

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО РЕВМАТОЛОГИЯ

д-р БОГДАН ФРЕДИЕВ ПЕНЕВ

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

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

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

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

СОФИЯ, 2025 г.

ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:

АИЗ – автоимунно заболяване

АНА – антинуклеарни антитела

АПК – антиген-представяща/и клетка/и

Ат – анти тяло/антитела

ААт – автоанти тяло/автоантитела

ИИФ – индиректна имунофлуоресценция

НЛЕ – непълен („субклиничен“) лупус еритематозус

РПС – роднини първа степен

СЛЕ – системен лупус еритематозус

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

ACR – American College of Rheumatology

anti-dsDNA – анти-двойноверижна ДНК

anti-ssDNA – анти-едноверижна ДНК

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

EBV – Epstein-Barr virus

ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay

EULAR - European League Against Rheumatism

ICAP – International Consensus of ANA Patterns

IFN – Interferon

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

HEp – Human epithelioma (cells)

TGF- β - Transforming Growth Factor beta

СЪДЪРЖАНИЕ:

1.	ВЪВЕДЕНИЕ.....	4
2.	ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР.....	5
2.1.	СЛЕ – характеристики и класификация.....	5
2.2.	СЛЕ – епидемиология и рискови фактори.....	15
2.3.	СЛЕ – имунопатогенеза.....	18
2.4.	АНА – механизъм на генериране.....	22
2.5.	АНА - методи за детекция. Типове светения, ICAP.....	24
2.6.	АНА в предклиничната фаза на СЛЕ.....	26
2.7.	Фамилност и генетичен модел при СЛЕ.....	28
2.8.	АНА в общата популация.....	29
2.9.	АНА и имунологични промени у роднини на болни със СЛЕ.....	34
2.10.	Заклучение.....	42
3.	ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	45
4.	МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	45
4.1.	Изследвани лица и биологичен материал.....	45
4.2.	Методи.....	47
5.	РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.....	58
5.1.1-2.	Демографски характеристики на изследваните групи.....	58
5.1.2-4.	Изследване на АНА-ИИФ, специфични АНА, фракции на комплемента и антифосфолипидни антитела сред изследваните групи	61
5.1.5-9.	Клинични оплаквания сред изследваните групи	85
5.1.10-11.	Рискови фактори и COVID 19 сред изследваните групи.....	102
5.1.12.	Нива на цитокини (BLys, APRIL, IFN- α , IL-6, IL-8, IL-10 и TGF- β) сред изследваните групи.....	105
5.1.13.	Нива на антитела срещу капсидния антиген на Епщайн-Бар вируса сред изследваните групи.....	107
5.1.13.1-5.	Конкретни и комплексни зависимости между изследваните променливи сред изследваните групи.....	109
5.2.	Общо обсъждане.....	129
6.	ИЗВОДИ.....	136
7.	ПРИНОСИ.....	137
8.	БИБЛИОГРАФИЯ.....	138
9.	ПРИЛОЖЕНИЕ.....	151

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Системният лупус еритематозус (СЛЕ) е хетерогенно системно аутоимунно ревматично заболяване с неясна етиология, характеризиращо се със системна имунна дисрегулация, патологична аутореактивност, образуване на аутоантитела и полиорганно засягане. Аутоантителата при СЛЕ са насочени срещу разнообразни аутоантигени, като тези, насочени срещу собствени ядрени структури – антинуклеарните антитела (АНА), са идентифицирани като най-характерните за СЛЕ и присъстват в около 95% от случаите. Предвид че се засягат в най-голяма степен жени между 20 и 50-годишна възраст, СЛЕ е причина за значима инвалидност на хора в трудоспособна и в детеродна възраст, което обуславя и демографската, и социално-икономическата значимост на заболяването. Задълбочаването на познанията за имунологичните промени при СЛЕ е причина за все по-ранна диагноза, съответно по-ранно лечение, което, заедно с терапевтичният напредък през последните десетилетия, постепенно го измества от категорията „смъртна присъда“. Нещо повече, натрупани са данни за имунологични промени предшестващи клиничната изява на болестта; сред тези промени обект на рутинно изследване са именно АНА [1-3]. Това създава и предпоставки за дръзновено надничане в прогностиката и търсене на още ранни специфични промени или комбинации от такива, които да ни алармират за вече започнал патологичен процес и така да ни „предупредят“ за задаващото се клинично заболяване. От друга страна, СЛЕ се характеризира с подчертана тенденция към фамилна агрегация и роднините първа степен на болните са водеща рискова група. На последните е и посветен настоящият труд, чиято цел е да обобщи и провери в изследване досегашните знания за най-ранните промени при „бъдещите болни“, като разглежда роднините на болните, вземайки за отправна точка антинуклеарните антитела, но насочвайки от там погледа към всички останали фактори, които изглежда да имат отношение към развитието на болестта.

2. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

2.1. СЛЕ – характеристики и класификация

По своята същност, СЛЕ е хетерогенен системен автоимуен синдром със сходни патогенетични механизми и припокриващи се клинични прояви. Въпреки все по-богатите данни за вероятни рискови фактори, генетични и епигенетични промени, и особено имунопатогенетични каскади, все още липсва интегрална картина за същността на болестта. Това е и причината диагнозата да се поставя все още на база комбинация от клинични белези и имунологични промени, като последните не винаги са с изяснена патогенетична роля. Т.е., все още разпознаването на СЛЕ става в голяма степен по характерния контур на „надводната част на айсберга“ и някои (макар и нарастващи по брой) признаци на „подводната“. Това ясно се наблюдава в развитието на класификационните критерии на болестта. Известен факт е, че същите са „класификационни“, а не „диагностични“, т.е. разработени са за целите на стандартизирането при научно-практическите изследвания, а не за да служат като формални изисквания със задължителен характер при диагноза [4]. Самите колективи при разработването им подчертават, че в практиката диагнозата СЛЕ може да бъде поставена и без те да са формално покрити. Въпреки това всеки клиницист постоянно ги използва, за да изгражда и коригира в себе си правилната представа за същността на болестта.

Първите класификационни критерии са на Американския колеж по ревматология (ACR), създадени през 1972 г. и ревизирани през 1982 и 1997 г. При тях са налице 11 клинични и параклинични критерия и един имунологичен, като за покриването им е необходимо да са покрити поне 4, независимо кои (табл. 1). През 2012 г. Международната група на сътрудничество на клиниките по СЛЕ (SLICC) ревизира отново критериите, прибавяйки алоpeciaта към клиничните и диверсифицирайки неврологичните критерии, дотогава включващи само психозата и припадъците. Може би най-значимата промяна е, че се поставя изискване поне един от четирите задължителни критерия да е измежду имунологичните, които също са претърпели диверсификация. Това е отражение на задълбочаващите се познания за патогенезата на болестта и ясното припознаване на същностния характер на имунологичните промени. Въпреки това, при последващо валидиране на SLICC 2012 върху група от 690 болни, се оказва, че макар и да имат по-голяма чувствителност спрямо ACR 1997 (97% спрямо 83%), те имат по-малка специфичност (84% спрямо 96%) [4]. Коментира се също така, че тази критерии не са достатъчно чувствителни за детекция на ранен СЛЕ.

Табл. 1. Развитие на класификационните критерии за СЛЕ.

При последните две класификации различните симптоми имат относителна тежест, изразена в точкуване (непоказано на таблицата) и съответно диагнозата се поставя при събиране на определен брой точки за разлика от предходните критерии, при които е необходимо събиране на определен брой критерии.

критерий	ACR 1971	ACR 1982	ACR 1997	SLICC 2012	ACR/EULAR 2019
					Фебрилитет
Маларен еритем Дискоиден обрив	Маларен еритем Дискоиден обрив	Маларен еритем Дискоиден обрив	Маларен еритем Дискоиден обрив	Остър кожен еритем Хроничен кожен еритем	Остър кожен еритем Подостър кожен лупус <i>или</i> дискоиден лупус
Феномен на Рейно	Феномен на Рейно				
Алопеция	Алопеция			Алопеция без белези	Алопеция без белези
Фоточувствителност (ФЧ)	ФЧ	ФЧ	ФЧ		
Орални или носни улцерации	Орални или носни улцерации	Орални или носни улцерации	Орални или носни улцерации	Орални или носни улцерации	Орални улцерации
Артрит	Артрит без деформации	Неерозивен артрит в поне две периферни стави	Неерозивен артрит в поне две периферни стави	Синовит на поне две стави <i>или</i> болка в поне две стави с 30 мин. сутр. скованост	Синовит на поне две стави <i>или</i> болка в поне две стави с 30 мин. сутр. скованост
Серозит	а) плеврит б) перикардит	а) плеврит б) перикардит	а) плеврит б) перикардит	а) плеврит б) перикардит	а) преврален или перикарден излив б) остър перикардит

Бъбречни промени	а) протеинурия б) клетъчни цилиндри	а) протеинурия б) клетъчни цилиндри	а) протеинурия б) клетъчни цилиндри	а) протеинурия б) еритроцитни цилиндри	а) протеинурия б) клас II или V лупусен нефрит в) клас III или IV лупусен нефрит
Неврологични промени	а) психоза б) конвулсии	а) психоза б) припадъци	а) психоза б) припадъци	а) психоза б) припадъци в) множествен мононеврит г) миелит д) периферна или черепномозъчна невропатия е) остро състояние на обърканост (делир)	а) делир б) психоза в) припадъци
Хематологични промени	а) хемолитична анемия б) левкопения в) тромбоцитопения	а) хемолитична анемия б) левкопения в) тромбоцитопения г) лимфопения	а) хемолитична анемия б) левкопения в) тромбоцитопения г) лимфопения	а) хемолитична анемия б) левкопения в) тромбоцитопения г) лимфопения	а) хемолитична анемия б) левкопения в) тромбоцитопения

Имунологични промени	<p>а) LE клетки</p> <p>б) фалшиво пол. Wassermann тест</p>	<p>а) LE клетки</p> <p>б) фалшиво пол. Wassermann тест</p> <p>в) anti-DNA</p> <p>г) anti-Sm</p>	<p>а) фалшиво пол. Wassermann тест</p> <p>б) anti-DNA</p> <p>в) anti-Sm</p> <p>г) АФС</p> <p>д) лупусен антикоагулант</p>	<p>а) anti-DNA</p> <p>б) anti-Sm</p> <p>в) АФС- лупусен антикоагулант - фалшиво пол. плазма реагинов тест - поне средни ACL антитела - anti-beta2-GPI</p> <p>г) нисък комплемент (C3, C4, CH50)</p> <p>д) пол. тест на Coombs без хемолитична анемия</p>	<p>а) anti-DNA или anti-Sm</p> <p>б) ACL антитела или anti-beta2-GPI или лупусен антикоагулант</p> <p>в) нисък комплемент C3 или C4 C3 и C4</p>
Антинуклеарни антитела (АНА)	положителни АНА	положителни АНА	положителни АНА	положителни АНА	положителни АНА

През 2019 г. са публикувани актуални класификационни критерии за СЛЕ, плод на сътрудничество между Американския колеж по ревматология (ACR) и Европейската лига срещу ревматизма (EULAR). Върху разработването им работят широк кръг от специалисти от различни центрове, а методиката на генерирането им е много задълбочена и минава през четири етапа [5]. Първият е генериране на брой потенциални критерии и провеждане на системен обзор с мета-анализ с цел проверка на хипотезата, че АНА следва да бъде задължителен входящ критерий. В рамките на този етап, с цел търсене на признаци на ранно заболяване, набраните кандидат-критерии са консултирани и с група пациенти, които са ги разгледали с особено внимание към най-ранните си оплаквания от година преди и година след поставяне на диагнозата. Триста тридесет и девет пациента с ранен СЛЕ докладват за кожно-лигавични симптоми в ранния етап, също както и умора, ставни болки и фебрилитет [6]. Така фебрилитетът, умората и артралгиите са „приети“ като кандидат-критерии, преминаващи към следващият етап за прецизиране. На втория етап събраните критерии са редуцирани от работна група чрез сравняването им с кохорта болни с ранен СЛЕ и са събрани в групи (кълъстери), така че да се брои само един от групата. Третият етап се състои във формулиране на определения на критериите чрез сравнение с данни от литературен обзор и оценка на тяхната относителна тежест чрез т. нар. *multiple-criteria decision analysis*. Това е дял на математическия анализ, използван за комплексна преценка на множество критерии, двойки от които си противостоят по отношение на крайния избор, напр. цена-трайност на даден продукт и т.н. Така се стига до 7 клинични и 3 имунологични групи критерии, като от всяка група следва да се взема предвид само показателят с най-голяма относителна тежест. Също така, в определенията заляга принципът, че даден симптом или параклинична промяна се приема за критерий, само ако липсва друго, несвързано със СЛЕ, по-вероятно обяснение за него (табл. 2). Четвъртият етап се състои в прецизиране на определенията на отделните критерии и валидирането на окончателно подбраните такива. За целта е обследвана кохорта от 2271 пациента, повече от половината от които със СЛЕ, подбрана чрез тройна експертиза по отношение на диагнозата. Така прецизирането на определенията на отделните критерии става чрез проверяването на досегашните им дефиниции в т. нар. производна кохорта (*derivation cohort*), извадка от горната, с 501 СЛЕ и 500 не-СЛЕ случая. Чрез това тестване например се оказва, че досегашното определение за ставно ангажиране „артрит на 2 или повече стави“ следва да се замени със „синовит на поне две стави *или* болка в поне две стави

с 30 мин. сутрешна скованост“, което има по-големи специфичност и чувствителност. Валидирането става чрез изпробване на подбраните критерии в т. нар. валидационна кохорта – останалите от общата кохорта след изваждане на производната, т.е. общо 1270 случая – 696 със СЛЕ и 574 контроли. Получените резултати са 96% чувствителност и 93,4% специфичност на новите критерии, подобри спрямо тези на ACR 97 и SLICC 12. Така се формират 7 клинични и 3 имунологични групи критерии с различна относителна тежест, с пол. АНА като необходим входящ критерии и необходим общ брой точки 10.

Както бе споменато по-горе, при изготвянето на последните критерии за СЛЕ се провежда изследване за най-ранните симптоми сред кохорта от 339 болни в Германия [6]. Изследването се осъществява чрез въпросник, изпратен пощата на 2498 пациента, участващи в немската организация на СЛЕ пациенти; 339 попълват и изпращат обратно резултати. Въпросникът се състои от въпроси с възможни отговори „да/не“ относно типични органни прояви, формулирани описателно и нетерминологично, напр. „посиняване/побеляване на пръстите“ за Рейно и т.н.; относно наличие на АНА и специфични антители; оставена е и възможност за докладване в свободен текст на непредложени симптоми. Пациентите са приканени да отбележат наличието на всеки симптом в три периода - година преди диагнозата, по време на диагнозата и по времето на попълване на въпросника, средно 17 години след диагнозата. Като цяло видът и честотата на докладваните симптоми съвпада с литературните данни. Правят впечатление два факта. Първо, има две групи симптоми – едните персистират със сходна честота в хода на заболяването, а вторите значително намаляват. Между първите са умората, фоточувствителността, синдромът на Рейно, а вторите са предимно възпалителни симптоми, които логично намаляват с лечението – ставни и мускулни болки, кожни обриви, фебрилитет, алоpecia и други. От тях най-маркантен е спадът във времето на фебрилитета (от ок. 52% преди или по време на диагнозата до около 14% по време на въпросника), следван от кожните обриви (от 72 на 45%), ставните болки (от 87 на 71%), миалгиите (от 77 на 69%), алоpecia и други. Второ, макар и в малък процент (ок. 5%), в отворената част на въпросника, болните съобщават за гастроинтестинални оплаквания (диария и коремна болка) – симптоми, които като цяло липсват в литературата. Така, в резултат на описаното проучване, фебрилитетът става част от критериите за СЛЕ. Като слабост на тезата за фебрилитета авторите посочват факта, че в проучването липсва ясна дефиниция и метод на регистрирането му – единствено съобщаването му от болните. Все пак

с приблизително същия процент честота фебрилитетът е описан и в проучване на EuroLupus кохортата [7].

В обобщение, при разглеждане еволюцията на диагностичните критерии за СЛЕ правят впечатление два факта. Първо, нарастването на относителния дял на имунологичните критерии и прецизирането им в три групи – АНА (anti-dsDNA и anti-Sm), антифосфолипидни антитела и комплемент. Както бе казано по-горе, това отразява задълбочаването на познанията ни за патогенезата на болестта. Към тази точка следва да включим и нещо много важно – наличието на положителни АНА по ИИФ в титър над 1:80 е изведено като абсолютно задължителен входящ критерий, т.е. при липсата на АНА не може да се говори за СЛЕ. Обратната страна на този „медал“ е, че в последните критерии няма изискване за наличие на задължителен друг имунологичен критерий, т.е. АНА плюс клинични критерии, събиращи над 10 точки, са достатъчни. Второ, от клинична гледна точка, включването на фебрилитета в критериите, трайното отпадане на фото-чувствителността и възвръщането на алоpecia, както и появата и голямата относителна тежест на биопсично доказан лупусен нефрит. Фебрилитетът единствен от групата с ранни симптоми (заедно с умората и артралгиите) преминава през експертното обсъждане от фаза I във фаза II. Това показва фокусирането върху ранните, макар и неспецифични, симптоми на болестта. Без съмнение отграничаването на даден симптом, който е достатъчно неспецифичен сам по себе си, като възможна същностна характеристика, е много трудна задача. Тъкмо затова окончателната преценка за диагнозата на конкретния пациент е комплексна и е оставена на клинициста, но заедно с указанието, че даден признак може да се приема за критерий, само ако липсва друго по-вероятно медицинско обяснение за него.

Табл. 2. Класификационни критерии за СЛЕ на ACR/EULAR от 2019 г.

<p>входящ критерий антинуклеарни антитела (АНА) в титър $\geq 1:80$ на HEp-2 клетки или еквивалентен пол. тест, когато и да било</p>	
<p>↓</p>	
<p>при неизпълнен входящ критерий, не се класифицира като СЛЕ при изпълнен входящ критерий, да се приложат допълнителните критерии</p>	
<p>↓</p>	
<p>допълнителни критерии да не се взимат предвид при налично по-вероятно от СЛЕ медицинско обяснение дори еднократна проява на дадения критерий е достатъчна за класифициране като СЛЕ е необходимо наличие на поне един клиничен критерий и общ сбор от ≥ 10 точки не е необходимо критериите да са налични по едно и също време от всяка група критерии се взема само този с най-високия брой точки</p>	
<p>клинични групи критерии отн. тежест</p>	<p>имунологични групи критерии отн.тежест</p>
<p>конституционални фебрилитет ..2</p>	<p>антифосфолипидни антитела ACL антитела или anti-beta2-GPI или лупусен антикоагулант 2</p>
<p>хематологични левкопения 3 тромбоцитопения 4 автоимунна хемолиза 4</p>	<p>протеини на комплемента нисък C3 или C4 3 ниски C3 и C4 4</p>
<p>невропсихиатрични делир 2 психоза 3 припадъци 5</p>	<p>специфични за СЛЕ антитела anti-dsDNA или anti-Sm 6</p>
<p>кожно-лигавични алопеция без белези 2 орални улцерации 2 подостър кожен или дискоиден лупус 4 остър кожен лупус 6</p>	
<p>серозни плеврален или перикарден излив 5 остър перикардит 6</p>	
<p>опорно-двигателни ставни прояви 6</p>	
<p>бъбречни протеинурия $> 0,5$ г/24 ч. 4 лупусен нефрит клас II или V 8 лупусен нефрит клас III или IV 10</p>	
<p>↓</p>	
<p>класифицира се като СЛЕ, ако общият брой точки е ≥ 10 и ако входящият критерий е покрит</p>	

Табл. 3. Определения на класификационните критерии за СЛЕ на ACR/EULAR от 2019 г.

Критерий	Определение
Антинуклеарни антитела (АНА)	АНА в титър $\geq 1:80$ на HEp клетки или еквивалентен тест поне веднъж. Силно се препоръчва ИИФ изследване на HEp кл. или твърдофазов метод за детекция на АНА еквивалентен по надеждност
Фебрилитет	Температура $> 38,3$ C
Левкопения	Левкоцити $< 4,000/\text{mm}^3$
Тромбоцитопения	Тромбоцити $< 100,000/\text{mm}^3$
Автоимунна хемолiza	Данни за хемолiza, напр. ретикулоцитоза, нисък хаптоглобин, повишен индиректен билирубин, повишена ЛДХ и положителен Кумбс (директен антиглобулинов) тест
Делир	Характеризира се с: 1) промяна в съзнанието или възбудимостта с намалена способност за концентриране; 2) развитие на проявите в рамките от няколко часа до 2 дни; 3) флукутация на проявите в хода на деня; 4) а) остра/подостра промяна в познавателните способности/когницията (напр. паметов дефицит или дезориентираност), или б) промяна в поведението, настроението или афекта (напр. неспокойствие, обръщане на цикъла сън/будност)
Припадъци	Първично генерализирани или парциални пристъпи
Алопеция без белези	Алопеция без белези, констатирана от лекар*
Устни улцерации	Устни улцерации, констатирани от лекар*
Подостър кожен или дискоиден лупус	Подостър кожен лупус, констатиран от лекар*: Ануларни или папуло-сквамозни (псориазиформени) лезии, обикновено разположени по слънцеизложени области При осъществена биопсия, следва да са налице типични промени (вакуолен дерматит на дермо-епидермалната граница с периваскуларни лимфо-хистиоцитарни инфилтрати, често с наличен муцин дермално) или Дискоиден лупус, констатиран от лекар* Еритемо-виолетови кожни лезии с вторично атрофично цикатризиране, диспигментация, често с фоликуларна хиперкератоза/запушване (по скалпа), водещо до алопеция с белези по скалпа При осъществена биопсия, следва да са налице типични промени (вакуолен дерматит на дермо-епидермалната граница с лимфо-хистиоцитарни

	инфилтрати периваскуларно и/или около придатъците; по скалпа често се наблюдават кератинови запушалки във фоликулите; при давностни лезии може да се открият и муцинови отлагания)
Остър кожен лупус	Маларен еритем или генерализиран макуло-папулозен еритем, констатиран от лекар* При осъществена биопсия, следва да са налице типични промени (вакуолен дерматит на дермо-епидермалната граница с периваскуларни лимфо-хистиоцитарни инфилтрати, често с наличен муцин дермално; рано в хода на развитието може да се наблюдава неутрофилен инфилтрат периваскуларно)
Плеврален или перикарден излив	Образни данни (УЗ, рентген, КТ, ЯМР) за плеврален или перикарден излив или и двата
Остър перикардит	≥ 2 от следните: 1) перикардиална гръдна болка (най-често остра, влошаваща се при вдишване и облекчаваща се при навеждане напред), 2) перикардно триене, 3) ЕКГ с новопоявили се дифузни ST-елевации или PR-депресии, 4) новопоявил се или влошаващ се перикарден излив (от УЗ, рентген, КТ, ЯМР)
Ставно ангажиране	Или 1) синовит на две или повече стави с оток или излив, или 2) болка в две или повече стави с поне 30 мин. сутрешна скованост
Протеинурия	Протеинурия > 0,5 г/24 ч. или еквивалент в отношението протеин/креатинин в урината
Лупусен нефрит клас II или V по класификацията на ISN/RPS 2003	Клас II: Мезангиален пролиферативен лупусен нефрит Изцяло мезангиален хиперцелуларитет която и да е степен или разширение на мезангиалния матрикс на светлинна микроскопия с мезангиални имунни депозити. До няколко изолирани депозита могат да се регистрират субендотелно или субепително с електронна микроскопия, но не и със светлинна. Клас V: Мембранозен лупусен нефрит Дифузно или сегментно субепителни имунни депозити или морфологични последици от тях на светлинна микроскопия или чрез имунофлуоресценция, или на електронна микроскопия, с или без мезангиални промени
Лупусен нефрит клас III или IV по класификацията на ISN/RPS 2003	Клас III : Огнищен лупусен нефрит Активен или неактивен огнищен, сегментен или глобален едно- или екстракапилярен гломерулонефрит, ангажиращ < 50%от всички гломерули, най-често със субендотелни имунни депозити, с или без мезангиални промени.

	<p>Клас IV: Дифузен лупусен нефрит</p> <p>Активен или неактивен дифузен, сегментен или глобален ендо-или екстракапилярен гломерулонефрит, ангажиращ $\geq 50\%$ от гломерулите, най-често с дифузни субендотелни депозити, с или без мезангиални промени. Този клас включва и случаи с дифузни т.нар. wire-loop отлагания**, но с малко или без гломерулна пролиферация.</p>
Положителни антифосфолипидни антитела	Антикардиолипинови антитела (IgA, IgG и IgM) в средни или високи титри (> 40 APL, GPL или MPL, или > 99 . перцентил) или положителни anti- $\beta 2$ GPI антитела (IgA, IgG и IgM) или положителен лупусен антикоагулант.
Нисък C₃ или C₄	C ₃ или C ₄ под долната граница на нормата
Ниски C₃ и C₄	C ₃ и C ₄ под долната граница на нормата
Anti-dsDNA или anti-Sm антитела	Anti-dsDNA антитела положителни по метод с доказана $> 90\%$ специфичност за СЛЕ спрямо релевантни контроли или anti-Sm антитела

* вкл. по представен снимков материал;

** wire-loop отлагания – вследствие масивни имунни субендотелни отлагания понякога капилярите изглеждат ацелуларни и се оцветяват в червено; тези промени се наричат wire-loop, тъй като приличат на телени бримки.

УЗИ – ултразвуково изследване; КТ – компютърен томограф;

ЯМР – ядреномагнитен резонанс

2.2. СЛЕ – епидемиология и рискови фактори

СЛЕ се числи към редките заболявания. Според различни проучвания, заболеваемостта в САЩ (считана за от една от най-високите) варира от 5,5 до 23,5 на 100 хил., а болестността – между 73 и 143 на 100 хил. [8, 9, 10, 11]. В различните държави в Европа заболеваемостта се движи в рамките между 1.0 и 4,9 на 100 хил. души, а болестността – между 22,2 и 97 на 100 хил. [12]. В световен мащаб липсват значими разлики и ясна закономерност на разпределение на заболеваемостта и болестността в посока север-юг или изток-запад [13]. Определено разпространението е по-голямо сред жителите с неевропейски произход в САЩ и Великобритания, особено у чернокожите жени, сред които също така има по-ранно начало, по-бързо натрупване на болестни увреди и честотата на лупусния нефрит е значително по-голяма [14, 15]. За съжаление в нашата страна липсват проучвания за честотата, както и регистър на болните със СЛЕ. По отношение на половото разпределение, СЛЕ е значително по-чест у жените, като пропорцията варира от 2:1 в предпубертетна и менопаузална възраст до 12:1 в детеродната.

Рискови фактори (РФ) за развитието на СЛЕ. Освен полът, расовата принадлежност и възрастта (начало на болестта най-често между 15 и 45 години), се открояват няколко други външни РФ.

Хормонални и репродуктивни фактори. Предвид липсата на друго обяснение на половото разпределение, хормоналният профил на болните е обект на изследвания от години. У жени със СЛЕ нивата на тестостерон и дехидроепиандростерон са значимо по-ниски в сравнение със здрави, а тези на естрадиол и пролактин – значимо по-високи [16]. Липсват обаче доказателства за посоката на причинната връзка. По данни от кохорта от близо 240 хил. предимно бели жени, проследявани в хода на 22 години, се установява еднозначно, че приемът на орални контрацептиви, както и постменопаузалната хормонална заместителна терапия корелира с повишен риск за заболяемост от СЛЕ [17]. Резултатите от описаното проучване, заедно с тези от друго мащабно такова от Великобритания, дават основание за се подозира, че наскоро започната хормонална терапия може да има остър ефект върху малка група предразположени към СЛЕ жени [18].

Тютюнопушене. Няколко епидемиологични проучвания, както и метаанализ посочват, че настоящото (актуалното) тютюнопушене, за разлика от тютюнопушенето в миналото, е свързано с повишен риск от заболяване от СЛЕ [19].

Витамин Д. По-ниски нива на витамин Д се наблюдават у болни със СЛЕ, без да е ясно дали са причина или следствие от болестта. Понижена концентрация на витамина се установява и при болни от СЛЕ преди и след поставянето на диагнозата [20, 21], но в проспективно проучване приемът на витамина и на други антиоксиданти не се асоциира с намален риск от заболяване [22].

