включените в проучването пациенти, патологично активен уринен седимент се установи при 37 (50,0%) пациенти. При проследяване в динамика, патологично активен уринен седимент е установен при общо 128 (48,1%) от всички обработени уринни проби.

Сред пациентите с ЛН, първоначално включени в проучването с повишени нива на anti-C3, патологично активен уринен седимент се установи при 13 (63,2%) пациенти, като при 7 (36,8%) пациенти не се установи патологична находка в уринния седимент. Сред пациентите с ЛН с референтни нива на anti-C3, патологично активен уринен седимент се установи при 25 (45,5%) пациенти, като при 30 (54,5%) пациенти не се установи патологична находка в уринния седимент. Това разпределение показва липса на статистически значимо влияние на патологично повишените нива на anti-C3 върху наличието на патологично активен уринен седимент при изследваните пациенти с ЛН (Fisher's exact test, $p=0,287$).

Сред изследваните в динамика лабораторни проби от пациентите с ЛН, които са позитивни за anti-C3, патологично активен уринен седимент се установи при 55 (65,5%) от пробите, докато пробите, негативни за anti-C3, без активен седимент са 109 (59,9%). Това разпределение, обаче показва, че съществува статистически значимо влияние на

позитивния серологичен статус за anti-C3 върху наличието на патологично активен уринен седимент (Fisher's exact test, $p=0,0001$).

При пациентите с патологично активен уринен седимент, средното нормализирано ниво на anti-C3 е $1,499\pm 2,273$ (от 0,008 до 8,820), докато при тези без патологично активен седимент това ниво е сравнително по-ниско – $0,817\pm 0,947$ (от 0,008 до 4,316), като разликата в нивата на anti-C3 между двете групи пациенти не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,524$). Сред пробите от пациенти с ЛН, изследвани в динамика, които са с патологично активен уринен седимент, се установи средно нормализирано ниво на anti-C3 от $1,743\pm 2,532$ (от 0,000 до 16,420), а при пробите от пациентите без активен уринен седимент това ниво е статистически значимо по-ниско: $0,904\pm 1,407$ (от 0,000 до 10,790) (Mann-Whitney, $p=0,0021$).

5.5.4.3. Автоантитела срещу C3 и бъбречна функция.

Разпределението на пациентите с ЛН в групи според eGFR, при които са изследвани anti-C4, е описано в „5.2.4.3. Автоантитела срещу C1r и бъбречна функция.”.

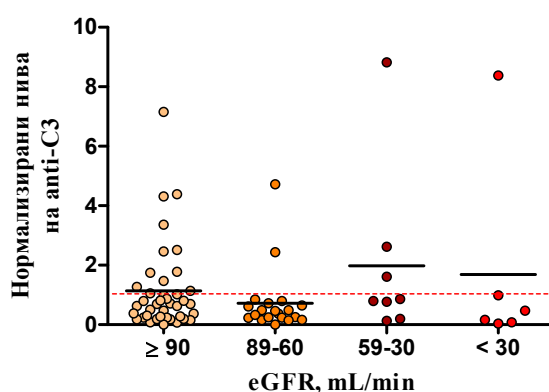
При пациентите с $eGFR < 60$ mL/min се установи средно нормализирано ниво на anti-C4 $1,852\pm 2,944$ (от 0,038 до 8,820), докато при пациентите с $eGFR \geq 60$ mL/min средното ниво на anti-C3 е сравнително, но статистически незначимо по-ниско – $0,997\pm 1,340$ (от 0,008 до 7,150) (Mann-Whitney, $p=0,741$).

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

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

mL/min са само 2 пациенти, поради което, с оглед коректността на статистическия анализ обединихме групите с eGFR 29-15 и <15 mL/min в обща група).

Не установихме статистически значима разлика между нивата на anti-C3 при отделните групи от пациенти с ЛН, обособени въз основа на eGFR, като липсва статистически значима зависимост между тези нива и поредността на отделните групи (One-way ANOVA, $p=0,324$; Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$; Post test for linear trend, $p=0,234$) (Фигура 5.5.5). Липсата на горепосочените зависимости се потвърди и при изследването на всички проби, проведени в динамика, разпределени в групите според eGFR (One-way ANOVA, $p=0,153$; Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$; Post test for linear trend, $p=0,150$).



Фигура 5.5.5. Средни нива на anti-C3 в обособените според eGFR групи от пациенти с ЛН, първоначално изследвани в проучването.

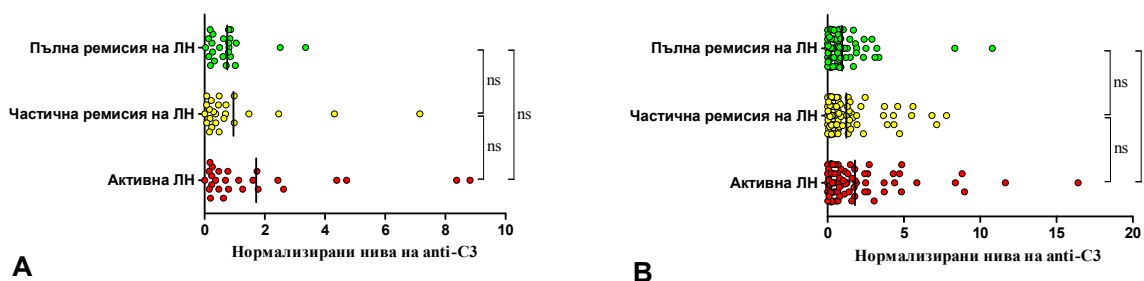
При пациентите, позитивни за anti-C3, средната eGFR е $92,9 \pm 34,5$ mL/min, сравнително, но статистически незначимо по-висока от средната eGFR при негативните за anti-C3 пациенти – $84,5 \pm 33,0$ mL/min (Mann-Whitney, $p=0,228$).

Пациентите с ЛН позитивни за anti-C3, при които установихме eGFR <60 mL/min са 4 (21,1%) от позитивните, а пациентите негативни за anti-C3, при които установихме eGFR ≥ 60 mL/min са 45 (81,8%) от негативните за anti-C3. Въз основа на това разпределение установихме, че липсва статистически значимо влияние на позитивния серологичен статус за anti-C3 върху наличието на декомпенсирана бъбречна функция при изследваната група пациенти с ЛН (Fisher's exact test, $p=0,746$).

5.5.4.4. Автоантитела срещу C3 и комплексната клиничко-лабораторна оценка на активността на ЛН.

Разпределението на изследваните за anti-C3 пациенти въз основа на клиничко-лабораторната активност на ЛН е описано в „5.2.4.4. Автоантитела срещу C1r и комплексната клиничко-лабораторна оценка на активността на ЛН.”.

В групата с активна ЛН 11 (42,3%) пациенти са позитивни за anti-C3, в групата с частична ремисия на ЛН позитивни за anti-C3 са 4 (16,7%) пациенти и в групата с пълна клиничко-лабораторна ремисия на ЛН позитивни за anti-C3 са 4 (16,7%) пациенти. Средните нормализирани нива на anti-C3 в трите групи пациенти с ЛН са както следва: в групата с активна ЛН – $1,714 \pm 2,372$ (от 0,008 до 8,820); в групата с частична ремисия на ЛН – $0,964 \pm 1,620$ (от 0,008 до 7,150); в групата с пълна клиничко-лабораторна ремисия на ЛН – $0,752 \pm 0,752$ (от 0,038 до 3,361), както е показано на Фигура 5.5.6. А



Фигура 5.5.6. А. Разпределение на пациентите с ЛН, изходно включени в проучването, в зависимост от комплексната клиничко-лабораторна оценка на активността на ЛН и нормализираните нива на anti-C3. **В.** Разпределение на пациентите с ЛН с всички проби, изследвани в динамика, в зависимост от комплексната оценка на активността на ЛН и нормализираните нива на anti-C3. Налице е статистически значима разлика между нивата на anti-C3 в групата с активна ЛН и групата с пълна ремисия на ЛН. Представени са средните нормализирани нива на anti-C3 в трите групи.

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

пациенти с ЛН, изследвани в динамика, установихме статистически значима разлика между нивата на anti-C3 в групите с активна ЛН и пълна ремисия на ЛН и статистически значимо нарастване на средното ниво на anti-C3 с нарастване на активността на ЛН (One-way ANOVA, $p=0,023$; Bonferroni's multiple comparison test, $p<0,05$ между групите с активна ЛН и пълна ремисия на ЛН; Post test for linear trend, $p=0,007$) (Фигура 5.5.6 В и Таблица 5.5.2).

Таблица 5.5.2. Множествен сравнителен тест на Bonferroni за изследване разликите в нивата на anti-C3 в групите от пациенти с активна ЛН, частична ремисия на ЛН и с пълна ремисия на ЛН. Изследвани са всички проби в динамика от пациентите с ЛН.

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

Сред позитивните за anti-C3 пациенти с ЛН, 11 (57,8%) са с активна ЛН, 4 (21,1%) от пациентите са с частична ремисия на ЛН и 4 (21,1%) от пациентите са в състояние на пълна клиничко-лабораторна ремисия на ЛН. Сред пациентите с ЛН с референтни нива на anti-C3, 15 (27,2%) са с активна ЛН, 20 (36,4%) са с частична ремисия на ЛН и 20 (36,4%) са с пълна клиничко-лабораторна ремисия на ЛН. При отчитане на липсата на клиничко-лабораторна активност на ЛН (имайки предвид само пациентите в състояние на пълна клиничко-лабораторна ремисия на ЛН) и наличието на активност на ЛН (обединявайки групите с активна ЛН и частична ремисия на ЛН), установихме, че няма статистически значимо влияние на наличието на позитивните нива на anti-C3 върху наличието на активност (статус на активна ЛН и частична ремисия на ЛН) (Fisher's exact test, $p=0,266$). На базата на същото разпределение, обаче, установихме статистически значимо влияние на позитивния статус за anti-C3 върху наличието на активна ЛН (Fisher's exact test, $p=0,025$).

При анализ на всички изследвани 266 проби установихме, че от всички позитивни за anti-C3 35 (41,7%) от пробите са при пациенти в състояние на активна ЛН, 28 (33,3%)

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

При пациентите с продължителност на пълната клинико-лабораторна ремисия на ЛН ≥ 12 месеца се отчете средно нормализирано ниво на anti-C3 от $0,735 \pm 0,767$, което е сравнително, но статистически незначимо по-ниско от нивото на anti-C3 при пациентите с продължителност на пълната клинико-лабораторна ремисия под 12 месеца ($0,801 \pm 0,760$) (Mann-Whitney, $p=0,878$).

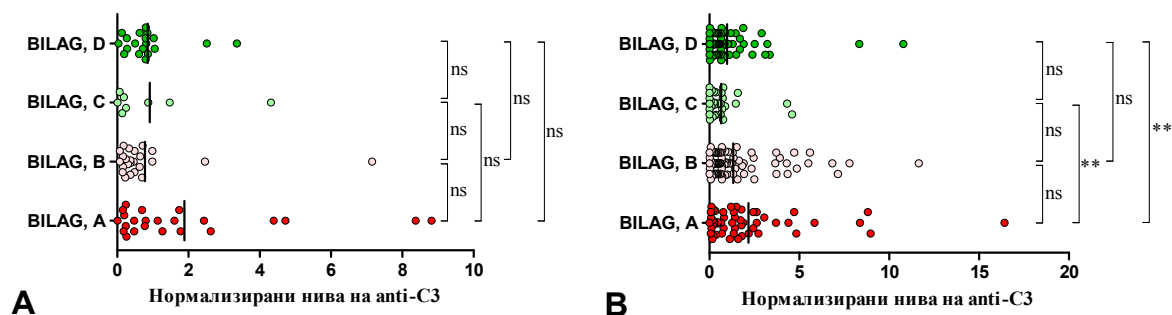
Независимо от състоянието на пациентите с ЛН към началния момент на включване в проучването, при сравняване на средното нормализирано ниво на anti-C3 при тези с постигнати епизоди на пълна ремисия на ЛН в миналото ($0,698 \pm 0,652$) с нивото при пациентите без постигана пълна ремисия в миналото ($1,747 \pm 2,433$), установихме сравнително, но статистически незначимо по-високо ниво на anti-C3 при пациентите без постигана пълна ремисия на ЛН в миналото (Mann-Whitney, $p=0,468$).

5.5.4.5. Автоантитела срещу C3 и комплексната оценка на ЛН (категориите) по BILAG Renal score.

Разпределението на пациентите с ЛН, изследвани за anti-C3, според категориите на ЛН по BILAG Renal score е описано в „5.2.4.5. Автоантитела срещу C1г и комплексната оценка на ЛН (категориите) по BILAG Renal score.”

При пациентите с ЛН от категория А по BILAG Renal score позитивните за anti-C3 са 11 (47,8%); при пациентите от категория В позитивни за anti-C3 са 2 (8,3%); при пациентите от категория С позитивни за anti-C3 са 2 (25,0%) и при пациентите от категория D позитивни за anti-C3 са 4 (21,1%). Средните нормализирани нива на anti-C3

при пациентите с различни категории по BILAG Renal score на ЛН са както следва: при категория А: $1,887 \pm 2,473$ (от 0,008 до 8,820); при категория В: $0,781 \pm 1,443$ (от 0,075 до 7,150); при категория С: $0,915 \pm 1,463$ (от 0,008 до 4,316) и при категория D: $0,856 \pm 0,805$ (от 0,038 до 3,361), както е показано на Фигура 5.5.7.



Фигура 5.5.7. А. Разпределение на пациентите с ЛН в зависимост от комплексната клинично-лабораторна оценка на активността на ЛН по BILAG Renal score и нормализираните нива на anti-C3. Представени са средните нормализирани нива на anti-C3 в отделните категории. **В.** Разпределение на всички изследвани в динамика проби от пациенти с ЛН в зависимост от комплексната клинично-лабораторна оценка на активността на ЛН по BILAG Renal score и нормализираните нива на anti-C3. Налице е статистически значима разлика между нивата на anti-C3 между категориите А – С и А – D (One-way ANOVA, $p=0,0023$; Bonferroni's multiple comparison test, $p<0,05$ между категории А-С и А-D; Post test for linear trend, $p=0,0003$).

Въпреки наличието на най-високо средно нормализирано ниво на anti-C3 при пациентите с категория А на ЛН по BILAG Renal score, не установихме статистически значима разлика между нивата на anti-C3 при отделните групи от пациенти с ЛН, като също така липсва и статистически значима зависимост между тези нива и поредността на отделните групи (One-way ANOVA, $p=0,123$; Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$; Post test for linear trend, $p=0,096$) (Фигура 5.5.7 А). При анализ на нормализираните нива на anti-C3 при всички изследвани в динамика проби от пациентите с ЛН установихме наличие на сигнификантна разлика между нивата при категории А и С, а така също и при категории А и D на ЛН по BILAG Renal score, като също така установихме и наличие на статистически значима линейна зависимост между нивата на anti-C3 и категориите на ЛН по BILAG Renal score (One-way ANOVA, $p=0,0023$; Bonferroni's multiple comparison test, $p<0,05$ между категории А-С и А-D; Post test for linear trend, $p=0,0003$) (Фигура 5.5.7 В и Таблица 5.5.3).

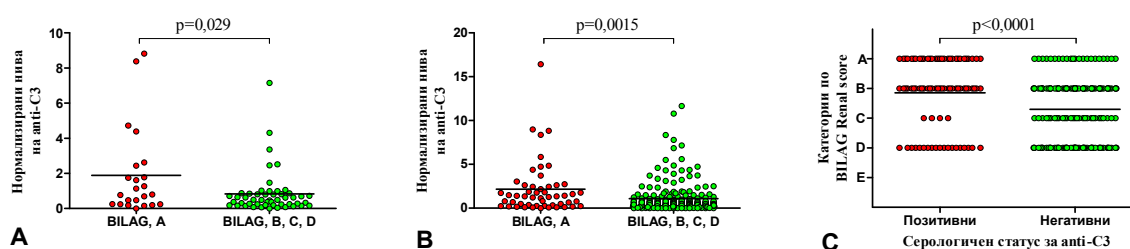
Таблица 5.5.3. Множествен сравнителен тест на Bonferroni за изследване разликите в нивата на anti-C3 в групите от пациенти с различни категории на ЛН по BILAG Renal score. Изследвани са всички проби в динамика от пациентите с ЛН.

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

Сред пациентите, позитивни за anti-C3, с категория А по BILAG Renal score са 11 (57,9%), а пациентите с категории В, С и D са 8 (42,1%), докато при пациентите негативни за anti-C3, с категория А са 12 (21,8%), а тези с по-ниска категория (В, С и D) – 43 (78,2%). Въз основа на това разпределение установихме, че наличието на патологично повишени нива на anti-C3 статистически значимо определя наличието на категория А по BILAG Renal score при изследваните пациенти с ЛН (Fisher's exact test, $p=0,0081$) с чувствителност от 47,8%, специфичност от 84,3%, позитивна предиктивна стойност от 57,9% и негативна предиктивна стойност от 78,2%, като относителният риск за наличие на категория А по BILAG Renal score при наличие на патологично повишено ниво на anti-C3 е 2,7. Сред всички изследвани в динамика проби от пациентите с ЛН, които са позитивни за anti-C3, пробите на пациенти от категория А по BILAG Renal score са 30 (35,7%), пробите на пациенти от категории В, С и D са 54 (64,3%). Сред негативните за anti-C3, пробите на пациенти от категория А по BILAG Renal score са 22 (12,1%), пробите на пациенти от категории В, С и D са 160 (87,9%). Въз основа на това разпределение потвърдихме същата тенденция, както и при изходно включените в проучването пациенти: налице е статистически значимо влияние на наличието на позитивния за anti-C3 серологичен статус върху наличието на активна ЛН от категория А по BILAG Renal score при изследваната група пациенти в динамика (Fisher's exact test, $p<0,0001$) с чувствителност от 57,7%, специфичност от 74,8%, позитивна предиктивна стойност от 35,7% и негативна предиктивна стойност от 87,9%, като относителният риск за наличие на категория А по BILAG Renal score сред динамично изследваните проби от пациенти с ЛН при наличие на патологично повишено ниво на anti-C3 е 3,0.

Средното нормализирано ниво на anti-C3 при пациентите от категория А по

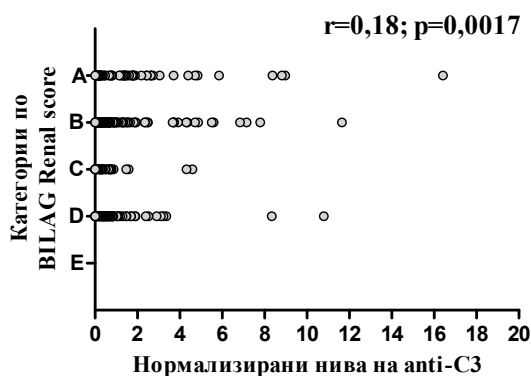
BILAG Renal score е $1,887 \pm 2,473$ (от 0,008 до 8,820) – статистически значимо по-високо от средното нормализирано ниво на anti-C3 при всички останали пациенти с ЛН (от категории В, С и D), което е $0,830 \pm 1,222$ (от 0,008 до 7,150) (Mann-Whitney, $p=0,029$) (Фигура 5.5.8 А). При сравнителен анализ на средното нормализирано ниво на anti-C3 при всички изследвани в динамика проби от пациенти с категория А по BILAG Renal score на ЛН ($2,169 \pm 2,972$ (от 0,008 до 16,420)) с нивото на anti-C3 при пациентите с категории В, С и D ($1,098 \pm 1,725$ (от 0,000 до 11,650)), също установихме статистически значимо по-високо ниво на anti-C3 в пробите от пациенти с категория А на ЛН (Mann-Whitney, $p=0,0015$) (Фигура 5.5.8 В). При сравнителен рангов анализ между пациентите позитивни за anti-C3 и пациентите негативните за anti-C3 (сред всички изследвани в динамика проби) установихме статистически значимо по-висока средна и геометрична средна на ранговете (категиите по BILAG Renal score) при пациентите, позитивни за anti-C3 в сравнение със средната и геометричната средна на ранговете при пациентите, негативни за anti-C3 (Mann-Whitney, $p<0,0001$) (Фигура 5.5.8 С).



Фигура 5.5.8. А. Нормализирани нива на anti-C3 при първоначално включените в проучването пациенти с категория А на ЛН по BILAG Renal score и при пациенти от другите категории (В, С и D). Налице е статистически значима разлика между нивата (Mann-Whitney, $p=0,029$). **В.** Нормализирани нива на anti-C3 при всички изследвани в динамика проби от пациенти с ЛН. Налице е статистически значимо по-високо ниво на anti-C3 при категория А на ЛН в сравнение с нивото при пациентите с всички останали категории (Mann-Whitney, $p=0,0015$). **С.** Категории на ЛН по BILAG Renal score в зависимост от статуса за anti-C3 (Mann-Whitney, $p<0,0001$).

При изследване на зависимостта между нормализираните нива на anti-C3 и категорията на ЛН по BILAG Renal score сред всички изследвани в динамика проби (след квантифициране на категориите: категория А – 5; категория В – 4; категория С – 3; категория D – 2 и категория Е – 1 (в последната категория Е липсват пациенти) установихме статистически значима позитивна слаба корелационна зависимост между

нивата на anti-C3 и категорията по BILAG Renal score (Spearman, $r=0,18$; $p=0,0017$) (Фигура 5.5.9).



Фигура 5.5.9. Корелационна зависимост между нормализираните нива на anti-C3 и категориите на ЛН по BILAG Renal score (Spearman, $r=0,18$; $p=0,0017$).

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

С оглед диагностиката и оценката на имунологичната активност на ЛН при изследваните пациенти с ЛН са определени плазмените нива на C4 компонента на комплемента, C3 компонента на комплемента, титрите на антинуклеарните антитела (ANA) и нивата на антителата срещу двойноверижна ДНК (anti-dsDNA).

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

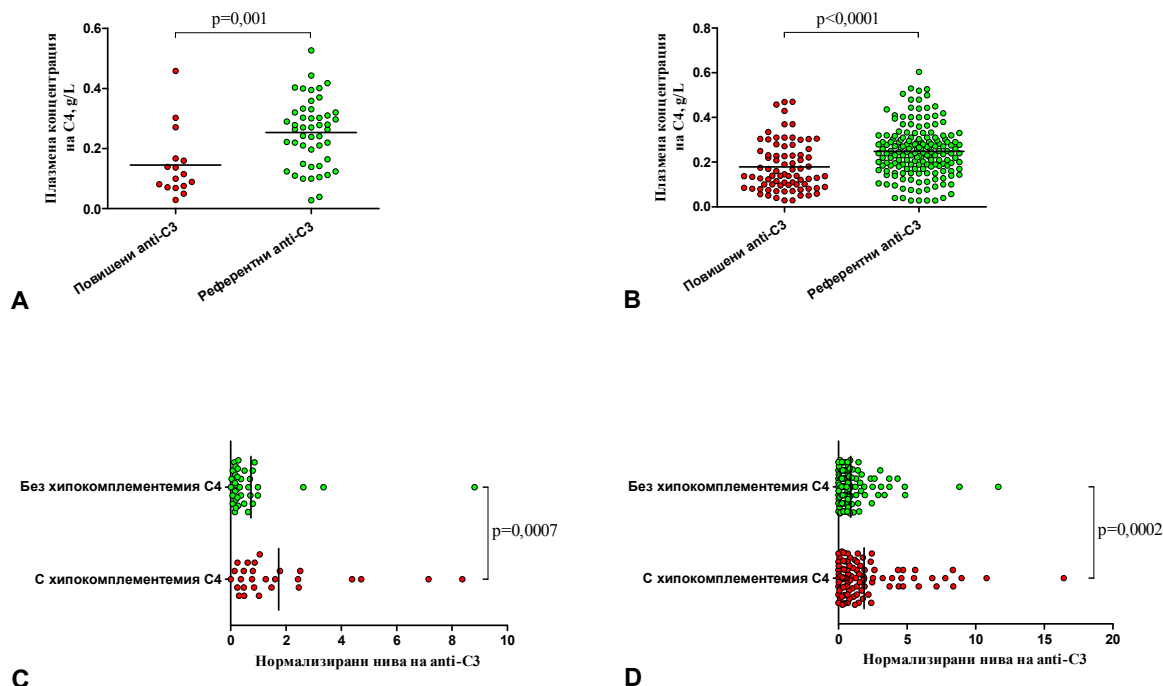
Сред пациентите с ЛН, включени в проучването ($N=74$), плазмените концентрации на C4 са изследвани при 64 (86,5%) пациенти, а плазмените концентрации на C3 – при 69 (93,2%) пациенти. Едновременно нивата на C4 и C3 са изследвани при 64 (86,5%) от пациентите с ЛН изходно включени в проучването.

Пациентите с ЛН, изследвани за anti-C3 с хипокомплементемия C4 са 27 (42,2%) от всички ($N=64$), при които са изследвани нивата на C4 изходно при включване в проучването, а пациентите с ЛН с хипокомплементемия C3 – 13 (18,8%) от всички ($N=69$), при които са изследвани нивата на C3 изходно при включване в проучването.

Пациентите с хипокомплементемия едновременно за C4 и C3 са 12 (18,8%) от тези при които са изследвани едновременно C3 и C4.

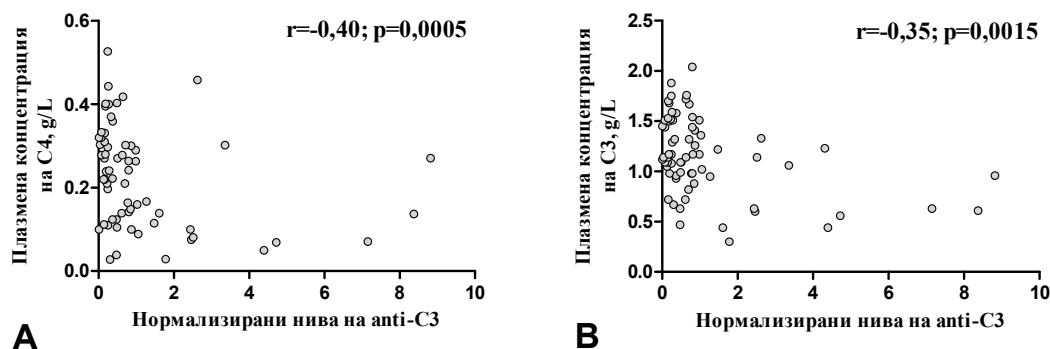
Сред пациентите с ЛН с повишени нива на anti-C3, плазмени концентрации на C4 са изследвани при 16 (84,2%) пациенти, като хипокомплементемия C4 установихме при 13 (81,3%) от тези 16 пациенти. Сред пациентите с референтни нива на anti-C3, плазмени концентрации на C4 са изследвани при 48 (87,3%), като хипокомплементемия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

Средната плазмена концентрация на C4 при пациентите с повишени anti-C3 е $0,145\pm 0,112$ g/L, която е статистически значимо по-ниска от тази при пациентите с референтни нива на anti-C3 – $0,253\pm 0,111$ g/L (Mann-Whitney, $p=0,001$), както е показано на Фигура 5.5.10 А. Тази зависимост потвърдихме и при изследване на всички проведени в динамика проби от пациентите с ЛН, при което установихме средна плазмена концентрация на C4 при пробите с повишени anti-C3 от $0,179\pm 0,110$ g/L, която е статистически значимо по-ниска от средната плазмена концентрация на C4 при пробите с референтни нива на anti-C3 ($0,248\pm 0,113$ g/L) (Mann-Whitney, $p<0,0001$) (Фигура 5.5.10 В). Средното нормализирано ниво на anti-C3 при пациентите с хипокомплементемия C4 е $1,738\pm 2,108$, което е статистически значимо по-високо от средното нормализирано ниво на anti-C3 при пациентите без хипокомплементемия C4 – $0,737\pm 1,520$ (Mann-Whitney, $p=0,0007$), както е показано на Фигура 5.5.10 С. Същата зависимост между нивата на anti-C3 и наличието или липсата на хипокомплементемия C4 установихме и при изследване на всички проведени в динамика проби от пациентите с ЛН. Средното нормализирано ниво на anti-C3 при пробите с хипокомплементемия C4 е $1,871\pm 2,655$, което е статистически значимо по-високо от средното ниво на anti-C3 при пробите без хипокомплементемия C4 ($0,891\pm 1,486$) (Mann-Whitney, $p=0,0002$) (Фигура 5.5.10 D).



Фигура 5.5.10. А. Плазмени концентрации на C4 при изходно включените в проучването пациенти с ЛН в зависимост от серологичния статус за anti-C3 (Mann-Whitney, $p=0,001$). **В.** Плазмени концентрации на C4 при всички, изследвани в динамика проби от пациенти с ЛН в зависимост от серологичния статус за anti-C3 (Mann-Whitney, $p<0,0001$). **С.** Нормализирани плазмени нива на anti-C3 при пациентите с ЛН, изходно включени в проучването, в зависимост от наличието на хипокомплементемия C4 (Mann-Whitney, $p=0,0007$). **Д.** Нормализирани плазмени нива на anti-C3 при всички, изследвани в динамика проби от пациенти с ЛН в зависимост от наличието на хипокомплементемия C4 (Mann-Whitney, $p=0,0002$).

Зависимостта на хипокомплементемията за C4 от плазмените нива на anti-C3 потвърдихме и с корелационен анализ – налице е статистически значима отрицателна умерена по сила зависимост между нормализираните нива на anti-C3 и плазмените концентрации на C4 (Spearman, $r=-0,40$; $p=0,0005$) (Фигура 5.5.11 А).

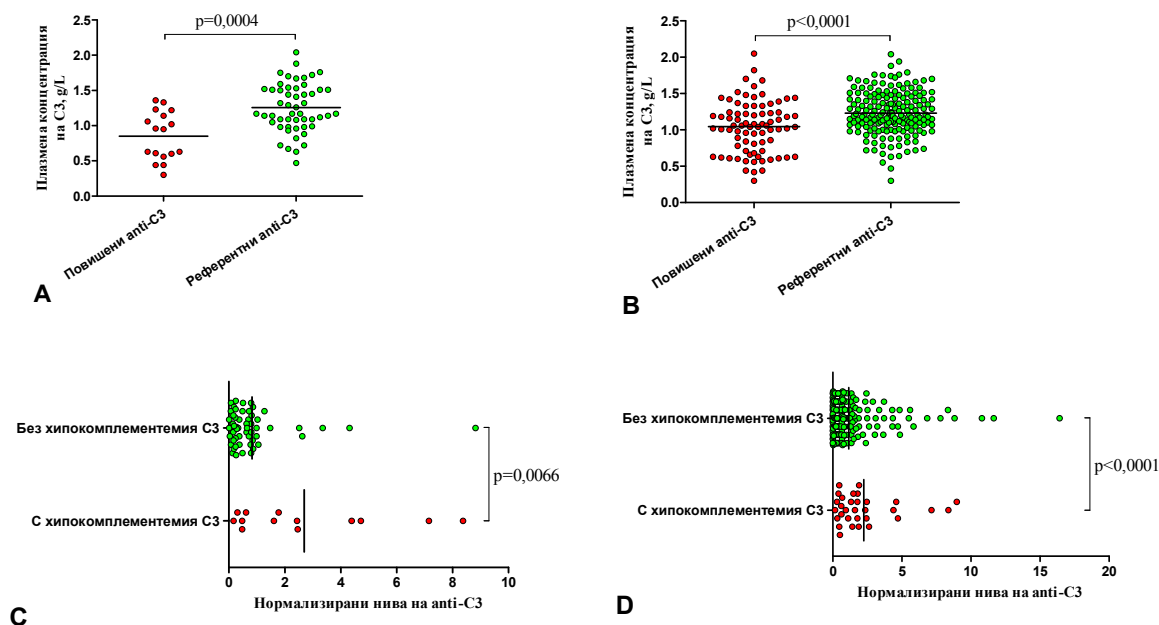


Фигура 5.5.11. А. Корелационна зависимост между нормализираното ниво на anti-C3 и плазмената концентрация на C4 (g/L) (Spearman, $r=-0,40$; $p=0,0005$). **В.** Корелационна зависимост между нормализираното ниво на anti-C3 и плазмената концентрация на C3 (g/L) (Spearman, $r=-0,35$; $p=0,0015$).

Сред пациентите с ЛН с повишени нива на anti-C3, плазмени концентрации на C3 са изследвани при 17 (89,5%), като хипокомplementемия C3 се установи при 8 (47,1%) от тези 17 пациенти. Сред пациентите с референтни нива на anti-C3, плазмени концентрации на C3 са изследвани при 52 (94,5%), като хипокомplementемия C3 се установи при 5 (9,6%) от тези 52 пациенти. Въз основа на това разпределение, установихме, че наличието на патологично повишени anti-C3 статистически значимо определя наличието на хипокомplementемия C3 (Fisher's exact test, $p=0,0018$).

Средната плазмената концентрация на C3 при пациентите с повишени anti-C3 е $0,852 \pm 0,344$ g/L, която е статистически значимо по-ниска от тази при пациентите с референтни нива на anti-C3 ($1,257 \pm 0,347$ g/L) (Mann-Whitney, $p=0,0004$), както е показано на Фигура 5.5.12 А. Тази зависимост потвърдихме и сред всички изследвани в динамика проби от пациентите с ЛН, като средната плазмена концентрация на C3 при пробите с повишени anti-C3 е $1,045 \pm 0,356$ g/L – статистически значимо по-ниска от средната плазмена концентрация на C3 при пробите с референтни нива на anti-C3 ($1,231 \pm 0,298$ g/L) (Mann-Whitney, $p<0,0001$) (Фигура 5.5.12 В). Средното нормализирано ниво на anti-C3 при пациентите с хипокомplementемия C3 е $2,689 \pm 2,701$, което е статистически значимо по-високо от средното ниво на anti-C3 при пациентите без хипокомplementемия C3 ($0,831 \pm 1,355$) (Mann-Whitney, $p=0,0066$), както е показано на Фигура 5.5.12 С. Същата зависимост между нивата на anti-C3 и наличието или липсата на хипокомplementемия C3 установихме и при изследване на всички проведени в динамика проби от пациентите с ЛН. Средното нормализирано

ниво на anti-C3 при пробите с хипокомplementемия C3 е $2,250 \pm 2,322$, което е статистически значимо по-високо от средното ниво на anti-C3 при пробите без хипокомplementемия C3 ($1,164 \pm 2,027$) (Mann-Whitney, $p < 0,0001$) (Фигура 5.5.12 D).



Фигура 5.5.12. **A.** Плазмени концентрации на C3 при изходно включените в проучването пациенти с ЛН в зависимост от серологичния за anti-C3 (Mann-Whitney, $p=0,0004$). **B.** Плазмени концентрации на C3 при всички, изследвани в динамика проби от пациенти с ЛН в зависимост от серологичния статус за anti-C3 (Mann-Whitney, $p<0,0001$). **C.** Нормализирани плазмени нива на anti-C3 при пациентите с ЛН, изходно включени в проучването, в зависимост от наличието на хипокомplementемия C3 (Mann-Whitney, $p=0,0066$). **D.** Нормализирани плазмени нива на anti-C3 при всички, изследвани в динамика проби от пациенти с ЛН в зависимост от наличието на хипокомplementемия C3 (Mann-Whitney, $p<0,0001$).

Зависимостта на хипокомplementемията за C3 от плазмените нива на anti-C3 потвърдихме и с корелационен анализ – налице е статистически значима отрицателна умерена по сила зависимост между нормализираните нива на anti-C3 и плазмените концентрации на C3 (Spearman, $r=-0,35$; $p=0,0015$) (Фигура 5.5.11 B).

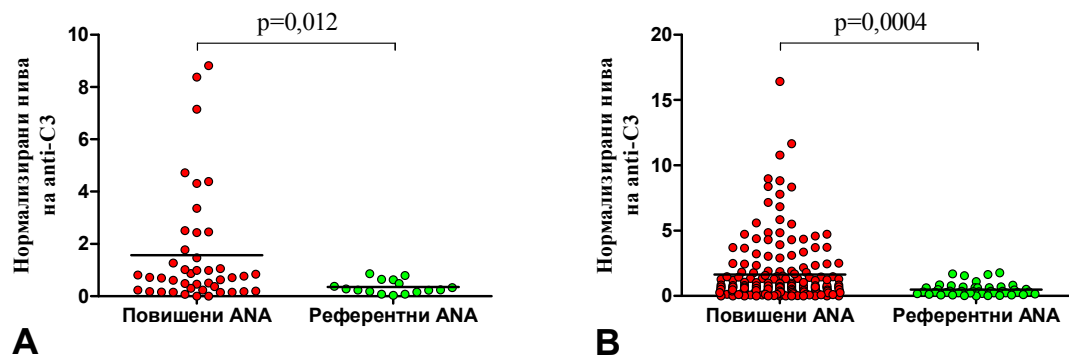
5.5.5.2. Автоантитела срещу C3 и антинуклеарни автоантитела (ANA).

Сред пациентите с ЛН, които са изследвани за anti-C3, изходно включени в

нашето проучване, ANA са изследвани при 59 (79,7%) и в общо 220 (82,7%) от всички изследвани проби. Патологично повишени титри на ANA ($>1:80$) установихме при 43 (72,9%) от първоначално изследваните за ANA и anti-C3 пациенти с ЛН и при 176 (80,0%) от всички изследвани за ANA и anti-C3 проби от пациенти с ЛН в динамика.

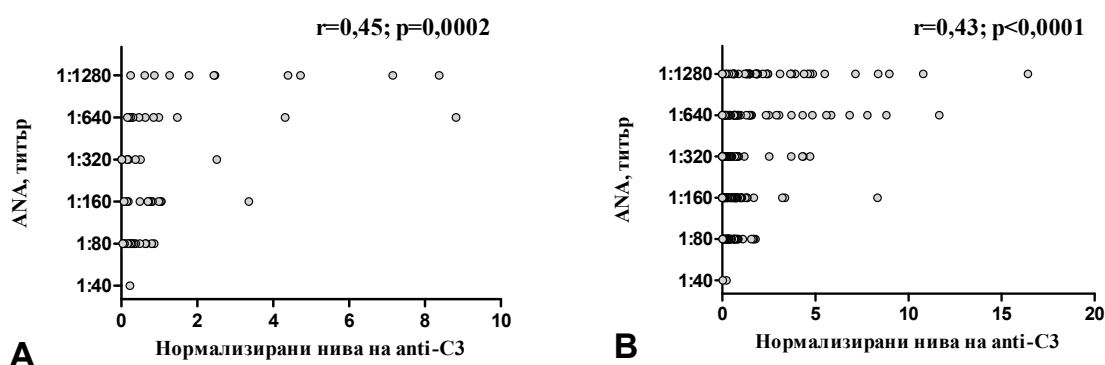
Сред първоначално включените в проучването пациенти с ЛН, позитивните за anti-C3 с патологично повишени ANA са 15 (100,0% от пациентите, позитивни за anti-C3, при които са изследвани ANA), а негативните за anti-C3, с референтни титри на ANA са 16 (36,4% от пациентите, негативни за anti-C3, при които са изследвани ANA). Въз основа на това разпределение установихме, че патологично повишените нива на anti-C3 статистически значимо определят наличието на патологично повишени титри на ANA (Fisher's exact test, $p=0,006$). Тази тенденция установихме и сред всички изследвани в динамика по време на проучването пациенти с ЛН, като пробите с повишени нива на anti-C3 и повишени титри на ANA са 67 (93,1% от всички проби с повишени нива на anti-C3, изследвани за ANA), а пробите с негативни anti-C3 и референтни титри на ANA са 39 (26,4% от всички негативни проби за anti-C3, изследвани за ANA). Въз основа на това разпределение установихме, че патологично повишените нива на anti-C3 статистически значимо определят наличието на повишени титри на ANA (Fisher's exact test, $p=0,0005$).

Средното нормализирано ниво на anti-C3 при изходно изследваните пациенти с ЛН с патологично повишени титри на ANA е $1,574 \pm 2,181$, което е статистически значимо по-високо от нивото на anti-C3 при пациентите с референтни титри на ANA ($0,354 \pm 0,259$) (Mann-Whitney, $p=0,012$) (Фигура 5.5.13 А). Средното нормализирано ниво на anti-C3 сред всички изследвани в динамика проби от пациентите с ЛН с патологично повишени титри на ANA е $1,643 \pm 2,431$, което е статистически значимо по-високо от нивото на anti-C3 при пробите от пациенти с референтни титри на ANA ($0,485 \pm 0,458$) (Mann-Whitney, $p=0,0004$) (Фигура 5.5.13 В).



Фигура 5.5.13. А. Нормализирани нива на anti-C3 при изходно включените в проучването пациенти с ЛН с патологично повишени титри на ANA и при тези с референтни титри на ANA. Налице е статистически значима разлика (Mann-Whitney, $p=0,012$). **В.** Същата зависимост сред всички изследвани в динамика проби от пациентите с ЛН (Mann-Whitney, $p=0,0004$).

Установихме наличие на статистически значима позитивна умерена по сила корелационна зависимост между нормализираното ниво на anti-C3 и титъра на ANA сред първоначално включените в проучването пациенти (Spearman, $r=0,45$; $p=0,0002$) (Фигура 5.5.14 А) и на същата зависимост между нормализираното ниво на anti-C3 и титъра на ANA сред всички изследвани в динамика проби от пациентите с ЛН (Spearman, $r=0,43$; $p<0,0001$) (Фигура 5.5.14 В).



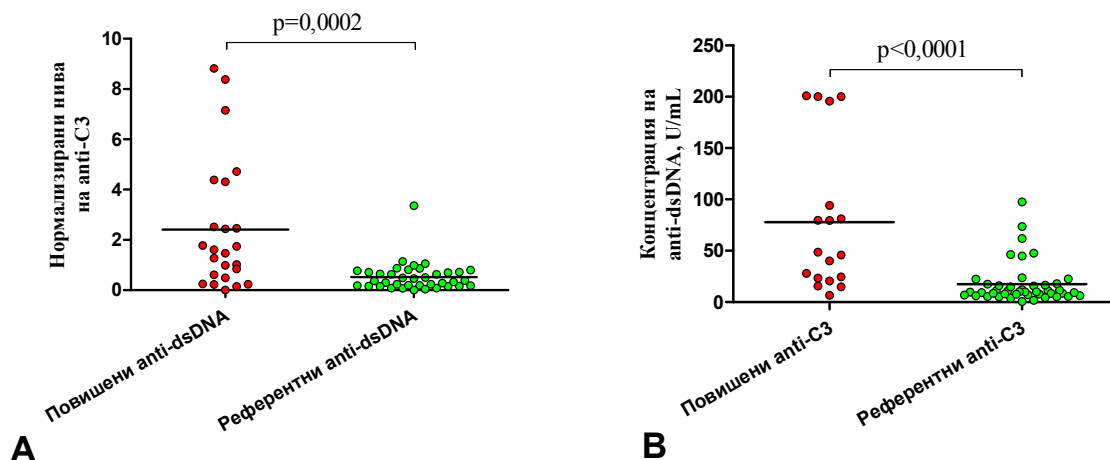
Фигура 5.5.14. Корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C3 и титрите на ANA (Spearman, $r=0,45$; $p=0,0002$) при изходно включените в проучването пациенти с ЛН (А) и при всички проследени в динамика проби от пациентите с ЛН (Spearman, $r=0,43$; $p<0,0001$) (В). Титрите на ANA са представени по ординатите в логаритмичен мащаб.

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

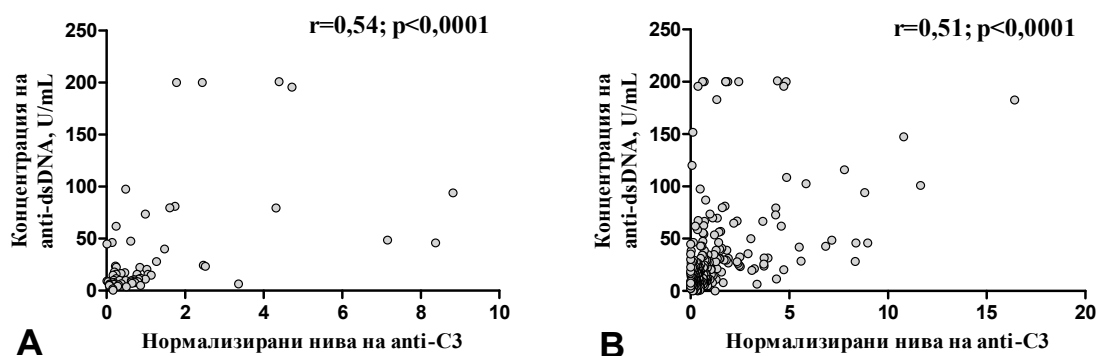
Сред пациентите с ЛН, изходно включени в нашето проучване и изследвани за anti-C3, anti-dsDNA са изследвани при 62 (83,8%) и в общо 224 (84,2%) от всички изследвани в динамика проби от пациенти с ЛН. Патологично повишени концентрации на anti-dsDNA (≥ 20 U/mL) установихме при 24 (38,7%) от първоначално изследваните за anti-dsDNA и anti-C3 пациенти с ЛН и при 121 (54,0%) от всички изследвани за anti-dsDNA и anti-C3 проби от пациенти с ЛН, проследени в динамика.

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

Средното нормализирано ниво на anti-C3 при изходно изследваните пациенти с ЛН с патологично повишени концентрации на anti-dsDNA е $2,412 \pm 2,588$, което е статистически значимо по-високо от средното ниво на anti-C3 при пациентите с референтни концентрации на anti-dsDNA ($0,525 \pm 0,569$) (Mann-Whitney, $p = 0,0002$) (Фигура 5.5.15 А). При пациентите с патологично повишени нива на anti-C3, средната концентрация на anti-dsDNA е $77,76 \pm 71,52$ U/mL, която е статистически значимо по-висока от средната концентрация на anti-dsDNA при пациентите с референтни нива на anti-C3 ($17,30 \pm 19,90$ U/mL) (Mann-Whitney, $p < 0,0001$) (Фигура 5.5.15 В).



Фигура 5.5.15. А. Нормализирани нива на anti-C3 при изходно включените в проучването пациенти с ЛН с повишени и при тези с референтни концентрации на anti-dsDNA. Налице е статистически значима разлика (Mann-Whitney, $p=0,0002$). **В.** Концентрации на anti-dsDNA при изходно включените в проучването пациенти с ЛН с патологично повишени и с референтни нива на anti-C3. Налице е статистически значима разлика (Mann-Whitney, $p<0,0001$).



Фигура 5.5.16. А. Корелационна зависимост между нормализираното ниво на anti-C3 и концентрацията на anti-dsDNA (U/mL) при изходно включените в проучването пациенти с ЛН (Spearman, $r=0,54; p<0,0001$). **В.** Корелационна зависимост между нормализираното ниво на anti-C3 и концентрацията на anti-dsDNA (U/mL) при всички проби от пациенти с ЛН, проследени в динамика (Spearman, $r=0,51; p<0,0001$).

Връзката между нивата на anti-C3 и концентрациите на anti-dsDNA потвърдихме и с корелационен анализ, който показва наличие на статистически значими позитивни умерени по сила корелационни зависимост между двете при пациентите с ЛН, първоначално включени в проучването (Spearman, $r=0,54; p<0,0001$) (Фигура 5.5.16 А)

и при всички проследени в динамика проби от пациенти с ЛН (Spearman, $r=0,51$; $p<0,0001$) (Фигура 5.5.16 В).

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

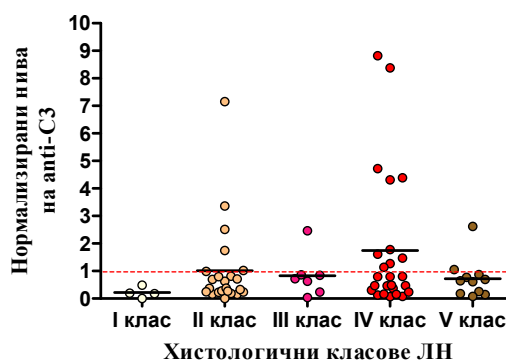
Пациентите с ЛН са диагностицирани с провеждане на пункционна бъбречна биопсия, като хистологична диагноза е налична при 71 (95,9%) от включените в проучването пациенти, при които са изследвани anti-C3. Разпределението на пациентите въз основа на хистологичния клас на ЛН е показано в „5.2.6. Автоантитела срещу C1r и някои хистологични признаци на ЛН.”. И тук, с оглед клинична достоверност на изследваните зависимости, когато са изследвани връзки, касаещи белези на хистологична активност на ЛН, при статистическите анализи са отчитани само случаите, при които времето между вземането на кръвните проби за изследване на anti-C3 и провеждането на пункционната бъбречна биопсия е било до 12 месеца. Това условие е изпълнено при 27 (38,0%) от пациентите с ЛН, включени в проучването.

5.5.6.1. Автоантитела срещу C3 и хистологичният клас на ЛН.

При пациентите с I хистологичен клас ЛН няма позитивни за anti-C3 (0,0%); при тези с II хистологичен клас ЛН позитивни са 5 (21,7%) пациенти; при тези с III хистологичен клас ЛН позитивен е 1 (14,3%) пациенти; при тези с IV хистологичен клас ЛН позитивни са 10 (40,0%) пациенти; при тези с V хистологичен клас ЛН позитивни са 2 (18,2%) пациенти; пациентът с VI хистологичен клас ЛН е с референтно ниво на anti-C3 (0,985); при останалите 3 пациенти, при които не е провеждано хистологично уточняване на ЛН 2 са с референтни нива на anti-C3 и 1 е позитивен за anti-C3 (2,436). Средните нормализирани нива на anti-C3 са съответно (Фигура 5.5.17): при пациентите с I хистологичен клас: $0,218\pm0,200$; при пациентите с II хистологичен клас: $1,012\pm1,563$; при пациентите с III хистологичен клас: $0,830\pm0,786$; при пациентите с IV хистологичен клас: $1,748\pm2,465$; при пациентите с V хистологичен клас: $0,722\pm0,710$.

Не установихме статистически значима разлика между нивата на anti-C3 при отделните хистологични класове ЛН, въпреки че сравнително най-високите нива са при

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



Фигура 5.5.17. Нива на anti-C3 в зависимост от хистологичния клас на ЛН. Не се установиха статистически значима зависимост между нивата на anti-C3 и класа ЛН, както и статистически значими разлики между нивата на anti-C3 при различните класове ЛН (One-way ANOVA, $p=0,314$; Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$; Post test for linear trend, $p=0,421$).

Сред пациентите, позитивни за anti-C3, такива с IV клас ЛН са 10 (55,6% от позитивните за anti-C3 с хистологична диагноза (18 пациенти)). При пациентите, негативни за anti-C3, такива с I, II, III, V или VI клас ЛН са 38 (71,7% от негативните за anti-C3 с хистологична диагноза (53 пациенти)). При изследване връзката между наличието на патологично повишени anti-C3 и наличието на ЛН от IV хистологичен клас установихме, че патологично повишените нива на anti-C3 определят статистически значимо наличие на дифузна ЛН (IV хистологичен клас) (Fisher's exact test, $p=0,048$) с чувствителност от 40,0%, специфичност от 82,6%, позитивна предиктивна стойност от 55,6% и негативна предиктивна стойност от 71,7%. Относителният риск за наличие на ЛН от IV хистологичен клас при наличие на позитивни anti-C3 е 2,0.

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

В настоящото проучване изследвахме зависимостите между нивата на anti-C3 и хистологични белези на активност (ендокапилярна пролиферация, гломерулна левкоцитна инфилтрация, субендотелни депозити („телени бримки”), фибриноидна некроза и/или кариорексис, клетъчни полулуния и интерстициална инфилтрация) и хистологични белези на хроничност (гломерулна склероза, фиброзни полулуния, тубулна атрофия и интерстициална фиброза), както и връзката между нивата на anti-C3 и хистологичните индекси на активност и хроничност, определени на базата на горепосочените хистологични белези (Вижте “IV. Материали и методи”, Таблица 4.1). В анализите са включени само пациентите с ЛН, при които времето между вземане на пробата за изследване на anti-C3 и провеждане на пункционната бъбречна биопсия е било до 12 месеца (при 27 (38,0%) от хистологично диагностицираните пациенти, изследвани за anti-C3).

Таблица 5.5.4. Сравнителен анализ между нивата на anti-C3 при наличие и липса на хистологични белези за активност и хроничност при пациентите с ЛН. Представени са средните нива $\pm$ стандартното отклонение (SD).

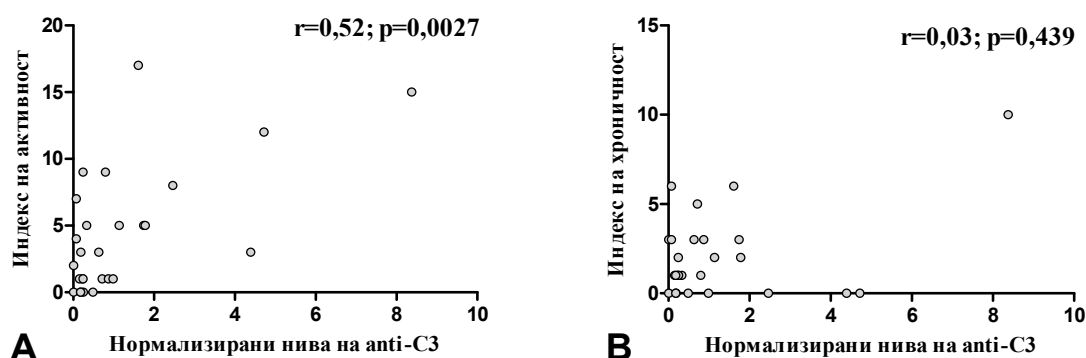
Хистологичен признак	Нормализирани нива на anti-C3 при:		p
	наличие на хистологичния признак	липса на хистологичния признак	
Ендокапилярна пролиферация	1,541 $\pm$ 2,094	0,293 $\pm$ 0,297	0,049
Гломерулна левкоцитна инфилтрация ¹	-	-	-
Субендотелни депозити, формиращи „телени бримки”	2,009 $\pm$ 1,565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

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

На Таблица 5.5.4 са показани данните от сравнителния анализ между нивата на anti-C3 в групите с и без съответните хистологични признаци за активност и хроничност на ЛН. При пациентите с наличие на хистологични признаци за активност на ЛН, като ендокапилярна пролиферация, субендотелни депозити, формиращи телени бримки и интерстициално възпаление, нивата на anti-C3 при наличие на тези признаци

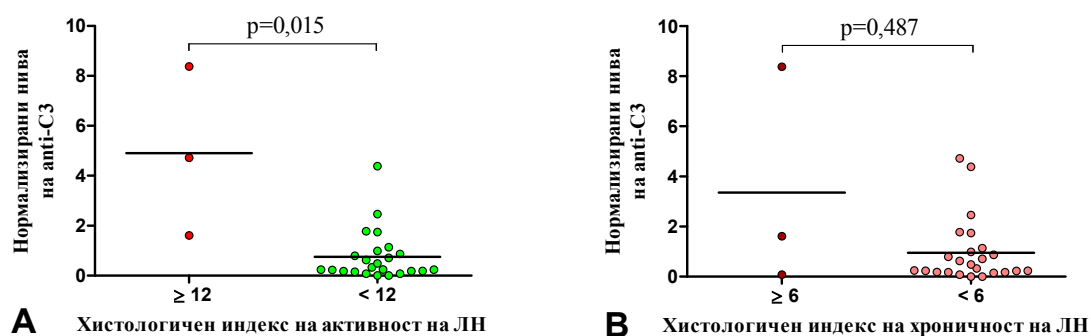
са статистически значимо по-високи от нивата при липса на признаците (Mann-Whitney, съответно $p=0,049$, $p=0,023$ и $p=0,029$). При наличие на фибриноидна некроза и клетъчни полулуния нивата на anti-C3 са сравнително по-високи в сравнение с нивата при отсъствие на тези белези за активност, но разликите не са статистически значими. При пациентите с наличие на хистологични признаци за хроничност на ЛН, като фиброзни полулуния, тубулна атрофия и интерстициална фиброза, нивата на anti-C3 са сравнително по-високи в сравнение с нивата при отсъствие на тези белези, но разликите не са статистически значими. При пациентите с наличие на гломерулна склероза нивата на anti-C3 са сравнително по-ниски от нивата при отсъствие на този белег, но разликата не е статистически значима. При двамата пациенти с наличие на гломерулна левкоцитна инфилтрация нормализираните нива на anti-C3 са съответно 4,722 и 2,466 (позитивни за anti-C3).

При изследване връзката между нивата на anti-C3 и хистологичния индекс на активност на ЛН установихме наличие на статистически значима позитивна умерено силна корелационна зависимост (Spearman, $r=0,52$; $p=0,0027$) (Фигура 5.5.18 А). Не установихме значима корелационна зависимост между нормализираните нива на anti-C3 и хистологичния индекс на хроничност при пациентите с ЛН (Spearman, $r=0,03$; $p=0,439$) (Фигура 5.5.18 В).



Фигура 5.5.18. А. Корелационен анализ на връзката между нормализираните нива на anti-C3 и хистологичния индекс на активност при пациентите с ЛН. Налице е статистически значима позитивна умерена по сила корелационна зависимост (Spearman, $r=0,52$; $p=0,0027$). **В.** Корелационен анализ на връзката между нормализираните нива на anti-C3 и хистологичния индекс на хроничност при пациентите с ЛН. Липсва статистически значима корелационна зависимост (Spearman, $r=0,03$; $p=0,439$).

Установихме, че средното нормализирано ниво на anti-C3 при пациентите с хистологичен индекс на активност на ЛН ≥ 12 ($4,902 \pm 3,387$), е статистически значимо по-високо от това при пациентите с хистологичен индекс на активност под 12 ($0,757 \pm 1,003$) (Mann-Whitney, $p=0,015$) (Фигура 5.5.19 А). Средното нормализирано ниво на anti-C3 при пациентите с хистологичен индекс на хроничност на ЛН ≥ 6 ($3,353 \pm 4,417$) е сравнително, но статистически незначимо по-високо от това при пациентите с индекс на хроничност на ЛН < 6 ($0,950 \pm 1,276$) (Mann-Whitney, $p=0,487$) (Фигура 5.5.19 В).