Инфекция с вируса на Epstein-Barr (EBV). Причините за допускането, че EBV може да играе етиологична или поне ключова патогенетична роля по отношение на СЛЕ са много. На първо място това са клиничните данни за случаи на инфекциозна мононуклеоза, предхождаща началото на лупуса [23]. Второ, честотата на серопозитивност за EBV е значително по-голяма у възрастни и деца със СЛЕ в сравнение с тази у съответни по възраст здрави контроли [24, 25]. Налични са и данни от проучвания, че болни със СЛЕ са по-често носители на EBV и имат повишен вирусен товар в кръвта в сравнение със здрави [26, 27]. Освен това е доказано, че части от Sm-антигена, един от най-типичните за СЛЕ, са твърде близки по структура на протеина Epstein-Bar nuclear antigen 1 (EBNA-1), което би могло да е основа за молекулярна мимикрия с последваща кръстосана

реактивност. Зайци, имунизирани с EBNA-1, развиват anti-Sm антитела [28]. Въпреки всичко това, до момента липсват проучвания, еднозначно статистически доказващи връзка между EBV инфекция и последващ СЛЕ. Напротив, мащабно датско проучване от 2010 г. не намира връзка между наличие на антитела срещу EBV, прекарана инфекциозна мононуклеоза, вкл. тежка такава, от една страна, и риск от развитие на СЛЕ, от друга [29]. Нещо повече, данните от проучването показват, че серологично негативните са с по-голяма вероятност за развитие на СЛЕ в рамките на 1 до 4 години след изследването за EBV; това обаче се обсъжда като резултат от факта, че в началните фази на болестта, предвид неясната симптоматика, болните често се изследват за EBV. Предвид че данните от това проучване изглеждат „обезкуражаващи“ по отношение на хипотезата за връзката между EBV и СЛЕ, е важно да се има предвид, че в нейна полза стоят още множество факти. Преди всичко, имунологичните основания са многостранни. Известно е, че вирусът инфектира В-клетките и често предизвиква временна антиялопродукция у здрави, а при лупусно болни е причина за поликлонална дисрегулация на В-клетките [30, 31, 32, 33]. Счита се, че често инфекцията е причина за развитие и на други автоимунни заболявания. Натрупват се данни за молекулярна мимикрия на anti-EBNA-1 антигена и с Ro60 антигена, който е един от първите, които се появяват в субклиничната фаза на СЛЕ [34]. Също така вирусът произвежда протеини, влияещи на апоптозата, както и протеин с активност подобна на тази на IL-10, важен регулаторен цитокин [30, 31]. Имунологичният отговор на СЛЕ болните спрямо EBV се различава от този у здрави [35, 36, 37, 38]. Много от тези данни се потвърждават в животински модели. От друга страна, както бе отбелязано, данните за налична инфекция у болните със СЛЕ са категорични – почти 100% са серологично положителни, а у здравите процентът е ок. 70 при почти всички проучвания. Предвид, че вирусът е с убиквитерно разпространение и персистира в В-клетките, всичко описано насочва към разбирането, че инфекцията с него не е самостоятелен етиологичен фактор, но по-скоро би могла да играе ролята на тригер на заболяването у предварително имунологично компрометирани индивиди.

През 2014 г. Суото и сътр. публикуват данни за асоциация между серопозитивността по отношение на EBV и наличието на повишени АНА у здрави [39]. Изследвани са 92 души с налични АНА-ИИФ над 1:160 и/или anti-dsDNA и/или ЕНА за IgM и IgG срещу VCA, EBNA-1 и EA антигените на EBV. Контролна група са 150 здрави кръводарителя, негативни по АНА. Установява се значимо

по-висока честота на IgG серопозитивността по VCA и EA при АНА-позитивните, вкл. тези с налични ЕНА. Освен това, субгрупата с налични ЕНА показва значимо по-висока серопозитивност по EBNA-1, антигенът с предполагаема молекулна мимикрия с anti-Ro60. Допълнително, IgM серопозитивните по VCA се асоциират с много високите АНА титри. Другите пък, които са с данни за прясна инфекция или реактивация, IgM/IgG серопозитивните по VCA, които са негативни по EBNA-1, се срещат по-често у АНА-позитивните, отколкото у АНА-негативните. Авторите обсъждат резултатите като насочващи към връзка между прясната инфекция или реактивация и формирането на АНА. В друго проучване, много издържано от методологична гледна точка, се демонстрира, че при болни с Ходжкинов лимфом завишаването на anti-VCA IgG се асоциира с реактивация на вируса [40].

През 2017 г. Vista и сътр. публикуват проучване на селорогични маркери за четирите херпес вируса (HSV-1, HSV-2, CMV и EBV) и връзката им със специфични АНА сред 233 болни от СЛЕ, 563 РПС и 221 неродствени здрави контроли от филипинската популация [41]. Трябва да се има предвид, че сред тази популация болестността от СЛЕ е по-голяма – около 19,9 на 100 хил. спрямо ок. 5,9/100 хил. след белите. Установява се, че серопозитивността по срещу EBV-VCA, CMV, HSV-1 и HSV-2 е по-голяма у болните със СЛЕ спрямо здравите (РПС и неродственици), но количествено разликата не е голяма. Такава е тя за anti-EBV-EA, считан за маркер за реактивация на вируса – от порядъка на 90% спрямо около 50% в другите две групи. също така, нивата на тези антитела корелират и с наличието на автоантитела срещу dsDNA, Chromatin, Sm, Sm/RNP и RNP A.

Други. Обсъждат се също така професионална експозиция на кварц (за което изглежда има убедителни доказателства) [42, 43, 44, 45], различни ваксинации и др.

2.3. СЛЕ – имунопатогенеза

Понастоящем, както е добре известно, се счита, че за развитието на СЛЕ е необходимо съчетание на генетично предразположение с отключващи фактори на средата (вж по-горе). Генетичното предразположение е многокомпонентно – участват няколко гена, кодиращи протеини на имунния отговор (HLA, няколко протеина от IFN тип I пътя и други от естествената защита, както и такива регулиращи придобития имунитет); с по-малко значение са множеството асоциирани със СЛЕ полиморфизми; много рядко се касае за мутация на един силно пенетрантен много „значим“ ген [46, 47]. Върху този терен факторите на средата най-вероятно са причина за разгръщане на патологична имунна активация

със следните предполагаеми механизми: клетъчна смърт с модифициране и екстернализиране на собствени антигени, епигенетични промени, благоприятстващи Т-клетъчната автореактивност, молекулярна мимикрия, В-клетъчна активация и др. Така имунологичните дефекти у болните с лупус засягат почти всички нива на системата и в своята съвкупност са причина за болестта.

Промени във вродения имунитет. Все повече *in vitro* и *in vivo* данни подкрепят тезата за централното значение на тип I интерфероните в патогенезата на заболяването. За това свидетелстват корелации на генетични полиморфизми с промени в интерфероновия път у болни със СЛЕ. Тип I IFN се активират от множество външни и вътрешни стимули – антители комплекси с нуклеинови киселини, оксигенирани нуклеинови киселини генерирани от екстрацелуларните неутрофилни мрежи (NETs) или УВ светлина, вирусopodobни секвенции от генома и др. [48, 49, 50]. Така дисрегулираните тип I IFNs могат да доведат до редица патологични промени: увредено антигенно представяне, засилен процес на превключване на имуноглобулиновия клас, промени в В-клетъчната активация и модулиране на Т-клетъчната пролиферация и др. Тип I IFNs също така директно влияят на тъканите и функцията на „местните“ клетки [51, 52, 53]. Множество други цитокини също участват в патогенезата на СЛЕ. В-лимфоцитния стимулатор (BLys) и индуциращият пролиферация лиганд (a proliferation inducing ligand, APRIL) играят съществена роля в преживяемостта на В-клетките и корелират с активността на болестта. Интерлевкин 6, ключов реагент за синтез на острофазови белтъци и активиране на В-клетките, също стои във връзка с активността на СЛЕ. Интерлевкини 17, 21 и 22 са също мощни провъзпалителни цитокини и повишените им ниво стоят във връзка с по-висока активност и бъбречно засягане [54]. Интерлевкин 10 представлява интерес, тъй като има както проинфламаторна, така и регулаторна функция. Той инхибира Т-клетките и АПК, но стимулира В-клетъчната пролиферация, превключването на имуноглобулиновия клас и антиялопродукцията [55]. Както ще стане ясно по-долу, IL 10 има известна предиктивна функция по отношение развитие на СЛЕ. Противоречива е и ролята на TNF, защото anti-TNF молекулите могат да доведат до автоимунитет от една страна, но могат да имат и протективен ефект при бъбречно и други органи засяганя [54, 55].

Неутрофили и неутрофилни извънклетъчни мрежи. У болни със СЛЕ се откриват особен вид неутрофили, наречени нископлътностни (LDGs, low density

granulocytes), които синтезират повече проинфламаторни цитокини, вкл. тип I IFNs, а също така и увреждат ендотелните клетки. Освен това LDGs в по-голяма степен продуцират т.н. неутрофилни извънклетъчни мрежи (NETs, neutrophil extracellular traps). NETs представляват генерирани от неутрофилите мрежи, съставени от техния собствен хроматин, в които при нормални условия екстрацелуларните патогени биват механично задържани и впоследствие унищожени от грануларните пептиди. Така програмираната клетъчна смърт на тези неутрофили се нарича нетоза. Счита се, че у предразположените индивиди, екстернализирания генетичен материал в лицето на NETs става имуногенен. Освен това, в хода на формирането на NETs ДНК бива оксигенирана, което от своя страна е причина за генериране на тип I IFNs. Опсонизирани NETs също така активират ендозомните тол-лайк рецептори (TLRs, toll-like receptors) в плазмацитоидните дендритни клетки (pDC, plasmacytoid dendritic cells), което отново води до синтеза на тип I IFNs. Значителна част от болните имат и нарушени механизми на почистване на NETs, което увеличава полуживота на модифицираните антигени и съответно повишава имуностимулационната им роля [48, 51, 52, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62].

Антиген-представящи клетки. В нормални условия антиген-представящите клетки (АПК) почистват образувалите се автоантигени, без да възбуждат възпаление или имунен отговор. Обичайно това се извършва от определен вид АПК – дендритните клетки, по-точно от незрелите такива (iDCs, immature dendritic cells). При СЛЕ този процес е нарушен – дендритните материи биват в по-голяма степен фагоцитирани и представени на лимфоцитите, което инициира имунен отговор. В този процес особено място заемат DCs и особено един техен подклас – плазмацитоидните DCs (pDCs). Активирането на pDCs става в голяма степен чрез TLR – група трансмембранни рецепторни протеини, които в обичайни условия разпознават частици на външни агенти. Както бе отбелязано по-горе, pDCs синтезират големи количества тип I IFNs, а и активират В-клетките, но без да активират регулаторните В-клетки [63]. Налице са също и данни, че и макрофагите реагират „проинфламаторно“ [60].

Промени в придобития (адаптивен) имунитет. В-клетки. В-клетъчната свръхактивност с образуването на разнообразни антитела се среща при почти всички болни с лупус [64]. Автоантителата при болните са обикновено във висок титър, с висок афинитет, от клас IgG. Те се продуцират обикновено от клетки, претърпели трайно превключване на синтеза на имуноглобулиновия клас

чрез генна рекомбинация и соматична хипермутация, което насочва към концепцията, че в това могат да участват и Т-клетки [64]. Описани са множество механизми на дисрегулация у В-клетките. Наблюдава се променена цитокинова секреция, оказваща влияние върху Т-клетъчните пътища и модифицираща активността на DCs. При активност на болестта намаляват наивните В-клетки за сметка на увеличаване циркулиращите CD27+ клетки, плазмобластите и плазмоцитите [65]. Налице са също така множество дисфункции на В-регулаторните клетки (Bregs) [66, 67, 68, 69], намалява се елиминирането или неутрализирането на автореактивните В-клетки [70] и др. Някои от тези девиации корелират с генетични полиморфизми, налични у болни със СЛЕ. Накратко, В-клетките и плазматичните клетки имат централна роля в патогенезата на СЛЕ предимно по два механизма. Първо, те продуцират автоантитела с деструктивно действие върху тъканите и второ, В-клетките действат като АПК, представяйки автоантигени на Т-клетките като по този начин затварят един порочен патогенетичен кръг [71].

Т-клетки и регулация на имунния отговор. Различни външни и вътрешни фактори променят значително фенотипа и функцията на Т-клетките у лупусно болните. Преди всичко, значително е намален активационният праг на Т-клетките, което води до нарушена функция на Т-хелперите и на Т-регулаторните клетки (Tregs) и на начина, по който те реагират на информацията от АПК [72, 73]. Описани са по-високи нива на костимулационни молекули при лупусните Т-клетки, което вероятно засилва активацията на В-клетки и DCs. Т-клетките също така продуцират недостатъчно количество IL 2, което води до намалената апоптоза и следователно удължен полуживот на автореактивните Т-клетки. Така Т-клетките при СЛЕ са свръхактивни в едни от своите функции, докато в други проявяват недостатъчност [72, 73]. Наблюдават се също така повишени количества на т. нар. двойно негативни Т-клетки (DN, double negative) – CD4 и CD8 отрицателни, които синтезират IL 17 и могат да стимулират антиялопродукцията от В-клетките отделяйки IL 4 и IL10 [74]. Установена е също така повишена способност на Т-клетките да се свързват с рецептори по ендотела, което има дава възможност да мигрират в отговор на цитокини и вероятно по този начин да допринасят за тъканните увреди [75]. Важна роля в дисрегулацията на Т-клетките играят и епигенетичните промени в лицето най-вече на метилирането. Метилирането е механизъм за генна супресия; медикаменти, свързани с медикаментозно предизвикания лупус (DRLE, drug related SLE) препятстват метилирането и така

предизвикват признаци на автореактивност в Т-клетките. Това се потвърждава и в миши модели [76, 77, 78, 79]. Описани са и други конкретни механизми, на които тук няма да се спираме. Най-общо, при болни със СЛЕ, вследствие на абнормни сигнали или епигенетични промени, прагът на активиране на Т-клетките е намален и провъзпалителната им активност увеличена, което накланя Т-клетъчно-регулираната част от имунитета към автореактивност и възпаление, а функциите на Т-ефекторните клетки за засилени.

2.4. Антинуклеарни антитела – генериране

Антинуклеарните антитела са хетерогенна група автоантитела (ААт), част от група антитела (Ат) насочени срещу интрацелуларни антигени. Най-честите нуклеарни структури таргети на хуморален имунен отговор при СЛЕ могат да бъдат dsDNA, ssDNA, Nuc, хистони, DFS-70, Ro60, Ro52, La, Ku, U1RNP, Sm, PCNA. Иммунната дисрегулация при СЛЕ води до загуба на периферен толеранс към собствени структури, което от своя страна е причина за патологична автореактивност, която пък води до образуване на АНА. Относно имуноглобулиновата специфичност на АНА при системен лупус, АНА могат да бъдат представени от Ат от класовете IgM, IgA и IgG, но най-значими в патогенетично, клинично и диагностично отношение са ААт, принадлежащи към имуноглобулиновия клас IgG [80]. Освен това редица проучвания демонстрират наличието на белези на соматични хипермутации, като прояви на афинитетно узряване [81]. Процесите на изотипово превключване на класа на ААт, както и проявите на афинитетно узряване в съгласие с концепцията за свързано разпознаване (linked recognition) нееднозначно демонстрират съгласуваното взаимодействие между автореактивни Т и В имунни клетки в механизмите на АНА-образуването [82]. Интрацелуларните антигени сред които и нуклеарните структури са с вътреклетъчно разположение, като за да станат „видими“ за имунокомпетентните клетки, необходимо условие е те да бъдат екстернализирани. В нормални условия екстернализирането на интрацелуларни антигени (ЕИА), нормално е следствие на процесите на апоптотична или некротична клетъчна смърт, като ЕИА биват фагоцитирани в условията на „имунологична тишина“, при което не се инициира ефекторен имунен отговор, а се индуцира имунен толеранс. Вследствие на придобити или вродени нарушения на механизми на различни нива (дефекти в апоптозата, дефекти в механизмите на изчистване и опсонизация, както и при ексцесивна клетъчна смърт, напр. при инфекциозни или

неопластични заболявания, прием на някои медикаменти) ЕИА могат да станат обект на хуморалния имунитет и да предизвикат образуване на ААт. Това може да стане, съгласно принципа на трисигналния модел, когато ЕИА биват представени от професионални антиген представящи клетки (АПК) в контекста на костимулационни молекули (В7) и проинфламаторна цитокинова среда и биват разпознати от автореактивни Т-лимфоцити, които от своя страна комуникират с автореактивни В-клетки, диференциращи се в плазматични и секретирани АНА. Факторите, благоприятстващи този процес са всички форми на дисрегулация, водещи до забавено очистване на апоптотични или некротични материи, към което се прибавя и високата имуногенност на нуклеарните антигени (dsDNA, Nuc, хистони, HSP60, HMGB1 и др.). Последните, посредством активацията на механизми от вродения имуноен отговор (напр. Toll-like рецептори, TLR), водят до усиление на синтеза на проинфламаторни цитокини, като интерферон-алфа (IFN- α), интерлевкини 6 и 12 (IL-6 и IL-12), тумор-некротичен фактор алфа (TNF- α) и други [83, 84]. Продукцията на IFN- α се свързва с потискане на регулаторните Т-хелперни лимфоцити, с увеличена секреция на BAFF (B-cell activating factor), активиране на NK клетките и продукцията на IFN- γ и засилване (upregulation) на транскрипцията на IFN-свързаните гени (известно в литературата като интерферонова сигнатура) [85, 86]. Редица проучвания потвърждават ролята на гореизложения механизъм и причисляват СЛЕ към заболяванията с повишена интерферонова сигнатура, като по литературни нивата на IFN- α са по-високи в серума на болни от СЛЕ спрямо здрави контроли [125]. Допълнителен механизъм е т.нар. процес на вторична некроза, който може допълнително да увеличи имуногенността на екстернализираните ядрени комплекси. Разпознаването им от макрофаги и плазмацитонидни дендритни клетки води до продукцията на В-клетъчния просървайвъл цитокин BLys [87, 83]. Увеличената секреция на BLys има мощен ефект върху В-лимфоцитите, като предпазва от клонална анергия или антиген-медирана клетъчна смърт на незрелите, междинните и зрелите В-клетки. BLys е мощен стимул за оцеляването на автореактивни В-клетки, необходими за секрецията на АНА и повишените му нива - основен механизъм, благоприятстващ пречупването на В-клетъчния толеранс в периферията [87, 83, 58]. Автореактивните В-клетки, разпознали своя автоантиген (хистони, dsDNA, рибонуклеопротеинови комплекси и др.) след интернализирането му посредством BCR (В-клетъчен рецептор) медирана ендоцитоза, получават допълнителен сигнал от ендозомално разположените TLR-3 (TRIF, IRF3) и TLR-7,8, 9 (MyD88,

IRF5, IRF7). Така те увеличават способността си за антигенна представяне, но и същевременно засилват мембранно разположения CD95 и други про-апоптотични молекули и стават податливи на апоптоза по CD95-зависим механизъм и/или цитокинова деплеция. В-лимфоцитите могат обаче да получат допълнителен трети сигнал, който да ги запази от апоптоза. Това става под влияние на Т-клетки посредством CD40L/CD40 пътя и при подходяща цитокинова среда или BAFF, взаимодействащ с BAFF-R (BR-3) или TACI, имащо за последица активацията на NF-kb (Nuclear Factor kappa beta) и MEK (Mitogen-activated protein Extracellular signal-related Kinase) пътищата [88]. Оцелелите автореактивни В-клетки могат на следващ етап да поемат по пътя на диференциация в краткоживеещи антитяло-продуциращи плазмобласти, или антитяло-продуциращи дългоживеещи плазматични клетки или паметови клетки. Ефективността при СЛЕ на новите терапевтични подходи, като например моноклоналния препарат Белимумаб, насочен към блокиране на биологичното действие на BLys са нееднозначно доказателство за централната етиопатогенетична роля на BLys сигналния път при СЛЕ.

2.5 Методи за установяване на АНА. Типове светения на АНА; стандартизиране по ICAP.

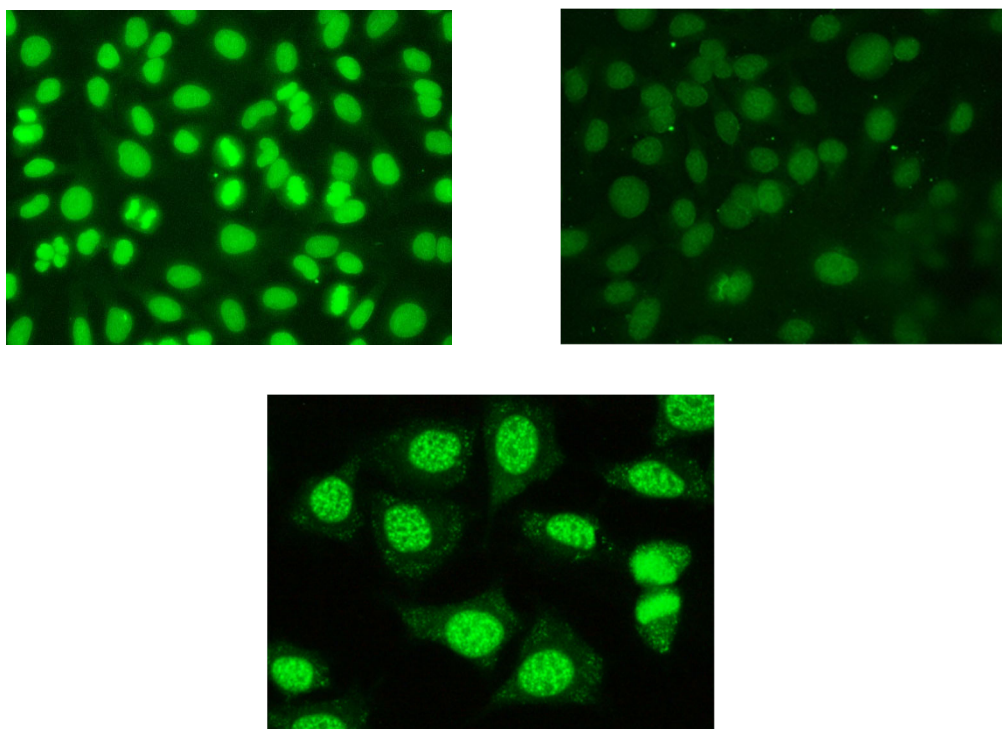
Наличието на антинуклеарни антитела при голяма част от пациентите със системни автоимунни заболявания води до разработването на различни методи за тяхното установяване. Един от най-широко използваните скринингови методи за установяване на АНА е индиректната имунофлуоресценция (ИИФ) на HEp-2 клетки. По своята същност методът представлява полагане на изследвания серум върху клетъчна линия от човешки епителиомни клетки (*Human Epithelioma type 2*, HEp-2). При наличие на антинуклеарни антитела в изследвания серум, те се залавят за съответните структури на HEp-2 клетките – ядра, нуклеоли, центромери и т.н. Веднъж заловени те биват конюгирани с антитела, натоварени с флуоресцентно вещество, което позволява визуализация на това върху кои структури са заловени автоантителата – оттук и наименованието индиректна имунофлуоресценция. Така степента на разреждане на изследвания серум показва титъра на антителата в него – на колкото по-голямо разреждане се визуализират светещи структури (1:80, 1:160, 1:320 и т.н.), толкова по-голям е титърът на автоантителата в изследвания серум.

Високата чувствителност и специфичност на този метод го определят като златен стандарт за установяване на АНА, като той влиза в критериите на ACR (American College of Rheumatology), EULAR (European League Against Rheumatism) и SLICC (Systemic Lupus International Collaborating Clinics) за диагностициране на множество автоимунни заболявания, в това число СЛЕ, системна склероза, синдром на Съогрен, смесена съединителнотъканна болест и др. [89, 90]. Освен установяването на автоантителата в серуми на пациенти и определяне на концентрацията им чрез титриране, при залавянето на автоантителата към различни структури се формират различни имунофлуоресцентни образи. Тези образи в немалка степен корелират със специфичните антинуклеарни антитела и съответстващите им патологични състояния. Поради тази причина всеки отделен образ е описан и класифициран в Международния консенсус за типовете АНА светене (International Consensus of ANA Patterns, ICAP) чрез буквено-цифров код в така нареченото „класификационно дърво“. Според класификацията на ICAP чрез ИИФ на HEp-2 клетки могат да се установят 30 типа светения, всеки от които има свой специфичен код – AC (alphanumeric code) от 0 до 29. Всеки специфичен образ насочва към определено автоантитяло или група автоантитела, което/които са насочени към антигени с еднакво или близко разположение в клетката [90, 91].

Както вече беше споменато, при пациентите със СЛЕ се установяват АНА насочени най-често срещу антигените dsDNA, ssDNA, Nucleosomes, histones, U1-RNP, Sm, SS-A (Ro60), SS-B (La) и Ku. Всеки тип от тези антитела формират специфичен образ при изследване чрез ИИФ на HEp-2 клетки. Така например автоантителата срещу dsDNA, считани за най-важен критерий за диагностициране на системен лупус еритематодес, се характеризират с тип светене AC-1 или ядрено хомогенно светене (Фиг. 1А). Антителата насочени срещу ssDNA, Nucleosomes и histones също се визуализират като AC-1. Автоантителата насочени срещу SS-A (Ro60), SS-B (La) и Ku се наблюдават като AC-4 (ядрено фино петнисто светене, фиг. 1Б). Трябва да се има предвид обаче, че този образ може да отговаря и на други автоантитела, свързани с други автоимунни заболявания. Така например автоантителата срещу Mi-2 α/β и TIF1 α/γ (transcription intermediary factor 1) също се визуализират като AC-4, но са диагностичен и прогностичен маркер за дерматомиозит. Групата антитела, насочени срещу U1-RNP и Sm се характеризират с тип светене AC-5 (ядрено едро петнисто светене, фиг. 1В). Подобно на AC-4 и при AC-5 се наблюдават и антитела насочени срещу други

антигени. Такива са антителата срещу RNAP-III, които се откриват при пациенти със системна склероза [89, 90, 92].

Така определянето на типа ИИФ светене по ICAP е основен скринингов метод за СЛЕ, системни заболявания на съединителната тъкан и други аутоимунни заболявания преди всичко поради своята чувствителност, възможност за количествена оценка и в немалка степен специфичност.



Фиг. 1. Най-чести ИИФ светения при СЛЕ; А – АС-1, ядрено хомогенно светене; Б – АС-4, ядрено фино петнисто светене; АС-5, ядрено едро петнисто светене (от снимки на Лаборатория по Клинична имунология към УМБАЛ И. Рилски, София).

2.6. АНА и имунологични промени в предклиничната фаза на СЛЕ

В хода на изследванията през годините става ясно, че АНА не само се асоциират с различни органни увреди при СЛЕ и са негова диагностична „емблема“, но на практика присъстват в серумите на болните до няколко години преди клиничната изява. Това се доказва в няколко проучвания [93, 94], но най-централното между тях е това на Arbuckle и сътр. [15]. Серумите на 130 пациента, бивши военни с доказана диагноза СЛЕ, са предоставени от US Department of Defense serum repository (DoDSR), взимани и съхранявани всяка година по време на военната служба (когато лицата са били здрави). Изследването установява, че при 115 пациента (88%) е имало АНА в повишени титри в безсимптомния период. АНА в тесен смисъл, установени чрез имунофлуоресценция на HEp-2

клетъчен субстрат, имат 78% от положителните лица, като за *cutoff* е приета стойността > 1:120. Предиктивни антитела срещу dsDNA показват 55% от лицата, anti-Ro60 – 47%, anti-La – 34%, anti-Sm - 32% и anti-RNP – 26%. Средно за всички антитела времето между безсимптомния период с наличие на автоантитела и поставянето на диагнозата е 3,3 години (варира от 1 до 9), като за anti-dsDNA този период намалява средно на 2,2 години, а за anti-Sm и anti-RNP антителата е 1,2 години. Така се установява и характерен профил с „ранни“ и „късни“ антитела, най-типично – anti-Ro60 и anti-La се позитивират рано, а anti-Sm са като че предвестник за началото на болестта, появявайки се по-малко от година преди първите симптоми и малко над година преди диагнозата. Друга характерна особеност е нарастването на броя автоантитела с „наближаване“ на болестта. По същите данни – пациенти и серумна банка (DoDSR), през 2007 г. Heinlen и сътр. установяват, че 104 от изследваните 130 са били с поне един наличен клиничен критерии по ACR преди диагнозата [95].

Последващи проучвания се задълбочават в имунологичните промени в предклиничната фаза на СЛЕ [96, 97, 98, 99]. Установява се, че в 55 серума от DoDSR нивата на свързаните с тип II интерфероновия (IFN) път разтворими медиатори нарастват с наближаване на клиничното развитие на болестта. Друго проучване пък показва, че след позитивирането на АНА и преди разгръщането на СЛЕ се повишава активността на IFN- α , а при 20% от изследваните тази активност е повишена дори преди повече от 4 години преди диагнозата. Така патогенезата на ранния СЛЕ включва дисрегулация на тип II IFN път, което засилва автоантитялопродукцията, а повишаването на IFN- α става почти непосредствено преди диагнозата.

В друго проучване Lu и сътр. изследват 84 серума на „бъдещи болни“ отново от DoDSR и ги сравняват с 85 такива на здрави, съответстващи по пол, възраст и раса контроли [100]. Изследвани са специфични лупусни антитела и цитокини в четири периода: над 3,5 г. преди диагнозата, между 3,5 и 0,9 г. преди, от 0,9 преди до 0,1 след диагнозата, и след 0,1 г. след диагнозата. Четири са основните резултата от изследването. Първо, над 3,5 години преди СЛЕ е налице дисрегулация на проинфламаторните цитокини, както от вродения, така и от придобития имунен отговор; от друга страна, нивото на трансформиращия растежен фактор – бета (transforming growth factor β , TGF- β), основен регулаторен цитокин, са значително по-ниски през цялото време в сравнение с тези у контроли. Второ, с времето

се увеличава броя дисрегулирани проинфламаторни цитокини от двата вида, а с приближаване на диагнозата особено ясно това се вижда у TNF суперфамилията: TNFR1, TNFR2, BlyS, и APRIL. Нивата на TGF- β остават стабилно ниски и не търпят съществена промяна. Трето, повята на специфични АНА логично се предшества от нарастване на дисрегулираните цитокини от специфичната защита, по-специално IFN- γ , IL-4, IL-5 и IL-6. Отново се потвърждава, че anti-Ro60 е най-ранното ААт, появяващо се в серума преди диагноза, последвано от ААт срещу RNP, chromatin, Sm, dsDNA и La/SSB. Четвърто, установява се, че най-голяма позитивна предиктивна стойност има комбинацията от АНА-позитивност и проинфламаторни цитокини, различни за четирите описани предклинични периода. Само наличието на АНА има далеч по-ниска такава, ок. 50%. Положителна предиктивна стойност за целия предклиничен период според това проучване, в комбинация с АНА, имат IL-5, IL-6 и MIG (монокин, индуциран от IFN- γ).

Така описаните проучвания ясно показват, че променени нива на имунни медиатори, завишени проинфламаторни и понижени регулаторни, заедно с наличие на АНА, предшестват болестта и могат да допринесат за идентифициране на рисковите за развитие на СЛЕ индивиди.