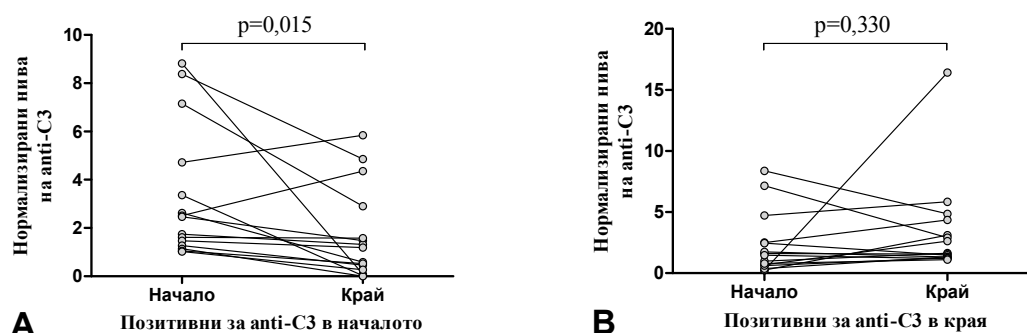
Фигура 5.5.19. Нормализирани нива на anti-C3 при пациентите с ЛН според хистологичните индекси на активност (А) и на хроничност (В). **А.** Налице е статистически значимо по-високо ниво на anti-C3 при пациентите с индекс на активност ≥ 12 и по-висок в сравнение с тези с индекс на активност под 12 (Mann-Whitney, $p=0,015$). **В.** Няма статистически значима разлика между нивата на anti-C3 при пациентите с индекс на хроничност ≥ 6 и по-висок и индекс на хроничност под 6 (Mann-Whitney, $p=0,487$).

5.5.7. Прогностично значение и динамика на промените в нивата на автоантителата срещу C3.

При 52 (70,3%) от пациентите с ЛН, е налице проследяване за период от средно 13,0 (от 6,0 до 25,0) месеца, с между 2 и 11 проби, при които са определяни нивата на anti-C3 и останалите клинично-лабораторни и имунологични параметри на ЛН.

Сред изследваните в динамика общо 266 проби от кръвни плазми на пациентите с ЛН установихме патологично повишени нива на anti-C3 при 84 (31,6%) от пробите

(Фигура 5.5.2). Изследвайки нивата на anti-C3 при проследените в динамика пациенти (с 2 и повече проби в хода на проучването при 52 пациенти с ЛН), установихме, че при първите проби, патологично повишени anti-C3 има при 15 (28,8%) от пациентите, а след среден период на проследяване от 13 месеца, патологично повишени нива на anti-C3 са налице също при 15 (28,8%) от пациентите. При 7 (46,7%) от пациентите с първоначално повишени нива на anti-C3, последните намаляват до референтни стойности, а при 8 (53,3%) от тези пациенти нивата се задържат в патологични граници. Сред пациентите с патологични anti-C3 на 13 месец от проследяването, при 8 (53,3%) нивата са били патологични от началото, а при 7 (46,7%) нарастват от изходно референтни. Средното нормализирано ниво на anti-C3 при пациентите, позитивни за anti-C3 в началото, е $3,289 \pm 2,706$ (от 1,023 до 8,820), докато след среден период от 13 месеца е $1,699 \pm 1,902$ (от 0,000 до 5,850), като е налице статистически значима разлика между тези две нива (Wilcoxon signed rank test, $p=0,015$) (Фигура 5.5.20 А). Средното нормализирано ниво на anti-C3 при позитивните в края на периода на проследяване пациенти с ЛН е $3,401 \pm 3,900$ (от 1,105 до 16,420), статистически незначимо по-високо от средното ниво на anti-C3 на същите тези пациенти в началото на проследяването, когато то е било $2,269 \pm 2,526$ (от 0,241 до 8,376) (Wilcoxon signed rank test, $p=0,330$) (Фигура 5.5.20 В).



Фигура 5.5.20. Динамика на нивата на anti-C3 при позитивните в началото на периода на проследяване (А) и при позитивните в края на периода на проследяване (В) пациенти с ЛН. При позитивните пациенти с ЛН за anti-C3 в началото е налице статистически значимо намаляване на средното нормализирано ниво на anti-C3 в края на периода на проследяване (Wilcoxon signed rank test, $p=0,015$), а при позитивните в края – статистически незначимо повишаване на нивото на anti-C3 в края (Wilcoxon signed rank test, $p=0,330$).

Сред проследяваните с повече от 1 проба пациенти с ЛН, при които са изследвани anti-C3, при първото изследване с активна ЛН са били 21 (40,4%), в състояние на частична ремисия на ЛН са били 15 (28,8%) и в състояние на пълна ремисия на ЛН са били 16 (30,8%). В края на проследяването с активна ЛН са били 14 (27,0%), в състояние на частична ремисия на ЛН са били 19 (36,5%) и в състояние на пълна ремисия на ЛН са били 19 (36,5%). При първото изследване, с категория А на ЛН по BILAG Renal score са били 18 (34,6%), с категория В – 18 (34,6%), с категория С – 4 (7,7%) и с категория D – 12 (23,1%). В края, разпределението на пациентите в категории на ЛН по BILAG Renal score е следното: с категория А – 6 (11,5%), с категория В – 24 (46,2%), с категория С – 5 (9,6%) и с категория D – 17 (32,7%).

5.5.7.1. Прогностично значение на автоантителата срещу C3.

При 42 (56,8%) от изходно включените в проучването пациенти с ЛН, при които са провеждани 3 или повече проби за anti-C3 в динамика, изследвахме връзките между нивата на anti-C3 и категорията по BILAG Renal score (Фигура 5.5.21) и нивата на anti-C3 и активността на ЛН, определена като активна, частична ремисия и пълна ремисия на нефропатията (Фигура 5.5.22). Патологични нива на anti-C3 поне в една от пробите установихме при 24 (57,1%) от пациентите.

Само при 5 пациенти установихме статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-C3 и категорията по BILAG (ASN, $r=0,89$; $p=0,042$; GSK, $r=1,00$; $p<0,0001$; JDJ, $r=0,87$; $p=0,006$; RNS, $r=-0,89$; $p=0,009$; UMK, $r=0,83$; $p=0,029$), както и само при 3 – статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-C3 и активността на ЛН (JDJ, $r=0,76$; $p=0,024$; RNS, $r=-0,89$; $p=0,009$; UMK, $r=0,83$; $p=0,021$) при прилагане на непараметричен корелационен анализ (Spearman, one-tailed).

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

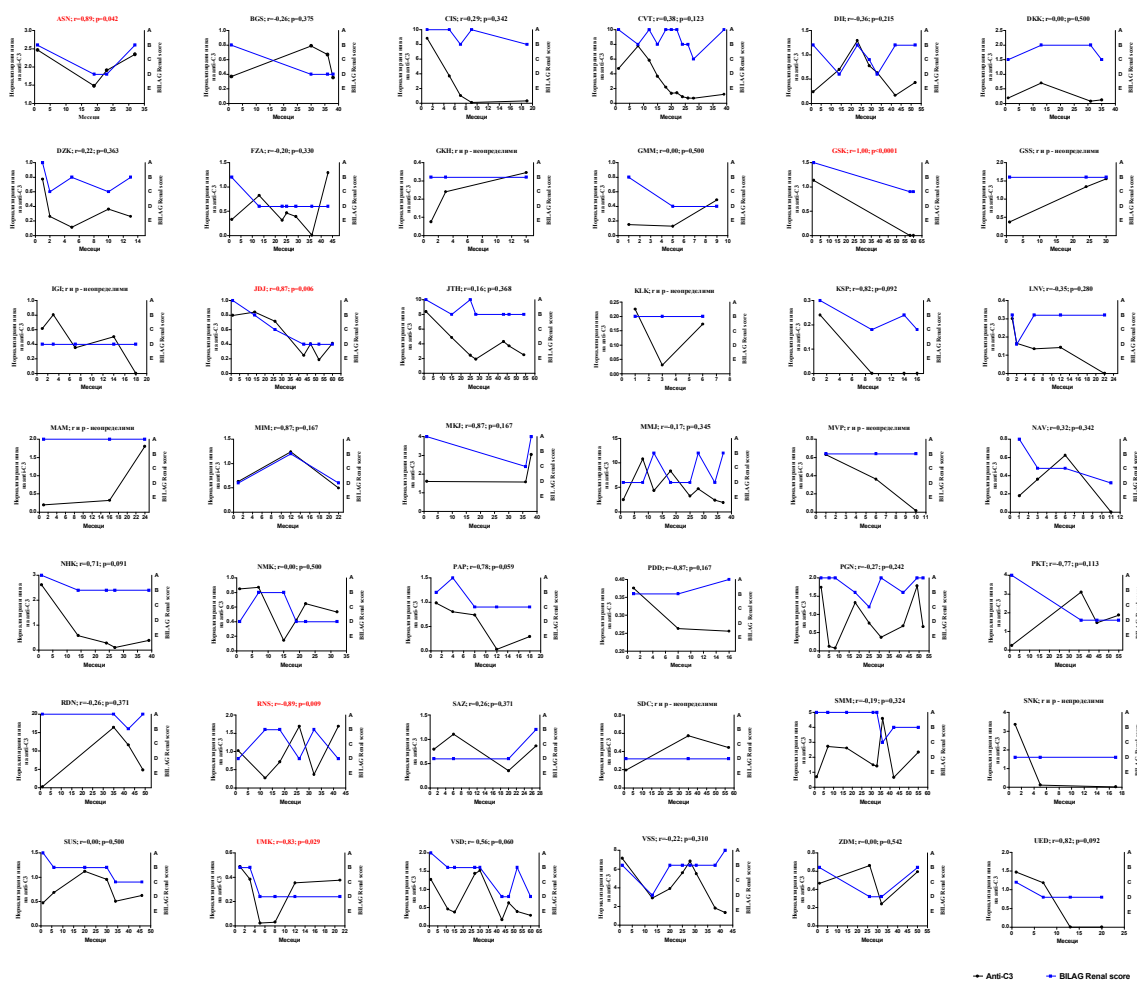
се отчете повишаване на нивата на anti-C3 до патологични стойности и не се отчете повишение на категорията на ЛН по BILAG Renal score са 15 (75,0% от всички, при които не се отчете повишаване на anti-C3 до патологични нива в динамика). Разпределението на пациентите с ЛН според наличието или липсата на повишение на нивата на anti-C3 до патологични стойности и според наличието или липсата на повишение на категорията на ЛН по BILAG Renal score е показано на Таблица 5.5.5.

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

Таблица 5.5.5. Разпределение на пациентите с ЛН, проследявани в динамика с 3 и повече проби по време на проучването, според наличието или липсата на повишение на нивата на anti-C3 до патологични стойности и наличието или липсата на последващо повишение на категорията на ЛН по BILAG Renal score.

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

Пациентите, при които в динамика anti-C3 нарастват до патологични нива, заедно с последващо активиране на ЛН са 16 (69,6% от всички, при които се установи в динамика повишаване на anti-C3 до патологични стойности). Пациентите, при които не се отчете повишаване на нивата на anti-C3 до патологични стойности и не се отчете активиране на ЛН (преминаване от пълна в частична ремисия или от частична ремисия в активна ЛН) са 13 (68,4% от всички, при които не се отчете повишаване на anti-C3 до патологични нива). Разпределението на пациентите с ЛН според наличието или липсата на повишение на нивата на anti-C3 до патологични стойности и според наличието или липсата на активиране на ЛН е показано на Таблица 5.5.6.

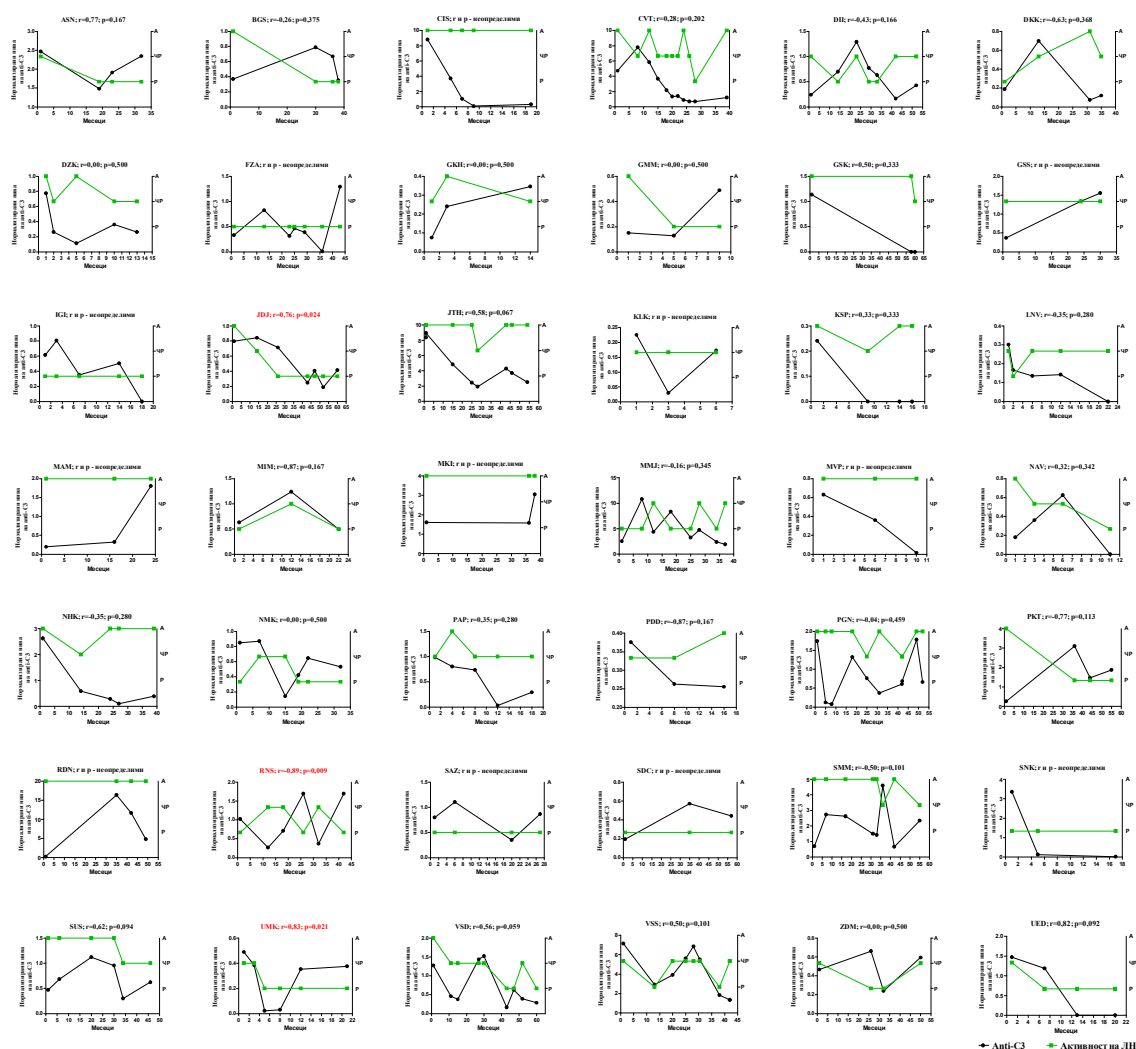


Фигура 5.5.21. Динамика на нормализираните нива на anti-C3 (в черно, по лява ордината на графиките) и категорията по BILAG Renal score (в синьо, по дясна ордината на графиките) при пациентите, проследени с 3 и повече проби. Само при 5 пациенти (обозначени в червено) се установи статистически значима корелационна връзка (Spearman, one-tailed) между нивата на anti-C3 и категорията по BILAG Renal score.

Таблица 5.5.6. Разпределение на пациентите с ЛН, проследявани в динамика с 3 и повече проби по време на проучването, според наличието или липсата на повишение на нивата на anti-C3 до патологични стойности и наличието или липсата на активиране на ЛН.

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

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



Фигура 5.5.22. Динамика на нормализираните нива на anti-C3 (в черно, по лява ордината на графиките) и активността на ЛН (активна ЛН - А, частична ремисия на ЛН - ЧР и пълна ремисия на ЛН - Р) (в зелено, по дясна ордината на графиките) при пациентите, проследени с 3 и повече проби. Само при 3 пациенти (обозначен в червено) се установи статистически значима корелационна връзка между нивата на anti-C3 и активността на ЛН.

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

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

С оглед динамичното проследяване на нивата на anti-C3 във връзка с основните клиничко-лабораторни и имунологични показатели при пациентите с ЛН определихме промяната на нивата на anti-C3 като процент ($\Delta N\%$) спрямо изходното ниво при първото изследване, по долупосочената формула (аналогично на изследването за anti-C1q, anti-C1r, anti-C1s и anti-C4), където: N_1 е нормализираното ниво на anti-C3 при първата проба на пациента в началото на проучването; N_x е нормализираното ниво на anti-C3 в крайното изследване (след среден период от 13 месеца на проследяване и лечение):

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

5.5.7.2.1. Динамика на автоантителата срещу С3 и протеинурията.

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

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

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

След прилагане на непараметричен корелационен анализ, не установихме статистически значима зависимост между промяната на нивата на anti-C3 ($\Delta N\%$) и промяната на протеинурията ($\Delta PU\%$) (Spearman, $r=0,08$; $p=0,279$).

При пациентите с нарастване на протеинурията спрямо изходната за период от 13 месеца, средното нормализирано ниво на anti-C3 в края на периода на проследяване е $1,700 \pm 3,709$, което е сравнително, но статистически незначимо по-високо от нивото на anti-C3 при пациентите, при които отчетохме намаление на протеинурията спрямо изходната за този период, което е $0,939 \pm 1,236$ (Mann-Whitney, $p=0,602$).

Липсва статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-C3 и протеинурията при всички изследваните в динамика проби от пациентите с ЛН (Spearman, $r=0,04$; $p=0,235$, Фигура 5.5.23 A1). Сред всички проби от пациентите с ЛН, които някога са имали екстраренални прояви на СЛЕ, установихме статистически значима, но слаба позитивна корелация между нормализираните нива на anti-C3 и протеинурията (Spearman, $r=0,13$; $p=0,031$, Фигура 5.5.23 A2). При пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ не установихме значима корелационна зависимост между нивата на anti-C3 и протеинурията (Spearman, $r=-0,15$; $p=0,144$, Фигура 5.5.23 A3).

5.5.7.2.2. Динамика на автоантителата срещу C3 и бъбречната функция.

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

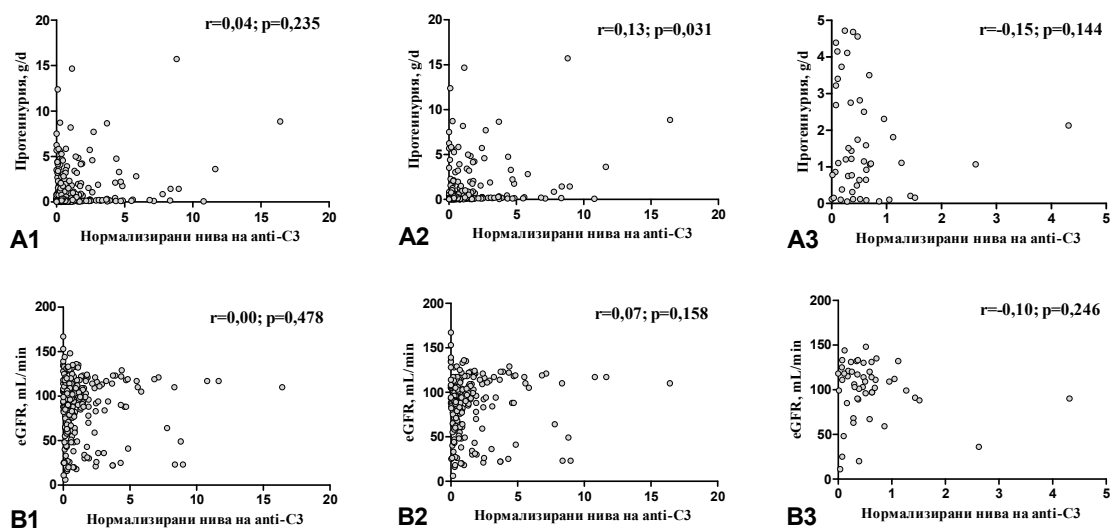
Аналогично на горепосоченото, определихме промяната на eGFR (ΔGFR) спрямо изходната GFR при пациентите, изследвани за anti-C3 (GFR_1 – GFR при първото изследване (mL/min); GFR_x – GFR при изследването след среден период на проследяване от 13 месеца (mL/min)):

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

Установихме липса на статистически значима корелационна зависимост между промяната на нормализираното ниво на anti-C3 спрямо изходното ($\Delta N\%$) и промяната на eGFR спрямо изходната ($\Delta eGFR$) за среден период от 13 месеца при пациентите с ЛН (Spearman, $r=-0,20$; $p=0,076$).

При пациентите с нарастване на eGFR спрямо изходната, средното нормализирано ниво на anti-C3 в края на периода на проследяване е $0,919 \pm 1,477$, което е сравнително, но статистически незначимо по-ниско от средното ниво на anti-C3 в края на периода на проследяване при пациентите, при които eGFR намалява ($1,738 \pm 3,477$) (Mann-Whitney, $p=0,057$).

Не установихме статистически значима корелационна зависимост между нивата на anti-C3 и eGFR при всички изследвани в динамика проби от пациентите с ЛН (Spearman, $r=0,00$; $p=0,478$, Фигура 5.5.23 B1). Сред всички проби от пациентите с ЛН, които някога са имали екстраренални прояви на СЛЕ, също не установихме значима корелация между нормализираните нива на anti-C3 и eGFR (Spearman, $r=0,07$; $p=0,158$, Фигура 5.5.23 B2), като липсата на такава зависимост е налице и при пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, $r=-0,10$; $p=0,246$, Фигура 5.5.23 B3).



Фигура 5.5.23. Липсват корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C3 и протеинурията (A) и anti-C3 и изчислената скорост на гломерулна филтрация (eGFR) (B): при всички изследвани в динамика проби от пациенти с ЛН (A1 и B1); при пробите, изследвани в динамика от пациенти с ЛН с екстраренални прояви на СЛЕ (A2 и B2) и при всички изследвани проби от пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ (A3 и B3) (Spearman, one-tailed).

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

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

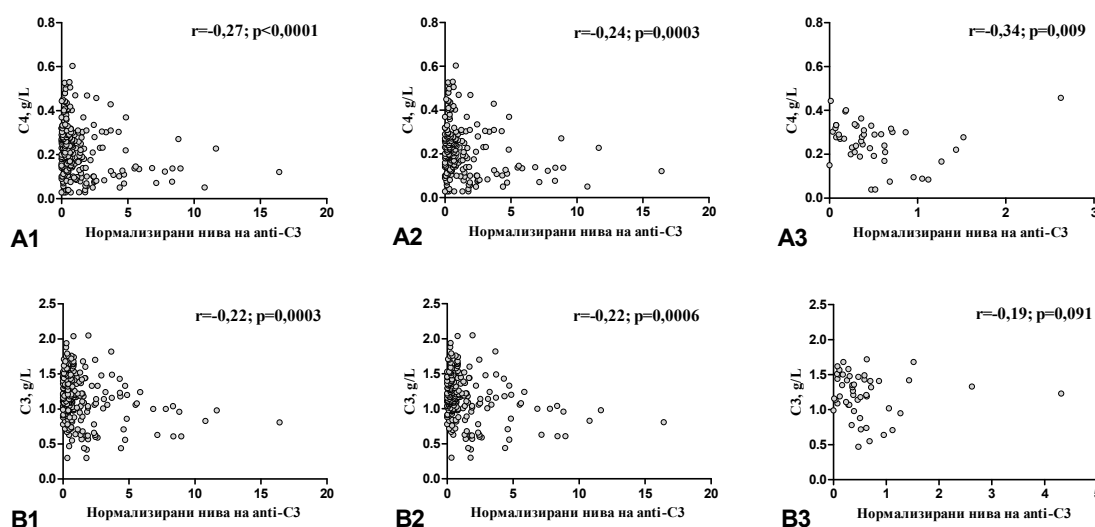
Аналогично, определихме и промените на C4 и C3 ($\Delta C4$ и $\Delta C3$) спрямо съответните изходни нива на C4 и C3 при изследването в началото (C_1 – съответното ниво на комплемента (C4 и C3) (g/L) в началото; C_x – съответното ниво на комплемента (C4 и C3) (g/L) в края на периода на проследяване):

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

Установихме липса на значима корелационна зависимост между промяната на нормализираните нива на anti-C3 спрямо изходните ($\Delta N\%$) и промяната на концентрацията на C4 спрямо изходната ($\Delta C4$) за периода на проследяване (Spearman, $r=-0,09$; $p=0,284$), а също така и липса на значима корелационна зависимост между промяната на нормализираните нива на anti-C3 спрямо изходните ($\Delta N\%$) и промяната на концентрацията на C3 спрямо изходната ($\Delta C3$) за същия период на проследяване (Spearman, $r=0,02$; $p=0,442$).

При изследване на зависимостите между нивата на anti-C3 и плазмените концентрации на C4 установихме, че сред всички динамично изследвани пациенти с ЛН, сред динамично изследваните пациенти с ЛН и екстраренални прояви на СЛЕ и сред динамично изследваните пациенти с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ съществуват статистически значими отрицателни слаби (умерена при пациентите без екстраренални прояви) корелационни зависимости (Spearman, съответно: $r=-0,27$, $p<0,0001$; $r=-0,24$, $p=0,0003$ и $r=-0,34$, $p=0,009$) (Фигура 5.5.24 A1, A2 и A3). Установихме наличие на статистически значими отрицателни слаби корелационни зависимости между нивата на anti-C3 и концентрациите на C3 сред всички пациенти,

изследвани в динамика с ЛН, както и сред динамично изследваните с ЛН и екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, съответно: $r=-0,22$, $p=0,0003$; $r=-0,22$, $p=0,0006$) (Фигура 5.5.24 В1 и В2). Сред динамично изследваните пациенти с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ не установихме статистически значима корелационна зависимост между нивото на anti-C3 и плазмената концентрация на C3 (Spearman, $r=-0,19$; $p=0,091$) (Фигура 5.5.24 В3).



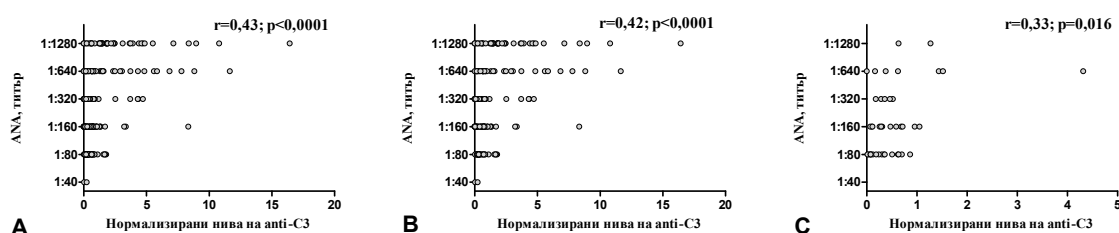
Фигура 5.5.24. Корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C3, изследвани в динамика при пациентите с ЛН и плазмените концентрации на C4 (А) и C3 (В) в тези проби. (А1 и В1) При всички пациенти с ЛН; (А2 и В2) При пациентите с ЛН с екстраренални прояви на СЛЕ; (А3 и В3) При пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ. (Spearman, one-tailed).

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

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

Проучвайки зависимостите между нивата на anti-C3 и титрите на ANA сред всички пациенти с ЛН, изследвани в динамика (при които са изследвани едновременно anti-C3 и ANA, $N=220$ проби), установихме, че е налице статистически значима

умерена позитивна корелационна зависимост между нормализираното ниво на anti-C3 и титъра на ANA (Spearman, $r=0,43$; $p<0,0001$) (Фигура 5.5.25 А). При изследвания сред групите от пациентите с ЛН с екстраренални прояви на СЛЕ и при пациенти с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ също установихме статистически значими умерени позитивни корелационни зависимости (Spearman, съответно: $r=0,42$; $p<0,0001$ и $r=0,33$; $p=0,016$) (Фигура 5.5.25 В и С).

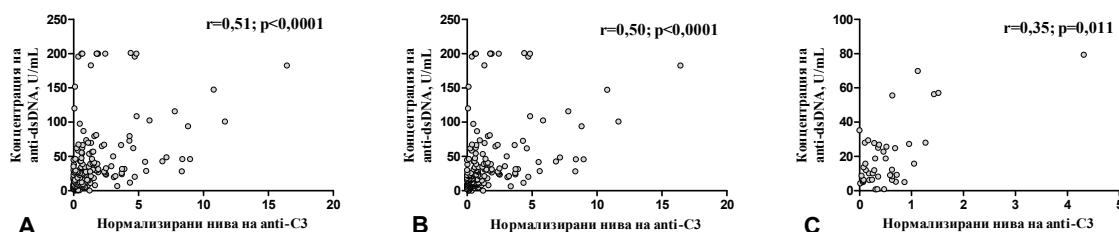


Фигура 5.5.25. Корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C3 и титрите на ANA (показани в логаритмичен мащаб по ординатите): **А.** При всички проведени в динамика проби от пациентите с ЛН (Spearman, $r=0,43$; $p<0,0001$); **В.** При пациентите с ЛН и екстраренални прояви на СЛЕ, изследвани в динамика (Spearman, $r=0,42$; $p<0,0001$); **С.** При пациентите с ЛН без екстраренални прояви на СЛЕ, изследвани в динамика (Spearman, $r=0,33$; $p=0,016$).