2.7 Фамилност и генетичен модел при СЛЕ

Понастоящем СЛЕ се счита за полигенно обусловено заболяване и като такова показва тенденция към фамилна агрегация. Най-мощното изследване за фамилна агрегация (ФА, λ) на СЛЕ е проведено в Латинска Америка в рамките на GLADEL кохортата. През 1997 GLADEL (Grupo Latinoamericano de Estudio del Lupus Eritematoso), съставена от 34 центъра в 9 латиноамерикански страни, създава представителна кохорта на болните от СЛЕ в региона [101]. Интервюирани със стандартизиран въпросник са 1177 от всички 1214 пациента относно наличие у техните роднини на СЛЕ, РА и други аутоимунни заболявания (АИЗ), а посочените болни роднини са интервюирани лично, разгледана е медицинската им документация, при необходимост някои са прегледани. ФА е изчислена по формулата $\lambda = K_{\text{роднина}}/K$, където $K_{\text{роднина}}$ е болестността у роднини, а K е общата болестност. Поради липса на данни за болестността от СЛЕ в Латинска Америка, болестността у роднините на изследваните е сравнена с най-високата докладвана по света болестност (у Афроамериканци, 0,005), както и с усреднена такава между най-високата и най-ниската (в Арктическа Норвегия, 0,0005 – 0,001).

От 1177 пациента, 166 имат поне един роднина с АИЗ, общо 238 болни роднини, от които 116 със СЛЕ, 79 с РА, 23 с автоимунен тиреоидит, единични с други АИЗ. Четиридесет и двама от пациентите със СЛЕ са с повече от един роднина с АИЗ. Така, сравнено със съответно най-високата и с усреднената болестност от СЛЕ, ФА (λ) за сиблинги възлиза на 5,8 и 29,0 за СЛЕ и 3,2 – 5,3 за РА, а за АИЗ общо – около 1,5 (табл. 4). Това на практика означава, че вероятността роднина първа степен на болен със СЛЕ да развие СЛЕ е между 10 и 50 пъти по-голяма в сравнение с вероятността индивид от общата популация да развие заболяването.

Табл. 4. Болестност на различните по степен роднини от кохортата GLADEL и сравнение с общата болестност по региони

	Болестност, %
Роднини на болни със СЛЕ	
първа степен	
родители/поколение	2,7
сиблинги (братя, сестри)	2,9
втора степен (лели, чичовци, племенници)	1,95
трета степен (братовчеди)	1,1
Популации	
Европейска	0,010 – 0,080
Афрокарибска	0,11 – 0,25
Афроамериканска	0,35

От получените данни, на база различната болестност у различните по степен роднини, по формулата на Risch (*Bergsteinsdottir et al., 2000*), е определен типа унаследяване: $\lambda_{\text{братовчед}} = \frac{1}{4}(\lambda_{\text{потомство}} + 3)$. На база на изчисленията се приема, че унаследяването на СЛЕ съответства на полигенния адитивен модел на унаследяване, а не на мултипликативния. Освен това, авторите на изследването сравняват пациентите, които имат болни роднини, с тези, които нямат. Оказва се, че вероятността даден пациент със СЛЕ да има роднина със СЛЕ не зависи от тежестта на болестта му (измервана със SLEDAI и SLICC/ACR DI), но нараства, ако болният има аваскуларна некроза (АВН), по-високо социално-икономическо равнище или ако е метис (вариантен регресионен анализ). Чрез йерархичен лог-линеен анализ авторите установяват, че за наличие на роднина със СЛЕ най-голямо значение имат АВН, високото социално-икономическо равнище и висока доза

преднизон в хода на лечението. Обсъжда се корелацията с по-високото социално равнище (и съотв. по-високата степен на образование) да е налице по методологични причини – по-високо образование пациенти в по-голяма степен могат да дадат ясни сведения за своите роднини и/или да оценят значението както на проучването, така и на факти от живота на роднините им.

Описаното проучване еднозначно доказва наличието на фамилна агрегация на АИЗ при СЛЕ – в най-голяма степен за СЛЕ, в по-малка за РА и др. АИЗ, показва най-вероятния генетичен модел на унаследяване на болестта и показва някои фактори, повишаващи ФА. Авторите обсъждат, че наблюдаваният феномен може да се дължи или на носителство в дадените фамилии на ген/и, които повишават склонността към развитие на АИЗ изобщо, или на ген/и, свързани с развитието на конкретните заболявания.

2.8. Разпространение на АНА сред общата популация

През 2006 г. в Далас, Тексас, САЩ Amy E. Wandstrat и сътр. провеждат изследване на АНА и ЕНА сред три групи – болни със СЛЕ и непълен лупус еритематодес (НЛЕ), роднини първа степен на същите и голяма кохорта хора (над 3000), популационна извадка за изследване на сърдечно-съдови заболявания, със значим дял на афроамериканци и латино [102]. Целта на проучването е да сравни количеството и профила на автоантитела от целия спектър на лупусното заболяване (от разгърнатия СЛЕ, през НЛЕ до РПС на болните) със същите у общата популация. Болните са общо 176, вкл. 32 РПС и 28 здрави контроли; „сърдечно-съдовата“ кохорта наброява 3470 души. Изследванията се правят по метода ELISA, като по отношение на титъра на АНА се провеждат няколко контролни изследвания по ИИФ (HEp) към местната лаборатория, като 10 EU по ELISA се равнява приблизително на 1:20 по ИИФ, 20 EU = 1:40 и т.н. В групата болни (СЛЕ и НЛЕ) АНА са подчертано завишени, значително по-малко е количеството у РПС и контролите. От специфичните антитела у СЛЕ болните превалят anti-dsDNA, anti-SSA, anti-SSB, anti-Sm и anti-RNP, у НЛЕ - anti-SSA, anti-SSB и anti-RNP; така тези срещу dsDNA, Sm и хроматин се срещат почти изключително у СЛЕ болните. В статията не са подадени данни за специфичните Ат у РПС. В голямата група АНА със стойност 20 EU (т.е. титър ок. 1:40) се наблюдава у 971 души, т.е. 27,12%, а в количество > 118 EU, т.е. над две стандартни отклонения от средната стойност в групата, се среща у 90 души, т.е. ок. 2,5%. По-високи са стойностите у жени, афроамериканци и латино; също така по-високите

стойности на АНА се срещат у по-млади индивиди. Серумите на тези с АНА > 65 ЕУ, т.е. над едно стандартно отклонение от средната стойност в групата (171 души, ок. 5%), са изследвани за ЕНА (но не и за anti-dsDNA поради липса на достатъчно серум). Едно или повече от ЕНА налични в групата болни (СЛЕ и НЛЕ) са установени у 59 души (т.е. 1,7% от цялата група), като не са установени корелации с пол или възраст, с изкл. на anti-SSA, което се среща по-често у жени, афроамериканци и латино. Авторите подчертават, че по отношение наличието на АНА в общата популация, резултатите им поразяващо хармонират с изследвания от различни части на света предвид расовите и ентически различия в проявата на СЛЕ и предполагат, че това насочва към широко разпространени генетични характеристики и фактори на околната среда, предразполагащи към автореактивност. По отношение на наличието на АНА в по-високи титри в ок. 5% от общата популация като (1) възможно дължащо се на друго АИЗ (напр. автоимунен тиреоидит), (2) възможно предклинично състояние на колагеноза, особено за тези 1,7%, които са носители на ЕНА, които вероятно са в състояние на повишена автореактивност, „нуждаеща се“ от експресията на допълнителни гени, за да се развие в заболяване.

През 2012 г. Satoh и сътр. публикуват популационно проучване на АНА сред серумите на 4,754 души от национално здравно изследване (National Health and Nutrition Examination Survey, NHANES, 1999–2004 г.) [103]. Изследват се АНА чрез ИИФ на HEp-2 клетки в титър 1:80, определят се основните типове светене (преди ICAP) и се изследват специфични ААт по метода на имунопреципитация при АНА положителните. Резултатите са разпределени по възраст и пол, раса, но още и по индекс на телесната маса, употреба на алкохол, тютюнопушене и нива на С-реактивния протеин в серума. Установяват се АНА в титър 1:80 при 13,9%, при жени и мъже съответно 17,8 и 9,6%. Установява се увеличаване на честотата на АНА с възрастта, но нелинейно, с пик в декадата 50 – 59-годишна възраст. Противно на очакваното, АНА са по-малко у хората с обезитет; липсва и сигнификантна асоциация с нивата на CRP, употребата на алкохол и пушенето, както и с икономическия статус или образованието. От специфичните ААт се anti-Ro се установяват в 3,9%, а anti-Su в 2,4%. Като ограничение авторите отбелязват едномоментния характер на изследването и възможността установените АНА да са преходни, както и това, че по метода имунопреципитация някои специфични ААт могат да останат недетектирани.

През 2019 г. Li и сътр. публикуват проучване на АНА сред над 25 хиляди здрави от града Баодин, областта Хъбей в североизточен Китай [104]. Изключващи критерии са състояния, водещи до образуване на АНА – автоимунно възпалително заболяване, хронична инфекция и т.н. При *cutoff* титър 1:100 по ИИФ метод, положителни са 14,01% като жените са два пъти повече от мъжете, а с титър над 1:320 са 5.93% със същото междуполово съотношение. Последната група е изследвана и за 15 специфични ААт, като са установени налични анти-Ro52 при 212 души, АМА-M2 – при 189 и anti-Ro60 – при 144. Разпределението при тези ААт отново е с превес на женския пол. Положителните по анти-Ro60 са изследвани за промени в кръвната картина, за нива на общ IgG и RF, както и за нива на С3 и С4 фракциите на комплемента, като са установени сигнификантни различия спрямо негативните по това анти тяло контроли. В статията не са описани конкретни стойности и промени на тези показатели. Изследователите също така изследват и АМА-M2 позитивните, като намират сигнификантна разлика по отношение на техните чердондробни показатели (най-вече алкалната фосфатаза, АФ) и доказват наличие на първична билиарна цироза при 34,7% от тази група. При изследваните с наличие на анти-Ro52 не се описват други промени. В обобщение, представеното проучване, предвид своята мащабност, еднозначно демонстрира наличието на повишени АНА сред общата популация – както по отношение на общите АНА по ИИФ, така и по отношение на отделни специфични ААт. Като оставим настрана диагностицираните с ПБЦ и параклиничните промени при положителните по anti-Ro60, авторите не предлагат обяснение за наличието на тези антитела след клинично здравите.

Изключително интересни са резултатите на публикуваното през 2020 г. от Slight-Webb и сътр. проучване на имунологичния профил на здравите АНА-позитивни индивиди [105]. След скриниране на 790 здрави хора за 11 специфични АНА, 57 (7%) се оказват позитивни. Изследвани са антитела срещу dsDNA, chromatin, ribosomal P, Ro/SSA, La/SSB, Sm, Sm/RNP, RNP, Scl-70, Jo-1, CENT-B и при наличие дори на едно от тях индивидът е приет за АНА-позитивен. Измежду позитивните, 31 американци от европейски произход са сравнени със съответстващи им по демографски характеристики пациенти със СЛЕ и АНА-негативни здрави. Серумите са изследвани за над 50 цитокина (от неспецифичната и специфичната защита), сравнени са както броя на подтиповете лимфоцити чрез имунофенотипизиране, така и активността на всички ангажирани клетки, в частност нивата на STAT-киназите след стимулиране с интерферон-алфа

чрез фосфоспецифична флоуцитометрия. Първото, което се установява е, че женският пол е единственият значим предиктор за АНА-позитивност, а възрастта, расата и индекса на телесната маса нямат отношение. Второ, болшинството от проинфламаторните цитокини, вкл. IFN- γ , TNF, IL-17 и гранулоцитния колония-стимулиращ фактор (G-CSF) се повишават постепенно с преминаване от АНА-негативните през АНА-позитивните до болните със СЛЕ. Но IFN- α , IFN- β , IL-12p40 и SCF/c-Kit ligand („високо течение на цитокиновата/клетъчна река“) са завишени единствено у болните. Интересно е, че В-лимфоцитния стимулатор (BLyS) е повишен у пациентите със СЛЕ, но е с пониски нива у АНА-позитивните здрави. Също така интерлевкин-1 рецепторния антагонист (IL-1Ra), имунорегулаторен цитокин, е с понижена концентрация у болните. Трето, по отношение на клетките и тяхната активност, у АНА-позитивните се установяват повишени нива на моноцити, паметови В-клетки и плазмобласти, а нивата на pSTAT-3 pSTAT-5 след стимулация в IFN- α са повисоки в сравнение с АНА-негативните. От резултатите на проучването следват няколко факта. Преди всичко, може да се заключи, че наличието на АНА корелира с характерен имунологичен профил, свързан с повишена автореактивност. Тук е важно да се отбележи, че за АНА-позитивни проучването приема индивиди с наличие на Ат срещу поне един от горепосочените специфични антигени, а не такива с наличие на ИИФ светене. В този смисъл, не е известно дали може изводите му механично да се прехвърлят върху АНА-позитивните по стандартния скринингов метод, т.е. ИИФ на Нер-клетки. Това е може би и единствения методологичен недостатък на изследването. Второ важно заключение е, че специфичният имунологичен профил на здравите носители на АНА прилича донякъде на този на болните от СЛЕ по стимулираните проинфламаторни цитокини, но също така твърде ясно се различава от него както по липсата на повишени нива на IFNs, BLyS, IL-12p40 и SCF/c-Kit ligand, така и по нормалните нива на регулаторния цитокин IL-1Ra, който е значително намален у лупусно болните. Известно е, че нормалната дейност на имунната система, т.е. справяне с инфекциозен агент без това да прерасне в автореактивност, е следствие от фин баланс между проинфламаторни и регулаторни фактори. Данните от описаното проучване насочват към разбирането, че лекостепенната автореактивност у АНА-позитивните здрави, вероятно се балансира от регулаторни механизми, изражение на които са повишеното отношение IL-1Ra/IL-1 β , нормалните нива на IFN-и тип 1, IL-12p40 и SCF/c-Kit ligand и понижените нива на BLyS. Всичко това може да бъде от изключително значение при проследяване във времето на рискови за развитие на СЛЕ лица.

2.9. АНА и имунологични промени у роднини на болни със СЛЕ

За пръв път през 1960 г. Pollak и сътр. изследват 51 лупусно болни и 50 роднини (не първа степен) за антинуклеарни „фактори“; контроли са 50 здрави и 49 болни от други заболявания [106]. Изследването е чрез имуофлуоресценция, върху ядра от клетки на букална лигавица, чрез флуоресциращи заешки anti-гама-глобулинови антитела. У 45 от болните „антинуклеарни фактори“ са налични при многократни разреждания (от 1:4 до 1:4096), а у роднините позитивни са 17 при разреждания 1:4 до 1:16 и още 7 при големи разреждания – до 1:4096; общо 24, т.е. 48%. У контролите процентите са 0 при здравите и 0,5 при болните от друго заболяване. Значително по-голям е процентът на положителните жени роднини в сравнение с мъжете (17:7). Независимо от качествената и количествената прецизността на метода, очевидно е, че „антинуклеарните фактори“ са налични и у роднините на болните. Основните проучвания на АНА и имунологични промени при роднини са обобщени в приложение 3, табл. 59.

Следват две проучвания, на които са достъпни единствено заглавията, от 1962 и 1972 г., първото на датски, със същия главен изследовател, които изследват антинуклеарни „фактори“ у роднини на болни със СЛЕ и вероятно също установяват наличието им в по-голяма степен у изследваните [107, 108].

Данни, насочващи към взаимодействие между генетични фактори и такива на средата в генезата на АНА и СЛЕ представя проучването на Raphael и сътр. от 1975 г. [109]. Изследването обхваща 28 лупусно болни и общо 124 членове на техните фамилии (вкл. неродственици и вкл. родственици втора степен). Серумите са изследвани за Ат срещу едно- и двойноверижна РНК (anti-sRNP anti-dsRNP) и срещу нативна ДНК (anti-nDNA) и лимфоцитотоксични антитела, след което са потърсени корелации между различните автоантитела, от една страна, и кръвната връзка или общото домакинство от друга. Процентът на anti-RNP у болните от СЛЕ е висок, те се установяват и в неголям, но значим процент от членовете на фамилиите, но в много малък процент у контролите. Anti-nDNA пък са налични у много от болните, но почти липсват и във фамилиите, и у контролите. Лимфоцитотоксичните антитела пък се откриват в 57% от болните и 68% от споделящите домакинството членове на семейството. У болните, наличието на лимфоцитотоксични антитела стои във връзка с наличието на anti-nDNA и anti-sRNP, но не и с това на anti-dsRNP; от друга страна, у членовете на домакинството, лимфоцитотоксичните антитела пък корелират с anti-dsRNP. А anti-RNP от своя

страна се откриват само у родствените членове на домакинството, а не у неродствените. Въпреки че понастоящем значението на лимфоцитотоксичните антитела, както и на anti-RNP при СЛЕ, е практически нулево, описаният експеримент може да се интерпретира като наличие на склонност към автоимунитет у родственици на болни от СЛЕ, който при общи външни фактори (авторите обсъждат общи прекарани вирусни инфекции в семейството) може да се изяви в поддържане на патологични автоантитела в серума; не у всички обаче това води до болест, необходими са (вероятно) и допълнителни имунни дисрегулации.

През 1985 г. Isenberg и сътр. установяват наличието на кръстосано реагиращи антитела в серумите на болни със СЛЕ, а по-късно ги установяват и в повишена концентрация в серума на здрави РПС на болните [110]. Кръстосано реагиращи антитела се наричат различни антитела със сходни епитопи; наричат се още споделени идиотипи. В описаното проучване споделеният на anti-dsDNA идиотип 16/16 се среща в 40% от пациентите и в ок. 24% от РПС спрямо едва 4% от контролите. Счита се, че наличието на такива антитела говори за генетично сродство – за гени, произхождащи от една клетъчна линия и разпространени в популацията. За отбелязване е, че при изследването не е установена корелация между различната концентрация на идиотип 16/16 и наличието на АНА-светене.

Интересно е проучването на Williams и Isenberg от 1996 г. [111]. Изследвани са 35 пациента, 33 роднини и 33 здрави контроли за наличие на IgM и IgG anti-ssDNA и anti-dsDNA по метода ELISA. Особеното е, че изследванията се правят както общо, така и при сепариране на IgG и IgM фракциите. Така anti-dsDNA и anti-евДНК се установяват у пациентите, а само anti-ssDNA се откриват също и у роднини, здрави контроли и у съпрузите на болните. След сепариране на IgG и IgM фракциите обаче прави впечатление, че anti-ssDNA се откриват дори в още по-високи титри у здравите. Авторите предлагат като възможно обяснение следното. Известен факт е, че често у здрави индивиди са налице IgM автоантитела с ниска специфичност и афинитет, които потенциално с развитието на разгърнат автоимунитет преминават в IgG такива с високи специфичност и афинитет. „Ранните“ IgM автоантитела обаче често не се изолират при изследване на цял (нефракциониран) серум, тъй като се счита, че anti-идиотипни IgG се свързват с тях и блокират тяхната активност. Това може да означава, че нормално у здрави е налице физиологична автореактивност, която при нормални условия е контролирана чрез захващане от анти-идиотипни антитела (IgG).

През 2001 г. С. Mohan и сътр. изследват болни и РПС за наличието на антитела (по ELISA) срещу dsDNA и такива срещу три вида комплекси от хистони и ДНК (т.е. антинуклеозомни антитела, anti-Nuc). Изследвани са 40 болни със 153 РПС, което дава възможност да се обхванат цели семейства [112]. У мишки, наличието на антинуклеозомни Ат и наличието на anti-dsDNA и стои във връзка със съответно гените Sle1 и комбинацията от Sle1 и Sle3; двата варианта също така имат различен фенотип – при наличие на anti-dsDNA често е налице ЛН, който иначе отсъства. Експериментът установява следното. Преди всичко, потвърждава се наличието на повишен титър на изследваните антитела у РПС спрямо здрави контроли – в проценти, вариращи от 7,8 до 18,3 спрямо 2,2 у здравите. Второ, потвърждава се корелацията на anti-dsDNA с ЛН, за разлика от при антинуклеозомните Ат. Трето, установява се, че най-често семействата (РПС) на болни с anti-dsDNA са АНА-позитивни, докато тези с антинуклеозомни Ат често са във семейства без АНА. На основание разглежданото проучване можем да направим две предположения: (I) че различните подтипове АНА стоят във връзка с различни гени или комбинации от гени и следователно имат различно унаследяване и (II) някои от подтиповете антитела са свързани в по-голяма степен с риск за наличие на АНА у РПС (anti-dsDNA ?), а други са „доброкачествени“ в това отношение (изолирани антинуклеозомни?).

Van der Linden и сътр. проверяват хипотезата дали антителата у пациенти и техните РПС са със една и съща специфичност като изследват 154 РПС на 50 пациента и 300 здрави контроли. Направени са изследвания на Ат срещу 14 вида нуклеарни антигени по ELISA. От пациентите 74% са позитивни, най-често срещу антигените SSA и хистоните, у РПС позитивни за 32%, а Ат са предимно срещу anti-RNP-C и anti-Scl; у контролите процентът е 1,5. Изказва се предположението, че у фамилията със СЛЕ е налице неспецифично нарушение в В-лимфоцитите [113].

В проучване, обхващащо почти 200 фамилии с 659 лупусно болни и 544 здрави роднини (но не само първа степен) Heinlen и сътр. изследват разпределението на anti-Ro и anti-nRNP [114]. След регресионен анализ се оказва, че корелация между наличието у болни и здрави роднини съществува само по отношение на anti-nRNP, но не и на anti-Ro; полът не е значим фактор. Това хармонира с проучванията върху еднояйчни близнаци, където anti-nRNP е налично и у двамата, за разлика от anti-Ro [115]. Авторите припомнят, че появата на изследваните антитела в субклиничния стадий на СЛЕ е различна по време, като

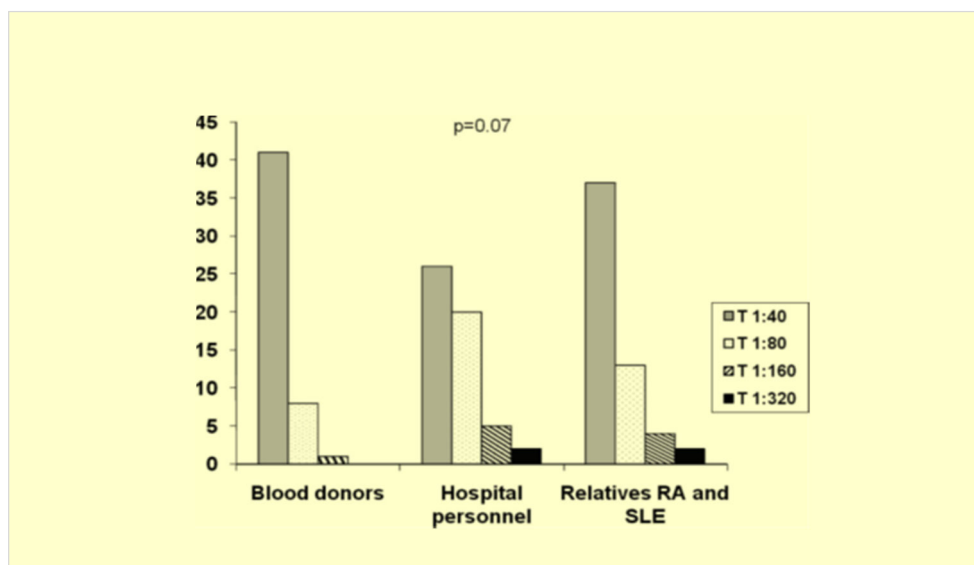
anti-nRNP се появяват почти непосредствено преди диагнозата, за разлика от anti-Ro, които могат да се намерят до 8 години преди това. Правят впечатление и факта, че у половината „здрави“ с anti-Ro се намират симптоми и се поставя диагноза синдром на Съогрен. Описаното проучване потвърждава по-голямата честота на АНА (макар и изследвана не чрез ИИФ) у роднини на болни и, от друга страна, затвърждава предположението, че различните специфични АНА се обуславят в различна степен от генетичната основа и факторите на средата.

През 2001 г. в Дания Laustrup и сътр. провеждат проучване на наличието на АНА у РПС и съпрузи на популационно ниво [116]. Представителността на извадката пациенти на популационно ниво се определя от това, че те са набрани по 4 независими начина, предимно от национални клинични и имунологични регистри, единият от които на болни със СЛЕ. Голям процент от всички РПС и съпрузи взимат участие – болните са 86, РПС – 226, съпрузите – 49; контроли са 100 кръводарителски серума. Изследването потвърждава тенденцията - от РПС при разреждане 1:160 са позитивни 23 (10%), при 1:80 – 55 (24%), а при 1:40 – 69 (31%). Сред съпрузите съответните стойности са 0, 2 (4%) и 5 (10%), а у здравите контроли - 5 (2,5%), 10 (5%) и 20 (10%). Тези данни насочват към разбирането, че фактори на средата, действащи на възрастният организъм не са от съществено значение, а водещ за АНА-позитивността е генетичният фактор. При клиничното изследване (осъществено чрез въпросници) се установява, че РПС са със значимо по-висок процент клинични оплаквания от всички групи спрямо съпрузите, което особено ясно е налице по отношение на исхемичната болест на сърцето. Липсва обаче статистическа връзка с наличието на АНА у РПС. Допълнително впечатление правят три факта. Първо, не се наблюдава фамилна агрегация на СЛЕ в разглежданите фамилии. Второ, у здравите контроли, повече жени отколкото мъже са АНА позитивни и при трите разреждания, напр. 5% спрямо <1% при 1:160 (каквата зависимост липсва у РПС). Трето, при болни с по-висок SLICC Damage Index (≥ 4) повече РПС са АНА позитивни при разреждане 1:80; такава тенденция е налице и при другите разреждания, но без да достига статистически значими стойности. Описаното проучване е показателно най-вече предвид представителността на извадката пациенти и голямата степен на обхващане на фамилиите им. Като недостатък може да се посочи контролната група, която може да се обсъди като недобре представяща общата популация предвид факта, че кръводарители обикновено са само хора до определена възраст и без заболявания.

Особено интересно е продължението на току-що описаното проучване в Дания. Почти същият авторски колектив проследява значителна част от началните участници след 12 години по същия метод – АНА-ИИФ на HEp клетки в разреждания 1:160, 1:80 и 1:40 [117]. От началните 226 участници 33 са починали, като на 29 от тях са разгледани медицинските документи, а от живите 143 се съгласяват да участват; контроли са 200 кръводарителя. Няма значима разлика между съгласилите се и отказалите да участват по отношение на пол, възраст или наличие на АНА. Към стандартния въпросник са добавени въпроси относно тютюнопушене, орална контрацепция (ОК) и хормонозаместителна терапия (ХЗТ). Резултатите са следните. От 9% (13 РПС) АНА-позитивните стават 24% (34), докато процентите на РПС с титър 1:80 и 1:40 намалява; чрез множествен регресионен анализ се установява, че наличието на АНА-позитивност при проследяването е в зависимост от АНА-позитивността в началото, без да е зависимо от възраст, пол или от което и да е оплакване от клиничния въпросник, както и от пушенето, ОК или ХЗТ. От участниците двама съобщават за развил се СЛЕ (единият от които АНА негативен), 6 – за „друго съединителнотъканно заболяване“, 6 – за появил се РА (освен 4 с РА още в началото); един от починалите е бил с диагноза полимиалгия ревматика, един с грануломатоза с полиангиит и един с ретроперитонеална фиброза. Авторите посочват, че описаните при проследяването диагнози са само докладвани от болните, но не са проверени. И така, обобщено резултатите от 12-годишното проследяване са, че (1) РПС на болни със СЛЕ са склонни към анти тялообразуване в сравнение със здрави контроли и (2) АНА-позитивните обикновено остават такива през годините; (3) у РПС се наблюдават ревматологични заболявания, вкл. СЛЕ и РА, в по-голяма степен в сравнение с общата популация. Авторите отчитат двете слабости на проучването – относително малкият брой изследвани РПС и разчитането само на докладване на диагнози от участниците при проследяването вместо клинична и параклинична проверка. Допълнително се отбелязва и генерално много ниската популационна честота на СЛЕ в Дания (заболеваемост 1 на 100 хил.) и липсата на фамилна агрегация на СЛЕ там. Коментира се недостатъчната предиктивна стойност на наличието на АНА по отношение на развитието на АИЗ, тъй като само 6 от 51 (12%) АНА-позитивни развиват АИЗ (СЛЕ, РА или „друго СЗСТ“) в сравнение с 8 от 92 (9%) от АНА-негативните в началото, които развиват АИЗ. Тук намираме за уместно да коментираме, че, съгласно данните от цитираното по-горе фундаментално проучване на Arbuckle и сътр., АНА се появяват най-рано

ок. 8-9 години преди клиничната изява на СЛЕ, т.е. 12-годишният период на настоящото изследване просто надвишава периода на „субклинични АНА“, което значи, че най-вероятно заболелите накрая „АНА-негативни в началото“ просто са станали АНА-позитивни по-късно. Друг важен статистически факт от настоящото проучване е, че тютюнопушенето не стои във връзка с антиядлообразуването или развитието на АИЗ.