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

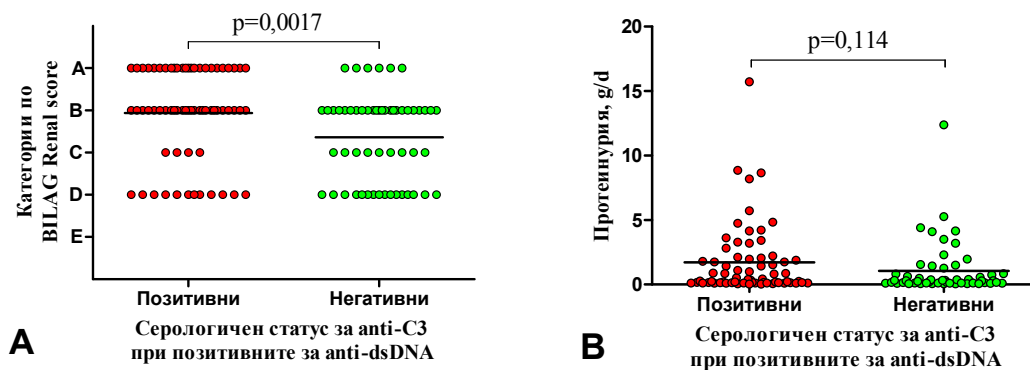
Динамиката на концентрацията на anti-dsDNA (U/mL) за периода на проследяване и лечение на пациентите с ЛН показва средно начално ниво от $32,6 \pm 37,0$ (от 5,6 до 195,8) U/mL и средно ниво в края от $33,2 \pm 43,8$ (от 0,1 до 183, 0) U/mL, като разликата не е статистически значима (Wilcoxon signed rank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

Проучвайки зависимостите между нивото на anti-C3 и концентрацията на anti-dsDNA (U/mL) сред всички пациенти с ЛН, изследвани в динамика (при които са изследвани едновременно anti-C3 и anti-dsDNA, $N=224$ проби), установихме наличие на статистически значима умерена по сила позитивна корелационна зависимост между нормализираното ниво на anti-C3 и концентрацията на anti-dsDNA (Spearman, $r=0,51$; $p<0,0001$, Фигура 5.5.26 А). Тази зависимост се потвърди и сред пациентите с ЛН, изследвани в динамика с и без екстраренални прояви на СЛЕ (Spearman, съответно: $r=0,50$, $p<0,0001$ и $r=0,35$, $p=0,011$) (Фигура 5.5.26 В и С).



Фигура 5.5.26. Корелационни зависимости между нормализираните нива на anti-C3 и концентрациите на anti-dsDNA (U/mL) при: **A.** Всички пациентите с ЛН, изследвани в динамика (Spearman, $r=0.51$; $p<0.0001$); **B.** При пациентите с ЛН с екстрауренални прояви на СЛЕ, изследвани в динамика (Spearman, $r=0.50$; $p<0.0001$); **C.** При пациенти с ЛН без екстрауренални прояви на СЛЕ, изследвани в динамика (Spearman, $r=0.35$; $p=0.011$).

При сравнителен анализ сред всички изследвани в динамика проби от пациенти, позитивни за anti-dsDNA ($N=121$), установихме, че при позитивните едновременно за anti-dsDNA и anti-C3 пациенти с ЛН средната и геометричната средна на ранговете (категориите по BILAG Renal score) са статистически значимо по-високи от средната и геометричната средна при пациентите, които са позитивни за anti-dsDNA и негативни за anti-C3 (Mann-Whitney, $p=0.0017$) (Фигура 5.5.27 A). Установихме сравнително по-висока протеинурия при пациентите едновременно позитивни за anti-dsDNA и anti-C3 (1.72 ± 2.73 g/d) в сравнение с протеинурията при пациентите, позитивни за anti-dsDNA, но негативни за anti-C3 (1.05 ± 2.01 g/d), въпреки че разликата не е статистически значима (Mann-Whitney, $p=0.114$) (Фигура 5.5.27 B).



Фигура 5.5.27. А. Сравнителен анализ между категориите (ранговете) на ЛН по BILAG Renal score при позитивните за anti-dsDNA пациенти с ЛН, изследвани в динамика, разделени въз основа на серологичния статус за anti-C3. Налице е статистически значимо по-висока средна категория по BILAG Renal score на ЛН при позитивните за anti-C3 (Mann-Whitney, $p=0,0017$). **В.** Сравнителен анализ между средните нива на протеинурия при пациентите, позитивни едновременно за anti-dsDNA и anti-C3, и тези, позитивни за anti-dsDNA и негативни за anti-C3 (Mann-Whitney, $p=0,114$).

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

При пациентите, изследвани за anti-C3, включени в проучването ($N=74$), според показанията е провеждано предходно имунопатогенетично лечение с: Кортикостероиди (CS) (Methylprednisolone; Prednisone; Prednisolone) при 70 (94,6%) за средна продължителност от 47,9 месеца (от 15 дни до 270 месеца); Cyclophosphamide (CYC) при 64 (86,5%) за средна продължителност от 9,0 месеца (от 3 дни до 36 месеца); Azathioprine или Mycophenolate mofetil (AZA/MMF) при 34 (45,9%) за средна продължителност от 16,3 месеца (от 1 до 108 месеца); Cyclosporine A (CyA) при 17 (23,0%) за средна продължителност от 9,1 месеца (от 1 до 51 месеца); Immunovenin intact (IVIG) при 6 (8,1%) със среден брой на приложените курсове 2 (от 1 до 3 курса) и плазмафереза (ПФ) при 22 (32,0%) със среден брой на сеансите 5 (от 1 до 10 сеанса).

При проследените за среден период от 13 месеца (от 6 до 25 месеца) пациенти с ЛН ($N=52$) по време на нашето проучване при 40 (76,9%) пациенти е проведена имунопатогенетична терапия с CS за среден период от 9,0 (от 1 до 24) месеца; при 25 (48,1%) пациенти – с CYC за среден период от 2 месеца (от 3 дни до 8 месеца); при 31 (59,6%) пациенти – с AZA/MMF за среден период от 5,6 (от 1 до 24 месеца); при 3 (5,8%) пациенти – с CyA за среден период от 8,0 (от 3 до 12 месеца); при 2 (3,8%)

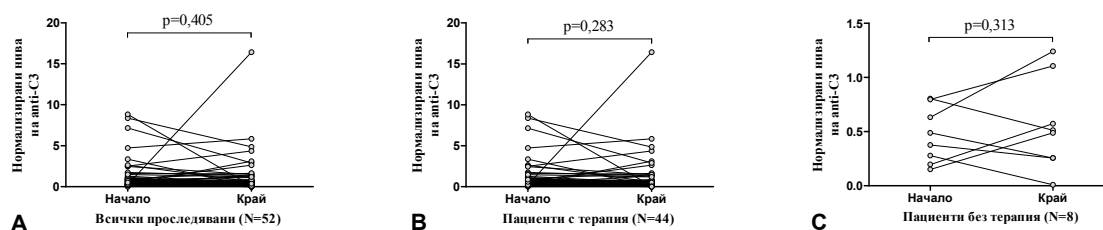
пациенти – с IVIG, като при единия е проведен един курс а при втория пациент – 3 курса и при 7 (13,5%) пациенти – с плазмафереза със среден брой на проведените сеанси 3 (от 2 до 5).

При всички проследявани пациенти (N=52), в началния момент средното нормализирано ниво на anti-C3 е $1,281 \pm 1,932$ (от 0,008 до 8,820), а в края на периода на проследяване – $1,237 \pm 2,482$ (от 0,000 до 16,420), като макар средното ниво да намалява разликата в началото и в края е статистически незначима (Wilcoxon signed rank test, $p=0,405$) (Фигура 5.5.28 А). При пациентите с проведена имунопатогенетична терапия в рамките на периода на проследяване (N=44), средното нормализирано ниво на anti-C3 в началото е $1,429 \pm 2,067$ (от 0,008 до 8,820), а в края – $1,362 \pm 2,679$ (от 0,000 до 16,420), като в тази група отново установихме статистически незначимо намаление на нивото на anti-C3 в края на периода на проследяване и лечение (Wilcoxon signed rank test, $p=0,283$) (Фигура 5.5.28 В). В групата пациенти, при които не е провеждана имунопатогенетична терапия (N=8), средното нормализирано ниво на anti-C3 в началото е $0,465 \pm 0,259$ (от 0,150 до 0,805), а в края – $0,555 \pm 0,424$ (от 0,008 до 1,241), като в тази група средното ниво на anti-C3 статистически незначимо нараства в края на периода на проследяване (Wilcoxon signed rank test, $p=0,313$) (Фигура 5.5.28 С).

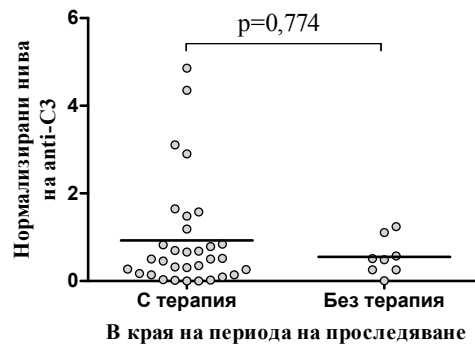
При прилагане на непараметричен сравнителен анализ установихме, че липсва статистически значима разлика между средните нормализирани нива на anti-C3 в края на периода на проследяване при пациентите, при които е провеждана имунопатогенетична терапия ($0,929 \pm 1,228$), и при пациентите без терапия ($0,555 \pm 0,424$) (Mann-Whitney, $p=0,774$) (Фигура 5.5.29).

С оглед вида на проведеното имунопатогенетично лечение, сред пациентите, при които е провеждано такова, обособихме основно 6 групи: 15 (34,1%) пациенти, при което е провеждано комбинирано лечение с CS+CYC+AZA/MMF; 8 (18,2%) пациенти, при които е провеждано комбинирано лечение с CS+CYC; 12 (27,3%) пациенти, при които е провеждано комбинирано лечение с CS+AZA или CS+MMF; 5 (11,4%) пациенти, при които е провеждана монотерапия с CS; 2 (4,5%) пациенти, при които е провеждано комбинирано лечение с CYC и AZA и 2 (4,5%) пациенти, при които е провеждана монотерапия: с AZA при единия и с MMF при другия. При сравнителен анализ на нивата на anti-C3 в началото и в края на проведеното лечение при различните групи пациенти установихме следното: в групата на терапия с CS+CYC+AZA/MMF

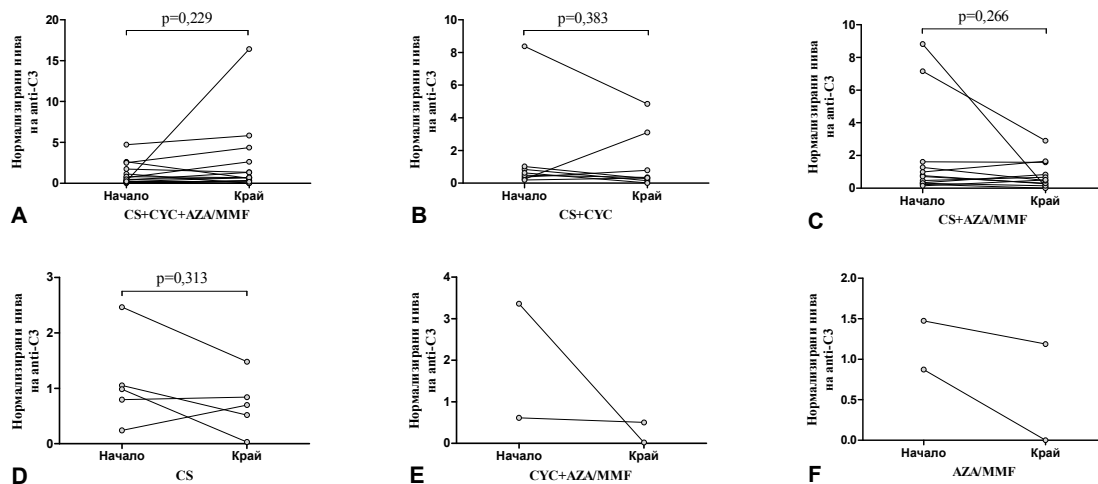
средното нормализирано ниво на anti-C3 в началото е $1,067 \pm 1,321$ (от 0,008 до 4,722), а в края – $2,359 \pm 4,241$ (от 0,000 до 16,420), като в тази група нивото се увеличава, но статистически незначимо (Wilcoxon signed rank test, $p=0,229$) (Фигура 5.5.30 А); в групата на лечение с CS+CYC средното ниво в началото е $1,523 \pm 2,783$ (от 0,196 до 8,376), а в края – $1,232 \pm 1,774$ (от 0,015 до 4,857), като в тази група средното ниво намалява, но статистически незначимо (Wilcoxon signed rank test, $p=0,383$) (Фигура 5.5.30 В); в групата на лечение с CS+AZA/MMF средното ниво в началото е $1,900 \pm 2,898$ (от 0,143 до 8,820), а в края – $0,782 \pm 0,857$ (от 0,000 до 2,902), като в тази група средното ниво също намалява, но статистически незначимо (Wilcoxon signed rank test, $p=0,266$) (Фигура 5.5.30 С); в групата на монотерапия с CS средното ниво в началото е $1,108 \pm 0,823$ (от 0,241 до 2,466), а в края – $0,714 \pm 0,527$ (от 0,030 до 1,481), като средното ниво в тази група също намалява, но статистически незначимо (Wilcoxon signed rank test, $p=0,313$) (Фигура 5.5.30 D); в групите на лечение с CYC+AZA и AZA/MMF попадат по 2 пациенти, като от Фигура 5.5.30 Е и F се вижда намаляване на нивата на anti-C3 в групата на терапия с CYC+AZA и намаляване на нивата в групата на терапия с AZA/MMF, но поради малкия брой на пациентите статистическият сравнителен анализ в тези две групи не е коректен.



Фигура 5.5.28. Крайни и начални нива на anti-C3 при: **А.** Всички проследявани пациенти (N=52), при които се отчита статистически незначимо намаляване на средното нормализирано ниво ($p=0,405$); **В.** Пациентите, при които е провеждана имунопатогенетична терапия (N=44), при които нивото също статистически незначимо намалява в края ($p=0,283$) и **С.** Пациентите, при които не е провеждана имунопатогенетична терапия през периода на проследяване (N=8), при които се отчита статистически незначимо увеличаване на нивото ($p=0,313$) (Wilcoxon signed rank test).



Фигура 5.5.29. Средни нормализирани нива на anti-C3 в края на периода на проследяване при пациентите с ЛН с имунопатогенетична терапия и без такава. Липсва статистически значима разлика между тези нива (Mann-Whitney, $p=0,774$).



Фигура 5.5.30. Нормализирани нива на anti-C3 в началото и в края на период на проследяване при пациенти, при които е провеждана терапия с: **A.** CS+CYC+AZA/MMF – средното ниво на anti-C3 нараства статистически незначимо в края (Wilcoxon signed rank test, $p=0,229$); **B.** CS+CYC – средното ниво на anti-C3 намалява статистически незначимо в края (Wilcoxon signed rank test, $p=0,383$); **C.** CS+AZA/MMF – средното ниво на anti-C3 намалява статистически незначимо в края (Wilcoxon signed rank test, $p=0,266$); **D.** CS – средното ниво на anti-C3 намалява статистически незначимо в края (Wilcoxon signed rank test, $p=0,313$). **E.** CYC+AZA – и при двамата пациенти нивата на anti-C3 намаляват в края; **F.** MMF при един пациент и AZA при един пациент, като нивата на anti-C3 намаляват в края.

ИЗВОДИ:

1. При изследваната група пациенти с ЛН установихме патологично повишени anti-C3 в значим процент от пациентите (25,7%), като при проследяване в динамика anti-C3 се позитивират в около 57,1% от пациентите, резултат, който би следвало да бъде потвърден в по-големи кохортни проучвания.

2. Не установихме връзка на anti-C3 с пола на пациентите и давността на ЛН, но е налице такава с възрастта на пациентите – с нарастване на възрастта намалява нивото на anti-C3.

3. Установихме значими връзки между anti-C3 и лабораторни маркери за оценка активността на ЛН като протеинурията и уринния седимент – пациентите с патологично повишени anti-C3 са с по-висока протеинурия и значимо по-чисто с патологичен седимент, като не установихме съществена връзка между anti-C3 и eGFR.

4. Установихме категорични връзки между anti-C3 и имунологичните маркери за активност: връзка на anti-C3 с хипокомплементемия C4 и с хипокомплементемия C3; както и връзка на anti-C3 с anti-dsDNA, като пациентите с ЛН, позитивни едновременно за anti-dsDNA и anti-C3, имат сравнително по-високостепенна протеинурия и значимо по-висока категория на ЛН по BILAG Renal score в сравнение с тези, които са позитивни за anti-dsDNA, но негативни за anti-C3.

5. Установихме значимо влияние на anti-C3 върху хистологичния клас на ЛН – патологично повишените anti-C3 определят наличие на IV клас ЛН, като освен това сравнително най-високи нива на anti-C3 се установяват при дифузна ЛН. Налице е категорична значима връзка на anti-C3 с хистологични лезии на активност, каквито са ендокапилярната пролиферация, субендотелните депозити и интерстициалното възпаление, както и значима връзка на anti-C3 с хистологичния индекс на активност на ЛН.

6. Установихме съществени връзки между anti-C3 и комплексната оценка на активността на ЛН: пациентите с повишени anti-C3 са с по-висока категория на ЛН по BILAG Renal score, значимо определят наличието на категория А по BILAG Renal score, а така също и повишените нива на anti-C3 се установяват при пациенти с активна ЛН и значимо определят наличието на активна ЛН.

7. Не установихме съществени динамични зависимости между anti-C3 и маркери за лабораторна оценка на ЛН като протеинурията и eGFR.

8. Установихме категорични значими динамични зависимости между нивата на anti-C3 и нивата на C4 и C3 компоненти на комплемента, а така също и между нивата на anti-C3 и anti-dsDNA и anti-C3 и ANA, като хипокомплементемията и патологично повишените anti-dsDNA са свързани с по-високи нива на anti-C3, което би могло да определи anti-C3 като динамичен маркер за оценка на имунологичната активност при пациентите с ЛН.

9. Установихме предиктивна роля на anti-C3 като маркер за последващо активиране на ЛН (повишаване на категорията на ЛН по BILAG Renal score и повишаване на активността на ЛН, определена с критериите за активна, частична ремисия и пълна ремисия на ЛН), но тази роля подлежи на допълнителни изследвания в по-големи кохортни проучвания.

10. Не установихме значими разлики в повлияване на нивата на anti-C3 от вида на проведеното имунопатогенетично лечение при изследваните пациенти.

11. Anti-C3 би могло да бъде използвано като маркер за оценка на имунологичната активност на ЛН, допълвайки останалите маркери за клинична и имунологична активност, като това значение на anti-C3 подлежи на валидиране в по-големи кохортни проучвания.

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

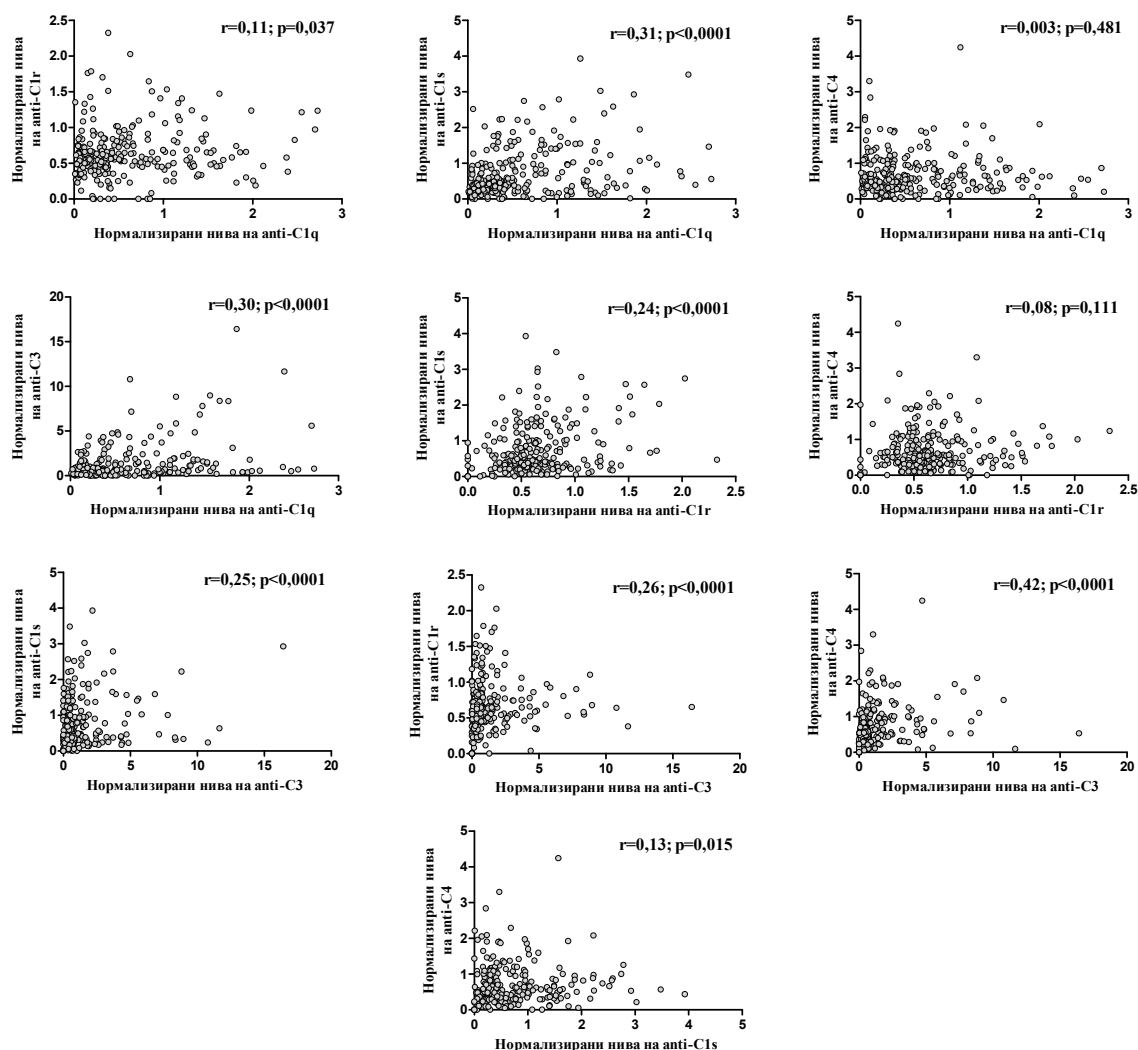
В рамките на лонгитудинално проучване в динамика на изследваните пациенти с ЛН (N=266 проби) установихме статистически значими корелационни зависимости между нормализираните нива на антикомплементните автоантитела (Таблица 5.6.1 и Фигура 5.6.1).

Таблица 5.6.1. Корелационни зависимости между нормализираните нива на различните изследвани антикомплементни автоантитела при всички изследвани в динамика пациенти с ЛН.

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

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

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

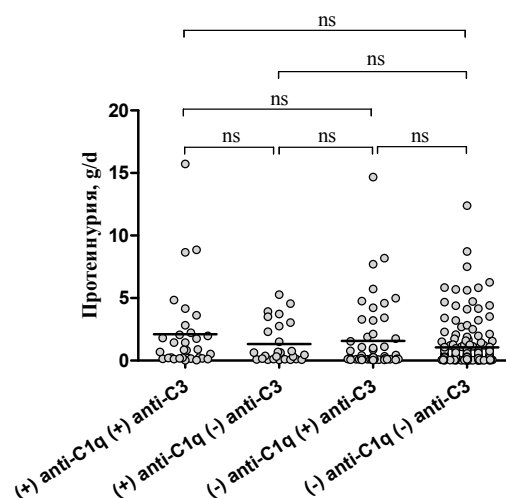


Фигура 5.6.1. Корелационни зависимости между нормализираните нива на антикомплементните автоантитела (Spearman).

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

Изследвахме влиянието на комбинацията от позитивния и негативния статус за anti-C1q и anti-C3 върху протеинурията при пациентите с ЛН. Не установихме статистически значима разлика между нивата на протеинурията при пациентите с ЛН в различните групи, обособени според наличието или липсата на патологично повишени anti-C1q и anti-C3 (One-way ANOVA, $p=0,086$; Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$) (Фигура 5.6.2). Въз основа на това установихме липса на статистически значимо влияние на серологичния статус на anti-C1q и серологичния статус на anti-C3 върху протеинурията (Two-ways ANOVA, съответно $F=1,34$, $p=0,249$ и $F=3,53$, $p=0,062$).

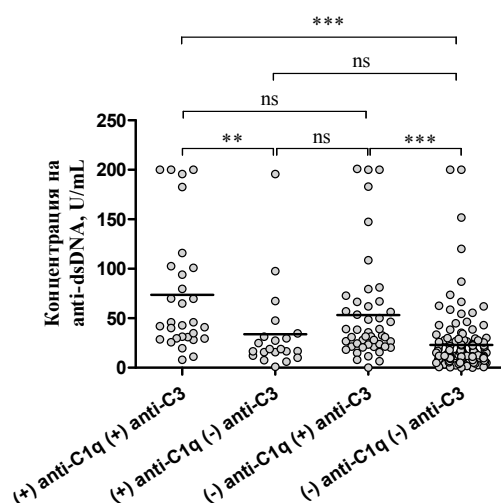
Ефектът на серологичния статус за anti-C1q върху протеинурията не се различава при различните серологични статуси за anti-C3 (Two-ways ANOVA, $F=0,12$, $p=0,729$).



Фигура 5.6.2. Средни нива на протеинурията (g/d) при пациентите с ЛН в зависимост от двойния серологичен статус за anti-C1q и anti-C3. Липсва статистически значима разлика между нивата в различните групи пациенти (One-way ANOVA, $p=0,086$; Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$).

Изследвахме влиянието на комбинацията от позитивния и негативния статус за anti-C1q и anti-C3 върху концентрацията на anti-dsDNA при пациентите с ЛН. При пациентите, позитивни едновременно за anti-C1q и anti-C3, средната концентрация на anti-dsDNA е статистически значимо по-висока от тази при пациентите едновременно негативни за anti-C1q и anti-C3. Концентрацията на anti-dsDNA е статистически значимо по-висока при пациентите позитивни едновременно за anti-C1q и anti-C3 от тази при пациентите позитивни за anti-C1q и негативни за anti-C3. Концентрацията на anti-dsDNA е статистически значимо по-висока при пациентите негативни за anti-C1q и позитивни за anti-C3 от тази при пациентите негативни за anti-C1q и негативни за anti-C3 (One-way ANOVA, $p<0,0001$; Bonferroni's multiple comparison test) (Фигура 5.6.3 и Таблица 5.6.2). Въз основа на това определихме влияние на серологичния статус на anti-C1q и на серологичния статус на anti-C3 върху концентрацията на anti-dsDNA, като по-силно влияние за наличие на повишена концентрация на anti-dsDNA има позитивния серологичен статус за anti-C3 (Two-ways ANOVA, съответно: $F=4,94$, $p=0,027$ и $F=24,78$, $p<0,0001$), докато ефектът на anti-C1q върху концентрацията на anti-dsDNA

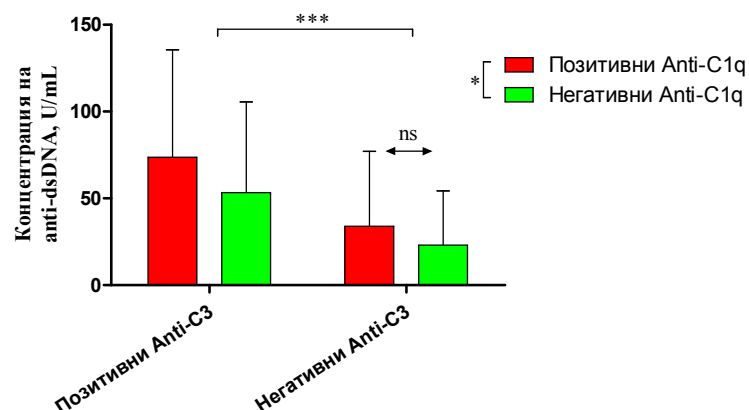
при различните серологични статуси за anti-C3 не се различава (Two-ways ANOVA, $F=0,46$, $p=0,497$) (Фигура 5.6.4).