През 2009 г. Marin и сътр. публикуват проучване, в което изследват АНА у 100 роднини първа степен на болни със СЛЕ и РА и ги сравняват с АНА у 104 кръводарителя и 100 души болничен персонал [118]. АНА се изследват имунофлуоресцентно, на HEp-2 клетки, в разреждания от 1:40 до 1:640. Половото разпределение на изследваните е на практика 1:1, а възрастовата медиана е 31,1 +/- 12,6 г., общо вариращи от 12 до 72 години. Така, общо сред трите групи флуоресценция се регистрира в 54,3%, от които в 35,4% е на разреждане 1:40, в 13,4 – на 1:80, в 3,2% - на 1:160, в 1,3% - на 1:320. По типове светенето е най-често петнисто в 50,3%, следвано от смесено петнисто с цитоплазмено (1,3 %), цитоплазмено (1%), хомогенно (0,7%) и накрая нуклеоларно в 0,5%. Изследователите сравняват и честотата на АНА светене по възрастови групи (20-30, 31-40 и т.н.) като не установяват значима разлика между тях. По отношение на разпределението на наличието на АНА сред трите групи изследвани, прави впечатление, че най-високи са титрите у групата на болничния персонал, следвана от роднините и накрая кръводарителите (в статията липсват точни цифри, подадена е само диаграма).



Фиг. 2. Разпределение на АНА сред трите изследвани групи, Marin et al., *Prevalence of Antinuclear Antibodies in 3 Groups of Healthy Individuals*, Journal of Clinical Rheumatology, 2009

Видът светене също показва различно в известна степен разпределение като лекарите са по-често с петнисто светене на 1:80; също така роднините на лупусно болните са по-често с петнисто светене на 1:40 и 1:80 спрямо тези на болните с РА. Показалите хомогенно светене (съответстващо сега на АС-1 по ICAP) – общо двама, са изследвани за anti-DNA по ELISA и са се оказали положителни – на единият е поставена диагноза СЛЕ, на другия – псориатичен артрит. И двамата са от медицинската група. Описаното проучване потвърждава факта за широкото разпространение на АНА в ниски титри сред популацията, с което показва необходимостта интерпретация на АНА да се осъществява от ревматолог. Още тогава авторите на проучването препоръчват за cut-off титър да бъде приет 1:160, особено при петнистото светене. Също така се потвърждава по-голямата честота на наличие на АНА в сигнификантни титри у РПС на болни със СЛЕ, а в случая и с РА. Впечатление прави повишената честота и сред болничен персонал – факт, който корелира с предходно проучване [119], установяващо anti-dsDNA с повишена честота у жени лаборантки. Като възможна интерпретация тогава е предложено предаване, чрез контакт с кръв на болните на агент, свързан с антиядлообразуване. Повишена концентрация на АНА се наблюдава и у други професионални групи, напр. работещи с пестициди, хербициди и разтворители [120, 44, 45].

Мащабно, комплексно и задълбочено е проучването на Benjamin F. Bruner и сътр., което изследва наличието на АНА (по ИИФ и 10 лупусни антители серологично) у над 1500 болни, 1127 роднини и 906 контроли [121]. Основната цел на проекта е да сравни скрининговия потенциал на микросферите (*bead-based*) тестове с традиционните ИИФ тестове. Заедно с това обаче авторите сравняват разпределението на антителата сред трите горепосочени групи, по расов признак, а също така търсят закономерности по отношение на фамилна агрегация на отделните антители. Така индивиди от трите групи, съответстващи си по пол и възраст, са сравнени по отношение на наличието и антителната специфичност. Последните са сравнени и по расови субгрупи (афроамериканци, такива от европейски произход, латино и др.). Чрез логистичен регресионен анализ, коригиран спрямо етнос/раса, е изследвана и фамилната агрегация на заболяването, както и възможно антително групиране; сравнени са пациентите от фамилии с единични случаи на заболяването с пациентите от фамилии с агрегация на няколко случаи. Резултатите са няколко; тук по-подробно ще опишем релевантните за темата на настоящия обзор. Първо, у афроамериканците се наблюдават по-често и по-голям брой АНА, независимо от това дали са болни, роднини или контроли.

Второ, определени специфични антитела се срещат по-често у тази група в сравнение с останалите и това са Ат срещу dsDNA, chromatin и други спрямо белите, а спрямо латино – срещу Sm, RNP/Sm и др. Трето, разпределението на Ат между трите групи. Авторите посочват, че 76% от болните, 28% от роднините и 12% от контролите имат поне по едно антинуклеарно антитяло; разбира се, наличието на всичките 10 изследвани лупусни Ат е несравнимо по-често у пациентите. Средният брой Ат у пациентите е 3,58, у роднините – 1,78, а у контролите – 1,29. От всички специфични АНА, тези срещу хроматина се срещат най-често както у болните (55,8%), така и сред техните роднини (12,4%). Роднините, сравнени с контролите, значимо по-често са носители на anti-dsDNA, anti-chromatin, anti-Ro52, anti-Ro60, anti-Sm, anti-RNP. Четвърто, оказва се, че различни специфични Ат преобладават у болните, които нямат болни роднини, а други у тези, които „не са сами“ във фамилията си. От изследваните болни около 54% са във фамилии с повече от един болен, 26% са „сами“, а за ок. 20% няма сигурни данни. Установява се, че сред „изолираните“ болни значимо преобладават anti-dsDNA (35%) и anti-chromatin (59%) в сравнение с тези от „множествените“ фамилии – съотв. 25% и 50%. От друга страна, след изследване на фамилната агрегация на специфичните антитела се установява, че у двойка болни братя и/или сестри се срещат по-често anti-рибозомни, anti-Sm/RNP и anti-Ro60, за разлика от болните, които нямат болни братя и сестри. Пето, след изследване за групиране на специфичните антитела (*hierarchical cluster analysis*) се оформят три подгрупи антитела – anti-Ro52, anti-Ro60 и anti-La; anti-Sm, anti-Sm/RNP, anti-nRNP A, anti-nRNP 68 и anti-хроматинови; anti-dsDNA и anti-ribosomal P. Всички тези три подгрупи са налични сред афроамериканците, докато сред тези от европейски произход и латино anti-хроматиновите антитела по-скоро се групират с anti-dsDNA и anti-ribosomal P.

Най-актуалното, мащабно и комплексно демографско, клинично и имунологично проучване е това на Munroe M. и сътр. [122]. Общо 409 роднини (не само първа степен) на лупусно болни с по-малко от 4 критерия по ACR, участващи в Lupus Family Registry and Repository (LFRR) са включени; в началото са взети серуми и са докладвани клинични данни; при проследяването изследваните попълват частта за СЛЕ от скрининговия въпросник за СЗСТ (CTDSQ) [123] и отново е взет серум. Изследвани АНА са anti-dsDNA (ИИФ), aCL, антитела срещу dsDNA, хроматин, Ro, La, Sm, RNP/Sm и RNP по ELISA, както и още 50 цитокина, хемокини от неспецифичната и специфична защита, както и молекули от TNF

суперфамилията. За целта, за да се отличат максимално точно предикторните фактори, са предложени два статистически метода: (1) всички развили СЛЕ се сравняват с всички неразвили, като се отчита корелацията по отношение фамилната принадлежност; (2) всеки отделен развил СЛЕ се сравнява с отделен неразвил, съответстващ му по възраст, раса, пол и АНА позитивност/негативност, за да се отличат предикторните фактори. От 409-те проследени, 45 (11%) стигат до разгръщане на диагноза СЛЕ в рамките на средно 6,4 г. Установява се, че развилите лупус още в началото на проследяването имат повече лупусни АНА, събират по голям брой точки от CTDSQ и покриват някои от ACR критериите за диагноза. Още в началото на проследяването същите имат повишени нива на възпалителни медиатори, вкл. BAFF (BLys), SCF и цитокини, асоциирани с IFN, както и по-ниски нива на регулаторни медиатори като TGF- β и IL-10. След статистическо моделиране се оказва обаче, че *независими* предиктори за разгръщане на СЛЕ у „здрави“ роднини са *само* следните: (1) наличието на клинични симптоми (т.е. висок брой точки от CTDSQ или брой критерии по ACR), (2) завишените нива на SCF и (3) понижени на TGF- β . Така положителната предиктивна стойност на комбинацията от клинични признаци, нива на SCF и TGF- β е 42%, а отрицателната – 92%. Освен горепосочените, изследването установява още няколко статистически зависимости (или липса на такива), които ще изброим накратко. Първо, повишените АНА, сами по себе си, не са независим предиктор на развитие на СЛЕ. Второ, типа роднинска връзка (родител, брат/сестра, дете или по-далечна) няма отношение към вероятността за развитие на болест. Трето, както бе посочено, както повишените нива на SCF и понижените на TGF- β , така и наличието на клинични симптоми се асоциират в значителна степен с преминаване към разгърнат лупус; нещо повече, променените нива на двата цитокина достигат значимост дори независимо от клиничните белези. При анализ не се установява корелация между това с кои клинични белези се комбинират имунните промени. Четвърто, въпреки че при стигналите до СЛЕ роднини са налице по-голям брой специфични антитела, не се установява взаимовръзка между титъра на АНА или броя видове специфични Ат и вероятността за болест. Пето, повишените нива на BLys, SCF и някои MCP, както и намалените на TGF- β , корелират (съответно позитивно или негативно) с броя клинични белези както при изходните изследвания, така и при проследяване. Също така роднините, които са развили заболяване, при изходните изследвания имат по-високи нива на BLys, както и на „движените“ от IFN цитокини MCP-1 и MCP-3. Въпреки това, обаче, нито BLys,

ните MCP-1 и MCP-3 не достигат сигнификантност като самостоятелен фактор в предикцията на бъдещ СЛЕ. По подобен начин, но с обратна зависимост, стоят нещата с регулаторния цитокин IL-10.

Като ограничения на изследването авторите посочват едномоментното проследяване, краткия отрязък от време, ретроспективния характер, и това, че изходното клинично оценяване се е осъществявало преди съставянето на SLICC критериите. Ние бихме могли да посочим като възможен недостатък наличието на клинични белези у изследваните роднини – авторите ги определят като такива с „по-малко от 4 критерия по ACR“, като едва 84 от всички 409 са без клинични белези (ACR = 0) при началната оценка. В известен смисъл може да се спекулира, че развилите СЛЕ още в началото са били с непълнен СЛЕ (НСЛЕ), т.е. не могат да бъдат категоризирани като „зdravi АНА-позитивни“. Дори при пълно припознаване на ограниченията, описаният експеримент остава с огромен принос за разбирането на имунологичните промени в ранните/предклинични фази на болестта. Освен това данните в голяма степен корелират с тези на Slight-Webb и сътр. (вж по-горе) [105]. Проучването затвърждава разбирането, че разгръщането на СЛЕ се обуславя от комбинацията от засилени проифламаторни механизми с недостатъчност на регулаторните такива. Като водещи и значими по отношение предикция за развитие на болест се открояват се имунологични промени по-скоро във „високото течение“ на цитокиновата „река“ (SCF), отколкото техните по-крайни продукти (напр. VLys). Ясното демонстриране на конкретни предиктивни фактори за разгръщане на болест само по себе си е от почти изключително значение, макар и да са необходими още (най-вече проспективни) проучвания, за които обаче настоящото предоставя конкретни задачи. Друг много важен извод от показаните зависимости касае наличието на АНА в повишени количества. От една страна разболелите се по-често са били с по-висок титър и с повече на брой специфични Ат, но от друга 85% от позитивните при проследяването не са развили болест, т.е. АНА-позитивността сама по себе си не е предиктивен фактор. Разбира се, тук може да се възрази, че периодът на проследяване е кратък (ок. 6,5 г.), но при потвърждаване в бъдеще, този факт може постепенно да промени общото традиционно разбиране за АНА и рутинната практика в тяхната интерпретация.

2.10. Заключение с оставащи въпроси

Системният лупус еритематодес е аутоимунно заболяване, дължащо се на комплексни патоимунологични промени, белези за които се откриват до 9 години преди клиничната изява. От тях АНА са обект на рутинно изследване в клиничната практика, а други са утвърдени показатели за функционирането на имунната система и се изследват също рутинно, но все още само в сферата на научните разработки и не са валидирани за клиничната практика. Промени в някои от тези показатели предшестват образуването на АНА, а други се асоциират с разгръщането на СЛЕ; като такива те са кандидат-предиктори за развитие на болест. Също така, у „бъдещите болни“ специфичните АНА показват характерна динамика, както по отношение на качество (едни антитела се появяват рано, други почти непосредствено преди болестта), така и по отношение количество (с приближаването към клиничното начало броят на отделните АНА се увеличава).

Понастоящем се счита, че за развитието на СЛЕ е необходимо въздействие на външни фактори, способстващи за „отключване“ или по-скоро „доразгръщане“ на генетично обусловена имунна дисрегулация. Като външни фактори се обсъждат промяна в нивата на естрогени/тестостерон (вкл. ятрогенна), намалени нива на витамин Д, актуално тютюнопушене, кварцова експозиция и инфекция с вируса на Epstein-Barr.

Системният лупус еритематодес има полигенно унаследяване и показва изразена тенденция за фамилна агрегация, като вероятността роднина на болен със СЛЕ да се разболеет от СЛЕ е от десет до петдесет пъти по-голяма в сравнение с тази у общата популация.

АНА се срещат както у роднини на болните, така и в общата популация и в по-голямата си част не са признак или предвестник на заболяване. Все пак, при роднините честотата на наличие на АНА, вкл. в титър 1:160 и по-висок (по ИИФ), е по-голяма – от 5-10 до около 35%, докато в общата популация варира от 2,5 до 5-7%. Имуннологичният профил на роднините на болните и този на АНА-позитивните от общата популация показват редица различия, за които има значими данни, че насочват към връзка бъдещо развитие или неразвитие на болест.

Всичко изложено насочва към разбирането, че роднините на болните със системен лупус еритематодес са специфична група с характерен имунологичен профил. В литературата все още липсват данни за проучвания, които да обединяват

в едно изследване предполагаемите рискови фактори на средата, възможните клинични и имунологичните промени при тази група. Също така, по отношение на новите данни за имунологичните промени, свързани с развитие или неразвитие на болест при АНА-позитивните роднини, са необходими допълнителен брой изследвания, които да потвърдят, отхвърлят или прецизират предполагаемите закономерности.

3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

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

За изложената цел бяха формулирани следните задачи:

1. Клиничен скрининг на роднините и здравите контроли за ранни белези на системно заболяване чрез въпросник и клиничен преглед.
2. Изследване за външни рискови фактори – тютюнопушене, прием на естрогенови препарати, серумни нива на витамин D_{2/3} и антитела срещу капсидния антиген на вируса на Епщайн-Бар.
3. Изследване на антинуклеарни антитела, фракции на комплемента, антифосфолипидни антитела и цитокини (BLys, APRIL, IFN- α , IL-6, IL-8, IL-10 и TGF- β) при изследваните групи.
4. Изследване на прости и комплексни статистически зависимости между всички описани по-горе както между здрави, роднини и болни, така и вътрегрупово при роднините.

4. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

4.1. Изследвани лица и биологичен материал

С цел да се придобие представа за целия спектър здраве-болест и за мястото на основната група изследвани лица – роднини първа степен на болни със СЛЕ в него, бяха изследвани *три* групи: здрави контроли, роднини първа степен на болни от СЛЕ и болни от СЛЕ. Трите групи ляха изследвани за *клинични прояви* (чрез въпросник и преглед), за *рискови фактори* (тютюнопушене и прием на естрогенни препарати чрез въпросник, лабораторно за нива на витамин Д, и серологично за инфекция с EBV) и *имунологично* (за АНА и подбрани цитокини). Предвид, че РПС са на практика здрави индивиди и цел на изследването е

отграничаването им от останалата здрава популация, от една страна, и предвид факта, че болните от СЛЕ с разгърната клинична картина, са в известен смисъл „несравними“ с другите две групи в клиничен аспект, изследването за клинични белези и рискови фактори бе проведено върху РПС и здравите контроли.

По своя тип проведеното проучване е крос-секционно.

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

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

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

Първоначално бяха набрани общо 101 лица за участие в проучването. След подробна оценка според включващи и изключващи критерии за участие бяха подбрани 93 лица: 56 РПС, 17 болни със СЛЕ и 20 здрави контроли. Набирането на участници беше осъществено в периода м. март 2018 г. до м. ноември 2021 г. Демографската характеристика на изследваните лица е представена на табл. 5.

Табл. 5. Демографска характеристика на изследваните лица

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

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

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

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

4.2. Методи

4.2.1. Скринингов въпросник за клинични оплаквания и рискови фактори

Беше изготвен въпросник за прояви на системно страдание. С цел скрининг за признаци, вкл. ранни, на съединителнотъканно заболяване и скрининг за рискови фактори, изследваните лица попълниха съставен от нас въпросник (вж приложение 1 и 2), като отговорите бяха преглеждани на място от автора, специалист по вътрешни болести и ревматология, и при наличие на оплаквания, същите бяха доизяснявани и бе провеждан физикален преглед. Въпросникът бе съставен на база скрининговия въпросник за съединителнотъканни заболявания (CSQ, прил. 1, табл. 58) и актуалните клинични критерии за СЛЕ, прогресивна системна склероза и синдром на Съогрен. През 1995 г. Karlson и сътр. разработват въпросник, т.нар. CSQ – connective tissue diseases screening questionnaire [123]. Въпросникът съдържа демографска част и набор от въпроси, съставени на база тогавашните класификационни критерии за основните СЗСТ и ревматоиден артрит; съдържа също така и въпроси относно основни имунологични и лабораторни промени. След съставянето му той е валидиран чрез попълване (по пощата) от три групи – такива със СЗСТ и РА (179 души), пациенти с остеоартроза и мекотъканен ревматизъм (55) и здрави (136). Резултатите са между 83 и 96% сензитивност и между 83 и 93% специфичност, а негативната предиктивна стойност възлиза на 99,7%. В обсъждането авторите обръщат внимание, че скрининговият въпросник винаги трябва да балансира между висока чувствителност с по-малка специфичност, което на практика означава допълнителни разходи за диагностично доуточняване (в сила особено за СЗСТ) и обратното, което носи риск от „неулавяне“ на болни в ранен стадий. При съставянето на въпросника за настоящото изследване бяха взети предвид две съображения – актуализиране според новите данни за ранни прояви на СЗСТ, както и разгръщане на по-висока чувствителност дори за сметка на по-малка специфичност. Последното беше допуснато предвид, че този въпросник включва и обсъждане с пациента след попълването му (т.е. доизясняване на специфичността на оплакванията). Отстранени от CSQ бяха също така въпросите, касаещи расова принадлежност предвид неприложимостта им към нашата страна.

При обработка на клиничната част на въпросника, оплакванията бяха класифицирани с следните категории: кожни, орални афтоподобни, ставни, синдром на Рейно, sicca-подобни, фоточувствителност, серозит и косопад.

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

При разглеждане отговорите от въпросниците, беше установено наличието на множество съобщени оплаквания, които по вид и интензивност категорично не са от системно или възпалително естество, за разлика от други, които могат да бъдат (или да са били) системна проява. Това наложи класифицирането на събраните оплаквания в две категории: първите определихме като „ирелевантни“, а вторите като „потенциално релевантни“. Избрахме двойката „ирелевантни/ потенциално релевантни“ като най-точна и с най-малко интерпретативен характер, за разлика от двойките „характерни/нехарактерни“ и „специфични/неспецифични“, които вече съдържат немалка степен на предварителна предубедена интерпретация. Водещи критерии в оценката, освен клиничната интуиция по време на прегледа, бяха честотата на поява, тежестта, и най-вече спонтанния характер, т.е. липсата на явна причинност. Например, болка в раменната става след натоварване категоризирахме като ирелевантно оплакване, но болки в малките стави сутрин, макар и без подуване и скованост у човек

под 50-годишна възраст, определихме като потенциално релевантни. Както беше отбелязано по-горе, в актуалните класификационни критерии за СЛЕ се обръща внимание, че дадено оплакване се приема за критерий, само ако няма друго вероятно медицинско обяснение за него и че критерии могат да бъдат и минали оплаквания/прояви, които в момента не са налични. Освен това и че фебрилитетът може да бъде ранен симптом за СЛЕ. Оттук и взетото от нас решение за доразпитване относно съобщените оплаквания, вкл. минали такива; оттук и решението за включване на въпрос за фебрилитет във въпросника.

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

4.2.2. Изследване на АНА

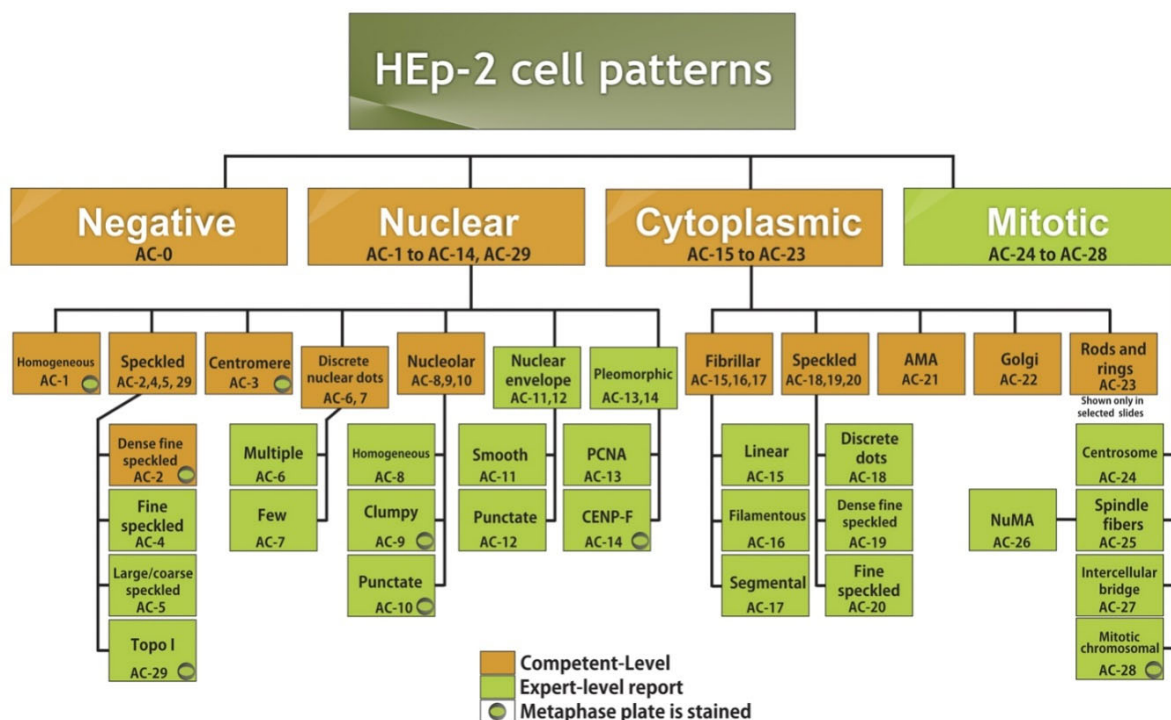
Както беше описано по-горе, освен че АНА предшестват началото на клиничните прояви на СЛЕ с години, имат патогенетична роля и са необходим критерий и диагностична „емблема“ на заболяването, те са и основен показател изследван рутинно в клиничната практика. В този смисъл имунологично профилиране на роднините първа степен би било немислимо без изследване на тези антитела. В описаните досега проучвания, АНА у роднини предимно са изследвани по методите ELISA и имуноблот. След унифициране начина на скринингово изследване на АНА в Международния консенсус за типовете АНА светения (International Consensus of ANA Patterns, ICAP), индиректната имуофлуоресценция (ИИФ) е приета като златен стандарт [92]. Така в нашето проучване трите групи бяха изследвани и по трите посочени метода – ИИФ, имуноблот и ELISA.

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

Както бе отбелязано по-горе, изследването на АНА чрез ИИФ върху HEp-2 клетки днес е всеобщо приет и унифициран скринингов метод, златен стандарт

сред световната имунологична общност. То е неделима част от АНА скрининга на системните и орган-специфичните аутоимунни възпалителни заболявания.

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

на данните са интерпретирани общо всички антитела срещу нуклеопротеиновия комплекс - anti-dsDNA, anti-Histones и anti-Nuc.

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

Серумните проби на трите групи, с изключение на 13 лица от РПС групата, бяха изследвани за наличие на C₃ и C₄ фракции на комплемента чрез метода турбидиметрия (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Промените в C₃ и C₄ фракциите на комплемента, са част от имунологичните критерии на съвременните класификационни критерии за системния лупус на ACR/EULAR 2019 [5].

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

Серумните проби на трите групи, с изключение на 13 лица от РПС групата, бяха изследвани за наличие на анти-кардиолипинови (ACL) и анти-бета-2-гликопротеин-I (anti- β 2-GPI) автоантитела чрез ELISA (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Положителните антикардиолипинови (ACL) и анти-бета-2-гликопротеин-I антитела (anti- β 2-GPI) са част от имунологичните критерии на съвременните класификационни критерии за системния лупус на ACR/EULAR 2019 [5].

4.2.5. Изследване на цитокини в кръвен серум чрез имуноензимни методи

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

IFN- α е интерферон тип I, синтезиран от фибробласти и моноцити. IFN- α се потиска регулаторните Т-хелперни лимфоцити, стимулира секрецията на BAFF, активира на NK клетките и увеличава продукцията на IFN- γ , и засилва транскрипцията на IFN-свързаните гени (т. нар. интерферонова сигнатура) [85, 86]. Така IFN- α участва в образуването на АНА, а нивата му са повишени при болни със СЛЕ [124], което причислява СЛЕ към заболяванията с повишена интерферонова сигнатура.

Интерлевкините IL-6 и IL-8 са също известни проинфламаторни цитокини. IL-6 участва в образуването на АНА [83, 84], нивата му се увеличават във времето преди разгръщане на СЛЕ, особено преди появата на специфични АНА [100]. Метаанализ пък демонстрира ясно значимо повишени нива на IL-8 при болни от СЛЕ [125].

BLys и APRIL са цитокини от т. нар. TNF-суперфамилия, участваща в регулацията на възпалението и имунния отговор, но също така и на пролиферацията, диференциацията, апоптозата и ембриогенезата. BLys е ключов цитокин в патогенезата на СЛЕ, както беше описано по-горе: той е отговорен за стимулацията на В-клетките, в случая надмерната продължителност на живота на автореактивните клонове В-клетки, което води до постоянното производство на автоантитела. APRIL има сходно на BLys действие и съответно роля в стимулиране преживяемостта на В-клетките. Често се описва т. нар. BLys/APRIL система; нивата и на двата цитокина са повишени при болни със СЛЕ. Според цитираните в нашия обзор студии, BLys и APRIL са повишени у „бъдещи болни“ години преди заболяването [76], но BLys може и да е понижен при някои АНА-позитивни здрави със запазени имунни регулаторни механизми [122]. Освен това нивата на BLys и APRIL корелират с активността на СЛЕ.

TGF- β и IL-10 са основни регулаторни цитокини. IL-10 потиска експресията на HLA и костимулаторните молекули по АПК, продукцията на проинфламаторни цитокини и активацията на Т-клетките и др. [126]. TGF- β е основен негативен регулатор на проинфламаторните цитокини, инхибира пролиферацията на Т-клетките и благоприятства диференциацията на Т-клетките в регулаторни Т-клетки (Tregs) и др. [пак там]. Според многократно цитираното вече проучване на *Munroe* и сътр. [122], и двата цитокина са с понижени нива у роднините на болни, които впоследствие са развили СЛЕ, а TGF- β дори има самостоятелна предиктивна стойност относно бъдещо заболяване.

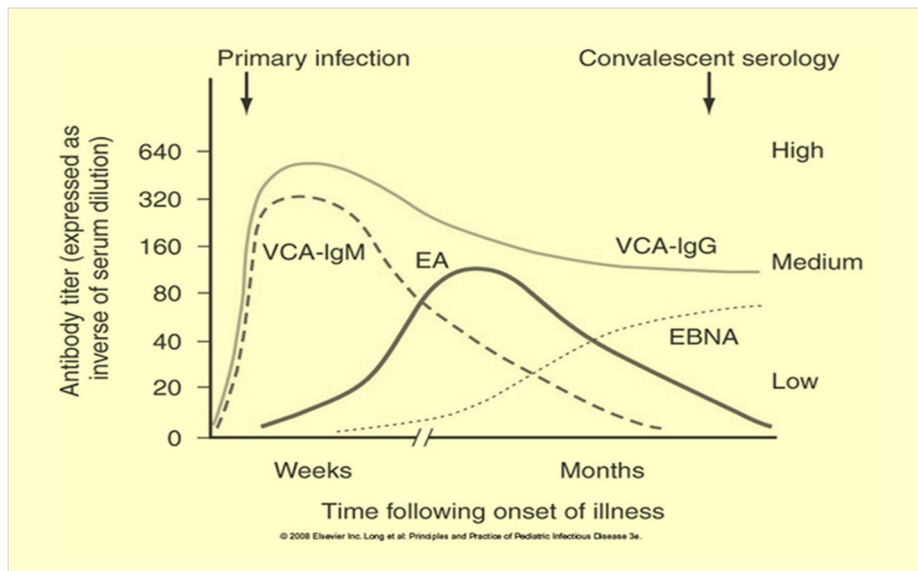
За количествено определяне на BLys, APRIL, IFN- α , IL-6, IL-8, IL-10 и TGF- β в серумите на изследваните здрави контроли, РПС и пациенти със СЛЕ използвахме метод „сандвич“ ELISA (TGF- β : Diaclone, France; BLys: Human BLys ELISA, Abexa, UK; APRIL: Human April ELISA, Biovendor; IFN- α : Diaclone, France,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

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

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

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

Както бе посочено по-горе, налице са сериозни основания за допускане, че инфекцията с EBV може да има значима патогенетична роля в развитието на СЛЕ, поради което се обсъжда като рисков фактор. Накратко, EBV е ДНК вирус, при който геномът е обграден от нуклеокапсид (протеин), от своя страна обграден от т. нар. тегумент (също протеин), заобиколен от обвивка (envelope), съставена от липиди и „стърчащи“ гликопротеини. Вирусът се предава по въздушно-капков, контактен и полов път, инфектира първоначално епителните клетки, след което се поселва в В-клетките, където остава в латентно състояние с периодични реактивации, водещи до т.нар. литична фаза, съпроводена с отделяне на вируса в телесните течности. Най-общо, съответно на описаните структури на вируса и фази в цикъла на инфекцията са и основните антителата срещу вируса, използвани в рутинната практика: anti-EA (early antigen, протеин появяващ се в ранната литична фаза), anti-EBNA-1 (Epstein-Barr nuclear antigen 1, срещу нуклеопротеин от генома), anti-VCA (viral capsid antigen, срещу антиген на капсида). Класическата представа за динамиката на серопозитивността за EBV е, че най-ранно позитивират anti-VCA и IgG остават трайно позитивни; постепенно в хода на хроничната инфекция позитивират и остават трайно позитивни anti-EBNA-1, а при реактивация се покачват anti-EA. Предвид, че anti-VCA антителата се асоциират с АНА позитивност у здрави, дори при негативност по anti-EBNA-1 [39], и че, освен че са белег на състояние на инфектираност, има данни и за възможна асоциация с покачването на титъра им и реактивация на вируса [40], избрахме да изследваме антитела именно срещу този антиген.