Фигура 5.6.3. Средни нива на концентрацията на anti-dsDNA (U/mL) при пациентите с ЛН в зависимост от двойния серологичен статус за anti-C1q и anti-C3. Налице са статистически значими разлики между концентрациите на anti-dsDNA при пациентите позитивни едновременно за anti-C1q и anti-C3 и тези, негативни едновременно за anti-C1q и anti-C3; при пациентите позитивни за anti-C1q и позитивни за anti-C3 и тези позитивни за anti-C1q и негативни за anti-C3; при пациентите негативни за anti-C1q и позитивни за anti-C3 и тези негативни за anti-C1q и негативни за anti-C3. Между останалите групи няма статистически значима разлика (One-way ANOVA, $p<0,0001$; Bonferroni's multiple comparison test, $p<0,05$ за посочените групи).

Таблица 5.6.2. Множествен сравнителен анализ на концентрацията на anti-dsDNA при пациентите с ЛН в зависимост от двойния серологичен статус за anti-C1q и anti-C3.

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



Фигура 5.6.4. Концентрация на anti-dsDNA при пациентите с ЛН в зависимост от комбинирания серологичен статус за anti-C1q и anti-C3. Серологичният статус за anti-C1q статистически значимо повлиява концентрацията на anti-dsDNA (Two-ways ANOVA, $F=4,94$, $p=0,027$ (*)). Серологичният статус за anti-C3 статистически значимо повлиява концентрацията на anti-dsDNA (Two-ways ANOVA, $F=24,78$, $p<0,0001$ (***)). Ефектът на серологичния статус за anti-C1q върху концентрацията на anti-dsDNA не се различава при различните серологични статуси за anti-C3 (Two-ways ANOVA, $F=0,46$, $p=0,497$ (ns)).

Изследвахме връзката между серологичния статус за anti-C1q и anti-C3 и наличието на категория А на ЛН по BILAG Renal score. Сред двойно позитивните за anti-C1q и anti-C3, изследвани в динамика, при 16 (50,0% от всички едновременно позитивни за anti-C1q и anti-C3) е налице категория А, а сред едновременно негативните за anti-C1q и anti-C3, пациентите с категория, различна от А (В, С или D) са 140 (90,3% от всички едновременно негативни за anti-C1q и anti-C3) (Таблица 5.6.3). Въз основа на това разпределение установихме, че двойно позитивният статус за anti-C1q и anti-C3 статистически значимо определя наличието на категория А на ЛН по BILAG Renal score (Fisher's exact test, $p<0,0001$) с чувствителност от 51,6%, специфичност от 89,7%, позитивна предиктивна стойност от 50,0%, негативна предиктивна стойност от 90,3%. Релативният риск (RR) за наличие на категория А на ЛН при двойно позитивен серологичен статус за anti-C1q и anti-C3 е 5,2.

Таблица 5.6.3. Разпределение на пациентите с ЛН според двойно позитивния и двойно негативния статус за anti-C1q и anti-C3 и наличието на категория А по BILAG Renal score на ЛН.

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

Изследвахме връзката между серологичния статус за anti-C1q и anti-C3 и хистологичния клас ЛН. Сред едновременно позитивните за anti-C1q и anti-C3 пациенти с ЛН, изследвани изходно в проучването, при 6 (100% от всички едновременно позитивни за anti-C1q и anti-C3, които имат хистологична диагноза) е налице IV хистологичен клас ЛН, а сред пациентите едновременно негативни за anti-C1q и anti-C3 при 35 (76,1% от всички едновременно негативни за anti-C1q и anti-C3, които имат хистологична диагноза) е налице хистологичен клас на ЛН, различен от IV (Таблица 5.6.4). Въз основа на това разпределение установихме, че позитивният статус едновременно за anti-C1q и anti-C3 статистически значимо определя наличието на ЛН от IV клас (Fisher's exact test, $p=0,0006$) с чувствителност от 35,3%, специфичност от 100%, позитивна предиктивна стойност от 100%, негативна предиктивна стойност от 76,1%. Релативният риск за наличие на дифузна лупусна нефропатия (IV клас) при наличие на двойно позитивни за anti-C1q и anti-C3 пациенти е 4,2.

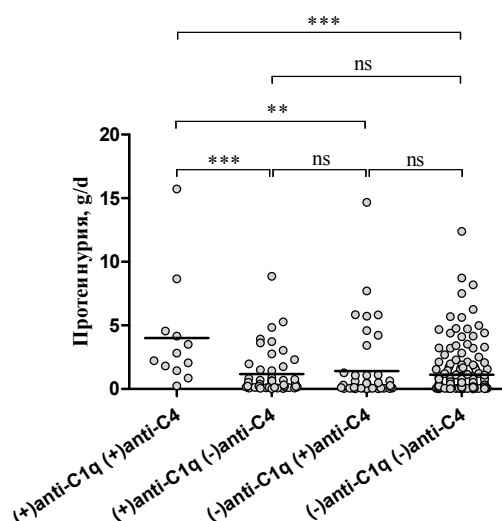
Таблица 5.6.4. Разпределение на пациентите с ЛН според двойно позитивния и двойно негативния статус за anti-C1q и anti-C3 и наличието на IV хистологичен клас на ЛН.

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

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

Изследвахме влиянието на комбинацията от позитивния и негативния статус за anti-C1q и anti-C4 върху протеинурията при пациентите с ЛН. Установихме статистически значима разлика между нивата на протеинурията при пациентите с ЛН в различните групи, обособени според наличието или липсата на патологично повишени anti-C1q и anti-C4. Протеинурията при двойно позитивните пациенти за anti-C1q и anti-C4 е значимо по-висока от тази при позитивните за anti-C1q и негативните за anti-C4, значимо по-висока от тази при негативните за anti-C1q и позитивните за anti-C4 и значимо по-висока от тази при двойно негативните за anti-C1q и anti-C4 (One-way ANOVA, $p=0,0003$; Bonferroni's multiple comparison test, $p<0,05$ за посочените групи) (Фигура 5.6.5 и Таблица 5.6.5). Въз основа на това определихме влиянието на серологичния статус на anti-C1q и серологичния статус на anti-C4 върху протеинурията,

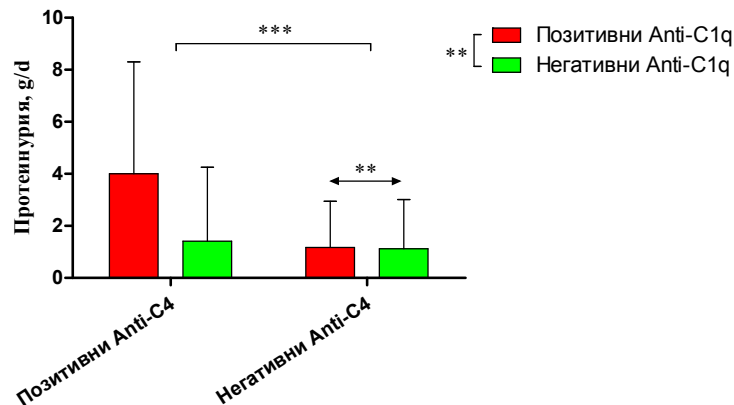
като по-силно влияние за наличие на повишена протеинурия има серологичния статус за anti-C4 (Two-ways ANOVA, съответно $F=10,73$, $p=0,0012$ и $F=14,99$, $p=0,0001$). Ефектът на серологичния статус за anti-C1q върху протеинурията се различава при различните серологични статуси за anti-C4 (Two-ways ANOVA, $F=9,94$, $p=0,0018$) (Фигура 5.6.6).



Фигура 5.6.5. Средни нива на протеинурията (g/d) при пациентите с ЛН в зависимост от двойния серологичен статус за anti-C1q и anti-C4. Налице е статистически значима разлика между нивата на протеинурията в посочените групи пациенти (One-way ANOVA, $p=0,0003$; Bonferroni's multiple comparison test, $p<0,05$ за посочените групи пациенти).

Таблица 5.6.5. Множествен сравнителен анализ на протеинурията при пациентите с ЛН в зависимост от двойния серологичен статус за anti-C1q и anti-C4.

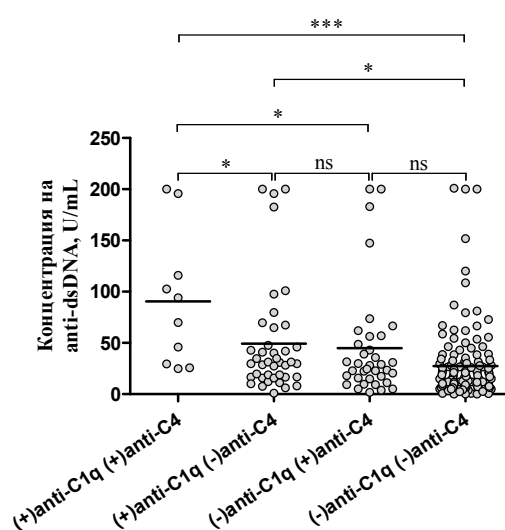
Bonferroni's multiple comparison test	Mean Diff.	t	$p<0,05$	95% CI of diff
(+)anti-C1q (+)anti-C4 с (+)anti-C1q (-)anti-C4	2,833	3,974	Да (***)	0,9379 до 4,728
(+)anti-C1q (+)anti-C4 с (-)anti-C1q (+)anti-C4	2,590	3,609	Да (**)	0,6821 до 4,498
(+)anti-C1q (+)anti-C4 с (-)anti-C1q (-)anti-C4	2,882	4,372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



Фигура 5.6.6. Протеинурия при пациентите с ЛН в зависимост от комбинирания серологичен статус за anti-C1q и anti-C4. Серологичният статус за anti-C1q статистически значимо повлиява протеинурията (Two-ways ANOVA, $p=0,0012$ (**)). Серологичният статус за anti-C4 статистически значимо повлиява протеинурията (Two-ways ANOVA, $p=0,0001$ (***)). Ефектът на серологичния статус за anti-C1q върху протеинурията се различава при различните серологични статуси за anti-C4 (Two-ways ANOVA, $p=0,0018$ (**)).

Изследвахме влиянието на комбинацията от позитивния и негативния статус за anti-C1q и anti-C4 върху концентрацията на anti-dsDNA при пациентите с ЛН. При пациентите позитивни едновременно за anti-C1q и anti-C4 средната концентрация на anti-dsDNA е статистически значимо по-висока от тази при пациентите едновременно негативни за anti-C1q и anti-C4. Концентрацията на anti-dsDNA е статистически значимо по-висока при пациентите позитивни едновременно за anti-C1q и anti-C4 от тази при пациентите позитивни за anti-C1q и негативни за anti-C4. Концентрацията на anti-dsDNA е статистически значимо по-висока при пациентите едновременно позитивни за anti-C1q и за anti-C4 от тази при пациентите негативни за anti-C1q и позитивни за anti-C4. Концентрацията на anti-dsDNA е статистически значимо по-висока при пациентите позитивни за anti-C1q и негативни за anti-C4 от тази при пациентите негативни едновременно за anti-C1q и anti-C4. Няма статистически значима разлика между концентрацията на anti-dsDNA при пациентите позитивни за anti-C1q и негативни за anti-C4 и тази при пациентите негативни за anti-C1q и позитивни за anti-C4. Няма статистически значима разлика между концентрацията на anti-dsDNA при пациентите негативни за anti-C1q и позитивни за anti-C4 и тази при пациентите негативни едновременно за anti-C1q и anti-C4. (One-way ANOVA, $p<0,0001$; Bonferroni's multiple comparison test) (Фигура 5.6.7 и Таблица 5.6.6). Въз основа на това определихме влияние на серологичния статус на anti-C1q и на серологичния статус на

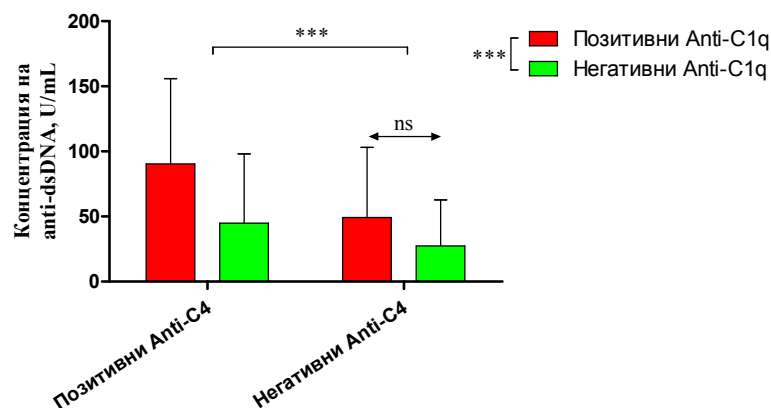
anti-C4 върху концентрацията на anti-dsDNA, като по-силно влияние за наличие на повишена концентрация на anti-dsDNA има позитивния серологичен статус за anti-C1q (Two-ways ANOVA, съответно $F=14,77$, $p=0,0002$ и $F=11,25$, $p=0,0009$). Ефектът на серологичния статус за anti-C1q върху концентрацията на anti-dsDNA не се различава при различните серологични статуси за anti-C4 (Two-ways ANOVA, $F=1,82$, $p=0,179$) (Фигура 5.6.8).



Фигура 5.6.7. Средни нива на концентрацията на anti-dsDNA (U/mL) при пациентите с ЛН в зависимост от двойния серологичен статус за anti-C1q и anti-C4. Налице са статистически значими разлики между концентрациите на anti-dsDNA при пациентите позитивни едновременно за anti-C1q и anti-C4 и тези негативни едновременно за anti-C1q и anti-C4; при пациентите позитивни едновременно за anti-C1q и anti-C4 и тези позитивни за anti-C1q и негативни за anti-C4; при пациентите позитивни едновременно за anti-C1q и anti-C4 и тези негативни за anti-C1q и позитивни за anti-C4 и при пациентите позитивни за anti-C1q и негативни за anti-C4 и тези едновременно негативни за anti-C1q и anti-C4. Между останалите две групи няма статистически значима разлика (One-way ANOVA, $p<0,0001$; Bonferroni's multiple comparison test, $p<0,05$ за посочените групи).

Таблица 5.6.6. Сравнителен анализ на концентрацията на anti-dsDNA при пациентите с ЛН в зависимост от двойния серологичен статус за anti-C1q и anti-C4.

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



Фигура 5.6.8. Концентрация на anti-dsDNA при пациентите с ЛН в зависимост от комбинирания серологичен статус за anti-C1q и anti-C4. Серологичният статус за anti-C1q статистически значимо повлиява концентрацията на anti-dsDNA (Two-ways ANOVA, $p=0,0002$ (***)). Серологичният статус за anti-C4 статистически значимо повлиява концентрацията на anti-dsDNA (Two-ways ANOVA, $p=0,0009$ (***)). Ефектът на серологичния статус за anti-C1q върху концентрацията на anti-dsDNA не се различава при различните серологични статуси за anti-C4 (Two-ways ANOVA, $p=0,179$ (ns)).

Изследвахме връзката между серологичния статус за anti-C1q и anti-C4 и наличието на категория А на ЛН по BILAG Renal score. Сред двойно позитивните за anti-C1q и anti-C4, изследвани в динамика, при 9 (75,0% от всички едновременно позитивни за anti-C1q и anti-C4) е налице категория А, а сред едновременно негативните за anti-C1q и anti-C4, пациентите с категория, различна от А (В, С или D) са 146 (89,6% от всички едновременно негативни за anti-C1q и anti-C4) (Таблица 5.6.7). Въз основа на това разпределение установихме, че двойно позитивният статус за anti-C1q и anti-C4 статистически значимо определя наличието на категория А на ЛН по BILAG Renal score (Fisher's exact test, $p<0,0001$) с чувствителност от 34,6%, специфичност от 98,0%, позитивна предиктивна стойност от 75,0%, негативна предиктивна стойност от 89,6%. Релативният риск (RR) за наличие на категория А на ЛН при двойно позитивен серологичен статус за anti-C1q и anti-C4 е 7,2.

Таблица 5.6.7. Разпределение на пациентите с ЛН според двойно позитивния и двойно негативния статус за anti-C1q и anti-C4 и наличието на категория А по BILAG Renal score на ЛН.

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

Изследвахме връзката между серологичния статус за anti-C1q и anti-C4 и хистологичния клас ЛН. Сред едновременно позитивните за anti-C1q и anti-C4 пациенти с ЛН, изследвани изходно в проучването, при 4 (100% от всички едновременно позитивни за anti-C1q и anti-C4, които имат хистологична диагноза) е налице IV хистологичен клас ЛН, а сред пациентите едновременно негативни за anti-C1q и anti-C4 при 30 (73,2% от всички едновременно негативни за anti-C1q и anti-C4, които имат хистологична диагноза) е налице хистологичен клас на ЛН, различен от IV (Таблица 5.6.8). Въз основа на това разпределение установихме, че позитивният статус едновременно за anti-C1q и anti-C4 статистически значимо определя наличието на ЛН от IV клас (Fisher's exact test, $p=0,0092$) с чувствителност от 26,7%, специфичност от 100%, позитивна предиктивна стойност от 100%, негативна предиктивна стойност от 73,2%. Релативният риск за наличие на дифузна лупусна нефропатия (IV клас) при наличие на двойно позитивни за anti-C1q и anti-C4 пациенти е 3,7.

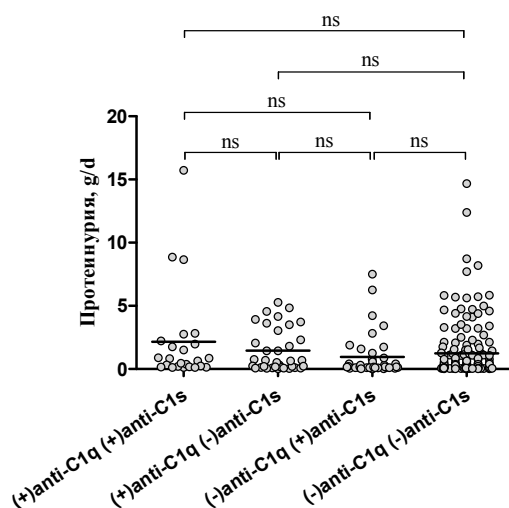
Таблица 5.6.8. Разпределение на пациентите с ЛН според двойно позитивния и двойно негативния статус за anti-C1q и anti-C4 и наличието на IV хистологичен клас на ЛН.

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

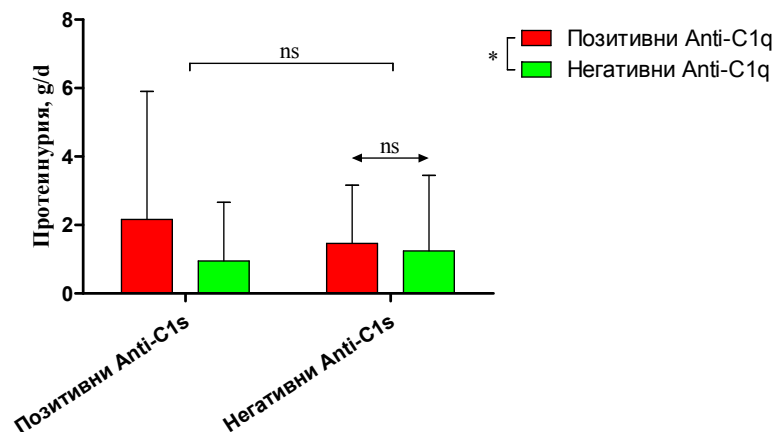
5.6.3. Комбинацията от автоантитела срещу C1q и C1s и някои аспекти на ЛН.

Изследвахме влиянието на комбинацията от позитивния и негативния статус за anti-C1q и anti-C1s върху протеинурията при пациентите с ЛН. Установихме липса на статистически значима разлика между нивата на протеинурията при пациентите с ЛН в различните групи, обособени според наличието или липсата на патологично повишени anti-C1q и anti-C1s. (One-way ANOVA, $p=0,197$; Bonferroni's multiple comparison test,

$p>0,05$) (Фигура 5.6.9). Въз основа на това определихме влиянието на серологичния статус на anti-C1q и серологичния статус на anti-C1s върху протеинурията, като влияние за наличие на повишена протеинурия има серологичния статус за anti-C1q (Two-ways ANOVA, съответно $F=3,91$, $p=0,049$). Серологичният статус за anti-C1s няма статистически значимо влияние върху протеинурията (Two-ways ANOVA, $F=0,32$, $p=0,571$). Ефектът на серологичния статус за anti-C1q върху протеинурията се различава при различните серологични статуси за anti-C1s (Two-ways ANOVA, $F=1,87$, $p=0,172$) (Фигура 5.6.10).



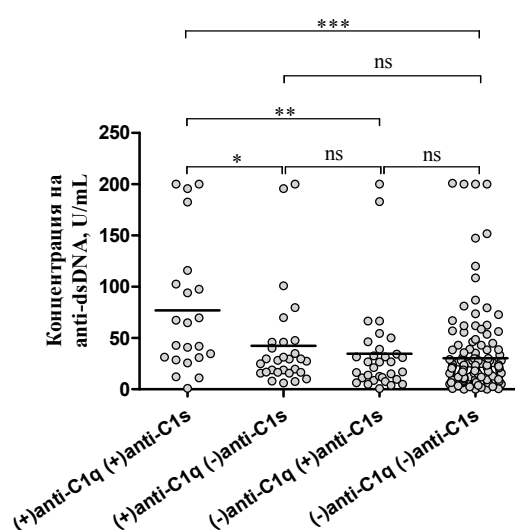
Фигура 5.6.9. Средни нива на протеинурията (g/d) при пациентите с ЛН в зависимост от двойния серологичен статус за anti-C1q и anti-C1s. Липсва статистически значима разлика между нивата на протеинурията в посочените групи пациенти (One-way ANOVA, $p=0,197$; Bonferroni's multiple comparison test, $p>0,05$ за посочените групи пациенти).



Фигура 5.6.10. Протеинурия при пациентите с ЛН в зависимост от комбинирания серологичен статус за anti-C1q и anti-C1s. Серологичният статус за anti-C1q статистически значимо повлиява протеинурията (Two-ways ANOVA, $F=3,91$, $p=0,049$ (*)). Серологичният статус за anti-C1s не повлиява значимо протеинурията (Two-ways ANOVA, $F=0,32$, $p=0,571$ (ns)). Ефектът на серологичния статус за anti-C1q върху протеинурията не се различава при различните серологични статуси за anti-C1s (Two-ways ANOVA, $F=1,87$, $p=0,172$ (ns)).

Изследвахме влиянието на комбинацията от позитивния и негативния статус за anti-C1q и anti-C1s върху концентрацията на anti-dsDNA при пациентите с ЛН. При пациентите позитивни едновременно за anti-C1q и anti-C1s средната концентрация на anti-dsDNA е статистически значимо по-висока от тази при пациентите едновременно негативни за anti-C1q и anti-C1s. Концентрацията на anti-dsDNA е статистически значимо по-висока при пациентите позитивни едновременно за anti-C1q и anti-C1s от тази при пациентите позитивни за anti-C1q и негативни за anti-C1s. Концентрацията на anti-dsDNA е статистически значимо по-висока при пациентите едновременно позитивни за anti-C1q и за anti-C1s от тази при пациентите негативни за anti-C1q и позитивни за anti-C1s. Няма статистически значима разлика между концентрацията на anti-dsDNA при пациентите позитивни за anti-C1q и негативни за anti-C1s и тази при пациентите негативни за anti-C1q и позитивни за anti-C1s. Няма статистически значима разлика между концентрациите на anti-dsDNA при пациентите позитивни за anti-C1q и негативни за anti-C1q и тази при пациентите едновременно негативни за anti-C1q и anti-C1s. Няма статистически значима разлика между концентрацията на anti-dsDNA при пациентите негативни за anti-C1q и позитивни за anti-C1s и тази при пациентите негативни едновременно за anti-C1q и anti-C1s. (One-way ANOVA, $p=0,0001$; Bonferroni's multiple comparison test) (Фигура 5.6.11 и Таблица 5.6.9). Въз основа на това определихме влияние на серологичния статус на anti-C1q и на серологичния статус

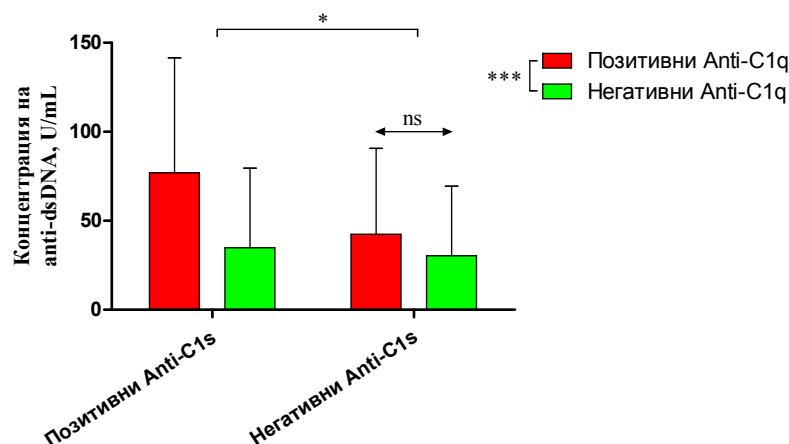
на anti-C1s върху концентрацията на anti-dsDNA, като по-силно влияние за наличие на повишена концентрация на anti-dsDNA има позитивния серологичен статус за anti-C1q (Two-ways ANOVA, съответно $F=12,81$, $p=0,0004$ и $F=6,56$, $p=0,011$). Ефектът на серологичния статус за anti-C1q върху концентрацията на anti-dsDNA не се различава при различните серологични статуси за anti-C1s (Two-ways ANOVA, $F=3,88$, $p=0,050$) (Фигура 5.6.12).



Фигура 5.6.11. Средни нива на концентрацията на anti-dsDNA (U/mL) при пациентите с ЛН в зависимост от двойния серологичен статус за anti-C1q и anti-C1s. Налице са статистически значими разлики между концентрациите на anti-dsDNA при пациентите позитивни едновременно за anti-C1q и anti-C1s и тези негативни едновременно за anti-C1q и anti-C1s; при пациентите позитивни едновременно за anti-C1q и anti-C1s и тези позитивни за anti-C1q и негативни за anti-C1s; при пациентите позитивни едновременно за anti-C1q и anti-C1s и тези негативни за anti-C1q и позитивни за anti-C1s. Между останалите три групи няма статистически значима разлика (One-way ANOVA, $p=0,0001$; Bonferroni's multiple comparison test, $p<0,05$ за посочените групи).

Таблица 5.6.9. Сравнителен анализ на концентрацията на anti-dsDNA при пациентите с ЛН в зависимост от двойния серологичен статус за anti-C1q и anti-C1s.

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



Фигура 5.6.12. Концентрация на anti-dsDNA при пациентите с ЛН в зависимост от комбинирания серологичен статус за anti-C1q и anti-C1s. Серологичният статус за anti-C1q статистически значимо повлиява концентрацията на anti-dsDNA (Two-ways ANOVA, $F=12,81$, $p=0,0004$ (***)). Серологичният статус за anti-C1s статистически значимо повлиява концентрацията на anti-dsDNA (Two-ways ANOVA, $F=6,56$, $p=0,011$ (*)). Ефектът на серологичния статус за anti-C1q върху концентрацията на anti-dsDNA не се различава при различните серологични статуси за anti-C1s (Two-ways ANOVA, $F=3,88$, $p=0,050$ (ns)).

Изследвахме връзката между серологичния статус за anti-C1q и anti-C1s и наличието на категория А на ЛН по BILAG Renal score. Сред двойно позитивните за anti-C1q и anti-C1s, изследвани в динамика, при 11 (45,8% от всички едновременно позитивни за anti-C1q и anti-C1s) е налице категория А, а сред едновременно негативните за anti-C1q и anti-C1s, пациентите с категория, различна от А (В, С или D) са 143 (85,1% от всички едновременно негативни за anti-C1q и anti-C1s) (Таблица 5.6.11). Въз основа на това разпределение установихме, че двойно позитивният статус за anti-C1q и anti-C1s статистически значимо определя наличието на категория А на ЛН по BILAG Renal score (Fisher's exact test, $p=0,0010$) с чувствителност от 30,6%, специфичност от 91,7%, позитивна предиктивна стойност от 45,8%, негативна предиктивна стойност от 85,1%. Релативният риск (RR) за наличие на категория А на ЛН при двойно позитивен серологичен статус за anti-C1q и anti-C1s е 3,1.

Таблица 5.6.11. Разпределение на пациентите с ЛН според двойно позитивния и двойно негативния статус за anti-C1q и anti-C1s и наличието на категория А по BILAG Renal score на ЛН.

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

Изследвахме връзката между серологичния статус за anti-C1q и anti-C1s и хистологичния клас ЛН. Сред едновременно позитивните за anti-C1q и anti-C1s пациенти с ЛН, изследвани изходно в проучването, при 3 (100% от всички едновременно позитивни за anti-C1q и anti-C1s, които имат хистологична диагноза) е налице IV хистологичен клас ЛН, а сред пациентите едновременно негативни за anti-C1q и anti-C1s при 41 (73,2% от всички едновременно негативни за anti-C1q и anti-C1s, които имат хистологична диагноза) е налице хистологичен клас на ЛН, различен от IV (Таблица 5.6.12). Въз основа на това разпределение установихме, че позитивният статус едновременно за anti-C1q и anti-C1s статистически значимо определя наличието на ЛН от IV клас (Fisher's exact test, $p=0,0251$) с чувствителност от 16,7%, специфичност от 100%, позитивна предиктивна стойност от 100%, негативна предиктивна стойност от 73,2%. Релативният риск за наличие на дифузна лупусна нефропатия (IV клас) при наличие на двойно позитивни за anti-C1q и anti-C1s пациенти е 3,7.

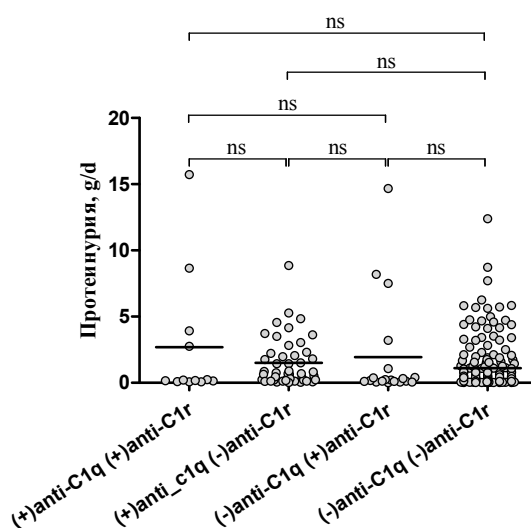
Таблица 5.6.12. Разпределение на пациентите с ЛН според двойно позитивния и двойно негативния статус за anti-C1q и anti-C1s и наличието на IV хистологичен клас на ЛН.

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

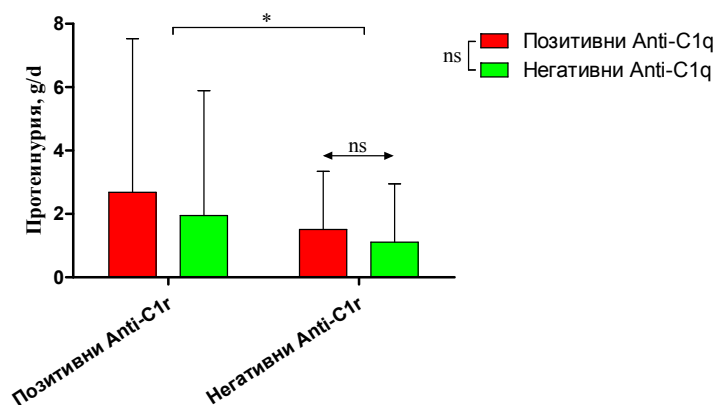
5.6.4. Комбинацията от автоантитела срещу C1q и C1r и някои аспекти на ЛН.

Изследвахме влиянието на комбинацията от позитивния и негативния статус за anti-C1q и anti-C1r върху протеинурията при пациентите с ЛН. Установихме липса на статистически значима разлика между нивата на протеинурията при пациентите с ЛН в различните групи, обособени според наличието или липсата на патологично повишени anti-C1q и anti-C1r. (One-way ANOVA, $p=0,051$; Bonferroni's multiple comparison test,

$p > 0,05$ между всички групи) (Фигура 5.6.12). Въз основа на това определихме влиянието на серологичния статус на anti-C1q и серологичния статус на anti-C1r върху протеинурията, като влияние за наличие на повишена протеинурия има серологичния статус за anti-C1r (Two-ways ANOVA, съответно $F=4,91$, $p=0,028$). Серологичният статус за anti-C1q няма статистически значимо влияние върху протеинурията (Two-ways ANOVA, $F=1,55$, $p=0,214$). Ефектът на серологичния статус за anti-C1q върху протеинурията не се различава при различните серологични статуси за anti-C3 (Two-ways ANOVA, $F=0,13$, $p=0,716$) (Фигура 5.6.14).

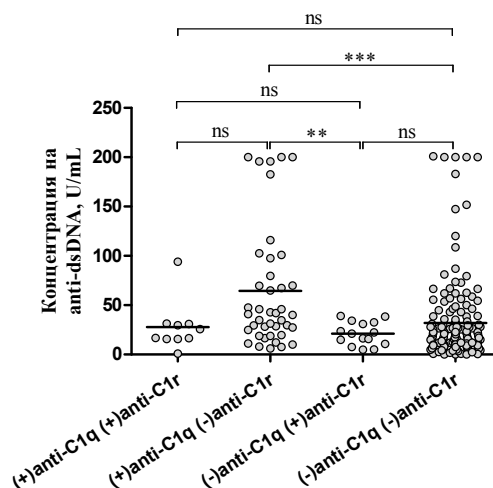


Фигура 5.6.13. Средни нива на протеинурията (g/d) при пациентите с ЛН в зависимост от двойния серологичен статус за anti-C1q и anti-C1r. Липсва статистически значима разлика между нивата на протеинурията в посочените групи пациенти (One-way ANOVA, $p=0,051$; Bonferroni's multiple comparison test, $p > 0,05$ за посочените групи пациенти).



Фигура 5.6.14. Протеинурия при пациентите с ЛН в зависимост от комбинирания серологичен статус за anti-C1q и anti-C1r. Серологичният статус за anti-C1q не повлиява значимо протеинурията (Two-ways ANOVA, $F=1,55$, $p=0,214$ (ns)). Серологичният статус за anti-C1r повлиява статистически значимо протеинурията (Two-ways ANOVA, $F=4,91$, $p=0,028$ (*)). Ефектът на серологичния статус за anti-C1q върху протеинурията не се различава при различните серологични статуси за anti-C1r (Two-ways ANOVA, $F=0,13$, $p=0,716$ (ns)).

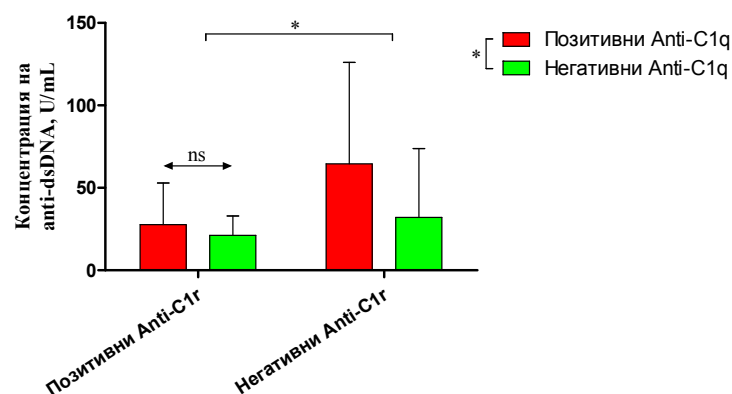
Изследвахме влиянието на комбинацията от позитивния и негативния статус за anti-C1q и anti-C1r върху концентрацията на anti-dsDNA при пациентите с ЛН. При пациентите позитивни за anti-C1q и негативни за anti-C1r средната концентрация на anti-dsDNA е статистически значимо по-висока от тази при пациентите негативни за anti-C1q и позитивни за anti-C1r. Концентрацията на anti-dsDNA е статистически значимо по-висока при пациентите позитивни за anti-C1q и негативни за anti-C1r от тази при пациентите негативни едновременно за anti-C1q и за anti-C1r. Няма статистически значима разлика между концентрациите на anti-dsDNA между останалите групи. (One-way ANOVA, $p=0,0002$; Bonferroni's multiple comparison test) (Фигура 5.6.15 и Таблица 5.6.13). Въз основа на това определихме влияние на серологичния статус на anti-C1q и на серологичния статус на anti-C1r върху концентрацията на anti-dsDNA, като по-силно влияние за наличие на повишена концентрация на anti-dsDNA има позитивния серологичен статус за anti-C1r (Two-ways ANOVA, съответно $F=3,93$, $p=0,049$ и $F=5,85$, $p=0,016$). Ефектът на серологичния статус за anti-C1q върху концентрацията на anti-dsDNA не се различава при различните серологични статуси за anti-C1r (Two-ways ANOVA, $F=1,74$, $p=0,188$) (Фигура 5.6.16).



Фигура 5.6.15. Средни нива на концентрацията на anti-dsDNA (U/mL) при пациентите с ЛН в зависимост от двойния серологичен статус за anti-C1q и anti-C1r. Налице са статистически значими разлики между концентрациите на anti-dsDNA при пациентите позитивни за anti-C1q и негативни за anti-C1r и тези негативни за anti-C1q и позитивни за anti-C1r; при пациентите позитивни за anti-C1q и негативни за anti-C1r и тези негативни едновременно за anti-C1q и anti-C1r. Между останалите четири групи няма статистически значима разлика (One-way ANOVA, $p=0,0002$; Bonferroni's multiple comparison test, $p<0,05$ за посочените групи).

Таблица 5.6.13. Сравнителен анализ на концентрацията на anti-dsDNA при пациентите с ЛН в зависимост от двойния серологичен статус за anti-C1q и anti-C1r.

Bonferroni's multiple comparison test	Mean Diff.	t	$p<0,05$	95% CI of diff
(+)anti-C1q (+)anti-C1r c (+)anti-C1q (-)anti-C1r	-36,82	2,355	He (ns)	-78,44 до 4,810
(+)anti-C1q (+)anti-C1r c (-)anti-C1q (+)anti-C1r	6,533	0,3610	He (ns)	-41,65 до 54,72
(+)anti-C1q (+)anti-C1r c (-)anti-C1q (-)anti-C1r	-4,291	0,2969	He (ns)	-42,78 до 34,19
(+)anti-C1q (-)anti-C1r c (-)anti-C1q (+)anti-C1r	43,35	3,241	Да (**)	7,735 до 78,96
(+)anti-C1q (-)anti-C1r c (-)anti-C1q (-)anti-C1r	32,52	4,186	Да (***)	11,84 до 53,21
(-)anti-C1q (+)anti-C1r c (-)anti-C1q (-)anti-C1r	-10,82	0,9038	He (ns)	-42,71 до 21,06



Фигура 5.6.16. Концентрация на anti-dsDNA при пациентите с ЛН в зависимост от комбинирания серологичен статус за anti-C1q и anti-C1r. Серологичният статус за anti-C1q статистически значимо повлиява концентрацията на anti-dsDNA (Two-ways ANOVA, $F=3,93$, $p=0,049$ (*)). Серологичният статус за anti-C1r статистически значимо повлиява концентрацията на anti-dsDNA (Two-ways ANOVA, $F=5,85$, $p=0,016$ (*)). Ефектът на серологичния статус за anti-C1q върху концентрацията на anti-dsDNA не се различава при различните серологични статуси за anti-C1r (Two-ways ANOVA, $F=1,74$, $p=0,188$ (ns)).

Изследвахме връзката между серологичния статус за anti-C1q и anti-C1r и наличието на категория А на ЛН по BILAG Renal score. Сред двойно позитивните за anti-C1q и anti-C1r, изследвани в динамика, при 5 (41,7% от всички едновременно позитивни за anti-C1q и anti-C1r) е налице категория А, а сред едновременно негативните за anti-C1q и anti-C1r, пациентите с категория, различна от А (В, С или D) са 158 (85,4% от всички едновременно негативни за anti-C1q и anti-C1r) (Таблица 5.6.14). Въз основа на това разпределение установихме, че двойно позитивният статус за anti-C1q и anti-C1r статистически значимо определя наличието на категория А на ЛН по BILAG Renal score (Fisher's exact test, $p=0,028$) с чувствителност от 15,6%, специфичност от 95,8%, позитивна предиктивна стойност от 41,7%, негативна предиктивна стойност от 85,4%. Релативният риск (RR) за наличие на категория А на ЛН при двойно позитивен серологичен статус за anti-C1q и anti-C1r е 2,9.

Таблица 5.6.14. Разпределение на пациентите с ЛН според двойно позитивния и двойно негативния статус за anti-C1q и anti-C1r и наличието на категория А по BILAG Renal score на ЛН.

Пациенти	BILAG, A	BILAG, B, C, D	Общо
Позитивни едновременно за anti-C1q и anti-C1r	5	7	12
Негативни едновременно за anti-C1q и anti-C1r	27	158	185
Общо	32	165	197

Изследвахме връзката между серологичния статус за anti-C1q и anti-C1r и хистологичния клас ЛН. Сред едновременно позитивните за anti-C1q и anti-C1r пациенти с ЛН, изследвани изходно в проучването, при 1 (50,0% от всички едновременно позитивни за anti-C1q и anti-C1r, които имат хистологична диагноза) е налице IV хистологичен клас ЛН, а сред пациентите едновременно негативни за anti-C1q и anti-C1r при 40 (75,5% от всички едновременно негативни за anti-C1q и anti-C1r, които имат хистологична диагноза) е налице хистологичен клас на ЛН, различен от IV (Таблица 5.6.15). Въз основа на това разпределение установихме, че позитивният статус едновременно за anti-C1q и anti-C1r не определя статистически значимо наличието на ЛН от IV клас (Fisher's exact test, $p=0,4478$).

Таблица 5.6.15. Разпределение на пациентите с ЛН според двойно позитивния и двойно негативния статус за anti-C1q и anti-C1r и наличието на IV хистологичен клас на ЛН.

Пациенти	IV хистологичен клас ЛН	Друг хистологичен клас ЛН	Общо
Позитивни едновременно за anti-C1q и anti-C1r	1	1	2
Негативни едновременно за anti-C1q и anti-C1r	13	40	53
Общо	14	41	55

ИЗВОДИ:

1. Съществуват значими корелационни връзки при пациентите с ЛН между anti-C1q и anti-C1r, anti-C1q и anti-C1s, anti-C1q и anti-C3, anti-C1r и anti-C1s, anti-C1r и anti-C3, anti-C1s и anti-C4, anti-C1s и anti-C3 и anti-C4 и anti-C3.

2. Налице е значима разлика в нивата на протеинурията при двойно положителния и двойно негативния серологичен статус за anti-C1q и anti-C4.

3. Налице е значима разлика в нивата на anti-dsDNA при двойно положителния и двойно негативния серологичен статус за anti-C1q и anti-C3, за anti-C1q и anti-C4 и за anti-C1q и anti-C1s.

4. Двойно положителният серологичен статус за anti-C1q и anti-C3 има относително по-голяма диагностична стойност за определяне на категория А на ЛН по BILAG Renal score в сравнение с положителния серологичен статус само за anti-C1q.

5. Двойно положителният серологичен статус за anti-C1q и anti-C4 определя наличието на категория А на ЛН по BILAG Renal score с относително по-голяма специфичност, по-голяма позитивна предиктивна стойност и по-голяма негативна предиктивна стойност в сравнение с положителния серологичен статус само за anti-C1q и положителния серологичен статус само за anti-C4.

6. Диагностичната стойност на anti-C1r и anti-C1s по отношение наличието на категория А на ЛН по BILAG Renal score е налице само при едновременното им изследване заедно с anti-C1q, като двойният серологичен статус за anti-C1q и anti-C1r и за anti-C1q и anti-C1s определят наличието на категория А на ЛН по BILAG Renal score с относително по-голяма специфичност в сравнение с позитивния серологичен статус само за anti-C1q.

7. Двойно положителният серологичен статус за anti-C1q и anti-C3 има относително по-голяма диагностична стойност за определяне наличието на IV хистологичен клас ЛН в сравнение с положителния серологичен статус само за anti-C1q и с положителния серологичен статус само за anti-C3.

8. Двойно положителният серологичен статус за anti-C1q и anti-C4 има относително по-голяма диагностична стойност за определяне наличието на IV хистологичен клас ЛН в сравнение с положителния серологичен статус само за anti-

C1q, докато положителният серологичен статус само за anti-C4 няма такава диагностична стойност.

9. Изследването на anti-C1s има диагностична стойност за определяне наличието на IV хистологичен клас ЛН само в комбинация с anti-C1q, като двойно положителният серологичен статус за anti-C1q и anti-C1s има относително по-голяма диагностична стойност в сравнение с положителния серологичен статус само за anti-C1q.

10. Изследването на anti-C1r няма диагностична стойност за определяне наличието на IV хистологичен клас ЛН, нито самостоятелно, нито в комбинация с anti-C1q.

VI. ДИСКУСИЯ

Системата на комплемента има основна роля за реализацията както на вродения, така и на придобития имунитет, за развитието на възпаление и за клирънса на имунни комплекси и апоптотични клетки от тъканите, като по този начин поддържа генетичната хомеостаза на организма. Наличието на автоантитела срещу различни компоненти на комплемента има значение за нарушаване на тези основни функции и за развитието на патологичен процес. В настоящото проучване изследвахме наличието, честотата и връзките на автоантитела срещу компоненти на комплемента с основни клинично-лабораторни, имунологични и хистологични маркери за оценка на ЛН, както и диагностичната и прогностичната стойност на тези автоантитела при пациенти от българската популация.

Според мащабни изследвания както сред хора, така и при експериментални животински модели (Botto и съавт., 1998; Siegert и съавт., 1999; Taylor и съавт., 2000), една от основните функции на C1q компонента на класическия път на каскадата на комплемента се изразява в отстраняване на имунни комплекси и апоптотични клетки от тъканите, като нарушаването на тази функция предполага натрупване на автоантигени. Освен това, при дефицити на C1q се установяват нарушения в развитието на негативната селекция на автореактивни В клетки, което наред с горепосоченото предразполага както към възникване, така и към значимо ускоряване на автоимунен отговор (Carrol, 2001; Potlukova, 2008). Това схващане се подкрепя от проучвания върху генетични дефицити на C1q, при които се развива картина на СЛЕ (Pickering и съавт., 2000; Botto и съавт., 2001; Mitchel и съавт., 2002). На свой ред компоненти от системата на комплемента могат да бъдат таргет на придобития имунен отговор, изразяващо се в продукцията на автоантитела (Horák и съавт., 2009). Anti-C1q са най-интензивно проучваните до момента в световен мащаб антикомплементни автоантитела и са важен имунологичен маркер за оценка активността на ЛН. Тези автоантитела са насочени основно срещу неопитопи в CLR на молекулата на C1q, които стават достъпни за имунно взаимодействие когато C1q се свърже със свои лиганди, каквито са имуноглобулиновите молекули от имунните комплекси, отложени в тъканите (Uwatoko и съавт., 1989). Трябва да бъде отбелязано, с оглед комплексната молекулна структура на C1q, че са описани автоантитела с епитопна специфичност към отделните глави (А,

В и С), като тези епитопи в GHR също могат да бъдат таргет за anti-C1q (Цачева и съавт., 2007, 2011). Наличието на anti-C1q възпрепятства осъществяването на основните функции на C1q и може да се разглежда като придобит функционален дефицит на C1q. Flierman оформя хипотезата за патогенетичната роля на anti-C1q в развитието на ЛН. Няколко изследвания установяват, че anti-C1q са необходими, но самостоятелно не са достатъчни за развитие на ЛН. Необходимо е и наличие и на имунни комплекси, отложени в гломерулите при пациенти със СЛЕ (много често съдържащи двойноверижна ДНК и anti-dsDNA), които се разпознават от C1q, а това от своя страна, на базата на конформационни молекулни промени, води до откриване на неоепитопи в CLR на C1q, които се разпознават от anti-C1q с последващо активиране на класическия път на каскадата на комплемента с развитие на тъканно възпаление и картина на ЛН. Тази теория се подкрепя от факта, че нарастването на титъра на anti-C1q и anti-dsDNA е свързано с обостряне на ЛН (Siebert и съавт. 1998; Marto, 2005).

В нашето проучване, в аспект на кроссекционно изследване установихме честота на anti-C1q сред пациентите с ЛН от 18,6% (при 18 от 97 пациенти с ЛН), докато в аспект на лонгитудинално изследване с повече от 3 различни във времето определяния на нивата на anti-C1q при всеки пациент с ЛН, тези автоантитела се позитивират с по-висока честота – при 55,6% от болните (при 25 от 45 пациенти). Това определя anti-C1q като динамична популация автоантитела от автоимунния репертоар на пациентите с ЛН. Установените от нас честоти са сравнително по-ниски до съизмерими с честотите на anti-C1q при пациенти със СЛЕ и ЛН, описвани от други автори – между 56% и 100% (Siebert и съавт., 1993 – при 38 от 68 пациенти; Trendelenburg и съавт., 1999 – при 14 от 14 пациенти; Marto и съавт., 2005 – при 50 от 77 пациенти; Trendelenburg и съавт., 2006 – при 35 от 36 пациенти). При българско изследване на Монова от 2010 г. сред пациенти с активен ЛН се посочва честота на anti-C1q от 79,6% при пациенти с активна ЛН, докато в нашето проучване честотите на anti-C1q при пациентите с активна ЛН и при такива с ЛН с категория А по BILAG Renal score са по-ниски – съответно 38,9% и 41,9%. Тези разлики в честотите биха могли да се дължат на различия в лабораторните методики за определяне на anti-C1q, условията за приемане на cut-off, прилагани в различните проучвания, и комерсиалните китове за ELISA, използвани в повечето описани в литературата изследвания.

Не установихме статистически значими връзки на нивата на anti-C1q с пола и възрастта на пациентите с ЛН, както и с давността на ЛН. Налице са данни от

литературата за повишаване нивата на anti-C1q с възрастта, но сред здрави доброволци, най-вероятно като естествен компонент на имунния репертоар (Siebert и съавт. 1993).

Клинико-лабораторен маркер за активност на ЛН е наличието на патологична протеинурия и патологично активен уринен седимент. Установихме, че наличието на патологично повишени anti-C1q сред пациентите с ЛН е свързано с наличие на патологична протеинурия ($p=0,019$), като нещо повече – нарастването на нивата на anti-C1q е свързано с нарастването на протеинурията ($p=0,048$) и също така е свързано с наличие на патологично активен уринен седимент ($p=0,049$). Установихме и значима връзка между позитивния серологичен статус за anti-C1q и наличието на декомпенсирана бъбречна функция ($eGFR < 60 \text{ mL/min}$), както сред пациентите при кроссекционното изследване ($p=0,031$), така и при лонгитудиналното динамично изследване на пациентите ($p=0,043$). Този факт най-вероятно се дължи отново на патогенетичната роля на anti-C1q с потенциране на имунното възпаление при ЛН и имунологична прогресия на хроничното бъбречно заболяване при изследваните пациенти.

Безспорно се потвърдиха връзките на честотата и плазмените нива на anti-C1q с активността на ЛН, установени вече от редица изследователи (Trendelenburg и съавт., 1999; Siebert и съавт., 1999; Marto и съавт., 2005; Sinico и съавт., 2005; Potlukova и съавт., 2008). В нашето изследване установихме също най-висока честота на anti-C1q при пациентите с активна ЛН от 38,9%, като при пациентите с частична ремисия на ЛН и при тези с пълна ремисия на ЛН честотата на anti-C1q е значимо по-ниска, съответно 6,5% и 6,7%. Нивата на anti-C1q при пациентите с активна ЛН са значимо по-високи от тези при пациентите с частична и пълна ремисия на ЛН ($p=0,002$). Същите зависимости установихме и оценявайки комплексно активността на ЛН чрез BILAG Renal score. Най-висока честота на anti-C1q отново установихме при пациентите с категория А на ЛН (41,9%), като са налице и значимо най-високи серумни нива на anti-C1q при пациентите с категория А на ЛН ($p=0,0005$). Налице е значима корелационна зависимост между нивата на anti-C1q и категорията на ЛН по BILAG Renal score ($r=0,34$, $p=0,003$). Освен това, наличието на патологично повишени anti-C1q значимо определя наличието на категория А на ЛН (т. е., заболяване, налагащо провеждане на имунопатогенетично лечение) ($p<0,0001$) с чувствителност от 43,1% и специфичност от 83,1%. Относителният риск за наличие на категория А на ЛН при наличие на позитивни anti-C1q е 2,6. При комбинирано изследване статуса на anti-C1q и anti-C3

диагностичната стойност за определяне наличието на категория А на ЛН е по-висока – двойно позитивният статус за anti-C1q и anti-C3 определя значимо ($p<0,0001$) категория А на ЛН с чувствителност от 51,6%, специфичност от 89,7% и относителен риск от 5,2. Диагностичната стойност на anti-C1q по отношение на специфичността се повишава и при изследването им заедно с anti-C4. В тези случаи установихме, че двойно позитивният статус за anti-C1q и anti-C4 значимо определя ($p<0,0001$) наличието на категория А на ЛН с чувствителност от 34,6%, но със значително по-висока специфичност от 98,0%, като релативния риск за наличие на категория А на ЛН при едновременно позитивни anti-C1q и anti-C4 е 7,2. При комбинираното изследване на anti-C1q и anti-C1s и anti-C1q и anti-C1r също установихме повишена диагностична стойност в сравнение със самостоятелното изследване на anti-C1q. Установените горепосочени зависимости определят anti-C1q като релевантен диагностичен маркер за комплексната оценка активността на ЛН.

Освен с клинико-лабораторните маркери за активност на ЛН, потвърдихме и връзките на anti-C1q с някои имунологични маркери за активност на ЛН, каквито са хипокомплементите C4 и C3 и повишените нива на anti-dsDNA (Horák и съавт., 2009). В нашето проучване установихме значими отрицателни корелационни зависимости между нивата на anti-C1q и плазмените нива на C4 ($r=-0,35$, $p=0,004$) и на C3 ($r=-0,36$, $p=0,0024$), както и значима позитивна корелация между нивата на anti-C1q и нивата на anti-dsDNA ($r=0,46$, $p<0,0001$). Сред позитивните за anti-dsDNA пациенти с ЛН, средната категория на ЛН по BILAG Renal score е значимо по-висока при позитивните за anti-C1q пациенти, в сравнение с пациентите позитивни за anti-dsDNA и негативни за anti-C1q ($p=0,014$), което определя anti-C1q като маркер за имунологична активност при пациентите с ЛН. Въпреки, че титърът на ANA при пациентите с ЛН няма значими връзки с тежестта и активността на ЛН, в нашето проучване установихме значима позитивна корелация между нивото на anti-C1q и титъра на ANA ($r=0,26$, $p<0,0001$). Всичко това определя anti-C1q като надежден имунологичен маркер за оценка активността на ЛН.

Установихме значими връзки между anti-C1q и хистологичните характеристики на лупусната нефропатия. Както и в проучвания на други изследователи (Монова, 2010), в нашето проучване констатирахме най-висока честота на anti-C1q при пациентите с дифузна ЛН (45,5%), като нивата на anti-C1q при ЛН IV хистологичен клас са значимо по-високи ($p=0,012$) от нивата при пациентите с ЛН от друг

хистологичен клас. Наличието на позитивни anti-C1q определя значимо наличието на ЛН от IV хистологичен клас ($p=0,002$) с ниска чувствителност (35,9%), със специфичност от 92,9% и релативен риск 2,0. Установихме, че при изследване едновременно на anti-C1q с други антикомплементни автоантитела диагностичната стойност по отношение наличието на дифузен ЛН се повишава. Двойно позитивният статус за anti-C1q и anti-C3 определя значимо наличието на ЛН IV хистологичен клас с чувствителност 35,5%, но с висока специфичност – 100,0% за изследваната група пациенти, с относителен риск от 4,2. Двойно позитивният статус за anti-C1q и anti-C4 и за anti-C1q и anti-C1s също има по-висока диагностична стойност по отношение определянето наличието на ЛН IV хистологичен клас в сравнение с диагностичната стойност на самостоятелно определения статус за anti-C1q. При пациентите с ЛН и наличие на активни хистологични лезии като ендокapилярна пролиферация; субендотелни депозити, формиращи т. нар. „телени бримки“; фибриноидна некроза и интерстициално възпаление, нивата на anti-C1q са незначимо, но относително по-високи от нивата при пациентите, при които тези хистологични признаци отсъстват. При пациентите с наличие на клетъчни полулуния, нивата на anti-C1q са значимо по-високи от нивата на anti-C1q при пациентите, при които екстракапилярна пролиферация отсъства ($p=0,013$). Наред с това установихме и значима корелационна зависимост между нивата на anti-C1q и индекса на хистологична активност на ЛН ($r=0,43$, $p=0,012$). Резултатите от нашето изследване, заедно с установените зависимости от други изследователи (Trendelenburg и съавт., 2006; Монова, 2010) безспорно показват връзката на anti-C1q с активните пролиферативни лезии на ЛН. Всичко това определя значението на anti-C1q като маркер за неинвазивна оценка на хистологичната активност на ЛН и повишените нива на anti-C1q при пациентите с ЛН би следвало да се разглеждат като показание за провеждане на активно имунопатогенетично лечение.

При изследване на прогностичната стойност на anti-C1q установихме, че повишаването на нивата на anti-C1q до патологични стойности определя значимо повишаване на категорията на ЛН по BILAG Renal score ($p=0,0012$) след среден период от 5,6 месеца, а също така определя и значимо активиране на ЛН (преминаване от състояние на пълна в частична ремисия или в състояние на активна ЛН или преминаване от състояние на частична ремисия в състояние на активна ЛН) ($p=0,0337$) в рамките от 0 до 10 месеца след повишаването на нивата. Тези резултати са в съгласие

с резултатите, получени от други изследователи (Moroni и съавт., 2001). Това определя anti-C1q като надежден прогностичен имунологичен маркер за развитие на тласък на ЛН.