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

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

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

Витамин Д се обсъжда като възможен рисков фактор за СЛЕ, като литературните данни са противоречиви, както бе отбелязано по-горе [20, 21]. Въпреки това, по експертно мнение, той се счита за фактор в склонността за развитие на аутоимунно заболяване [127].

Общата концентрация на 25-(ОН)-Vitamin D3 и 25-(ОН)-Vitamin D2 в серум на здрави контроли, РПС и пациенти със СЛЕ беше установено чрез метод конкурентна ELISA. За целта беше използван кит 25-ОН Vitamin D3/D2 (ORGENTEC Diagnostika GmbH, Germany) и напълно автоматизирана система Alegria (ORGENTEC Diagnostika GmbH, Germany). Резултатите бяха отчетени като дефицит (<12 ng/ml), недостиг (12 – 20 ng/ml) и нормална концентрация на витамин D (>20 – 150 ng/ml) според препоръките на производителя.

4.2.8. Статистически методи

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

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

Приложени са изброените по-долу методи.

4.2.8.1. Дескриптивна статистика

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

5.1. Резултати с обсъждане

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

5.1.1. Демографски характеристики на трите включени в проучването групи лица

5.1.1.1. Разпределение по пол и възраст

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

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

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

Табл. 7. Разпределение по пол в трите групи - здрави, РПС и болни със СЛЕ

		пол		
		жени	мъже	общо
здрави	n (%)	16 (80,0)	4 (20,0)	20 (100,0)
РПС	n (%)	48 (85,7)	8 (14,3)	56 (100,0)
СЛЕ	n (%)	16 (94,1)	1 (5,9)	17 (100,0)
всички	n (%)	80 (86,0)	13 (14,0)	93 (100,0)

В наличните литературни данни за имунологичния профил на РПС далеч не винаги са представени половото разпределение на участниците, но при налично такова женският пол преобладава. Това може се дължи на факта, че жените са със съзнанието за принадлежност към групата на склонните към автоимунитет индивиди от една страна, както и на по-високата степен на естествено чувство за отговорност спрямо здравето на поколението (било то настоящо или бъдещо). По отношение на болните контроли половото разпределение е лесно обяснимо, предвид целта здравата контролна група да съответства доколкото е възможно по пол и възраст на изследваната (съотв. 86,7% спрямо 86,0%).

В нашето изследване липсва статистическа зависимост между пола и който и да е от изследваните показатели. Такава е описана единствено за АНА в няколко проучвания [103, 107, 116] и, както беше посочено по-горе, се приема за асоциирана на първо място с женските полови хормони, които – внесени отвън – са и вероятен рисков фактор за развитие на СЛЕ [16, 17, 18]. У от Slight-Webb и сътр., 2020 г., [105] женският пол е единственият значим предиктор за АНА-позитивност сред общата популация. Интересно е да се отбележи, че зависимостта на АНА от пола се открива предимно в изследванията на общата популация; в проучванията на АНА и имунологични промени при РПС не се описва такава или е описана в контролната група [116]. Нещо повече, в задълбоченото проучване на Мингое и сътр. [122] женският пол не е самостоятелен предиктивен фактор за развитие на СЛЕ при роднините.

От приложените данни за възрастта на отделните групи ясно личи, че средната възраст и в трите групи е между 39 и 40 години, а стандартната девиация варира в диапазона 11-12 години (табл. 6). По отношение на пациентите със СЛЕ, това е лесно обяснимо – заболяването засяга предимно жени в детородна възраст и такива са и болшинството изследвани от нас. РПС и здравите контроли

бяха така подбрани, че по този начин да намалее влиянието на фактора възраст при последващите анализи. В нашите резултати липсва статистическа зависимост между възрастта и останалите променливи. Традиционно е приемано, че АНА нарастват с възрастта. Най-общо казано, като основание за това допускане стои разбирането, че вероятно с възрастта процесите на клетъчна или тъканна деструкция се увеличават от една страна, а системите за почистване на вътреклетъчно съдържимо от страна на неспецифичната защита функционират все по-бавно, от друга; от трета пък, експозицията на фактори на средата е по-продължителна. Литературните данни обаче са противоречиви или по-скоро не подкрепят подобна хипотеза. От една страна, Satoh и сътр. описват в извадка от над 4 хил. души увеличаване на честотата на АНА с възрастта, нелинейно, с пик в декадата 50 – 59-годишна възраст [103]. В много по-голяма извадка обаче, над 25 хиляди, макар и само в една област в Китай, такава зависимост не се описва [75]. Тя е опровергана и от проучването на Slight-Webb и сътр. [105], според чиито данни, както беше отбелязано по-горе, изрично се демонстрира, че възрастта не е фактор по отношение формирането на АНА.

5.1.1.2. Вид роднинска връзка в групата на РПС

Видът роднинска връзка при подбраните от нас РПС е показан в таблица 7. Както се вижда, преобладават деца на болни; това може да се обясни с отговорността на родителите по отношение предаване на тяхната болест на поколението. Освен това, вероятността родител на болен да разгърне заболяването намалява с времето, поради обичайната възраст за появата на СЛЕ – между 20 и 50 години.

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

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

В литературата са налице данни за малки различия в степента на фамилната агрегация, λ , между сиблинги от една страна и родители/поколение от друга в полза на първите (вж по-горе) [80]. В цитираното изследване болестността в проценти при сиблинги е ок. 2,9, а при родители и поколение е 2,7; популационната

варира от 0,001 у северноевропейците до 0,35% у афроамериканците. У Munroe [122] изрично се отбелязва, че типа роднинска връзка няма отношение към вероятността за разгръщане на заболяване. В останалите публикации липсват данни за каквато и да е зависимост на АНА или имунологичния профил на РПС спрямо типа родство с болния.

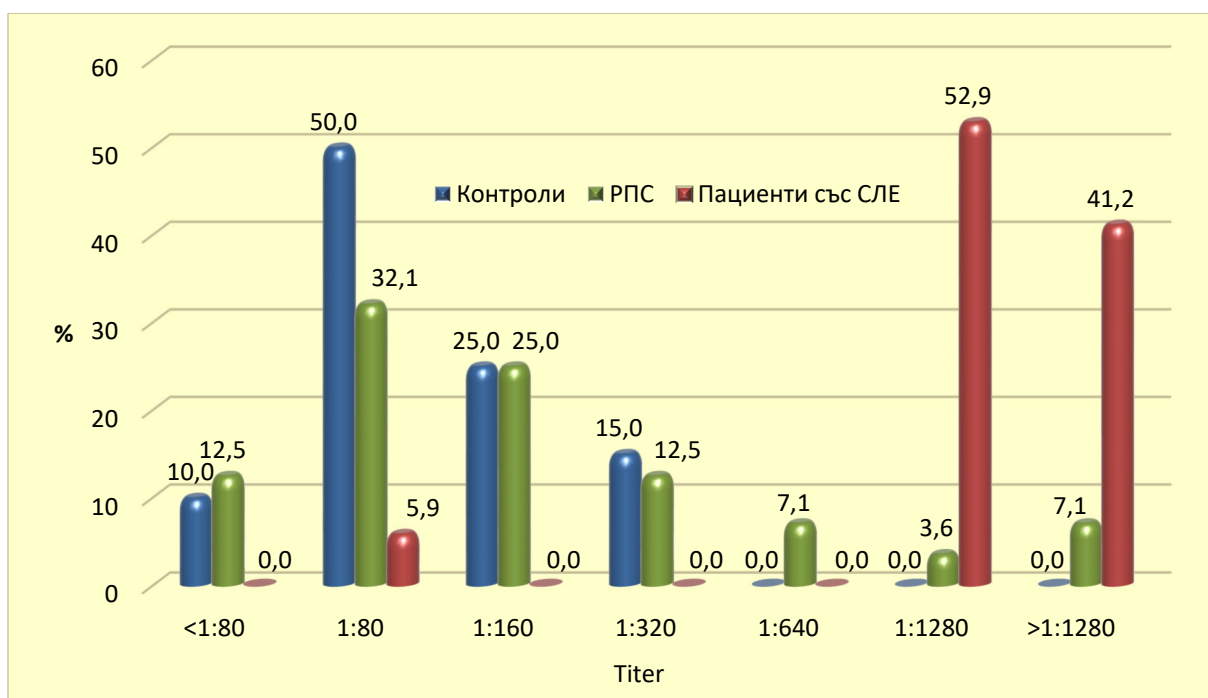
5.1.2. Изследване разпределението на АНА по ИИФ - титър и типове светене според номенклатурата на ICAP сред здрави, РПС и болни от СЛЕ

При изследване на честотното разпределение на трите групи по титър на АНА се вижда, че те се различават сигнификантно при 4 от титрите: 1:80, 1:160, 1:1280 и >1:1280 (табл. 9 и фиг. 5). При 1:80 и 1:160 статистически достоверно по-високи относителни дялове имат здравите и РПС (които не се различават статистически помежду си) спрямо пациентите от групата на болните със СЛЕ, докато при двата най-високи титъра статистически значимо по-висок относителен дял имат болните със СЛЕ спрямо останалите две групи, чиито относителни дялове отново не се различават статистически помежду си. На фиг. 5 се вижда, че след високия стълбец (50%) при здравите при 1:80 следва спад до 0% на 1:640, оставащ на същото ниво до <1:1280. Болните със СЛЕ липсват почти изцяло в началото на скалата, придобивайки рязко най-високи стойности при 1:1280 и >1:1280. Относителните дялове на РПС по своята динамика наподобяват контролите – намаляват отляво надясно след 1:80 до 3,6% при 1:1280 и бележат леко повишение при > 1:1280 до 7,1%. Както е видно, въпреки че не достигат сигнификантно различие със здравите по отношение на честотното разпределение на титрите, при РПС се наблюдава тенденция към сигнификантност за „разстилане“ по всички титри, за разлика от здравите, които „заемат“ само ниските стойности. Възможно е при по-голям брой изследвани тази тенденция да придобие значим характер.

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

При сравняване на трите изследвани групи според разпределение по различни *cutoff* титри (1:160, 1:320 и >1:320, съотв табл. 10, 11 и 12) се вижда, че значима разлика между здравите и РПС се наблюдава едва при титри *над* 1:320. Така 51,8% от РПС в нашето проучване са с титър на АНА *равен на или по-голям* (\geq) от 1:160, спрямо 40% от здравите контроли и 100% от болните. С титър *над* ($>$) 1:160 от РПС са 28,6%, а от здравите контроли – 15,0%; с покачване на титъра – *над* ($>$) 1:320, разликата между РПС и здрави контроли се задълбочава, съответно 18,9% спрямо 0%. И тук е налице тенденция към сигнификантност още от титър >1:160, която е възможно да се изяви при по-голяма група изследвани лица. Тези резултати съответстват на описаните в литературата, които по отношение на АНА поставят РПС в междинно положение спрямо болните със СЛЕ и здравите. Разбира се, РПС остават значително по-близки до здравите и като че ли „повтарят“ разпределението на АНА при здравите, но с „уголемен мащаб“ (срв. фиг. 5). Това е напълно обяснимо, предвид, че РПС все пак са *здрави* лица.

Проучванията за наличието на антинуклеарни антитела у роднините на болни със СЛЕ са десетки (вж. табл. 59 в приложението), започват още през 60-те години на миналия век и продължават и досега. Всички те категорично свидетелстват за по-голямата честота на серумни АНА в тази група, макар по методологични причини невинаги да са директно сравними по отношение на точната честота. Световните данни за АНА у РПС варират от 5-10 до около 35% наличие у РПС на общи АНА или на отделни антитела. Все пак, около 10% АНА позитивност прави впечатление от по-мащабните и съвременни проучвания. В едно проследяващо проучване от Дания, в хода на 12 г., броят на АНА позитивни сред РПС нараства от 10 на 34% [117]. В нашите данни прави впечатление високият процент АНА *около и над* *cutoff* титъра у РПС и здрави контроли (съответно 51,8 и 40%, табл. 10); това би могло да се обсъди като специфика на българската популация, но трябва да се вземе предвид и възможна промяна при увеличаване броя на изследваните лица. Този резултат трябва да се разглежда, разбира се, и в светлината на все по-широко възприетото изместване на *cut-off* титъра от 1:80 на 1:160; т.е. описаната честота (51,8% от РПС с АНА \geq 1:160) на практика включва и нормални/гранични титри. Наистина, самата работна група по ICAP обсъжда, че *cut-off* титърът следва да бъде определян емпирично и локално [127]. Така и в нашето проучване, с нарастване на титъра, разликата между РПС и здрави се увеличава, съответно 28,6% спрямо 15% (АНА > 1:160), до 18,9% спрямо 0% (АНА > 1:320), табл. 11 и 12. Т.е. АНА-позитивните РПС *stricto sensu* са ок. 30%.

Необходими са допълнителни изследвания на РПС и здрави за наличие на АНА в нашата популация.

При изследване зависимостта между титър на АНА и пол не се установява сигнификантна такава в нито едната от трите групи на изследване (табл. 13 - 15). Наличните данни не дават основание да се твърди и че съществува статистически значима асоциация между титъра на АНА и възрастта (табл. 16).

Табл. 13. Честотно разпределение на АНА титър по пол при здравите ($p=0,737$)

	титър на АНА	честота	пол		общо
			мъже	жени	
з д р а в и		брой	1	1	2
	< 1:80	% по пол	50,0	50,0	100,0
		% по титър	25,0	6,3	10,0
		брой	2	8	10
	1:80	% по пол	20,0	80,0	100,0
		% по титър	50,0	50,0	50,0
		брой	1	4	5
	1:160	% по пол	20,0	80,0	100,0
		% по титър	25,0	25,0	25,0
		брой	0	3	3
	1:320	% по пол	0,0	100,0	100,0
		% по титър	0,0	18,8	15,0
		брой	4	16	20
	общо	% по пол	20,0	80,0	100,0
		% по титър	100,0	100,0	100,0

Табл. 14. Честотно разпределение на титър на АНА по пол при РПС ($p=1,000$)

	титър на АНА	честота	пол		общо
			мъже	жени	
РПС	< 1:80	брой	1	6	7
		% по пол	14,3	85,7	100,0
		% по титър	12,5	12,5	12,5
	1:80	брой	3	15	18
		% по пол	16,7	83,3	100,0
		% по титър	37,5	31,3	32,1
	1:160	брой	3	11	14
		% по пол	21,4	78,6	100,0
		% по титър	37,5	22,9	25,0
	1:320	брой	1	6	7
		% по пол	14,3	85,7	100,0
		% по титър	12,5	12,5	12,5
	1:640	брой	0	4	4
		% по пол	0,0	100,0	100,0
		% по титър	0,0	8,3	7,1
	1:1280	брой	0	2	2
		% по пол	0,0	100,0	100,0
		% по титър	0,0	4,2	3,6
> 1:1280	брой	0	4	4	
	% по пол	0,0	100,0	100,0	
	% по титър	0,0	8,3	7,1	
общо	брой	8	48	56	
	% по пол	14,3	85,7	100,0	
	% по титър	100,0	100,0	100,0	

Табл. 15. Честотно разпределение на титър на АНА по пол при болните със СЛЕ ($p=0,471$)

	титър на АНА	честота	пол		общо
			мъже	жени	
болни със СЛЕ	< 1:80	брой	0	1	1
		% по пол	0,0	100,0	100,0
		% по титър	0,0	6,3	5,9
	1:1280	брой	0	9	9
		% по пол	0,0	100,0	100,0
		% по титър	0,0	56,3	52,9
	> 1:1280	брой	1	6	7
		% по пол	14,3	85,7	100,0
		% по титър	100,0	37,5	41,2
	общо	брой	1	16	17
		% по пол	5,9	94,1	100,0
		% по титър	100,0	100,0	100,0

Табл. 16. Сравнителен анализ на възрастта по титър на АНА в трите групи на изследване

група	титър на АНА	n	\bar{X}	SD
зdravi	< 1:80	2	38,00	5,66
	1:80	10	36,90	9,39
	1:160	5	46,00	10,79
	1:320	3	40,00	24,98
РПС	< 1:80	7	37,57	15,65
	1:80	18	39,78 ^a	9,77
	1:160	13	41,08 ^a	14,01
	1:320	7	37,57	7,41
	1:640	4	42,00	14,63
	1:1280	2	37,50	9,19
	> 1:1280	4	32,75	13,67
болни със СЛЕ	< 1:80	1	20,00	.
	1:1280	9	40,22	12,64
	> 1:1280	7	42,57	7,21

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

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

Както бе отбелязано по-горе (т. 5.1.1.1.), традиционното разбиране за нарастване на АНА с възрастта не се подкрепя от световния опит, а данни за зависимост от пола по отношение на АНА у РПС в повечето случаи не са налични.

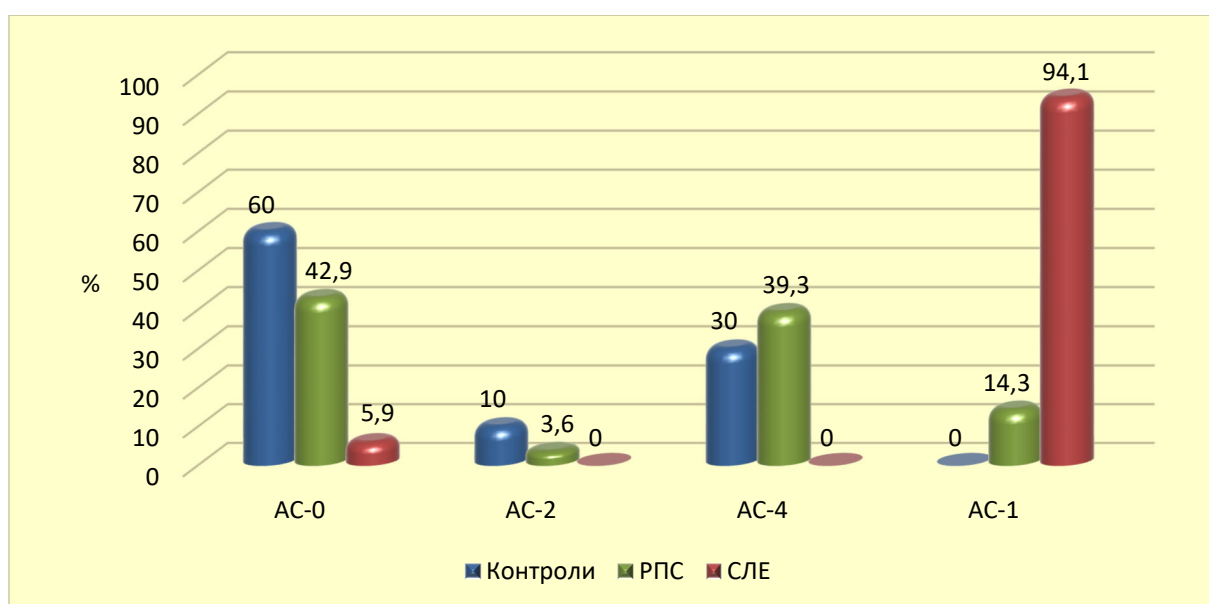
По отношение на получените имунофлуоресцентни образи, сред изследваните се наблюдават следните типове според номенклатурата на ICAP: AC-0, AC-1, AC-2, AC-4 и смесени типове на светене. Тъй като последните са едва няколко случая от цялата извадка, и то различни по вид, те бяха изключени от анализа поради липса на статистическа сигнификантност *a priori*. При светене тип AC-0 на практика може да има ИФ светене, но то не е съсредоточено в нито една структура отделно, т.е. не е нито нуклеарно, нито цитоплазмено, нито митотично. AC-1, хомогенното ядрено светене, се асоциира с наличието на anti-dsDNA, а AC-4, финото петнисто ядрено светене – често с anti-Ro60, но не винаги; AC-2, пък, плътно петнисто ядрено светене, най-често се дължи на наличие на anti-DFS70 антителата, които в най-голяма степен се асоциират с *липсата* на аутоимунно заболяване.

Изследваните групи се различават статистически достоверно по честотното разпределение на три от типовете светене – AC-1, AC-4 и AC-0. Резултатите са представени на табл. 17 и фиг. 6. При AC-1 статистически значимо по-висок относителен дял имат болните със СЛЕ спрямо останалите две групи, чиито относителни дялове не се различават статистически помежду си, докато при AC-4 и AC-0 сигнификантно по-високи относителни дялове имат здравите и РПС (които отново не се различават статистически помежду си) спрямо пациентите от групата на болните със СЛЕ. При AC-2 разликата в честотното разпределение е статистически нищожна. На табл. 17 се вижда, че относителният дял на здравите варира от 0% при AC-1 до 60% при AC-0. Най-рязко контрастират болните със СЛЕ – от двете нули при AC-4 и AC-2, незначителните 5,9% при AC-0 и почти 100% (94,1%) при AC-1. РПС присъстват навсякъде – най-много (42,9%) при AC-0, следвани от 39,3% при AC-4 и най-малко – 3,6% при AC-2. Т.е., както и при разпределението по титър на АНА, РПС следват това на здравите, но се „протягат“ и към болните със СЛЕ, покривайки целия спектър; и отново, макар да не достигат статистически значима разлика със здравите, е налице тенденция към значимост във всички видове светене, която би могла да се окаже значима при по-голяма извадка.

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

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

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



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

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

- при титър на АНА <1:80 и 1:80 статистически достоверно по-висок относителен дял има АС-0 спрямо останалите три типа светене, чиито относителни дялове не се различават статистически помежду си (при <1:80 АС-2 не се различава статистически значимо от АС-0 поради малкия брой случаи - само 4 - с тази категория).
- при титър 1:160 сигнификантно по-високи относителни дялове имат АС-4 и АС-2 (неразличаващи се статистически помежду си) спрямо останалите два типа ИФ светене, чиито относителни дялове също не се различават статистически помежду си.
- при 1:320 статистически достоверно по-високи относителни дялове имат АС-4 и АС-2 (неразличаващи се статистически помежду си) спрямо АС-0, но не и спрямо АС-1, чийто относителен дял не се различава статистически от тези на всички останали категории.
- при 1:640 статистически достоверно по-висок относителен дял има АС-1 спрямо тези на АС-4 и АС-0 (чиито относителни дялове не се различават сигнификантно помежду си), но не и спрямо този на АС-2, който не се различава статистически значимо от тези на АС-1 и АС-0.
- при АНА титър 1:1280 статистически достоверно по-висок относителен дял отново има АС-1 спрямо тези на АС-4 и АС-0 (чиито относителни дялове не се различават сигнификантно помежду си), но не и спрямо този на АС-2, който не се различава статистически значимо от тези на всички останали категории.
- при >1:1280 статистически значимо по-висок относителен дял имат АС-1 и АС-2 (неразличаващи се статистически помежду си) спрямо тези на АС-4 и АС-0 (чиито относителни дялове също не се различават сигнификантно помежду си).

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

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

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

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

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

- при титър 1:80 статистически достоверно по-висок относителен дял има АС-0 спрямо АС-4 и АС-2, чиито относителни дялове не се различават статистически помежду си;
- при 1:160 и 1:320 сигнификантно по-високи относителни дялове имат АС-4 и АС-2 (неразличаващи се статистически помежду си) спрямо този на АС-0;

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

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

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

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

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

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

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

- при титри $<1:80$ и $1:80$ статистически достоверно по-висок относителен дял има АС-0 спрямо останалите три типа светене, чиито относителни дялове не се различават статистически помежду си (при $<1:80$ АС-2 не се различава статистически значимо от АС-0 поради малкия брой случаи - само 2 - с тази категория, не се различава сигнификантно и от АС-1);
- при титър $1:160$ статистически достоверно по-висок относителен дял има АС-4 спрямо останалите три вида светене, чиито относителни дялове не се различават статистически помежду си (относителният дял на АС-2 не се различава статистически от този на АС-4 поради малкия брой случаи с АС-2);
- при $1:320$ статистически достоверно по-високи относителни дялове имат АС-1 и АС-4 (неразличаващи се статистически помежду си) спрямо АС-0, но не и спрямо АС-2, чийто относителен дял не се различава статистически от тези на всички останали категории;
- при $1:640$ статистически достоверно по-висок относителен дял има АС-1 спрямо тези на АС-4 и АС-0 (чиито относителни дялове не се различават сигнификантно помежду си), но не и спрямо този на АС-2, който не се различава статистически значимо от тези на всички останали;
- при $1:1280$ разликата в честотното разпределение на типовете светене е статистически нищожна;
- при титър $>1:1280$ статистически значимо по-висок относителен дял има АС-2 спрямо тези на всички останали (чиито относителни дялове не се различават сигнификантно помежду си).

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

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

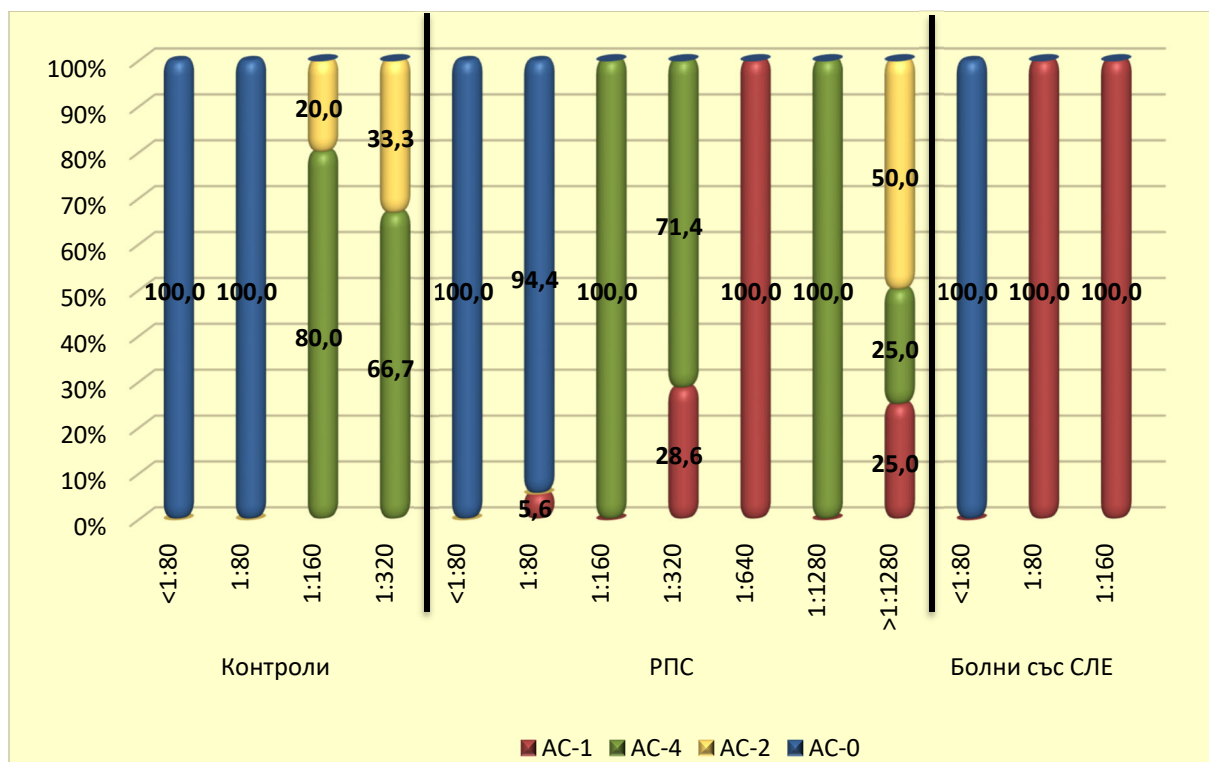
титър	честота	тип ИФ светене				общо
		АС-1	АС-4	АС-2	АС-0	
< 1:80	брой	0	0	0	7	7
	% по светене	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	% по титър	0,0 ^{ac}	0,0 ^a	0,0 ^{ac}	29,2 ^{bc}	12,5
1:80	брой	1	0	0	17	18
	% по светене	5,6	0,0	0,0	94,4	100,0
	% по титър	12,5 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	70,8 ^b	32,1
1:160	брой	0	14	0	0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

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

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

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

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



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

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

На практика с клинично значение са само специфичните видове светене, в нашия случай АС-1, АС-2 и АС-4. Предвид че АС-2 се асоциира с антителата anti-DFS70, които най-често са свързани с липса на аутоимунно заболяване, реално клинично значими остават АС-1 и АС-4 светенията. Така, значими ИФ образи (АС-1 и АС-4) наблюдаваме сред РПС в 53,9%, сред здрави контроли – почти наполовина по-рядко - в 30%; при болните процентът е 94,1 (табл. 19, 20 и 21). Разбира се, не трябва също така да се забравя, че в последна сметка оценяването на ИФ образ и титър е субективен метод. По отношение на клинично значимото светене, при РПС то е най-често АС-4, по-рядко АС-1, при болните – само АС-1, а при здравите – само АС-4 (фиг. 7). Това отново показва междинното положение на РПС, сред които се открива и асоциираното с anti-dsDNA АС-1 светене, и често срещаното и у здрави, и у болни АС-4. Следва да се припомни, че АС-4 е свързано с наличието на anti-Ro60 антитела, които са най-рано появяващите се в предклиничното развитие на СЛЕ [15].