При изследване на динамичните промени на някои показатели за оценка на ЛН с динамичните промени на нивата на anti-C1q установихме корелационни зависимости между промяната на нивата на anti-C1q и промяната на протеинурията ($r=0,31$, $p=0,018$) и между промяната на нивата на anti-C1q и промяната на eGFR ($r=0,27$, $p=0,027$) – колкото по-голяма е промяната в нивата на anti-C1q, толкова по-голяма е промяната в протеинурията и в eGFR при пациентите с ЛН. В аспект на провежданото лонгитудинално изследване с проследяване в динамика на пациентите с ЛН установихме значими динамични отрицателни корелационни зависимости между нивата на anti-C1q и плазмените концентрации на C4 ($r=-0,22$, $p=0,0003$) и нивата на anti-C1q и плазмените концентрации на C3 ($r=-0,21$, $p=0,0003$). Такава динамична позитивна корелационна връзка намерихме и между нивата на anti-C1q и нивата на anti-dsDNA при пациентите с ЛН ($r=0,46$, $p<0,0001$). Това определя значението на anti-C1q като маркер за динамично проследяване и оценка на ЛН.

C1s и C1r компонентите на комплемента са серин-протеази, участващи в състава на C1-комплекса, отговорни за хидролизата на C4 и C2 (основно C1s), като по този начин се формира C3-конвертазата на класическия път на активиране на каскадата на комплемента (C4b2a) (Walport, 2001; Berger и съавт., 2005; Ricklin и съавт., 2010; Merle и съавт., 2015). Генетични дефицити на C1s и C1r са свързани с развитие на картина на СЛЕ (Pickering и съавт., 2000). Други автори описват автоантитела, насочени срещу C1s (anti-C1s) при 7 от 15 пациенти със СЛЕ и ЛН (He и съавт., 1998), които са свързани с повишена протеолитична активност на C1s, която може да бъде причина за редукция в нивата на C4, усилена комплемент-зависима клетъчна лиза и поява на автоантигени, активиращи В клетките с развитие и поддържане на автоимунитет при пациентите със СЛЕ.

В нашето проучване в аспект на кроссекционното изследване установихме наличие на anti-C1s при 8,1% от пациентите, като при лонгитудиналното изследване установихме позитивиране на anti-C1s със значително по-висока честота от 54,8% от пациентите, което определя тези автоантитела като динамична популация в автоимунния репертоар на антикомплементните автоантитела при пациентите с ЛН.

Установихме статистически незначимо, но относително повишение на нивата на anti-C1s с възрастта на изследваните пациенти ($r=0,162$, $p=0,084$). Липсват и връзки между anti-C1s и пола на пациентите с ЛН и anti-C1s и давността на ЛН. Не установихме значими зависимости между anti-C1s и протеинурията, anti-C1s и бъбречната функция, anti-C1s и комплексно оценената активност на ЛН при изследваните пациенти в нашето проучване. Изследването на нивата на anti-C1s, обаче, би могло да повиши диагностичната стойност за определяне на категория А на ЛН при комбинираното му изследване с anti-C1q. Двойно позитивният статус за anti-C1q и anti-C1s при пациентите с ЛН определя значимо наличието на категория А на нефрита ($p=0,001$) при с много ниска чувствителност (30,6%), но с по-висока специфичност (91,7%) и относителен риск от 3,1. Не установихме и значими зависимости между нивата на anti-C1s и плазмените концентрации на C4 и C3 компонентите на комплемента (съответно, $p=0,680$ и $p=0,198$), въпреки че при повишени нива на anti-C1s плазмените концентрации на C4 и C3 са относително по-ниски от съответните при пациентите с референтни нива на anti-C1s. Не установихме и статистически значими зависимости между нивата на anti-C1s и anti-dsDNA, въпреки че концентрацията на anti-dsDNA е относително по-висока при пациентите с ЛН с патологично повишени anti-C1s ($p=0,425$). Не установихме значими връзки на anti-C1s с хистологичния клас ЛН, както и с хистологичните лезии за активност и хроничност при изследваните пациенти. Тези резултати, предвид относително по-ниската честота на anti-C1s в сравнение с честотата на anti-C1q, биха могли да се дължат на сравнително малкия брой изследвани в нашето проучване пациенти с ЛН. При изследване едновременно на anti-C1q и anti-C1s диагностичната стойност на последните е налице, като двойно позитивния статус за anti-C1q и anti-C1s определя значимо наличието на ЛН IV хистологичен клас с много ниска чувствителност (16,7%), но с висока специфичност от 100,0% и относителен риск от 3,7 при изследвана група пациенти. Установихме известна самостоятелна прогностична роля на anti-C1s – повишението на anti-C1s до патологични нива значимо определя последващо повишение на категорията на ЛН по BILAG Renal score ($p=0,0042$) след среден период от 5,0 месеца, а също така определя и значимо активиране на ЛН (преминаване от състояние на пълна в частична ремисия или в състояние на активна ЛН или преминаване от състояние на частична ремисия в състояние на активна ЛН) ($p=0,023$) в рамките от 0 до 6 месеца след повишаването на нивата.

Горепосоченото определя anti-C1s по-скоро като допълващ имунологичен маркер при съвместното му изследване заедно с anti-C1q при комплексната оценка на ЛН.

В литературата липсват данни за значението и ролята на anti-C1r. В нашето проучване изследвахме anti-C1r, като не установихме значими връзки с възрастта и пола на пациентите с ЛН, с давността на ЛН, с клинично-лабораторните и имунологичните маркери за оценка на ЛН, както в аспект на кроссекционното изследване, така и в динамика. Не установихме значими зависимости на anti-C1r с хистологичния клас на ЛН, активните и хроничните хистологични лезии и индексите на хистологична активност и хроничност. Не установихме надеждна прогностична роля на anti-C1r. При едновременното изследване на anti-C1q и anti-C1r, последното може да повиши в известна степен диагностичната стойност на anti-C1q при определяне наличието на категория А на ЛН по BILAG Renal score. Двойно позитивният статус за anti-C1q и anti-C1r определя значимо наличието на категория А на ЛН по BILAG Renal score с ниско чувствителност (15,6%), но с по-висока специфичност в сравнение със специфичността на anti-C1q при неговото самостоятелното изследване – 95,8%, като относителния риск за наличие на категория А на ЛН при пациенти позитивни едновременно за anti-C1q и anti-C1r е 2,9. Anti-C1r няма диагностично значение за определяне на хистологичния клас на ЛН нито самостоятелно, нито в комбинация с anti-C1q.

Необходими са, обаче, допълнителни изследвания в по-големи кохортни проучвания за по-прецизна оценка на клиничното значение на anti-C1s и anti-C1r в нефрологичната практика.

В научната литература има оскъдна информация по отношение на автоантителата срещу C4 компонента на комплемента (отнасяни към т. нар. имуноконглутинини), като такива са описани при един пациент със СЛЕ (Ripoché и съавт., 1983). При пациенти със СЛЕ и С3 гломерулопатии е описвано антитяло срещу C3- и C5-конвертазите на класическия път на каскадата на комплемента (съответно - C4b2a и C4b2aBb) – C4-нефритен фактор (C4NeF), което потиска тяхното разграждане, удължават полуживота им, нарушавайки негативната регулация на комплементната каскада (Daha и съавт., 1980; Zhang и съавт., 2017).

В нашето проучване установихме anti-C4 със значима честота в кроссекционно проучване при пациентите с ЛН - 31,1%, като при динамичното лонгитудинално

изследване установихме позитивиране на anti-C4 при значимо повече пациенти – 59,5%, което определя anti-C4 като динамична популация автоантитела при пациентите с ЛН. Въпреки че с нарастване на възрастта при пациентите с ЛН нивата на anti-C4 намаляват, в нашето изследване не установихме значима корелационна зависимост между възрастта и нивата на anti-C4 ($r=-0,18$, $p=0,064$). Липсват и връзки между anti-C4 и пола на пациентите с ЛН и между anti-C4 и давността на ЛН. Не установихме значими връзки между нивата на anti-C4 и клинично-лабораторните маркери за оценка на ЛН, като протеинурията и eGFR. При едновременно изследване на anti-C1q и anti-C4 установихме, че при пациентите с ЛН с двойно позитивен статус за anti-C1q и anti-C4 имат значимо по-висока протеинурия в сравнение с протеинурията при останалите пациенти с ЛН ($p=0,0003$). В аспект на лонгитудинално изследване установихме, че патологично повишените нива на anti-C4 определят значимо наличието на патологично активен уринен седимент при изследваните пациенти с ЛН ($p=0,007$), като при пациентите с патологично активен уринен седимент средното ниво на anti-C4 е значимо по-високо от това при пациентите без активен седимент ($p=0,007$). В аспект на лонгитудинално динамично изследване установихме, че позитивният статус за anti-C4 е свързан със значимо по-висока категория на ЛН по BILAG Renal score ($p=0,0021$) и определя значимо наличието на категория А по BILAG Renal score на ЛН ($p=0,0005$) с чувствителност 40,4%, специфичност 83,6% и релативен риск 2,5. При едновременното изследване на anti-C1q и anti-C4 диагностичната стойност на последното по отношение наличието на категория А на ЛН е повишена (описано по-горе в „Дискусия”). Това определя anti-C4 като потенциален маркер за оценка активността на ЛН.

Налице са значими зависимости между anti-C4 и нивата на C4 и C3 компонентите на комплемента. При пациентите с ЛН с повишени anti-C4 плазмената концентрация на C4 е значимо по-ниска от тази при пациентите с референтни нива на C4 ($p=0,007$). При пациентите с повишени anti-C4 плазмената концентрация на C3 е значимо по-ниска от тази при пациентите с референтни нива на anti-C4 ($p=0,005$). Установихме е значими отрицателни корелационни зависимости между anti-C4 и C4 ($r=-0,34$, $p=0,003$) и anti-C4 и C3 ($r=-0,30$, $p=0,007$). Установихме значими позитивни корелационни зависимости между нивата на anti-C4 и ANA ($r=0,37$, $p=0,002$) и между нивата на anti-C4 и anti-dsDNA ($r=0,36$, $p=0,002$) при пациентите с ЛН. Освен това, при пациентите с ЛН с двойно позитивен статус за anti-C1q и anti-C4 концентрацията на anti-dsDNA е значимо по-висока в сравнение с концентрацията на anti-dsDNA при останалите пациенти с ЛН

($p < 0,0001$). Тези факти биха могли да се обяснят с евентуални свойства на anti-C4, наподобяващи C4NeF, т. е. удължаващи полуживота на C3- и C5-конвертазите на класическия път на каскадата на комплемента (съответно, C4b2a и C4b2aBb) с аплификация на терминалния път с формиране на MAC и комплемент-зависимо клетъчно увреждане и възпаление с натрупване на автоантигени в тъканите с поликлонална активация на В клетките и развитие на автоимунитет и клиника на СЛЕ и ЛН. За категорично заключение и подкрепа на горепосочената теза са необходими допълнителни функционални изследвания на природата на anti-C4 при пациентите с ЛН. Горепосочените данни с голяма вероятност определят anti-C4 като патогенетичен фактор за развитие на имунно възпаление и потенциално надежден имунологичен маркер за оценка активността на ЛН.

При изследване на зависимостите на anti-C4 с хистологични аспекти на ЛН установихме, че позитивният статус за anti-C4 не определя наличието на дифузна ЛН ($p = 0,789$). Едновременното изследване, обаче, на статуса за anti-C1q и anti-C4 при пациентите с ЛН има значима диагностична стойност. Двойно позитивният статус за anti-C1q и anti-C4 определя значимо наличието на ЛН IV хистологичен клас с чувствителност 26,7%, специфичност 100,0% и релативен риск 3,7. При пациентите с наличие на хистологични признаци за активност на ЛН като фибриноидна некроза и клетъчни полулуния нивата на anti-C4 са относително по-високи в сравнение с нивата на anti-C4 при липса на тези хистологични признаци, без обаче тази разлика да е значима. При наличие на ендокапилярна пролиферация и субендотелни депозити нивата на anti-C4 са значимо по-високи от нивата на anti-C4 при липса на тези хистологични признаци за активност на ЛН (съответно, $p = 0,025$ и $p = 0,0025$). Установихме и значима позитивна корелационна зависимост между нивата на anti-C4 и хистологичния индекс на активност ($r = 0,61$, $p = 0,0004$). Тези резултати определят ролята на anti-C4 като потенциален надежден неинвазивен маркер за оценка на хистологичната активност на ЛН.

При изследване на прогностичната стойност на anti-C4 установихме, че повишаването на нивата на anti-C4 до патологични стойности определя значимо последващо повишаване на категорията на ЛН по BILAG Renal score ($p = 0,0044$) след среден период от 3,4 месеца, а също така определя и значимо последващо активиране на ЛН (преминаване от състояние на пълна в частична ремисия или в състояние на активна ЛН или преминаване от състояние на частична ремисия в състояние на активна

ЛН) ($p=0,048$) в рамките от 0 до 18 месеца след повишаването на нивата. Това определя anti-C4 като прогностичен имунологичен маркер за развитие на тласък на ЛН.

При изследване на anti-C4 в динамика установихме динамична значима отрицателна слаба корелационна зависимост между нивата на anti-C4 и плазмените концентрации на C4 ($r=-0,18$, $p=0,002$), но не и между нивата на anti-C4 и плазмените концентрации на C3 ($r=-0,08$, $p=0,102$). Налице са, обаче, значими позитивни корелационни зависимости между промяната в нивата на anti-C4 (Δ) и промяната в плазмената концентрация на C4 ($\Delta C4\%$) ($r=0,34$, $p=0,015$) и между промяната на нивата на anti-C4 (Δ) и промяната на плазмената концентрация на C3 ($\Delta C3\%$) ($r=0,28$, $p=0,029$). Установихме значими позитивни динамични корелационни зависимости между anti-C4 и ANA ($r=0,27$, $p<0,0001$) и между anti-C4 и anti-dsDNA ($r=0,28$, $p<0,0001$). Тзи факти определят anti-C4 като потенциален динамичен маркер за проследяване имунологичната активност при пациентите с ЛН. Динамичното проследяване на anti-C4 с динамиката на клинично-лабораторните параметри за оценка на лабораторната активност на ЛН, обаче, не показаха значими зависимости.

Единствено за anti-C4 установихме значимо намаление на нивата в хода на проведената имунопатогенетична терапия при пациентите с ЛН за среден период на проследяване и лечение от 13 месеца ($p=0,0035$).

Наличието на anti-C3, наричани имуноконгλουтини, е описано при пациенти със СЛЕ с честоти между 25 и 32% (Durand и съавт., 1984; Nilsson и съавт., 1992; Kenyon и съавт., 2011). В нашето проучване установяваме наличие на anti-C3 със съизмерими честоти – при 25,7% от пациентите с ЛН в кроссекционното изследване, като при динамично проследяване anti-C3 се позитивират при 57,1% от пациентите с ЛН. Anti-C3 са с описвана в литературата епитопна специфичност към C3b, iC3b, C3c и C3dg (Nilsson и съавт., 1992). Установено е свойството на anti-C3 да потискат инактивирането на C3b до iC3b от фактор I в присъствието на CR1 (Nilsson и съавт., 1990) и да нарушават клирънса на апоптотични клетки в експериментални миши модели (Kenyon и съавт., 2011). В наше предходно пилотно проучване (Vasilev и съавт., 2015, осъществено съвместно с екип на Roumenina, INSERM, UMRS 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France) са проучени функционално anti-C3, като се показва тяхното значение за дисрегулация на C3-конвертазата на алтернативния път на каскадата на комплемента (C3bBb) с епитопно характеризирани, показващо

разпознаване на C3, C3b, iC3b, C3c от проучените anti-C3. Последните при една част от пациентите с ЛН водят до стабилизиране на C3-конвертазата на алтернативния път с удължаване на нейния полуживот и активно разграждане на C3 до C3a и C3b с амплификация на активността на комплементната каскада чрез алтернативния път на активиране (т. нар. „амплификационна бримка”). Това свойство на anti-C3 е подобно в известна степен на свойството на C3NeF (наличен при пациентите с болест на плътните отлагания), който е описан в малка част от пациенти със СЛЕ с парциална липодистрофия (Walport и съавт., 1994) и разпознава неоепитоп от четвъртичната структура на алтернативната C3-конвертаза (C3bBb), но не и епитопи от нейните отделни компоненти (C3b и Bb) (Dragon-Durey и съавт., 2013). Нито един от включените в нашето изследване пациенти с ЛН не е имал признаци на парциална липодистрофия, а също така е демонстрирана и специфичност на anti-C3 към C3 и C3b, поради което изследваните anti-C3 са различни от C3NeF. Освен това, свързването на anti-C3 с неговите антигени води до нарушаване на свързването на C3b с негативните регулатори на алтернативния път на комплементната каскада – фактор Н и CR1 и затруднено инактивиране на C3b до iC3b и дисбаланс в системата на комплемента.

Установихме, че с нарастване на възрастта на пациентите с ЛН в нашето проучване, нивата на anti-C3 намаляват ($r=-0,28$, $p=0,014$). Липсват връзки на anti-C3 с пола на пациентите и с давността на ЛН. При пациентите с ЛН, позитивни за anti-C3, нивото на протеинурията е значимо по-високо от това при пациентите, негативни за anti-C3 ($p=0,014$). Наличието на anti-C3 определя значимо наличието на патологично активен уринен седимент сред всички изследвани в динамика проби от пациенти с ЛН ($p=0,0001$). Не установихме зависимост между anti-C3 и eGFR. Позитивният статус за anti-C3 значимо определя наличието на категория А по BILAG Renal score при пациентите с ЛН ($p<0,0001$) с чувствителност 57,7%, специфичност 74,8% и релативен риск 3,0. При едновременното изследване на anti-C1q и anti-C3 диагностичната стойност за определянето на категория А на ЛН е по-висока (чувствителност 51,6%, специфичност 89,7). Пациентите с ЛН, позитивни за anti-C3 имат значимо по-висока категория на ЛН по BILG Renal score ($p<0,0001$). Горепосочените данни определят anti-C3 като надежден маркер за оценка на клинично-лабораторната активност на ЛН.

При пациентите с ЛН с повишени нива на anti-C3 плазмените концентрации на C4 и C3 са значимо по-ниски от плазмените концентрации на C4 и C3 при пациентите с референтни нива на anti-C3 (съответно, $p=0,001$ и $p=0,0004$). Съществуват и значими

отрицателни корелации между anti-C3 и C4 ($r=-0,40$, $p=0,0005$) и anti-C3 и C3 ($r=-0,35$, $p=0,0015$). Налице са позитивни корелационни връзки между нивата на anti-C3 и титрите на ANA ($r=0,45$, $p=0,0002$), както и между нивата на anti-C3 и концентрациите на anti-dsDNA ($r=0,54$, $p<0,0001$). При позитивните за anti-dsDNA пациенти с ЛН, тези с повишени anti-C3 имат значимо по-висока категория на ЛН по BILAG Renal score в сравнение с категорията при пациентите, позитивни за anti-dsDNA, но негативни за anti-C3 ($p=0,0017$). Гореописаните данни са в съответствие с описаните функционални свойства на anti-C3 и тяхната патогенетична роля в развитието на имунното възпаление при пациентите с ЛН и определят anti-C3 като надежден имунологичен маркер за оценка активността на ЛН.

Най-високо ниво на anti-C3 установихме при пациентите с ЛН IV хистологичен клас. Позитивният статус за anti-C3 значимо определя наличието на ЛН IV хистологичен клас ($p=0,048$) с чувствителност 40,0%, специфичност 82,6% и относителен риск 2,0. Диагностичната стойност на двойно позитивния статус за anti-C1q и anti-C3 е по-висока по отношение на определянето наличието на ЛН IV хистологичен клас, описана е по-горе. При пациентите с ЛН с наличие на активни хистологични признаци нивата на anti-C3 са по-високи в сравнение с нивата при пациентите без наличие на хистологични признаци на активност, като разликата в тези нива е значима при наличие на ендокapiлярна пролиферация ($p=0,049$), субендотелни депозити ($p=0,023$) и интерстициално възпаление ($p=0,029$). Установихме и значима позитивна корелационна зависимост между нивата на anti-C3 и индекса на хистологична активност при пациентите с ЛН ($r=0,52$, $p=0,0027$). Всичко това определя anti-C3 като надежден неинвазивен маркер за оценка на хистологичната активност на ЛН.

При изследване на прогностичната стойност на anti-C3 установихме, че повишаването на anti-C3 до патологични нива значимо определя последващо повишаване на категорията на ЛН по BILAG Renal score ($p=0,0068$) след среден период от 4,3 месеца, а също така значимо определя и последващо активиране на ЛН (преминаване от състояние на пълна в частична ремисия или в състояние на активна ЛН или преминаване от състояние на частична ремисия в състояние на активна ЛН) ($p=0,029$) в рамките от 0 до 11 месеца след повишаването на нивата. Подобна прогностична роля се описва и от други изследователи, а именно, че anti-C3b са позитивни при пациенти с ЛН преди обостряне, при които последното е предхождано

от повишаване на нивата на anti-C1q (Birmingham и съавт., 2016). Това определя anti-C3 като прогностичен имунологичен маркер за развитие на тласък на ЛН.

При изследване в динамика на anti-C3 във връзка с динамичното проследяване на основните клиничко-лабораторни параметри на ЛН не установихме динамични зависимости между anti-C3 и протеинурията и anti-C3 и eGFR. Установихме значими динамични корелационни зависимости между нивата на anti-C3 и плазмените концентрации на C4 ($r=-0,27$, $p<0,0001$), между нивата на anti-C3 и плазмените концентрации на C3 ($r=-0,22$, $p=0,0003$), между нивата на anti-C3 и титрите на ANA ($r=0,43$, $p<0,0001$) и между нивата на anti-C3 и концентрациите на anti-dsDNA ($r=0,51$, $p<0,0001$). Това определя anti-C3 като маркер за динамична оценка на имунологичната активност на ЛН.

Не установихме значими зависимости между нивата на anti-C3 и вида на проведеното имунопатогенетично лечение при пациентите с ЛН, което най-вероятно се дължи на сравнително краткия период на проследяване.

VII. ОБОБЩЕНИ ОСНОВНИ ИЗВОДИ

1. Честотата на повечето автоантитела срещу компонентите на каскадата на комплемента при пациентите с ЛН е значима: anti-C1q при 18,6%, като в динамика се позитивират при 55,6%; anti-C1r при 9,5%, като в динамика се позитивират при 45,2%; anti-C1s при 8,1%, като в динамика се позитивират при 54,8%; anti-C4 при 31,1%, като в динамика се позитивират при 59,5% и anti-C3 при 25,7%, като в динамика се позитивират при 57,1% от пациентите с ЛН. Това разкрива изследваните антитела като динамична популация в автоимунния репертоар при пациентите с ЛН.

2. Липсват значими връзки между нивата на автоантителата срещу компонентите на комплемента с пола и възрастта на пациентите и давността на ЛН, като единствено при anti-C3 е налице намаление на нивата с възрастта на пациентите с ЛН.

3. Значими връзки на протеинурията и наличието на патологично активен уринен седимент като рутинни маркери за оценка активността на ЛН съществуват с anti-C1q и anti-C3, като липсват с anti-C1r, anti-C1s и anti-C4.

4. Значими връзки на рутинни маркери за имунологична активност на СЛЕ и ЛН, каквито са хипокомplementемията за C4, хирокомplementемията за C3, както и нивото на anti-dsDNA съществуват с anti-C1q, anti-C3 и anti-C4, като липсват с anti-C1r и anti-C1s.

5. Значими връзки на хистологичния клас ЛН съществуват с anti-C1q и anti-C3 (най-високи нива на тези антитела се установяват при IV клас ЛН). Налице са връзки между хистологични признаци на активност на ЛН и нивата на anti-C1q, anti-C3 и anti-C4, като липсват значими връзки между хистологичните белези на ЛН и anti-C1r и anti-C1s.

6. Значими връзки на комплексно оценената като активна ЛН съществуват с anti-C1q, anti-C3 и anti-C4, като липсват такива значими връзки с anti-C1s и anti-C1r.

7. Значими динамични връзки на лабораторните маркери за оценка активността на ЛН са налице само с anti-C1q, докато с останалите антикомplementни автоантитела липсват.

8. Значими динамични връзки на някои рутинни маркери за имунологична активност на ЛН съществуват с anti-C1q, anti-C3 и anti-C4, докато такива връзки

липсват с anti-C1r и anti-C1s, което прави anti-C1q, anti-C3 и anti-C4 възможни маркери за проследяване имунологичната активност на ЛН.

9. Като диагностични предиктори за последващо активиране на ЛН биха могли да бъдат използвани anti-C1q, anti-C3, anti-C4, както и anti-C1s, като съществено такова прогностично значение на anti-C1r не се установи.

10. Относително повлияване на нивата на anti-C1q при пациентите с ЛН се установи при приложение на дву- и трикомпонентни имунопатогенетични терапевтични схеми, в сравнение с повлияването от монотерапия. Налице е значимо повлияване в хода на терапията на нивата на anti-C4, като последното не зависи от вида на приложената терапевтична схема. Липсва съществено повлияване на нивата на anti-C3, anti-C1r и anti-C1s от проведеното лечение. Това вероятно би могло да определи нивата на anti-C4 като маркер за проследяване ефекта от лечението.

VIII. ОСНОВНИ ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

8.1. ПРИНОСИ С ОРИГИНАЛЕН ХАРАКТЕР

1. За първи път са определени наличието и честотата на антикомплементните автоантитела anti-C1r, anti-C1s, anti-C4, anti-C3 сред пациенти с ЛН от българската популация. (С научно-теоретичен характер.)

2. За първи път комплексно са проучени връзките на антикомплементните автоантитела anti-C1r, anti-C1s, anti-C4, anti-C3 с маркери за лабораторна, имунологична и хистологична активност при пациенти с ЛН както в кроссекционно, така и в лонгитудинално проучване. (С научно-теоретичен и научно-практичен характер.)

3. За първи път е проучена диагностичната стойност на антикомплементните автоантитела anti-C1r, anti-C1s, anti-C4 и anti-C3 сред пациенти с ЛН. (С научно-практичен характер.)

4. За първи път е проучена прогностичната стойност на антикомплементните автоантитела anti-C1r, anti-C1s, anti-C4 и anti-C3 сред пациенти с ЛН. (С научно-практичен характер.)

5. За първи път е проучена диагностичната стойност на комбинации от антикомплементни автоантитела по отношение на активността на ЛН и хистологичния клас на ЛН. (С научно-практичен и научно-теоретичен характер.)

6. Чрез проучване на наличието на антикомплементните автоантитела anti-C1r, anti-C1s, anti-C4 и anti-C3 и техните връзки с останалите лабораторни, имунологични и хистологични параметри, характеризиращи ЛН, се демонстрира ролята на придобитите дефекти на класическия и на алтернативния път на каскадата на комплемента за развитие на ЛН. (С научно-теоретичен характер.)

8.2. ПРИНОСИ С ПОТВЪРДИТЕЛЕН ХАРАКТЕР

1. Проучено е наличието и честотата на anti-C1q при пациенти с ЛН от българската популация.

2. Проучени и потвърдени са връзките на anti-C1q с основни лабораторни, имунологични и хистологични признаци, характеризиращи ЛН, както в кроссекционно, така и в лонгитудинално проучване.

3. Проучени и потвърдени са диагностичната и прогностичната стойности на anti-C1q при пациенти с ЛН.

IX. ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

1. Монова Д. Клинико-морфологични и имунологични проучвания при лупусни нефрити. Дисерт. труд за присъждане на научна степен "доктор на науките", София, 2010.
2. Монова Д, Тодоров Т, Монов С. Сезонни вариации в проявата на лупусните нефрити. Нефрол, Диал, Трансплант; 2008;14:32-36.
3. Николова М. Лупусен нефрит - етиология, патогенеза, клинико-лабораторни характеристики. Нефрол Диал Трансплант; 2003;1:15-22.
4. Раданова М. Проучване на молекулни ефекти от инхибиране на C1q при болни с лупусен нефрит. Дисерт. труд за присъждане на образователна и научна степен "доктор", Варна, 2011.
5. Тишков И. Нефропатия при системния еритематозен лупус. В: Клинична нефрология, 1 изд. Василев Т, Стефанов Г. ред. Медицина и физкултура; 1990:265-274.
6. Abdellatif AA, Waris J, Lakhani A, et al. True vasculitis in lupus nephritis. Clin Nephrol. 2010;74:106-112.
7. Abu-Shakra M, Urowitz MB, Gladman DD, Gough J. Mortality studies in systemic lupus erythematosus: results from a single center. II. Predictor variables for mortality. J Rheumatol 1995;22:1265-70.
8. Adler S, Baker PJ, Johnson RJ et al. Complement membrane attack complex stimulates production of reactive oxygen metabolites by cultured rat mesangial cells. J Clin Invest 1986;77:762-767.
9. Agnello V, Koffler D, Eisenberg JW, Winchester RJ, Kunkel HG. C1q precipitins in sera of patients with systemic lupus erythematosus and other hypocomplementemic states: characterisation of high and low molecular weight types. J Exp Med. 1971;134(3):228-41.
10. Alsenz J, Bork K, Loos M. Autoantibody-mediated acquired deficiency of C1 inhibitor. N Engl J Med. 1987;316:1360-1366.