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

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

При изследване разпределението на anti-dsDNA (ELISA) между трите групи, се открояват сигнификантни различия (табл. 22). Здравите, РПС и болните са сравнени по наличие на стойности в норма (0 – 25), слабо повишени (25,1 – 50)

и силно повишени (> 50). Нормалните стойности на anti-dsDNA имат сигнификантно по-висок относителен дял при здравите и РПС (без сигнификантна разлика помежду им), докато значимо повишените - при болните със СЛЕ. За леко завишените стойности (25,1 - 50) може да се твърди с гранична статистическа достоверност ($p < 0,1$), че са с по-висок процент в групата на болните спрямо другите две групи.

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

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

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

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

Трите групи на изследване се различават сигнификантно по честотното разпределение на 6 от общо 13-те изследвани специфични антитела (табл. 23, фиг. 8), както следва:

- anti-DFS70 – относителният дял на високите им стойности при контролите е статистически значимо по-висок от този на РПС, но не и от този на болните със СЛЕ, който не се различава статистически от тези на останалите две групи;

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

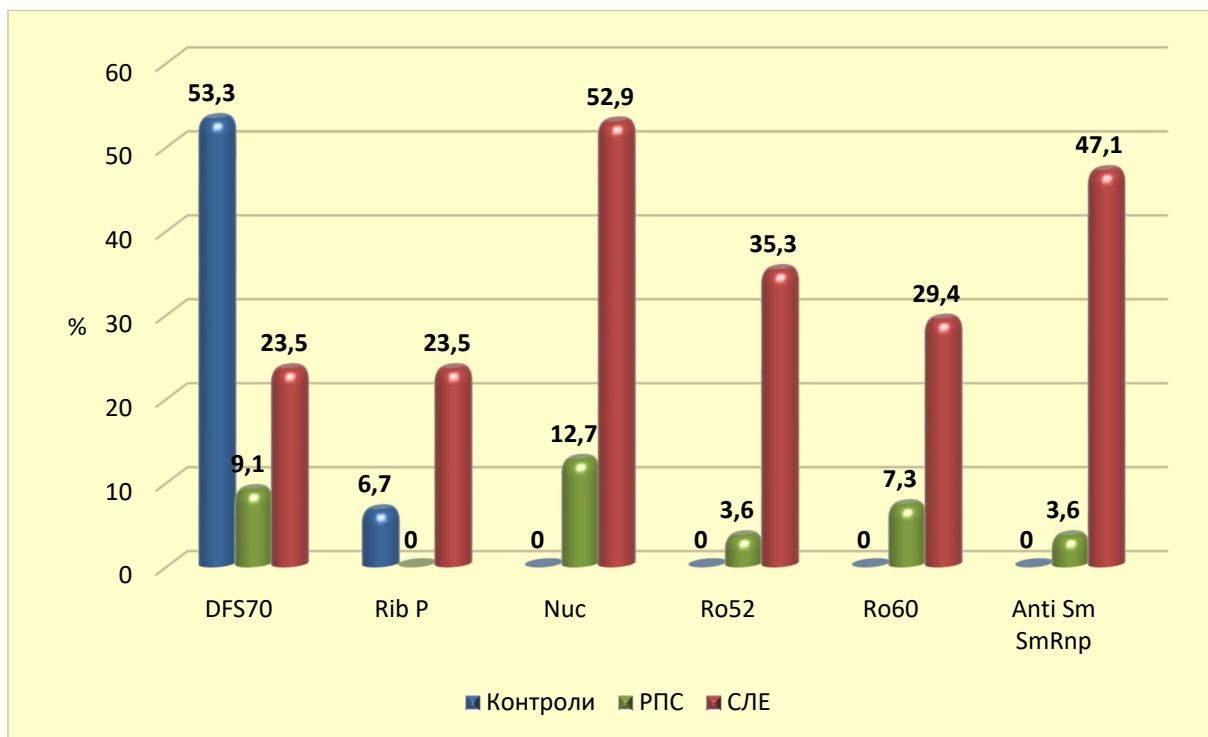
На фиг. 8 се вижда, че с изключение на anti-DFS70, които „доминират“ здравите, при останалите 5 специфични антитела най-високите относителни дялове са на болните със СЛЕ. Освен това - независимо от недостигнатата сигнификантност – се вижда, че с изключение на anti-RibP, тези специфични антитела се установяват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

Табл. 23. Сравнителен анализ на групите на изследване по честотното разпределение на изследваните специфични антитела

специфични антитела	здравни		РПС		болни със СЛЕ	
	n	%	n	%	n	%
anti-DFS70 ($p=0,001$)						
нормални	7	46,7	50	90,9	13	76,5
високи	8	53,3 ^a	5	9,1 ^{bc}	4	23,5 ^{ac}
anti-M2 ($p=0,353$)						
нормални	14	93,3	54	98,2	17	100,0
високи	1	6,7	1	1,8	0	0,0
anti-RibP ($p=0,002$)						
нормални	14	93,3	55	100,0	13	76,5
високи	1	6,7 ^{ac}	0	0,0 ^a	4	23,5 ^{bc}
anti-Nuc ($p<0,001$)						
нормални	15	100,0	48	87,3	8	47,1
високи	0	0,0 ^a	7	12,7 ^a	9	52,9 ^b
anti-PCNA ($p=0,077$)						
нормални	13	86,7	54	98,2	15	88,2
високи	2	13,3	1	1,8	2	11,8

специфични антитела	зdravi		PHC		болни със СЛЕ	
	n	%	n	%	n	%
anti-CENT-B (<i>p</i> =0,172)						
нормални	14	93,3	55	100,0	17	100,0
високи	1	6,7	0	0,0	0	0,0
anti-Jo-1 (<i>p</i> =1,000)						
нормални	15	100,0	53	96,4	17	100,0
високи	0	0,0	2	3,6	0	0,0
anti-PM/Scl (<i>p</i> =0,646)						
нормални	13	86,7	51	92,7	15	88,2
високи	2	13,3	4	7,3	2	11,8
anti-Scl70						
нормални	15	100,0	54	100,0	17	100,0
високи	0	0,0	0	0,0	0	0,0
anti-Ro52 (<i>p</i> =0,001)						
нормални	15	100,0	53	96,4	11	64,7
високи	0	0,0 ^a	2	3,6 ^a	6	35,3 ^b
anti-Ro60 (<i>p</i> =0,021)						
нормални	15	100,0	51	92,7	12	70,6
високи	0	0,0 ^a	4	7,3 ^a	5	29,4 ^b
anti-La (<i>p</i> =0,368)						
нормални	15	100,0	55	100,0	16	94,1
високи	0	0,0	0	0,0	1	5,9
anti-Sm (<i>p</i> <0,001)						
нормални	14	100,0	53	96,4	9	52,9
високи	0	0,0 ^a	2	3,6 ^a	8	47,1 ^b
anti-RNP/Sm (<i>p</i> <0,001)						
нормални	14	100,0	53	96,4	9	52,9
високи	0	0,0 ^a	2	3,6 ^a	8	47,1 ^b

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



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

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

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

- 0 – статистически значимо по-висок относителен дял се наблюдава в групата на РПС спрямо тази на болните със СЛЕ, но не и от тази на здравите, чийто относителен дял не се различава статистически от тези на другите две групи;
- 3 – относителният дял при болните със СЛЕ е статистически достоверно по-висок от тези на останалите две групи, които не се различават статистически помежду си;
- 4 – относителният дял при болните със СЛЕ е статистически достоверно по-висок от този на РПС, но не и от този на здравите, които не се различава статистически от относителните дялове на останалите две групи;

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

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

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

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

На пръв поглед, получените данни за разпределението на специфичните антитела сред трите групи, и особено за разпределението им по брой на един изследван и разпределението според наличие или отсъствие на антитела, изглеждат обратни на очакваното. Предвид фамилната агрегация на заболяването, както и предвид тенденцията за установяване на повече АНА сред РПС би следвало да се очакват и повече специфични антитела. Тук трябва да се обърне внимание на две неща. Първо, и тук е налице тенденция към сигнификантност, най-изявена при anti-dsDNA. Второ, по отношение на наличието на антитела и броя им, наличието на антитялото anti-DFS70 значително повлиява на описаните резултати. А това антитяло, както неколкократно бе споменато, се асоциира в най-голяма степен с повишен титър на АНА при липса на системно заболяване [129]. Т.е., в известен смисъл, наличието на повече специфични антитела при здравите, не е клинично значимо по смисъла за потенциал за развитие на болест. Все пак обаче, намираме тези антитела и при болните, в комбинация с по няколко типични лупусни ААт. Това поставя въпроса за значението на тези антитела, когато са изолирани, и когато са в комбинация с други.

Както и в други проучвания [121], и в нашите резултати сред роднините се срещат anti-dsDNA, anti-Ro52, anti-Ro60, anti-Sm, anti-RNP. Наличието на anti-Ro60 у РПС в нашето проучване е в съгласие и със световния опит, че тези антитела се срещат като цяло по-често сред здрави, и сред РПС [114]. Разбира се, както нееднократно бе отбелязано по-горе, anti-Ro60 са първите по време появяващи се в предклиничната фаза на СЛЕ ААт, т.е. наличието им тук може да бъде и начало на болест.

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

5.1.4. Изследване серумните нива на C₃ и C₄ фракции на комплемента, антикардиолипинови (ACL) и анти-бета-2-гликопротеин-I (anti-β₂-GPI) автоантитела сред здрави, РПС и болни от СЛЕ

Проведеният сравнителен анализ на групите на изследване по честотното разпределение на C₃ и C₄ установи, че относителният дял на ниските им стойности при болните със СЛЕ е статистически достоверно по-висок от тези на останалите две групи, които не се различават статистически помежду си (табл. 25).

Табл. 25. Сравнителен анализ на групите на изследване по честотното разпределение на серумните нива на C₃ и C₄ фракциите на комплемента

комплемент	здравни		РПС		болни със СЛЕ	
	n	%	n	%	n	%
C₃ (<i>p</i>=0,015)						
нормални	15	100,0	19	100,0	13	76,5
ниски	0	0,0 ^a	0	0,0 ^a	4	23,5 ^b
C₄ (<i>p</i><0,001)						
нормални	15	100,0	19	100,0	9	52,9
ниски	0	0,0 ^a	0	0,0 ^a	8	47,1 ^b

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

В литературата липсват данни за изследвания, третиращи промени в нивата на фракциите на комплемента у роднини на болните със системен лупус еритематозус. Този факт буди учудване, предвид че понижените нива на C₃ и C₄ фракциите на комплемента са част от съвременните критерии за СЛЕ. Обяснените може да се търси във факта, че промените в комплемента влизат в класификационните критерии за пръв път едва при създадените от SLICC през 2012 г. критерии (вж. гл. I).

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

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

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

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

Има съобщения за повишени нива на различни антифосфолипидни антитела, при роднини както на болни с първичен антифосфолипиден синдром, така и със СЛЕ [130], но те не са изследвани в цитираните големи проследяващи проучвания, третиращи имунологичните промени с прогностична стойност. На практика в нашите резултати РПС заемат междинно положение по отношение на посочените две антитела, ако и да не се различават формално статистически сигнификантно от другите две групи; възможно достигане на такава сигнификатност може да се очаква при по-голяма извадка. Както нивата на серумния комплемент, така и антифосфолипидните антитела, и то именно aCL и anti-beta-2GPI, са част от актуалните критерии за СЛЕ още от SLICC критериите от 2012 г. насам [5].

5.1.5. Наличие на клинични оплаквания сред групите РПС и здрави

Проведеният сравнителен анализ на здравите и РПС по честотното разпределение на изследваните клинични оплаквания установява наличие на

статистически достоверна разлика при кожните оплаквания (табл. 27), като сигнификантно по-висок относителен дял се наблюдава в групата на РПС спрямо тази на здравите. При останалите клинични оплаквания разликата в честотното разпределение в двете разглеждани групи е статистически нищожна.

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

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

При изследване отношенията на ирелевантни спрямо потенциално релевантни оплаквания сред двете групи се вижда, че няма сигнификантна разлика между тях (табл. 28). В групата на здравите най-високото съотношение (~7:1) И:ПР (ирелевантни спрямо потенциално релевантни) е при ставните клинични

оплаквания, следвано от афтоподобните с 1:1. При останалите оплаквания съотношенията не могат да бъдат изчислени поради липса на една от компонентите. При РПС най-високото съотношение (~6:1) И:ПР отново е при ставните клинични оплаквания, следвано от кожните с ~4:1 и афтоподобните с ~3:1. При останалите оплаквания съотношенията не могат да бъдат изчислени поради липса на една от компонентите. Двете възможни отношения на съотношенията са при афтоподобни и ставни клинични оплаквания: първото е около 1:3, а второто приблизително 1:1. Т.е. при РПС не се откриват („очакваните“) повече потенциално релевантни оплаквания в сравнение с при здравите.

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

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

*И – ирелевантни; ПР – потенциално релевантни

При сравняване средния брой оплаквания у един изследван сред двете групи става ясно, че няма сигнификантна разлика между здравите и групата на РПС (табл. 29). Прави впечатление обаче, че почти половината от здравите нямат никакви оплаквания (спрямо едва 20% от РПС), а по 4 и по 5 оплаквания имат само РПС и нито един от здравите. Напълно възможно е при по-голяма извадка тези разлики да се задълбочат и да достигнат статистическа сигнификантност.

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

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

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

В повечето изследвания, описани в литературата, няма данни за наличие на оплаквания; изключение правят гореописаните две проучвания на Heinlen и сътр. и на Mungoe и сътр. [114, 122]. В първото става въпрос за корелация на оплакванията с налични anti-Ro Ат, а във второто се демонстрира, че броят налични оплаквания у роднините стои във връзка с вероятността за развитие на СЛЕ. Този факт ще бъде разгледан по-подробно в общото обсъждане.

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

Проведеният статистически анализ не установява наличие на сигнификантна зависимост между клиничните оплаквания (като цяло и като брой) и титъра на АНА в трите изследвани групи и цялата извадка (табл. 30-33). Не се установява статистически значима зависимост и между клиничните оплаквания (като цяло и като брой) с покачване на титъра на АНА на $\geq 1:160$ в групата на здравите, РПС и в цялата извадка (табл. 34, 36). Аналогичният анализ при АНА $\geq 1:320$ установява наличие на статистически достоверно различие единствено в цялата извадка: при брой на клиничните оплаквания 5 – по-високият относителен дял е на имащите АНА $\geq 1:320$ (табл. 35, 37).

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

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

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

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

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

група	брой клинични оплаквания	честота	титър на АНА						
			< 1:80	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	> 1:1280
РПС (<i>p=0,447</i>)	0	n	1	3	3	1	0	1	1
		%	14,3	18,8	23,1	14,3	0,0	50,0	25,0
	1	n	3	6	6	3	1	0	0
		%	42,9	37,5	46,2	42,9	50,0	0,0	0,0
	2	n	1	2	3	0	0	0	0
		%	14,3	12,5	23,1	0,0	0,0	0,0	0,0
	3	n	1	4	1	3	0	0	1
		%	14,3	25,0	7,7	42,9	0,0	0,0	25,0
	4	n	1	1	0	0	0	1	1
		%	14,3	6,3	0,0	0,0	0,0	50,0	25,0
	5	n	0	0	0	0	1	0	1
		%	0,0	0,0	0,0	0,0	50,0	0,0	25,0

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

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

Табл. 34. Анализ на зависимосттамежду наличието на клинични оплаквания и АНА $\geq 1:160$

група	клинични оплаквания	честота	АНА ≥ 160	
			не	да
зdrави ($p=1,000$)	не	n	4	4
		%	40,0	50,0
	да	n	6	4
		%	60,0	50,0
РПС ($p=0,726$)	не	n	4	6
		%	16,0	23,1
	да	n	21	20
		%	84,0	76,9
общо ($p=0,592$)	не	n	8	10
		%	22,9	29,4
	да	n	27	24
		%	77,1	70,6

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

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

Табл. 36. Анализ на зависимостта между броя на наличните клинични оплаквания у един изследван и АНА $\geq 1:160$

група	брой клинични оплаквания	честота	АНА $\geq 1:160$		
			не	да	
зdrави ($p=0,898$)	0	n	4	4	
		%	40,0	50,0	
	1	n	4	2	
		%	40,0	25,0	
	2	n	1	1	
		%	10,0	12,5	
	3	n	1	1	
		%	10,0	12,5	
	РПС ($p=0,809$)	0	n	4	6
			%	16,0	23,1
		1	n	11	8
			%	44,0	30,8
2		n	3	3	
		%	12,0	11,5	
3		n	5	5	
		%	20,0	19,2	
4		n	2	2	
		%	8,0	7,7	
5		n	0	2	
		%	0,0	7,7	
цяла извадка ($p=0,749$)	0	n	8	10	
		%	22,9	29,4	
	1	n	15	10	
		%	42,9	29,4	
	2	n	4	4	
		%	11,4	11,8	
	3	n	6	6	
		%	17,1	17,6	
	4	n	2	2	
		%	5,7	5,9	
	5	n	0	2	
		%	0,0	5,9	

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

група	брой клинични опаквания	честота	АНА $\geq 1:320$		<i>p</i>					
			не	да						
зdravi	0	n	6	2	<i>0,412</i>					
		%	40,0	66,7						
	1	n	6	0						
		%	40,0	0,0						
	2	n	2	0						
		%	13,3	0,0						
3	n	1	1							
	%	6,7	33,3							
РПС	0	n	7	3	<i>0,059</i>					
		%	18,9	21,4						
	1	n	16	3						
		%	43,2	21,4						
	2	n	6	0						
		%	16,2	0,0						
	3	n	6	4						
		%	16,2	28,6						
	4	n	2	2						
		%	5,4	14,3						
	5	n	0	2						
		%	0,0	14,3						
цяла извадка (<i>p=0,012</i>)	0	n	13	5	<i>0,722</i>					
		%	25,0	29,4						
	1	n	22	3		<i>0,068</i>				
		%	42,3	17,6						
	2	n	8	0			<i>0,088</i>			
		%	15,4	0,0						
	3	n	7	5				<i>0,136</i>		
		%	13,5	29,4						
	4	n	2	2					<i>0,223</i>	
		%	3,8	11,8						
	5	n	0	2						<i>0,013</i>
		%	0,0	11,8						

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

Проведеният статистически анализ не установява наличие на сигнификантна зависимост между клиничните оплаквания (като цяло и като брой) и типовете имунофлуоресцентно светене в здравите, РПС и цялата извадка (табл. 38, 39).

Табл. 38. Анализ на зависимостта между наличието на клинични оплаквания и типа ИФ светене на АНА при здравите, РПС и цялата извадка

група	клинични оплаквания	честота	тип ИФ светене на АНА			
			АС-1	АС-4	АС-2	АС-0
здрав ($p=0,438$)	не	n		4	0	4
		%		66,7	0,0	40,0
	да	n		2	2	6
		%		33,3	100,0	60,0
РПС ($p=0,405$)	не	n	0	5	1	4
		%	0,0	23,8	50,0	18,2
	да	n	6	16	1	18
		%	100,0	76,2	50,0	81,8
общо ($p=0,435$)	не	n	0	9	1	8
		%	0,0	33,3	25,0	25,0
	да	n	6	18	3	24
		%	100,0	66,7	75,0	75,0

Табл. 39. Анализ на зависимостта между броя на наличните клинични оплаквания у един изследван и типа ИФ светене на АНА при здравите, РПС и цялата извадка

група	брой клинични оплаквания	честота	тип ИФ светене на АНА			
			АС-1	АС-4	АС-2	АС-0
зdrави ($p=0,505$)	0	n		4	0	4
		%		66,7	0,0	40,0
	1	n		1	1	4
		%		16,7	50,0	40,0
	2	n		1	0	1
		%		16,7	0,0	10,0
3	n		0	1	1	
	%		0,0	50,0	10,0	
РПС ($p=0,776$)	0	n	0	5	1	4
		%	0,0	23,8	50,0	18,2
	1	n	2	8	0	9
		%	33,3	38,1	0,0	40,9
	2	n	1	3	0	2
		%	16,7	14,3	0,0	9,1
	3	n	1	3	1	5
		%	16,7	14,3	50,0	22,7
	4	n	1	1	0	2
		%	16,7	4,8	0,0	9,1
	5	n	1	1	0	0
		%	16,7	4,8	0,0	0,0
цяла извадка ($p=0,551$)	0	n	0	9	1	8
		%	0,0	33,3	25,0	25,0
	1	n	2	9	1	13
		%	33,3	33,3	25,0	40,6
	2	n	1	4	0	3
		%	16,7	14,8	0,0	9,4
	3	n	1	3	2	6
		%	16,7	11,1	50,0	18,8
	4	n	1	1	0	2
		%	16,7	3,7	0,0	6,3
	5	n	1	1	0	0
		%	16,7	3,7	0,0	0,0

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

Направеният анализ не показва статистически достоверна зависимост между наличието и/или броя клинични оплаквания и специфичните антитела anti-dsDNA, anti-DFS70, anti-M2, anti-RibP, anti-Nuc, anti-PCNA, anti-CENT-B, anti-Jo1, anti-PM100, anti-Ro52, anti-Ro60, anti-Sm и anti-RNP/Sm. Anti-Scl не участва в анализа, тъй като има само нормални стойности, а anti-La – само една висока, при която няма стойности на променливата, отразяваща наличието на клинични оплаквания. Предвид негативния резултат, за да не се натоваарва изложението, тук представяме таблица с данните само за anti-PCNA (табл. 40).

Табл. 40. Анализ на зависимостта между наличието на клинични оплаквания и anti-PCNA при здравите, РПС и цялата извадка

група	клинични оплаквания	честота	anti-PCNA	
			нормални	високи
здрав (<i>p=1,000</i>)	не	n	4	1
		%	30,8	50,0
	да	n	9	1
		%	69,2	50,0
РПС (<i>p=1,000</i>)	не	n	10	0
		%	20,4	0,0
	да	n	39	1
		%	79,6	100,0
общо (<i>p=0,551</i>)	не	n	14	1
		%	22,6	33,3
	да	n	48	2
		%	77,4	66,7

Проведеният статистически анализ на зависимостта между наличието на клинични оплаквания и броя специфични антитела при здравите, РПС и цялата извадка не установява наличие на сигнификантна такава (табл. 41). Не се установява статистически значима зависимост също така между броя на наличните клинични оплаквания и броя специфични антитела в контролната група, РПС и цялата извадка (табл. 42).

Табл. 41. Анализ на зависимостта между наличието на клинични оплаквания и броя специфични антитела при здравите, РПС и цялата извадка

група	клинични оплаквания	честота	брой специфични антитела		
			0	1	2
здравни <i>(p=0,500)</i>	не	n	3	1	1
		%	60,0	20,0	20,0
	да	n	2	4	4
		%	40,0	80,0	80,0
РПС <i>(p=0,495)</i>	не	n	8	2	0
		%	24,2	20,0	0,0
	да	n	25	8	7
		%	75,8	80,0	100,0
общо <i>(p=0,359)</i>	не	n	11	3	1
		%	28,9	20,0	8,3
	да	n	27	12	11
		%	71,1	80,0	91,7

Табл. 42. Анализ на зависимостта между броя на наличните клинични оплаквания и броя специфични антитела в контролната група, РПС и цялата извадка

група	брой клинични оплаквания	честота	брой специфични антитела		
			0	1	2
зdrави (<i>p</i> =0,250)	0	n	3	1	1
		%	60,0	20,0	20,0
	1	n	1	4	1
		%	20,0	80,0	20,0
	2	n	1	0	1
		%	20,0	0,0	20,0
3	n	0	0	2	
	%	0,0	0,0	40,0	
РПС (<i>p</i> =0,566)	0	n	8	2	0
		%	24,2	20,0	0,0
	1	n	11	5	2
		%	33,3	50,0	28,6
	2	n	4	0	2
		%	12,1	0,0	28,6
	3	n	7	2	1
		%	21,2	20,0	14,3
	4	n	2	1	1
		%	6,1	10,0	14,3
	5	n	1	0	1
		%	3,0	0,0	14,3
цяла извадка (<i>p</i> =0,344)	0	n	11	3	1
		%	28,9	20,0	8,3
	1	n	12	9	3
		%	31,6	60,0	25,0
	2	n	5	0	3
		%	13,2	0,0	25,0
	3	n	7	2	3
		%	18,4	13,3	25,0
	4	n	2	1	1
		%	5,3	6,7	8,3
	5	n	1	0	1
		%	2,6	0,0	8,3

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

Наличието и/или броя кл. оплаквания не корелират статистически достоверно, както с категорийните показатели EBV-позитивност (т.е. наличие повишени IgM или IgG антитела срещу EBV) и понижени стойности на витамин Д (т.е. стойности на 25-OH vitamin D3/D2 < 20 ng/ml), така и с количествените показатели нива на VLys, TGF- β , anti-EBV (VCA) IgM и IgG. Предвид негативните резултати и за да не се натоварва изложението, са представени само по една таблица за категорийна променлива (антителна позитивност за EBV, табл. 43) и една за количествена такава (табл. 44).

Табл. 43. Анализ на зависимостта между наличието на клинични оплаквания и антителна позитивност по EBV при здравите, РПС и цялата извадка

група	клинични оплаквания	честота	EBV позитивност	
			не	да
зdrави	не	n		8
		%		44,4
	да	n		10
		%		55,6
РПС (<i>p=0,548</i>)	не	n	1	9
		%	33,3	22,0
	да	n	2	32
		%	66,7	78,0
общо (<i>p=1,000</i>)	не	n	1	17
		%	33,3	28,8
	да	n	2	42
		%	66,7	71,2

Табл. 44. Сравнителен анализ на нивата на ВLys според наличието на клинични оплаквания при здравите и РПС

група	клинични оплаквания	ВLys		
		n	\bar{X}	SD
контроли	не	4	227,00	126,63
	да	9	238,22	117,90
РПС	не	10	192,90 ^a	156,29
	да	37	272,97 ^a	207,18
общо	не	14	202,64 ^a	144,45
	да	46	266,17 ^a	192,36

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

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

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

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

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

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

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

Данните в литературния обзор относно тютюнопушенето, естрогенния прием и нивата на витамин Д насочват към разбирането, че това все още са кандидат-рискови фактори, за които липсват достатъчно данни относно ролята им в етиопатогенезата на заболяването. Както бе споменато, понижена концентрация на витамина се установява при болни от СЛЕ преди и след поставянето на диагнозата [20]. Липсата на каквито и да е сигнификантни разлики в нивата на витамина в нашето изследване биха могли да се дължат на сравнително неголямата извадка.

5.1.11. Изследване на COVID 19 статуса сред трите групи изследваните

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

Табл. 46. COVID 19 статус на участниците.

	зdrави (n=20)	РПС (n=56)	СЛЕ (n=17)
боледували от COVID 19, n (%)	0 (0%)	4 (7,4%)	0 (0%)

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

показател	групи	n	\bar{X}	SD
IL-10	зdrави	11	9,98 ^a	11,95
	РПС	37	7,29 ^a	6,77
	болни със СЛЕ	4	5,62	0,00
TNF- α	зdrави	11	7,35 ^a	0,00
	РПС	37	6,95 ^a	1,68
	болни със СЛЕ	4	7,35	0,00
IL-6	зdrави	11	0,23 ^a	0,00
	РПС	37	0,35 ^a	0,56
	болни със СЛЕ	4	0,23	0,00
IL-8	зdrави	11	26,09 ^a	86,53
	РПС	37	2,52 ^a	15,31
	болни със СЛЕ	4	0,00	0,00
BLys	зdrави	15	80,67 ^a	65,65
	РПС	51	86,42 ^a	69,61
	болни със СЛЕ	17	902,00 ^b	2398,54
IFN- α	зdrави	15	4,27 ^a	7,32
	РПС	42	9,55 ^a	15,70
	болни със СЛЕ	15	14,29 ^a	19,66
APRIL	зdrави	15	0,67 ^a	2,58
	РПС	42	106,59 ^a	466,18
	болни със СЛЕ	15	1,63 ^a	6,30

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

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

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

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

Изследваните цитокини TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10, APRIL и IFN- α са налични в детектируеми нива в едва 10% от всички изследвани лица и съответно статистически връзки не са открити с който и да е от останалите изследвани показатели или клинични оплаквания. Вероятно при по-голяма извадка изследвани лица биха могли да се открият описаните в литературата зависимости, а именно IL-10 да бъде с по-ниски нива у някои РПС с потенциал за развитие на заболяване, а IL-6 и APRIL да са с по-високи нива при тази подгрупа [122]; или пък IFN- α и IL-8 да са с по-високи нива при болните от СЛЕ в сравнение с останалите [124, 125].