11. Appel GB, Cohen DJ, Pirani CL, et al. Long term follow-up of lupus nephritis: a study based on the WHO classification. *Am J Med.* 1987;83:877.
12. Appel GB, D'Agati VD. Renal involvement in systemic lupus erythematosus. In: Massry S, Glassock R, eds. *Textbook of Kidney Disease*. St. Louis: Williams & Wilkins; 2000:787-797.
13. Appel GB, D'Agati VD: Lupus nephritis—pathology and pathogenesis. In Wallace DJ, Hahn BH, ds. *Dubois' Lupus Erythematosus*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007:1094-1112.
14. Appel GB, Jayne D. Lupus nephritis. In: Johnson R, Floege J, Feehaly J, eds. *Comprehensive Clinical Nephrology*. St. Louis: Elsevier; 2010.
15. Appel GB, Pirani CL, D'Agati VD. Renal vascular complications of systemic lupus erythematosus. *J Am Soc Nephrol.* 1994;4:1499.
16. Austin HA, Boumpas DT, Vaughan EM, et al. Predicting renal outcomes in severe lupus nephritis: contributions of clinical and histologic data. *Kidney Int.* 1994;43:544-550.
17. Bagavant H, Fu SM. Pathogenesis of kidney disease in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheum.* 2009;5:489-494.
18. Balow JE. Clinical presentation and monitoring of lupus nephritis. *Lupus.* 2005;14:25–30.
19. Banfi G, Bertani T, Boeri V, et al. Renal vascular lesions as a marker of a poor prognosis in patients with lupus nephritis. *Am J Kidney Dis.* 1991;18:240.
20. Baudino L, Sardini A, Ruseva MM, Fossati-Jimack L, Cook HT, Scott D, et al. C3 opsonization regulates endocytic handling of apoptotic cells resulting in enhanced T-cell responses to cargo-derived antigens. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111:1503–8.
21. Berger SP, Roos A, Daha MR. Complement and the kidney: What the nephrologist needs to know in 2006? *Nephrol Dial Transplant.* 2005; 20:2613–2619.
22. Bertolaccini ML, Hughes GRV, Khamashta MA. Systemic Lupus Erythematosus. In: *Diagnostic Criteria in Autoimmune Diseases*. 1st ed. Shoenfeld Y, Cervera R, Gershwin ME eds. Humana Press. 2008:3-8.

23. Bienenstock J, Bloch KJ. Immunoconglutinin in various rheumatic diseases and certain diseases suspected of an autoimmune pathogenesis. *Arthritis Rheum.* 1967;10:187-198.
24. Birmingham DJ, Bitter JE, Ndukwe EG, Dials S, Gullo TR, Conroy S, Nagaraja HN, Rovin BH, Hebert LA. Relationship of circulating anti-C3b and anti-C1q IgG to lupus nephritis and its flare. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2016;11:47-53.
25. Botto M, Walport MJ. Hereditary deficiency of C3 in animals and humans. *Int Rev Immunol.* 1993;10:37-50.
26. Castelli R, Zanichelli A, Cicardi M, Cugno M. Acquired C1-inhibitor deficiency and lymphoproliferative disorders: a tight relationship. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2013;87(3):323-32.
27. Cervera R, et al., European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus: Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients. *Medicine (Baltimore);* 2003;82:299-308.
28. Cicardi M, Beretta A, Colombo M, Gioffré D, Cugno M, Agostoni A. Relevance of lymphoproliferative disorders and of anti-C1 inhibitor autoantibodies in acquired angio-oedema. *Clin Exp Immunol.* 1996;106(3):475-80.
29. Clarke EV, Weist BM, Walsh CM, Tenner AJ. Complement protein C1q bound to apoptotic cells suppresses human macrophage and dendritic cell-mediated Th17 and Th1 T cell subset proliferation. *J Leukoc Biol.* 2015;97:147–60.
30. Coremans IE, Spronk PE, Bootsma H, Daha MR, van der Voort EA, Kater L, Breedveld FC, Kallenberg CG. Changes in antibodies to C1q predict renal relapses in systemic lupus erythematosus. *Am J Kidney Dis.* 1995;26:595–601.
31. D’Agati V, Appel GB, Knowles D, et al. Monoclonal antibody identification of mononuclear cells in renal biopsies of lupus nephritis. *Kidney Int.* 1986;30:573.
32. D’Agati VD. Renal disease in systemic lupus erythematosus, mixed connective tissue disease, Sjogren’s syndrome, and rheumatoid arthritis. In: Jennette CJ, Olson L, Schwartz MM, et al., eds. *Pathology of the Kidney.* 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998.

33. Daha MR, Hazevoet HM, Hermans J, van Es LA, Cats A. Relative importance of C4 binding protein in the modulation of the classical pathway C3 convertase in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* 1983;54:248-252.
34. Daha MR, van Es LA. Relative resistance of the F-42-stabilized classical pathway C3 convertase to inactivation by C4-binding protein. *J Immunol.* 1980;125(5):2051-4.
35. Davies KA, Schifferli JA, Walport MJ. Complement deficiency and immune complex disease. *Springer Semin Immunopathol.* 1994;15:397-416.
36. Deapen D, Escalante A, Weinrib L, Horwitz D, Bachman B, RoyBurman P, Walker A, Mack TM: A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1992;35:311-318.
37. Donadio Jr JV, et al. Membranous lupus nephropathy: a clinicopathologic study. *Medicine.* 1977;56:527.
38. Doyle HA, Yan J, Liang B, Mamula MJ. Lupus autoantigens: their origins, forms, and presentation. *Immunol Res.* 2001;24:131-147.
39. Dragon-Durey M-A, Blanc C, Marinozzi MC, van Schaarenburg RA, Trouw LA. Autoantibodies against complement components and functional consequences. *Mol Immunol.* 2013;56(3):213-21.
40. Durand CG, Burge JJ. A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring immunoconglutinins directed against the third component of human complement. Findings in systemic lupus erythematosus. *J Immunol Methods.* 1984;12;73(1):57-66.
41. Egner W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. *J Clin Pathol.* 2000;53:424–432.
42. Fang Q-Y, Yu F, Tan Y, Xu L, Wu L, Liu G, Shao F, Zhao. Anti-C1q antibodies and IgG subclass distribution in sera from Chinese patients with lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24:172–178.
43. Font J, Torras A, Cervera R, et al. Silent renal disease in systemic lupus erythematosus. *Clin Nephrol.* 1987;27(6):283-288.

44. Gaboriaud C, Frachet P, Thielens NM, Arlaud GJ. The human C1q globular domain: structure and recognition of non-immune self ligands. *Front Immunol.* 2012;6;2:92.
45. Gaboriaud C, Juanhuix J, Gruez A, Lacroix M, Darnault C, Pignol D, Verger D, Fontecilla-Camps JC, Arlaud GJ. The crystal structure of the globular head of complement protein C1q provides a basis for its versatile recognition properties. *J Biol Chem.* 2003;278(47):46974-82.
46. Geha RS, Quinti I, Austen KF, Cicardi M, Sheffer A, Rosen FS. Acquired C1-inhibitor deficiency associated with antiidiotypic antibody to monoclonal immunoglobulins. *N Engl J Med.* 1985;28;312(9):534-40.
47. Gerald BA, Radhakrishnan J, D'Agati VD. Systemic Lupus Erythematosus. In: Brenner & Rector's The Kidney. 9th ed. Taal M, Chertow G, Marsden P, Skorecki K, Yu A, Brenner B eds. Philadelphia. Elsevier Saunders. 2012:1193-1208.
48. Gershov D, Kim S, Brot N, Elkon KB. C-reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity. *J Exp Med.* 2000;192:1353-64.
49. Gladman DD, Urowitz MB, Goldsmith CH, et al. The reliability of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997;40:809–13.
50. Gladman DD, Urowitz MB. Prognosis, mortality and morbidity in systemic lupus erythematosus. In: Wallace DJ, Hahn BH, eds. Dubois' lupus erythematosus. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007:1333-53.
51. Gupta B, Raghav SK, Agrawal C, Chaturvedi VP, Das RH, Das HR. Anti-MBL autoantibodies in patients with rheumatoid arthritis: prevalence and clinical significance. *J Autoimmun.* 2006;27(2):125-33.
52. Hack CE, Relan A, van Amersfoort ES, Cicardi M. Target levels of functional C1-inhibitor in hereditary angioedema. *Allergy.* 2012;67(1):123-30.
53. Hahn BH. Antibodies to DNA. *N Engl J Med.* 1998;338:1359-1368.

54. He S, Lin Y-L. In vitro stimulation of C1s proteolytic activities by C1s-presenting autoantibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 1998;160:4641-4647.
55. Hill G, Delahousse M, Nochy D, et al. A new index for evaluation of renal biopsies in lupus nephritis. *Kidney Int.* 2000;58:11600–1173.
56. Hill GS, Delahousse M, Nochy D, et al. Proteinuria and tubulointerstitial lesions in LN. *Kidney Int.* 2001;60:1893-1903.
57. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus [letter]. *Arthritis Rheum* 1997;40:1725.
58. Hofman ZL, Relan A, Hack CE. Hereditary Angioedema Attacks: Local Swelling at Multiple Sites. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2014;20:1-7.
59. Holers VM. Anti-C1q autoantibodies amplify pathogenic complement activation in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 2004;114(5):616-9.
60. Horák P, Zadražil J, Ciferská H, Hermanová Z. Antibodies against complement system in SLE and their potential diagnostic utility. *Curr Rheum Rev.* 2009;5:58-63.
61. Inaba S, Okochi K, Yae Y, Niklasson F, de Verder CH. Serological studies of an SLE-associated antigen-antibody system discovered as a precipitation reaction in agarose gel: the HAKATA antigen-antibody system. *Fukuoka Igaku Zasshi.* 1990;81(9):284-91.
62. Isenberg DA, Rahman A, Allen E, et al. BILAG 2004. Development and initial validation of an updated version of the British Isles Lupus Assessment Group's disease activity index for patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2005;44: 902–6.
63. Jaekel H-P, Trabandt A, Grobe N, Verle E. Anti-dsDNA antibody subtypes and anti-C1q antibodies: toward a more reliable diagnosis and monitoring of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Lupus.* 2006;15:335–345.
64. Jennette JC, Iskander SS, Dalldorf FG. Pathologic differentiation between lupus and nonlupus membranous glomerulopathy. *Kidney Int.* 1983;24:377.

65. Johnson AE, Gordon C, Palmer RG, Bacon PA. The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Birmingham, England. Relationship to ethnicity and country of birth. *Arthritis Rheum*; 1995;38:551-558.
66. Kallenberg CGM. Anti-C1q autoantibodies. *Autoimmun Rev*. 2008;7(8):612-5.
67. Kishore U, Ghai R, Greenhough TJ, Shrive AK, Bonifati DM, Gadjeva MG, Waters P, Kojouharova MS, Chakraborty T, Agrawal A. Structural and functional anatomy of the globular domain of complement protein C1q. *Immunol Lett*. 2004;95(2):113-28.
68. Kishore U, Gupta SK, Perdikoulis MV, Kojouharova MS, Urban BC, Reid KB. Modular organization of the carboxyl-terminal, globular head region of human C1q A, B, and C chains. *J Immunol*. 2003;171(2):812-20.
69. Kishore U, Reid KB. C1q: structure, function, and receptors. *Immunopharmacol*. 2000;49(1-2):159-70.
70. Kishore U, Reid KB. Modular organization of proteins containing C1q-like globular domain. *Immunopharmacol*. 1999;42(1-3):15-21.
71. Kohro-Kawata J, Wener MH, Mannik M. The effect of high salt concentration on detection of serum immune complexes and autoantibodies to C1q in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2002;29(1):84-9.
72. Kojouharova MS, Tsacheva IG, Tchorbadjieva MI, Reid KB, Kishore U. Localization of ligand-binding sites on human C1q globular head region using recombinant globular head fragments and single-chain antibodies. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1652(1):64-74.
73. Korb LC, Ahearn JM. C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. *J Immunol*. 1997;158:4525-8.
74. Kouser L, Madhukaran SP, Shastri A, Saraon A, Ferluga J, Al-Mozaini M, Kishore U. Emerging and Novel Functions of Complement Protein C1q. *Front Immunol*. 2015;29:6:317.

75. Kozyro I, Perahud I, Sadallah S, Sukalo A, Titov L, Schifferli J, Trendelenburg M. Clinical value of autoantibodies against C1q in children with glomerulonephritis. *Pediatrics*. 2006;117:1663–8.
76. Lachmann PJ. The amplification loop of the complement pathways. *Adv Immunol*. 2009;104:115-49.
77. Laitman RS, Glicklich D, Sablay L, et al. Effect of long-term normalization of serum complement levels on the course of lupus nephritis. *Am J Med*. 1989;87:132.
78. Lam GKW, Petri M. Assessment of systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol*. 2005;23(Suppl.39):S120-S132.
79. Liu C-C, Ahearn JM. The Search for Lupus Biomarkers. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2009;23(4): 507–523.
80. Magil AB, Puterman ML, Ballon HS, et al. Prognostic factors in diffuse proliferative lupus glomerulonephritis. *Kidney Int*. 1988;34:511-517.
81. Mannik M, Merrill CE, Stamps LD, et al. Multiple autoantibodies form the glomerular immune deposits in patients with SLE. *J Rheum*. 2003;30:1495-1504.
82. Mannik M, Wener MH. Deposition of antibodies to the collagen-like region of C1q in renal glomeruli of patients with proliferative lupus glomerulonephritis. *Arthritis Rheum*. 1997;40(8):1504-11.
83. Manson J, Rahman A. Systemic lupus erythematosus. *Orphan J Rare Dis*. 2006;1:6
84. Markowitz GS, D’Agati VD. Classification of lupus nephritis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2009;18:220-225.
85. Markowitz GS, D’Agati VD. The ISN/RPS 2003 classification of lupus nephritis: an assessment at 3 years. *Kidney Int*. 2007;71:491–195.
86. Marto N, Bertolaccini MI, Calabuig E, Hughes GRV, Khamashta MA. Anti-C1q antibodies in nephritis: correlation between titres and renal disease activity and positive predictive value in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2005;64:444–8.
87. Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement system part I – molecular mechanisms of activation and regulation. *Front Immunol*. 2015;6:262.

88. Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement system part II: role in immunity. *Front Immunol*. 2015;6:257.
89. Mészáros T, Füst G, Farkas H, Jakab L, Temesszentandrás G, Nagy G, Kiss E, Gergely P, Zeher M, Griger Z, Czirják L, Hóbor R, Haris A, Polner K, Varga L. C1-inhibitor autoantibodies in SLE. *Lupus*. 2010;19(5):634-8.
90. Mevorach D, Mascarenhas JO, Gershov D, Elkon KB. Complement dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. *J Exp Med*. 1998;188:2313-20.
91. Mok CC, Ho LY, Leung HW, Wong LG. Performance of anti-C1q, antinucleosome, and anti-dsDNA antibodies for detecting concurrent disease activity of systemic lupus erythematosus. *Transl Res*. 2010;156(6):320-5.
92. Mok MY, Jack DL, Lau CS, Fong DY, Turner MW, Isenberg DA, Lydyard PM. Antibodies to mannose binding lectin in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2004;13(7):522-8.
93. Moroni G, Trendelenburg M, Del Papa N, Quaglini S, Raschi E, Panzeri P, Testoni C, Tincani A, Banfi G, Balestrieri G, Schifferli JA, Meroni PL, Ponticelli C. Anti-C1q antibodies may help in diagnosing a renal flare in lupus nephritis. *Am J Kidney Dis*. 2001;37:490–498.
94. Nauta AJ, Castellano G, Xu W, Woltman AM, Borrias MC, Daha MR, et al. Opsonization with C1q and mannose-binding lectin targets apoptotic cells to dendritic cells. *J Immunol*. 2004;195(173):3044–50. doi:10.4049/jimmunol.173.5.3044.
95. Nauta AJ, Daha MR, van Kooten C, Roos A. Recognition and clearance of apoptotic cells: a role for complement and pentraxins. *Trends Immunol*. 2003;24:148–154.
96. Nauta AJ, Raaschou-Jensen N, Roos A, et al. Mannose-binding lectin engagement with late apoptotic and necrotic cells. *Eur J Immunol*. 2003;33:2853–2863.
97. Nauta AJ, Trouw LA, Daha MR et al. Direct binding of C1q to apoptotic cells and cell blebs induces complement activation. *Eur J Immunol*. 2002;32:1726–1736.
98. Nayak A, Pednekar L, Reid KB, Kishore U. Complement and non-complement activating functions of C1q: a prototypical innate immune molecule. *Innate Immun*. 2012;18(2):350-63.

99. Nilsson B, Ekdahl KN, Svarvare M, Bjelle A, Nilsson UR. Purification and characterization of IgG immunoconglutinins from patients with systemic lupus erythematosus: implications for a regulatory function. *Clin Exp Immunol.* 1990;82:262-267.
100. Nilsson B, Nilsson Ekdahl K, Sjöholm A, Nilsson UR, Sturfelt G. Detection and characterization of immunoconglutinins in patients with systemic lupus erythematosus (SLE): serial analysis in relation to disease course. *Clin Exp Immunol.* 1992;90:251-255.
101. Norsworthy P, Theodoridis E, Botto M, Athanassiou P, Beynon H, Gordon C, Isenberg D, Walport MJ, Davies KA. Overrepresentation of the Fc γ receptor type IIA R131/R131 genotype in caucasoid systemic lupus erythematosus patients with autoantibodies to C1q and glomerulonephritis. *Arthritis Rheum.* 1999;42:1828–32.
102. Park MH, D'Agati VD, Appel GB, et al. Tubulointerstitial disease in lupus nephritis: relationship to immune deposits, interstitial inflammation, glomerular changes, renal function, and prognosis. *Nephron.* 1986;44:309-319.
103. Paronetto F, Koffler D. Immunofluorescent localization of immunoglobulins, complement, and fibrinogen in human diseases. I. Systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 1965;44:1657-1664.
104. Pickering MC, Botto M, Taylor PR, Lachmann PJ, Walport MJ. Systemic lupus erythematosus, complement deficiency, and apoptosis. *Adv Immunol.* 2000;76:227-324.
105. Pons-Estel GJ, Alarcón GS, Scofield L, Reinlib L, Cooper GS. Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum.* 2010;39:257-68.
106. Popat RJ, Robson MG. Complement and Glomerular Diseases. *Nephron Clin Pract.* 2014;128:238–242.
107. Potlukova E, Kralikova P. Complement component C1q and anti-C1q antibodies in theory and in clinical practice. *Scand J Immunol.* 2008;67(5):423–430.
108. Pradhan V, Mahant G, Rajadhyaksha A, Surve P, Rajendran V, Patwardhan M, Nadkarni A, Dighe S, Ghosh K. A study on anti-mannose binding lectin (anti-MBL) antibodies

- and serum MBL levels in Indian systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatol Int.* 2013;33(6):1533-9.
109. Rahman A, Isenberg D. Systemic Lupus Erythematosus. *N Engl J Med* 2008;358:929-939.
 110. Reefman E, Limburg PC, Kallenberg CGM, Bijl M. Fcγ receptors in the initiation and progression of systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1051:52–63.
 111. Reichlin M. Clinical and immunologic significance of antibodies to Ro and La in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1982;25:767.
 112. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD: Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol.* 2010;11:785–797.
 113. Ripoche J, Fontaine M, Godin M, Hauptmann G, Goetz J. Partial deficiency of the fourth component of human complement (C4) and autoantibody directed against C4 in a patient with SLE. *Ann Immunol (Paris).* 1983;134D(2):233-45.
 114. Roumenina LT, Popov KT, Bureeva SV, Kojouharova M, Gadjeva M, Rabheru S, Thakrar R, Kaplun A, Kishore U. Interaction of the globular domain of human C1q with *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1784(9):1271-6.
 115. Roumenina LT, Ruseva MM, Zlatarova A, et al. Interaction of C1q with IgG1, C-reactive protein and pentraxin 3: mutational studies using recombinant globular head modules of human C1q A, B, and C chains. *Biochemistry.* 2006;45(13):4093-104.
 116. Rovin B. Biomarkers for lupus nephritis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009;4:1858-1865.
 117. Rus V, Maury EE, Hochberg MC: The epidemiology of SLE. In Wallace DJ, Hahn BH, eds. *Dubois' Lupus Erythematosus.* 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007:34-43.
 118. Schwartz M, Berstein J, Hill GS, et al. Predictive value of renal pathology in diffuse proliferative lupus glomerulonephritis. *Kidney Int.* 1989;36:891-896.
 119. Schwartz MM. The holy grail: pathological indices in LN. *Kidney Int.* 2000;58:1354-1355.

120. Seelen MA, Trouw LA, Daha MR. Diagnostic and prognostic significance of anti-C1q antibodies in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2003;12(6):619-24.
121. Seelen MA, Trouw LA, van der Hoorn JW, Fallaux-van den Houten FC, Huizinga TW, Daha MR, Roos A. Autoantibodies against mannose-binding lectin in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol*. 2003;134:335-343.
122. Servais A, Noël LH, Roumenina LT, Le Quintrec M, et al. Acquired and genetic complement abnormalities play a critical role in dense deposit disease and other C3 glomerulopathies. *Kidney Int*. 2012;82(4):454-64.
123. Sherer Y, Gorstein A, Fritzler M, Shoenfeld Y. Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus: more than 100 different antibodies found in SLE patients. *Semin Arthritis Rheum*. 2004;34:501-537.
124. Shoenfeld Y, Szyper-Kravitz M, Witte T, et al. Autoantibodies against protective molecules--C1q, C-reactive protein, serum amyloid P, mannose-binding lectin, and apolipoprotein A1: prevalence in systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1108:227-39.
125. Siegert CE, Daha MR, Swaak AJ, van der Voort EA, Breedveld FC. The relationship between serum titers of autoantibodies to C1q and age in the general population and in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol*. 1993;67(3 Pt 1):204-9.
126. Siegert CE, Daha MR, Tseng CM, Coremans IE, van Es LA, Breedveld FC. Predictive value of IgG autoantibodies against C1q for nephritis in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 1993;52(12):851-6.
127. Siegert CE, Daha MR. C1q as antigen in humoral autoimmune responses. *Immunobiology*. 1998;199(2):295-302.
128. Siegert CE, Kazatchkine MD, Sjöholm A, Wurzner R, Loos M, Daha MR. Autoantibodies against C1q: view on clinical relevance and pathogenic role. *Clin Exp Immunol*. 1999;116:4-8.

129. Sinico RA, Radice A, Ikehata M, Giammarresi G, Corace C, Arrigo G, Bollini B, Li Vecchi M. Anti-C1q autoantibodies in lupus nephritis: prevalence and clinical significance. *Ann NY Acad Sci.* 2005;1050:193–200.
130. Sprangers B, Appel GB. Renal vascular involvement in SLE. In: Lewis EJ, Schwartz M, Korbet SM, eds. *Lupus Nephritis*. Oxford: Oxford Press; 2010.
131. Takahashi R, Tsutsumi A, Ohtani K, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Wakamiya N, Sumida T. Anti-mannose binding lectin antibodies in sera of Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* 2004;136(3):585-90.
132. Tan EM, Cohen AS, Fries JF et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25: 1271–1277.
133. Taylor PR, Carugati A, Fadok VA, et al. A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells in vivo. *J Exp Med.* 2000;192:359-66.
134. Termaat RM, Assmann KJM, Dijkman HBPM, et al. Anti-DNA antibodies can bind to the glomerulus via two distinct mechanisms. *Kidney Int.* 1992;43:1363.
135. Trendelenburg M, Lopez-Trascasa M, Potlukova E, Moll S, Regenass S, Frémeaux-Bacchi V, Martinez-Ara J, Jancova E, Picazo ML, Honsova E, Tesar V, Sadallah S, Schifferli J. High prevalence of anti-C1q antibodies in biopsy proven active lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21:3115–21.
136. Trendelenburg M, Marfurt J, Gerber I, et al. Lack of occurrence of severe lupus nephritis among anti-C1q autoantibody-negative patients. *Arthr Rheum.* 1999;42:187–188.
137. Trendelenburg M. Antibodies against C1q in patients with systemic lupus erythematosus. *Springer Semin Immun.* 2005;27:276–285.
138. Trouw LA, Groeneveld TW, Seelen MA, Duijs JM, Bajema IM, Prins FA, Kishore U, Salant DJ, Verbeek JS, van Kooten C, Daha MR. Anti-C1q autoantibodies deposit in glomeruli but are only pathogenic in combination with glomerular C1q-containing immune complexes. *J Clin Invest.* 2004;114:679–88.

139. Tsacheva I, Radanova M, Todorova N, Argirova T, Kishore U. Detection of autoantibodies against the globular domain of human C1q in the sera of systemic lupus erythematosus patients. *Mol Immunol.* 2007;44:2147-51.
140. Tsokos G. Systemic Lupus Erythematosus. *N Engl J Med*, 2011;365:2110-21.
141. Turner MW. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol Immunol.* 2003;40:423–429.
142. Urowitz MB, Bookman AA, Koehler BE, Gordon DA, Smythe HA, Ogryzlo MA. The bimodal mortality pattern of systemic lupus erythematosus. *Am J Med*, 1976;60:221-5.
143. Uwatoko S, Aotsuka S, Okawa M, Egusa Y, Yokohari R, Aizawa C, Suzuki K. C1q solid-phase radioimmunoassay: binding properties of solid-phase C1q and evidence that C1q-binding IgG complexes in systemic lupus erythematosus are not bound to endogenous C1q. *J Immunol Methods.* 1984;73(1):67-74.
144. Uwatoko S, Aotsuka S, Okawa M, Egusa Y, Yokohari R, Aizawa C, Suzuki K. Characterization of C1q-binding IgG complexes in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol.* 1984;30(1):104-16.
145. Uwatoko S, Mannik M. IgG subclasses of antibodies to the collagen-like region of C1q in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1989;32(12):1601-3.
146. Vanhecke D, Roumenina LT, Wan H, Osthoff M, Schaller M, Trendelenburg M. Identification of a major linear C1q epitope allows detection of systemic lupus erythematosus anti-C1q antibodies by a specific peptide-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Arthritis Rheum.* 2012;64(11):3706-14.
147. Waldman M, Madaio MP. Pathogenic autoantibodies in lupus nephritis. *Lupus.* 2005;14:19-24.
148. Walport MJ, Davies KA, Botto M, Naughton MA, Isenberg DA, Biasi D, Powell RJ, Cheung NT, Struthers GR. C3 nephritic factor and SLE: report of four cases and review of the literature. *QJM.* 1994;87(10):609-15.
149. Walport MJ. Complement and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res.* 2002;4 (suppl 3):S279-S293.

150. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med*. 2001;344:1058-1066.
151. Walport MJ. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med*. 2001;344:1140-1144.
152. Ward MM: Prevalence of physician-diagnosed systemic lupus erythematosus in the United States: results from the third national health and nutrition examination survey. *J Womens Health (Larchmt)*; 2004;13:713-718.
153. Weening JJ, D'Agati VD, Appel GB, et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus nephritis revisited. *Kidney Int*. 2004;65:521-530.
154. Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, et al. The Classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:241-250.
155. Wisnieski JJ, Jones SM. Comparison of autoantibodies to the collagen-like region of C1q in hypocomplementemic urticarial vasculitis syndrome and systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 1992;148:1396–403.
156. Wisnieski JJ, Naff GB. Serum IgG antibodies to C1q in hypocomplementemic urticarial vasculitis syndrome. *Arthritis Rheum*. 1989;32:1119–27.
157. Yae Y, Inaba S, Sato H, Okochi K, Tokunaga F, Iwanaga S. Isolation and characterization of a thermolabile beta-2 macroglycoprotein ('thermolabile substance' or 'Hakata antigen') detected by precipitating (auto) antibody in sera of patients with systemic lupus erythematosus. *Biochim Biophys Acta*. 1991;12;1078(3):369-76.
158. Zhang Y, Meyer NC, Fervenza FC, Lau W, Keenan A, Cara-Fuentes G, Shao D, Akber A, Fremeaux-Bacchi V, Sethi S, Nester CM, Smith RJH. C4 nephritic factors in C3 glomerulopathy: a case series. *Am J Kidney Dis*. 2017;12;70(6):834-843.

Х. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Stoyanova V, Bogoeva V, Petrova L, Tchorbadjieva M, Petrova S, Georgieva V, Georgiev G, Deliyska B, **Vasilev V**, Tsacheva I. Autoantigenicity of human C1q is associated with increased hydrophobicity due to conformational transitions in the globular heads. Mol BioSyst. 2015; 11: 1370-1377. [IF: 3,21]
2. Radanova M, Bratoeva K, **Vasilev V**, Deliyska B, Ikonov V, Argirova T. Association between anti-C1q and anti-dsDNA antibodies in patients with Lupus nephritis. Science & Technologies, 2015; V(1): 55-60.
3. Radanova M, Stoyanova V, Bratoeva K, **Vasilev V**, Ivanova D. Antibodies recognizing the globular domain of C1q - view on association between lupus nephritis activity and anti-gC1q autoantibodies. Scripta Scientifica Medica, 2016; 48(1): 13-21.