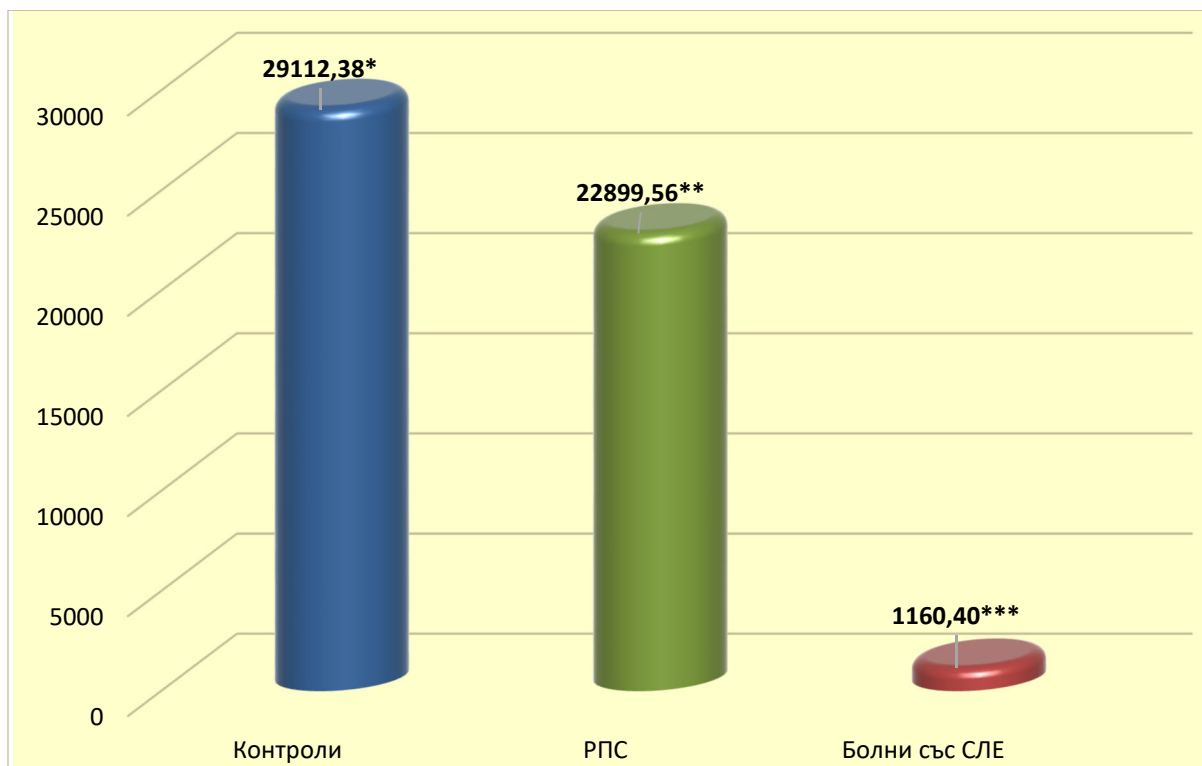
Налице и сигнификантна разлика в нивата на BLys между лупусно болните от дне страна и здравите и РПС от друга (табл. 47). Представената зависимост е напълно закономерна и съответства на досегашните проучвания. Както споменахме по-горе обаче, според литературата групата на РПС е по-хетерогенна по отношение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

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

Табл. 48. Сравнителен анализ на групите на изследване по показателя TGF- β

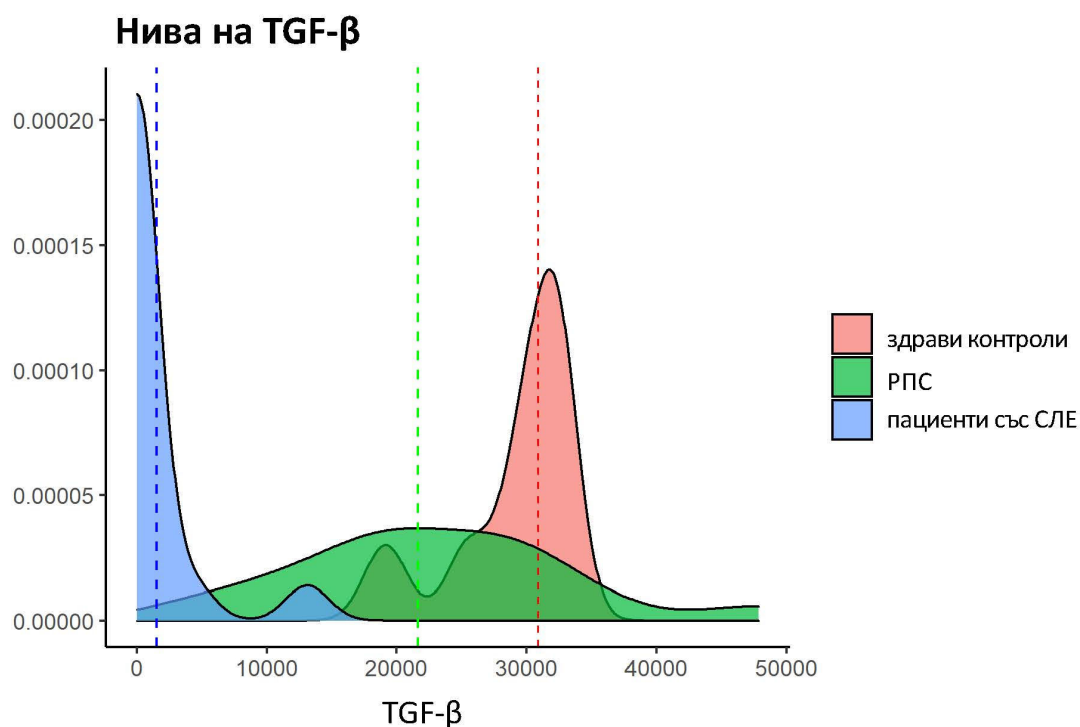
показател	групи	n	\bar{X}	SD
TGF- β	здравни	8	29112,38 ^a	4663,15
	РПС	16	22899,56 ^b	10637,79
	болни със СЛЕ	15	1160,40 ^c	3487,62

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



Фиг. 9. Сравнителен анализ на изследваните групи по показателя TGF-β

TGF-β е регулаторен цитокин с много ниски нива при лупусно болните, нормални нива в АНА-негативните здрави и повишени у АНА-позитивните здрави [100]. Това е израз на работещи регулаторни механизми в имунната система: здравите с нормални АНА не са застрашени от автоимунитет и TGF-β няма причина да е повишен. В повишени нива той е необходим само при тези с белези на автоимунитет – АНА-позитивните. При роднини на болни понижените му нива са самостоятелен предикторен фактор за развитие на СЛЕ [122]. Ето защо, бихме очаквали и нашата извадка на роднини да съдържа такива с високи стойности на TGF-β, които ще останат здрави и такива с ниски стойности, които са с потенциал да се разболеят. И вероятно при достатъчно голяма извадка биха се открили съответни подгрупи с различни нива на цитокина; така настоящата междинна стойност вероятно отразява такава вътрешна нехомогенност (фиг. 10).



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

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

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

Сравнителният анализ на групите на изследване по нивата на anti-EBV (VCA) IgM и anti-EBV (VCA) IgG антителата не установява статистически значими разлики между групите (табл. 49). Трите групи на изследване не се различават статистически и по наличие на позитивност по EBV, т.е. по наличие на повишени нива на антитела от който и да е клас (табл. 50).

Табл. 49. Сравнителен анализ на групите на изследване по показателите anti-EBV (VCA) IgM и anti-EBV (VCA) IgG

показател	групи	n	\bar{X}	SD
anti-EBV IgM	контроли	15	3,41 ^a	3,20
	РПС	36	4,26 ^a	4,06
	болни със СЛЕ	15	5,05 ^a	4,91
anti-EBV IgG	контроли	20	247,29 ^a	148,50
	РПС	48	279,03 ^a	146,37
	болни със СЛЕ	15	355,59 ^a	64,36

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

Табл. 50. Сравнителен анализ на групите на изследване по честотното разпределение на позитивността по EBV (VCA) от който и да е клас антитела

позитивност EBV ($p=1,000$)	по	контроли		РПС		болни със СЛЕ	
		n	%	n	%	n	%
не		1	5,0	3	6,3	0	0,0
да		19	95,0	45	93,8	15	100,0

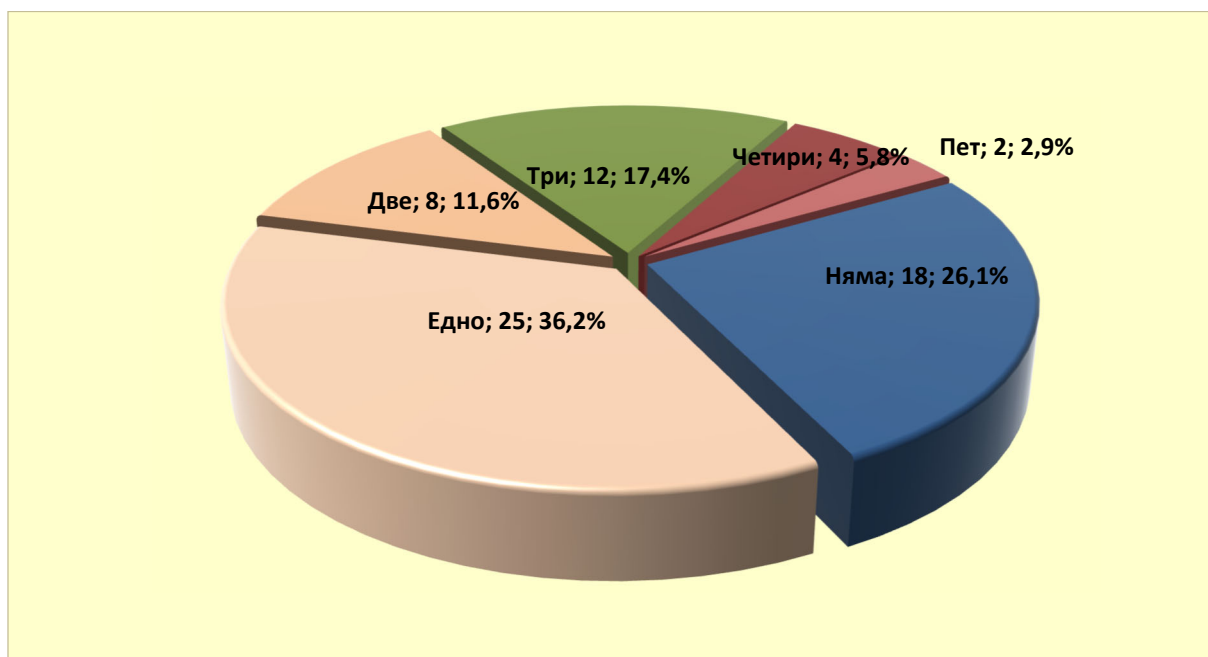
Известно е, че вирусът на Epstein-Barr е с убиквитерно разпространение и че 100% от лупусно болните имат налични антитела срещу него, за разлика от около 70% от здравите [24, 25]. В нашите данни наистина абсолютно всички болни са с повишени антитела поне от един клас, докато при другите две групи се срещат и изследване без никакви антитела, без обаче да се достига сигнификантност. Тук, разбира се, не бива да се пренебрегва възможността за флукутации в хода на времето на антителата срещу вируса и шансът настоящата находка да е случайна. Освен това, динамиката на сероконверсия спрямо вируса е сложна и различните антитела са отражение на различни процеси; anti-VCA антителата обаче се асоциират с АНА позитивност дори при здрави, което може да е обяснение за нашите резултати [39]. Необходими са по-големи извадки изследвани с по-комплексна оценка на състоянието на инфектираност с EBV и серологичния профил на изследваните лица.

5.1.14. Изследване на конкретни или комплексни зависимости между изследваните променливи

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

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

На фиг. 11 се вижда, че според наличните данни за 69 от участниците (здравни и РПС) в проучването с най-голям относителен дял (36,2%) са имащите едно клинично оплакване, следвани от тези при които няма такива с 26,1%. Най-малко са имащите 5 клинични оплаквания – 2,9%. Ако приемем, че по-голям брой оплаквания е над две, тогава отговарящите на това условие са 18 или 26,1% от изследваните.

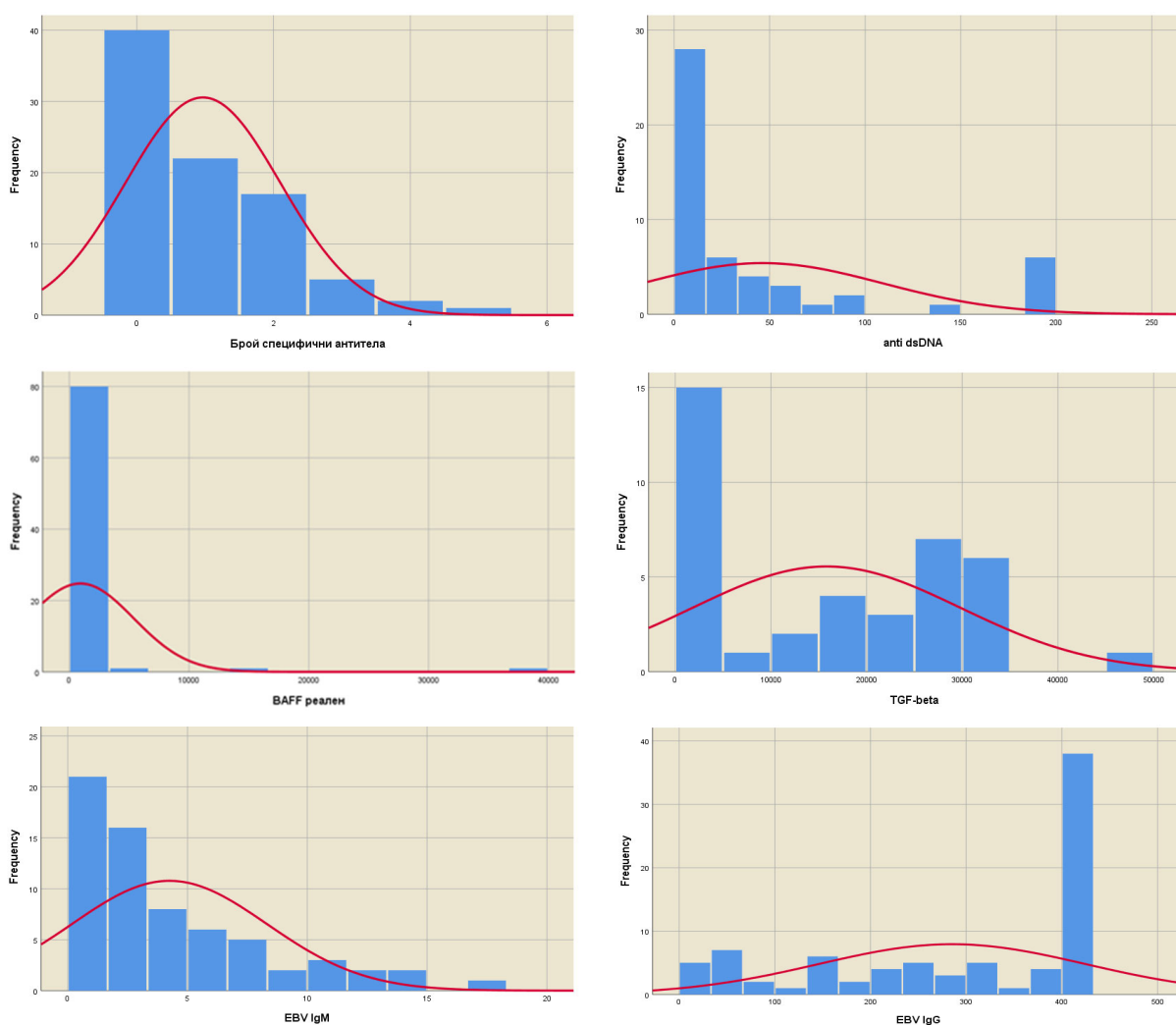


Фиг. 11. Честотно разпределение на участниците в проучването по брой на клиничните оплаквания (налични данни за 69 от тях).

За да се определи кои от изследваните показатели са във връзка с по-голям брой клинични оплаквания е приложен бинарен логистичен регресионен анализ. Изследвани са следните показатели - *количествени*: брой специфични антитела, VLys, TGF- β , anti-EBV IgM и IgG и *категорийни*: АНА \geq 1:160, АНА \geq 1:320, тип имунофлуоресцентно светене, повишени/нормални специфични антитела

anti-dsDNA, anti-DFS70, anti-M2, anti-RibP, anti-Nuc, anti-PCNA, anti-CENT-B, anti-Jo1, anti-PM100, anti-Ro52, anti-Ro60, anti-Sm, anti-Sm/RNP, EBV-позитивност, витамин D3/D2 < 20 ng/ml.

За да участват директно в бинарен логистичен регресионен анализ *количествените* показатели трябва да имат нормално разпределение. Тъй като нито един от тях няма такава, е приложен ROC curve анализ за определяне при възможност на прагова стойност, разделяща имащите малък и по-голям брой клинични оплаквания. За нито един от количествените признаци не са установява статистически достоверна прагова стойност (фиг. 12).



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

При *категорийните* показатели единственият, при който отношението на шансовете (*odds ratio, OR*) е със сигнификантен характер ($p=0,006$) е АНА \geq 1:320 – OR = 5,375 при 95% доверителен интервал (ДИ 1,630 – 17,721).

Това означава, че шансът за наличие на повече от 2 клинични оплаквания при имащите АНА титър $\geq 1:320$ е около 5,4 пъти по-висок спрямо имащите по-нисък такъв.

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

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

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

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

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

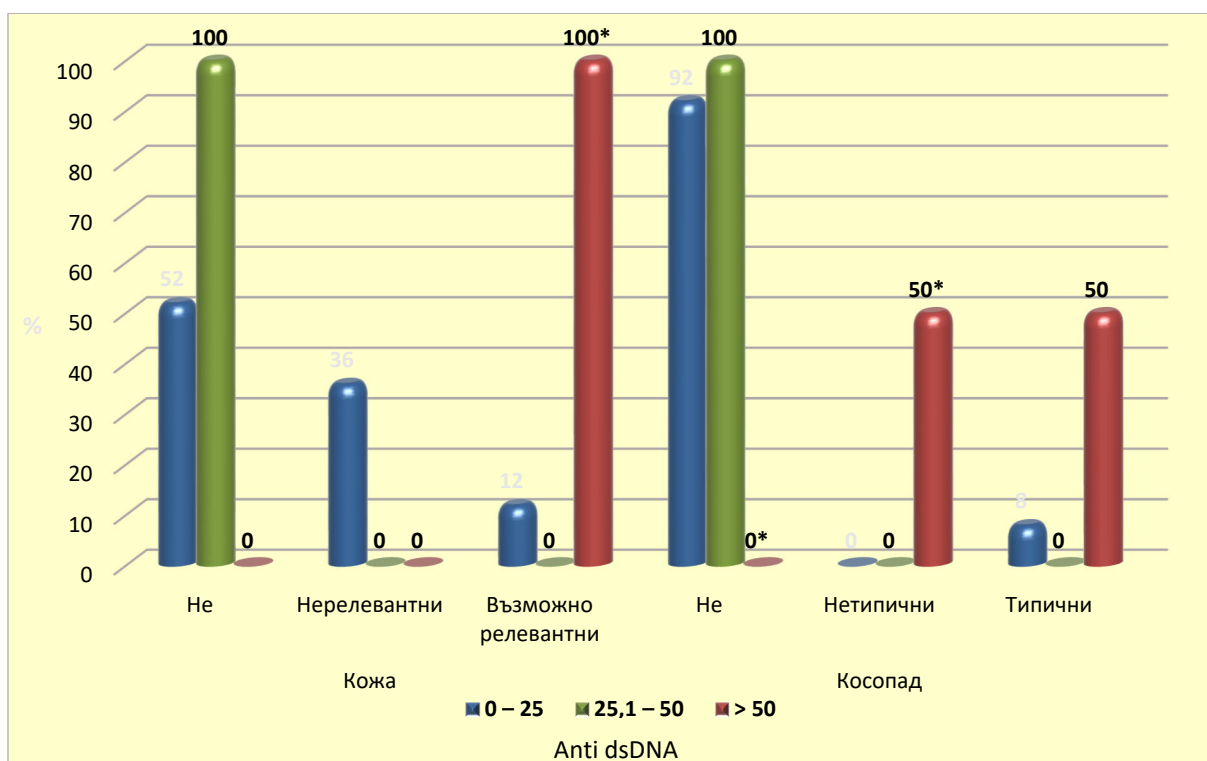
- възможно релевантните кожни оплаквания са статистически достоверно свързани със значимо повишените стойности на anti-dsDNA;
 - липсата на косопад е сигнификантно свързана с по-ниските стойности на anti-dsDNA, докато ирелевантния косопад – със значимо повишените.
- При потенциално релевантния косопад разликата в честотното разпределение на

anti-dsDNA е статистически нищожна, но това може да се дължи и на малкия брой случаи - само три.

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

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

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



Фиг. 11. Анализ на зависимостта между клиничните кожни оплаквания и косопادا, и специфичните антитела anti-dsDNA в групата на РПС

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

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

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

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

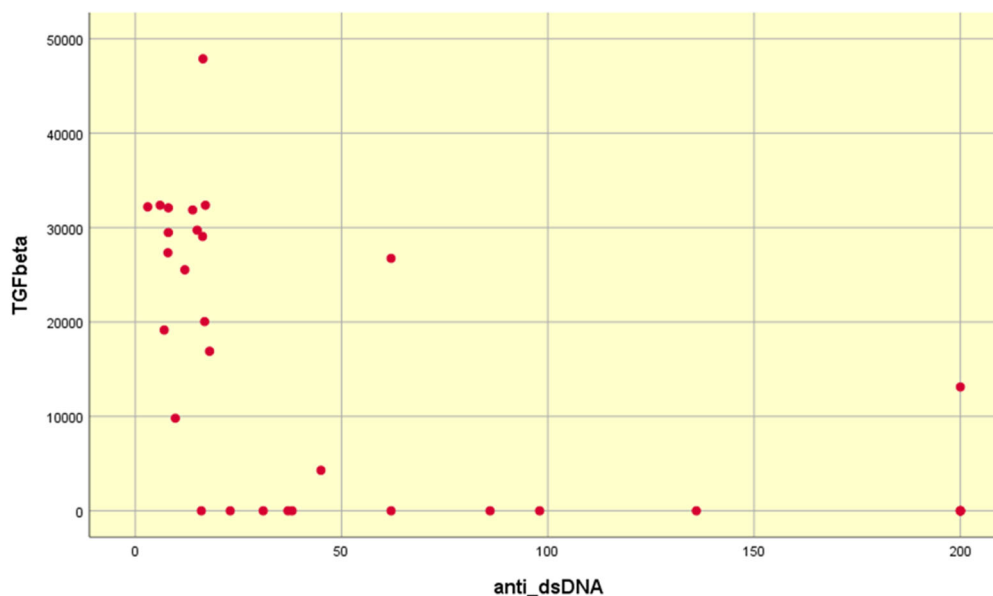
групи	показатели	TGF-β, <i>r</i>
здравни	anti-dsDNA	0,024
	anti-EBV IgM	0,120
	anti-EBV IgG	0,024
	BLys	-0,286
	витамин D2/D3	0,595
РПС	anti-dsDNA	-0,143
	anti-EBV IgM	0,286
	anti-EBV IgG	0,280
	BLys	-0,153
	витамин D2/D3	-0,659**
болни със СЛЕ	anti-dsDNA	0,160
	anti-EBV IgM	0,073
	anti-EBV IgG	-0,020
	BLys	0,187
	витамин D2/D3	-0,392
РПС + болни със СЛЕ	anti-dsDNA	-0,580**
	anti-EBV IgM	0,008
	anti-EBV IgG	-0,198
	BLys	-0,267
	витамин D2/D3	-0,051
цяла извадка	anti-dsDNA	-0,710***
	anti-EBV IgM	0,186
	anti-EBV IgG	-0,098
	BLys	-0,203
	витамин D2/D3	-0,006

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

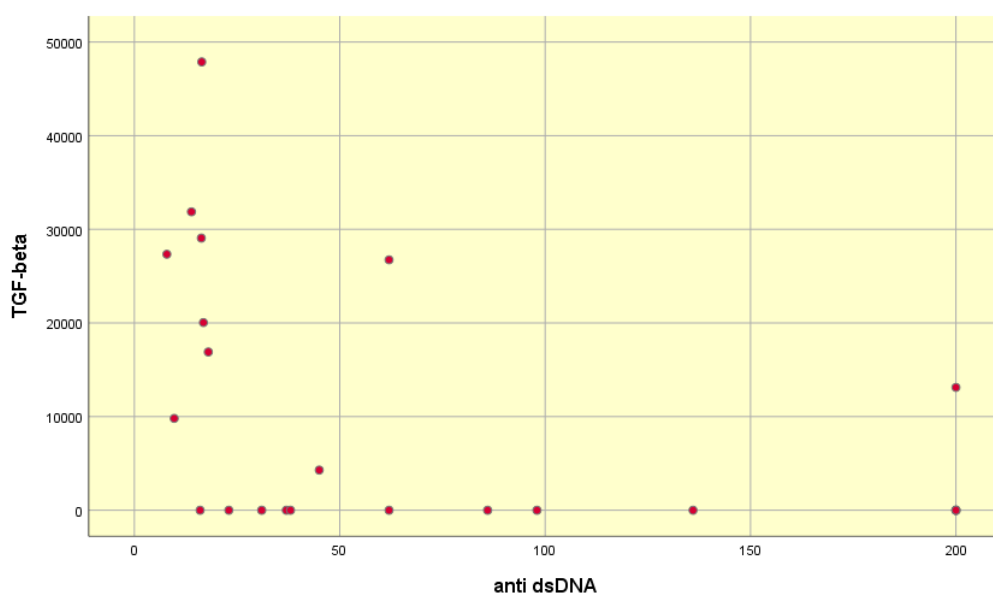
r – сила на връзката: $< 0,3$ - слаба; $0,3 - 0,499$ – умерена; $0,5 - 0,699$ – изразена; $0,7 - 0,9$ – силна; $> 0,9$ – много силна.

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

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



Фиг. 12. Диаграма на разсейване между показателите TGF- β и anti-dsDNA (цяла извадка)



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

Сигнификантна обратнопропорционална зависимост на TGF- β се наблюдава и с *категорийните* показатели титър на АНА, anti-dsDNA (< 25, 25,1 – 50 и > 50), anti-Nuc, anti-Sm и anti-RNP/Sm (цяла извадка и сборната група РПС + болни със СЛЕ). Освен това, в цялата извадка средната стойност на TGF- β е статистически значимо по-ниска при тип светене АС-1 спрямо тези на АС-4 и АС-0, които не се различават статистически помежду си. В сборната група РПС + болни със СЛЕ средната стойност на TGF- β е сигнификантно по-ниска при АС-1 спрямо тази на АС-4 (табл. 54 и 55, фиг. 16-18).

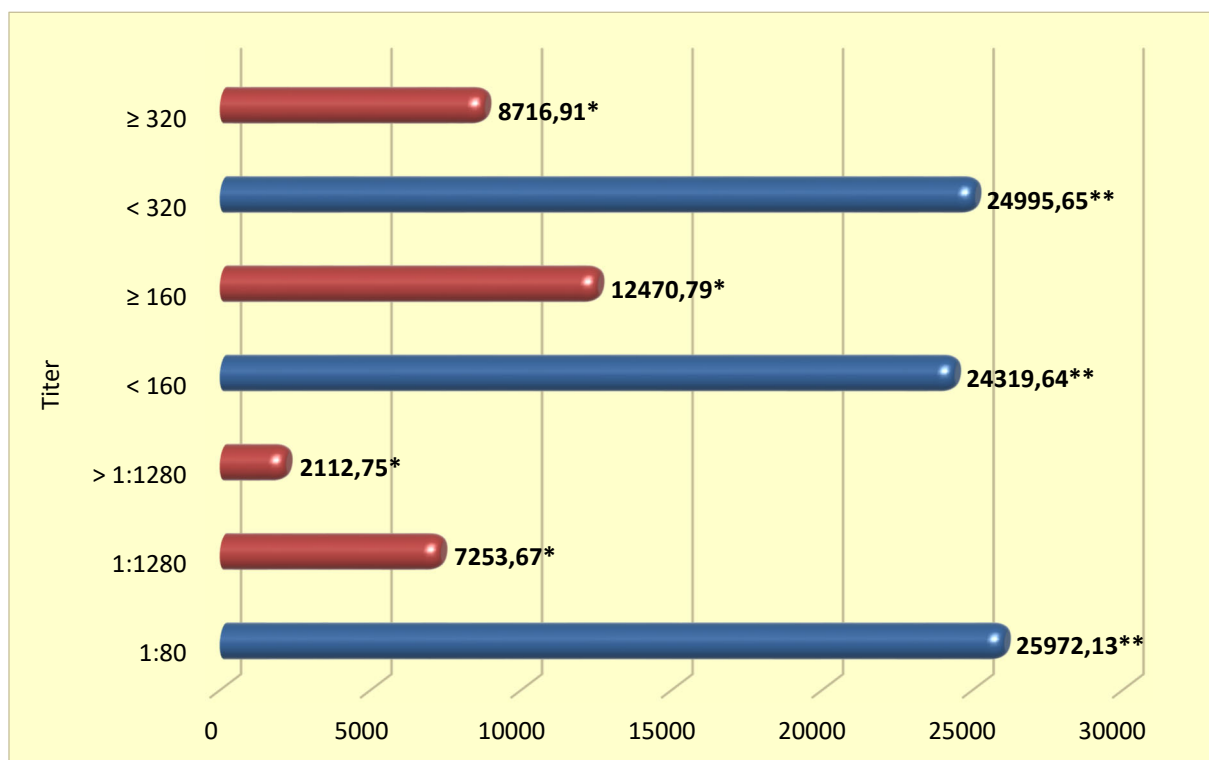
Табл. 54. Анализ на зависимостта между TGF- β и показателите титър на АНА, anti-dsDNA, anti-Nuc, anti-Sm и anti-Sm/RNP (цяла извадка)

показател	TGF- β		
	n	\bar{X}	SD
титър на АНА			
< 1:80	2	20472,00	12150,92
1:80	8	25972,13 ^a	9764,59
1:160	7	25172,14	6731,72
1:320	4	20712,00	9206,59
1:640	1	26739,00	.
1:1280	9	7253,67 ^b	15847,53
> 1:1280	8	2112,75 ^b	5975,76
титър на АНА ($p=0,012$)			
< 1:160	11	24319,64 ^a	9471,28
\geq 1:160	28	12470,79 ^b	14211,50
титър на АНА ($p<0,001$)			
< 1:320	17	24995,65 ^a	8425,21
\geq 1:320	22	8716,91 ^b	13419,81
тип ИФ светене			
АС-1	18	5314,50 ^a	10518,55
АС-4	11	24960,00 ^b	10339,04
АС-2	1	32370,00	.
АС-0	9	23789,67 ^b	9734,15

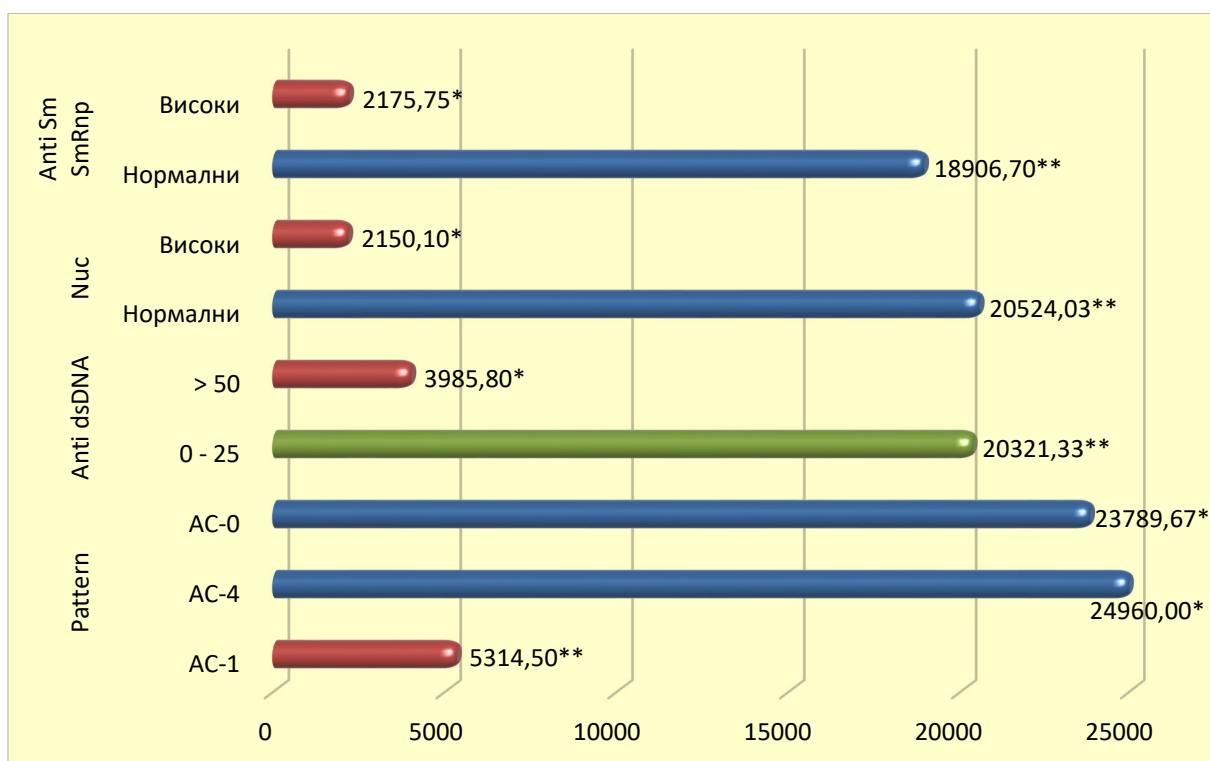
показател	TGF- β		
	n	\bar{X}	SD
anti-dsDNA			
0 - 25	17	24458,29 ^a	15678,81
25,1 - 50	4	1071,75	2143,50
> 50	10	3985,80 ^b	8995,16
anti-Nuc ($p < 0,001$)			
нормални	29	20524,03 ^a	13076,05
високи	10	2150,10 ^b	4229,87
anti-Sm ($p = 0,003$)			
нормални	30	18906,70 ^a	13475,91
високи	8	2175,75 ^b	4669,28
anti-RNP/Sm ($p = 0,003$)			
нормални	30	18906,70 ^a	13475,91
високи	8	2175,75 ^b	4669,28

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

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



Фиг. 16. Анализ на зависимостта между TGF- β и титър на АНА (цяла извадка)



Фиг. 17. Анализ на зависимостта между TGF-β и показателите тип светене на АНА, anti-dsDNA, anti-Nuc, anti-Sm и anti-RNP/Sm (цяла извадка)

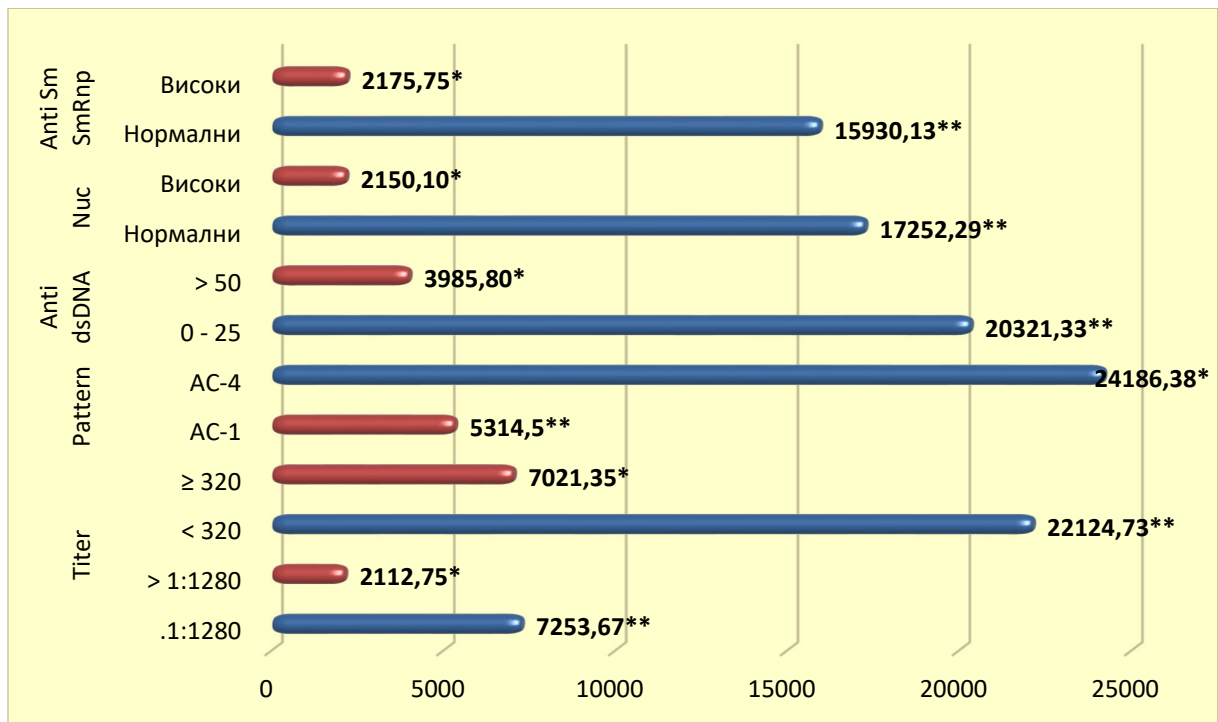
Табл. 55. Анализ на зависимостта между TGF-β и показателите титър и тип светене на АНА, anti-dsDNA, anti-Nuc, anti-Sm и anti-RNP/Sm (РПС + болни със СЛЕ)

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

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

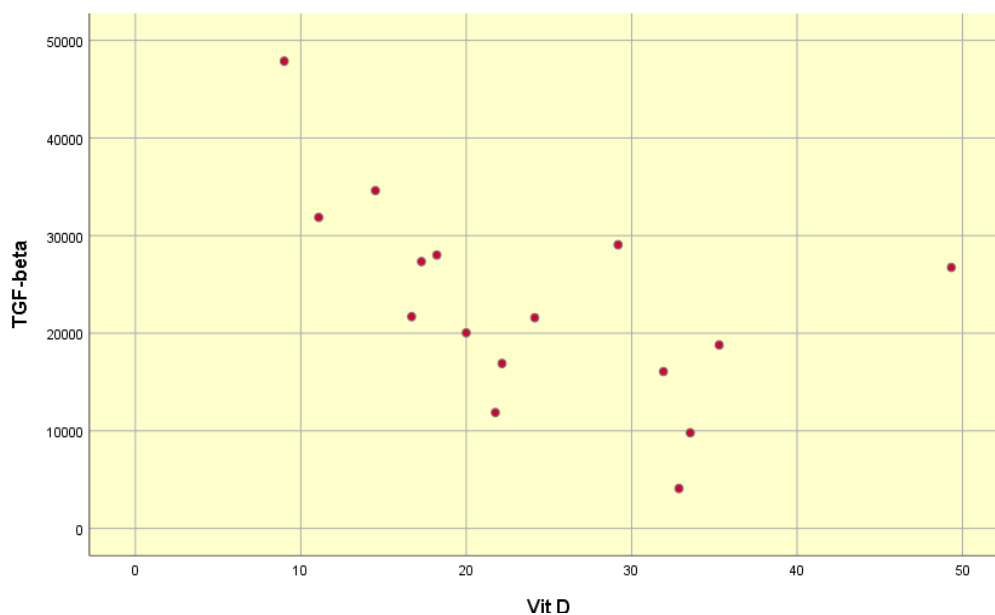
* еднаквите букви по вертикалите означават липса на сигнификантна разлика, а различните – наличие на такава ($p < 0,05$)

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



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

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



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

Описаните взаимовръзки на TGF- β с останалите показатели са с много голямо значение. На първо място, те са напълно в съгласие с фундаменталната имунопатогенетична и биомедицинска логика, според която недостатъчната регулация в имунната система води до условия за образуване на антинуклеарни антитела. Второ, те са в съгласие и с натрупания емпиричен материал, най-вече многократно цитираното проучване на Munroe и сътр. [122], извеждащо TGF- β като самостоятелен предиктор за развитие на заболяване. Трето, тези резултати насочват към разбирането, че като белези на *недостатъчност на имунна регулация* биха могли да се обсъждат АНА $\geq 1:320$, тип светене АС-1, наличието на позитивни anti-dsDNA ≥ 50 , повишените стойности на anti-Nuc, anti-Sm и anti-RNP/Sm. Това има голямо значение предвид факта, че TGF- β не е рутинно изследван показател. Не трябва да се забравя, че в споменатото проучване повишените АНА не са предикторен фактор за развитие на *болест*, т.е. не следва по-вторичният показател, АНА, да се приема за „еквивалент“ на TGF- β ; известно е, че имунопатогенезата на СЛЕ е комплексна и многопластова, на първо място налице са и силно завишени провъзпалителни цитокинови нива (напр. SCF, „движените“ от IFN цитокини MCP-1 и MCP-3, VLyS и др.). Не на последно място, трябва да се подчертае, че тези резултати затвърждават значението на имунофлуоресцентните образи, в случая на АС-1, като надежден показател. Доколкото ни е известно, нашето проучване е първото, което срявнява светенията по ICAP сред болни, роднини и здрави.

И докато коментираните взаимовръзки са асоциативни и за посоката им говорят само фундаментално научните данни, то внимание заслужават данните от корелационния анализ на връзката между TGF- β с anti-dsDNA и с витамин D2/D3. Силно изразена корелация се наблюдава между регулаторния цитокин и лупусното антитяло, като тази зависимост е налична в цялата извадка и е коментирана по-горе. Особено интересна е зависимостта между витамин D2/D3 и TGF- β *само сред роднините*. При потвърждаване на такава връзка във фундаментални и по-мощни изследвания, това би означавало, че *склонните към аутоимунитет индивиди*, според концепцията на Harel и Schoenfeld [127], наистина следва да приемат витамин Д като една от профилактичните мерки с цел превенция на развитие на заболяване. Възможността TGF- β да бъде повлиян от фактор на средата – в случая витамин D2/D3 – и то само при роднините на болните, навежда към разбирането, че съществуват групи лица с двойк потенциал – и към развитие на заболяване, и към това да останат клинично здрави; и че роднините на болните, със своя специфичен имунологичен терен, са представител на този тип лица.

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

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

Сигнификантна зависимост на anti-EBV IgM се наблюдава с категорийните показатели титър на АНА (в цялата извадка), титър и тип ИФ светене на АНА (сборна група РПС + болни със СЛЕ) (табл. 56, фиг. 20):

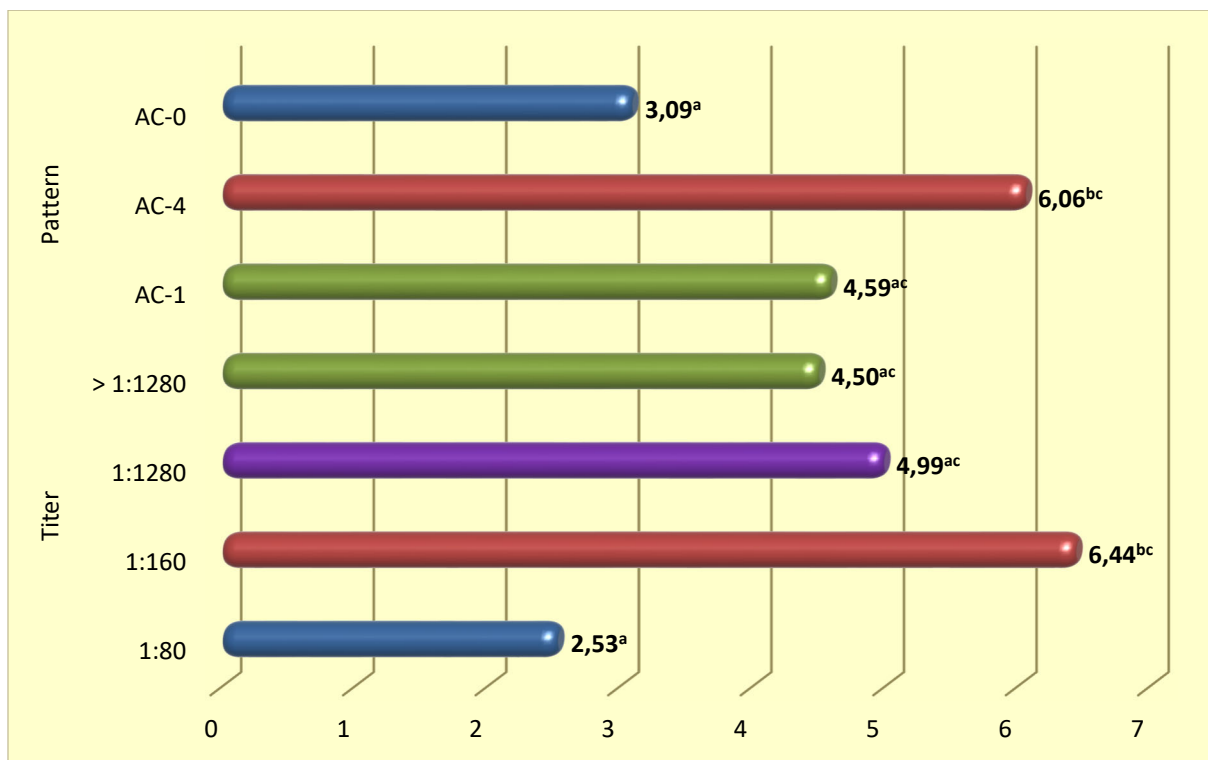
- При титър 1:160 средната стойност на anti-EBV IgM е статистически значимо по-висока от тази на 1:80, но не и от тези на 1:1280 и $>1:1280$, които не се различават статистически, както помежду си, така и от тази на 1:80. Това се наблюдава в цялата извадка и сборна група РПС + болни със СЛЕ;
- в цялата извадка при титър на АНА $< 1:160$ средната стойност на anti-EBV IgM е статистически достоверно по-ниска от тази при АНА ≥ 160 ;
- в сборната група РПС + болни със СЛЕ средната стойност на anti-EBV IgM при светене АС-4 е статистически значимо по-висока от тази на АС-0, но не и от тази на АС-1, която не се различава статистически от тези на всички останали.

Табл. 56. Анализ на зависимостта между anti-EBV IgM и титър и тип ИФ светене на АНА (цяла извадка, РПС + болни със СЛЕ)

групи	показател	anti-EBV IgM		
		n	\bar{X}	SD
титър на АНА				
цяла извадка	< 1:80	3	6,33	6,91
	1:80	24	2,69 ^a	3,23
	1:160	13	5,83 ^{bc}	4,08
	1:320	6	4,62	3,95
	1:640	2	3,60	2,69
	1:1280	10	4,99 ^{ac}	5,34
	> 1:1280	8	4,50 ^{ac}	3,55
	титър на АНА ($p=0,023$)			
	< 160	29	3,13 ^a	3,68
	\geq 160	37	5,12 ^b	4,19
титър на АНА				
РПС + болни със СЛЕ	< 1:80	3	6,33	6,91
	1:80	15	2,53 ^a	3,06
	1:160	10	6,44 ^{bc}	4,42
	1:320	3	4,91	5,25
	1:640	2	3,60	2,69
	1:1280	10	4,99 ^{ac}	5,34
	> 1:1280	8	4,50 ^{ac}	3,55
тип ИФ светене				
	АС-1	20	4,59 ^{ac}	4,41
	АС-4	14	6,06 ^{bc}	4,13
	АС-0	17	3,09 ^a	4,04

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

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



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

Статистически достоверна зависимост на anti-EBV IgG се наблюдава с категорийните показатели титър и тип ИФ светене на АНА, anti-Sm, anti-RNP/Sm и витамин D2/D3 < 20 ng/ml (цяла извадка), и титър и тип ИФ светене на АНА, anti-Sm и anti-RNP/Sm (сборна група РПС + болни със СЛЕ) (табл. 57, фиг. 21 и 22):

- в извадката като цяло, при титър на АНА 1:80 средната стойност на anti-EBV IgG е статистически значимо по-ниска от при титри 1:160 и 1:1280 (които не се различават статистически помежду си), но не и от тази при >1:1280, която не се различава статистически от тези на останалите категории имащи статистическа представителност;
- в сборната група РПС + болни със СЛЕ, при титър 1:80 средната стойност на anti-EBV IgG е статистически достоверно по-ниска от тази при титър 1:1280, но не и от тези при титри 1:160 и >1:1280, които не се различават статистически помежду си, и от тази на 1:1280, която не се различава сигнификантно от тези на останалите категории имащи статистическа представителност;
- в извадката като цяло и в сборната група РПС + болни със СЛЕ средната стойност на anti-EBV IgG е статистически достоверно по-малка при титър < 1:160 спрямо по-големите титри, при AC-0 спрямо AC-1 и AC-4 (които не се различават статистически помежду си), при нормалните anti-Sm и anti-Sm/RNP спрямо високите;

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

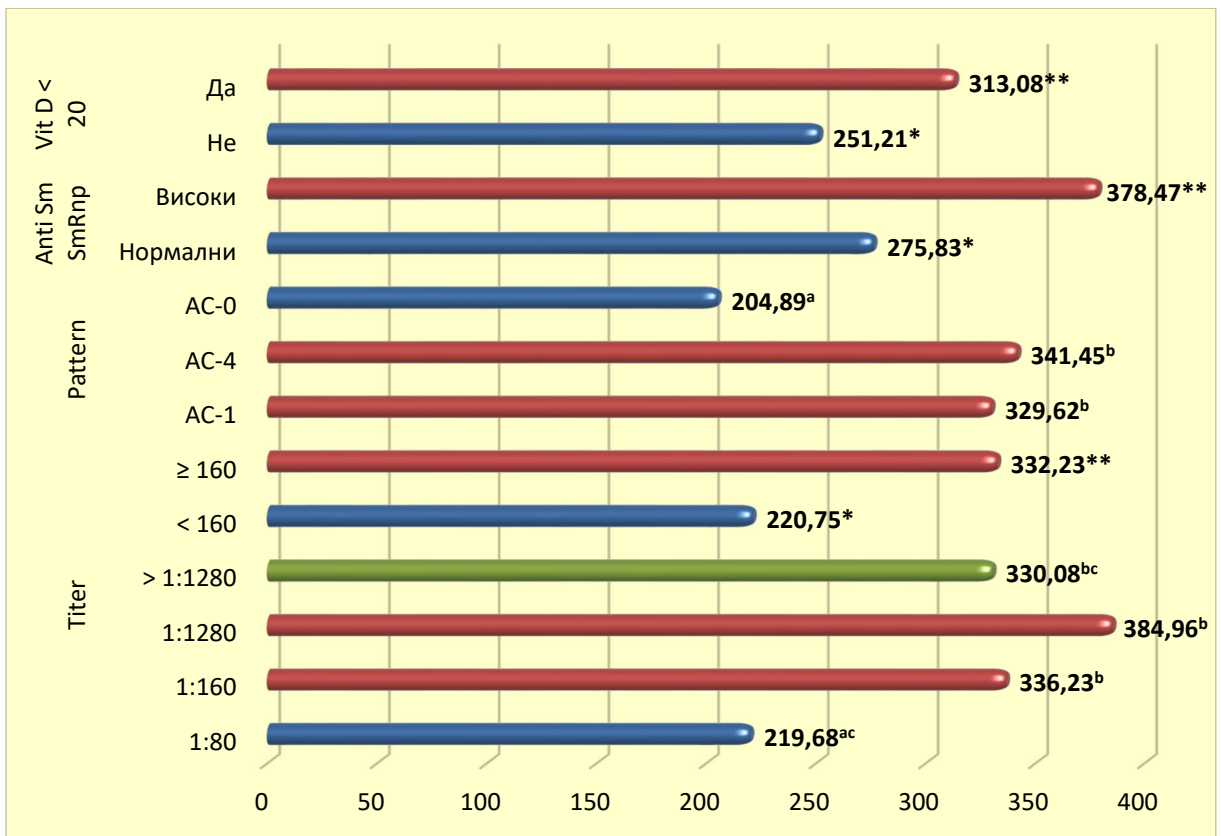
Табл. 57. Анализ на зависимостта между anti-EBV IgG и показателите титър и тип ИФ светене на АНА, anti-Sm и anti-Sm/RNP и витамин D2/D3 < 20 ng/ml (цяла извадка, РПС + болни със СЛЕ)

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

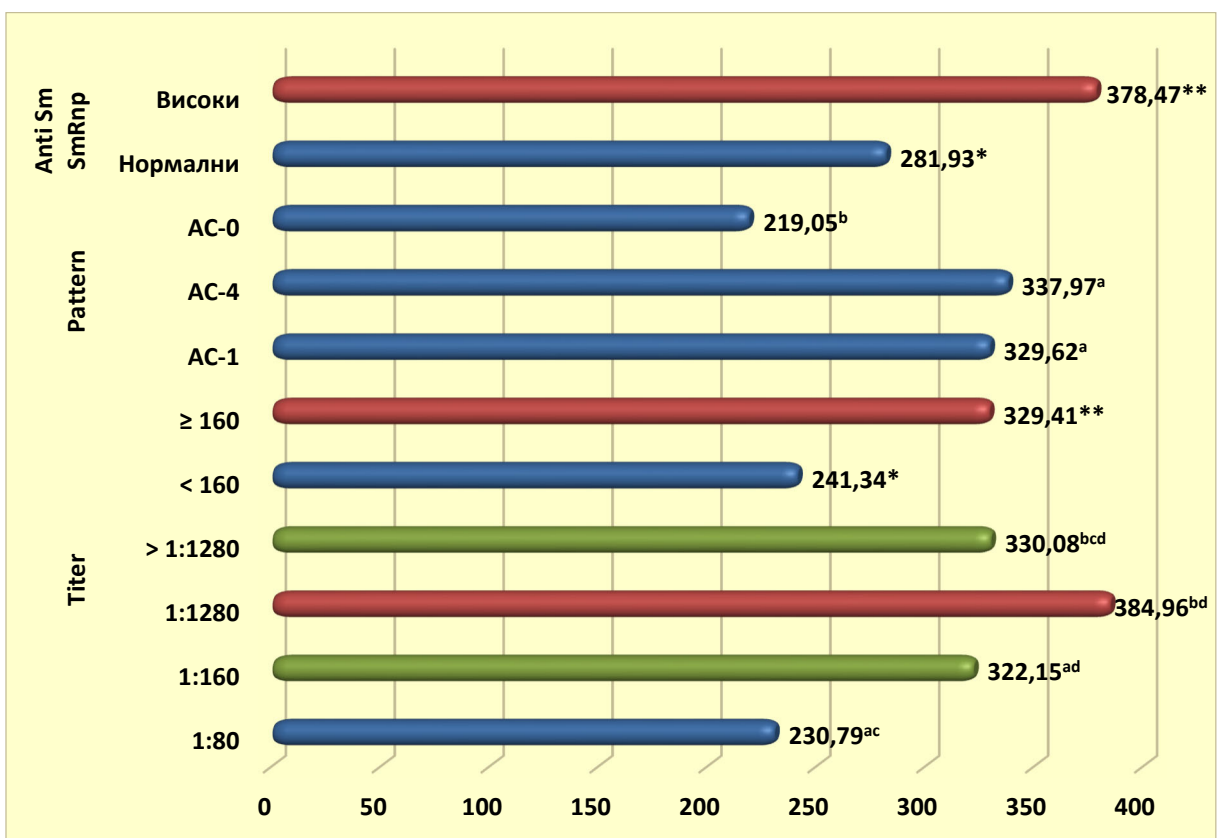
групи	показател	anti-EBV IgG		
		n	\bar{X}	SD
РПС + болни със СЛЕ	титър на АНА			
	< 1:80	4	214,40	135,49
	1:80	17	230,79 ^{ac}	160,36
	1:160	13	322,15 ^{ad}	134,07
	1:320	5	274,48	182,36
	1:640	3	301,77	159,87
	1:1280	10	384,96 ^{bd}	31,47
	> 1:1280	11	330,08 ^{bcd}	73,93
	титър на АНА ($p=0,038$)	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

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

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



Фиг. 21. Анализ на зависимостта между anti-EBV IgG и показателите титър и тип светене на АНА, anti-Sm и anti-RNP/Sm и витамин D2/D3 < 20 ng/ml (цяла извадка)



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

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

Очаквано, че по-високи титри на anti-EBV IgG се асоциират с по-ниски нива на витамин D2/D3 (< 20 ng/ml) в цялата извадка. Проучванията относно връзка между витамин Д и серопозитивност за Епщайн-Бар касаят най-вече патогенезата на множествената склероза [132] и насочват към разбирането за протективна роля на витаминна по отношение на инфекция и/или реактивация на вируса. Необходими са по-широки изследвания за разбиране на тази асоциация сред индивиди с генетична предразположеност към системен лупус.

Предвид известните данни, дали основание за обсъждане на етиологична или тригерираща роля на EBV по отношение на СЛЕ, описаните резултати представляват интерес. Известно е, че вирусът е с убиквитерно разпространение и че 100% от лупусно болните имат налични антитела срещу него, за разлика от около 70% от здравите [24, 25]. Нашите данни показват ясна асоциация между титъра на антитела срещу капсидния антиген на вируса и белези на автореактивност, каквито са АНА. Тук, разбира се, не бива да се пренебрегва възможността за флуктуации в хода на времето на антителата срещу вируса и шансът настоящата находка да е случайна. Освен това, антителата срещу VCA далеч не отразяват цялата динамика на инфекцията, макар да има данни, че се асоциират с АНА позитивност при здрави [39], и че има данни и за възможна асоциация с покачването на титъра им с реактивация на вируса [40]. Ако оставим това настрана, би могло да се обсъжда, че степента на напрегнатост на имунитета срещу вируса и/или реактивацията му стоят във връзка с формирането на АНА. При потвърждение в по-мощни изследвания, тези резултати могат да допринесат за изясняването на една от множеството причини за формиране на „бенигни“ АНА сред популацията. Разбира се, ако въобще е налице причинност между двата феномена, напълно възможно е тя да е с обратна посока – хората с тлеещ аутоимунитет (каквито са РПС) да поддържат по-висок титър антитела срещу вируса.

5.2. Общо обсъждане

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

В нашето проучване прави впечатление по-големия процент на повишени АНА в сравнение със световните данни - както у РПС, така и у здравите контроли (вж по-горе). Възможните обяснения за тези повишени АНА, могат да се търсят вкл. и на популационно ниво, за което е необходимо разширяване на изследваната извадка, и задълбочаване изследванията за съпътстващия имунологичен профил на тези лица. Както беше споменато по-горе, различните популации могат да имат

различна норма (cut-off титър) за АНА и при нашата той би бил по-висок, напр. 1:320 [91]. За отбелязване е, че, както става и с много други изследвания, все по-честото им прилагане (обосновано или не) води до натрупване на нови знания за тяхната диагностична стойност, както като сензитивност, така и като специфичност, и съответно до коригиране на техните референтни граници. Така например, в ежедневната ревматологична практика, титър от 1:320 без насочващи към системно страдание симптоми рядко е причина за по-подробни изследвания за АНА.

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

Вторият вид резултати, които отличават нашето проучване от описаните досега, са данните за наличие на повече оплаквания в групата на РПС и асоциацията им с титъра на АНА. Едно от малкото проучвания, третиращи клинични промени, е това на Мургое М. и сътр. [122], което открива, че един от независимите предиктори за разгръщане на СЛЕ у „здрави“ роднини е наличието на клинични симптоми (т.е. висок брой точки от „Скринингов въпросник за съединителнотъканни заболявания (CSQ) по Karlson и сътр., 1995 г.“ или брой критерии по ACR). Там също така се отбелязва, че повишените нива на BLYs, SCF (Stem Cell Factor) и някои MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), както и намалените на TGF- β , корелират (съответно позитивно и негативно) с броя клинични белези както при изходните изследвания, така и при проследяване. Както отбелязахме по-горе в обсъждането на съставения от нас въпросник, скринирането за симптоми на СЗСТ може да бъде по-специфично за сметка на по-малка чувствителност или обратното. В изследването на Мургое и сътр. се обсъждат оплаквания, които са на практика с характер на типични критерии за заболяването (виж CSQ в приложението, сравни ACR критерии за СЛЕ); в известен смисъл това проучване може да се обсъжда като такова на индивиди с непълен (субклиничен) СЛЕ. В нашето изследване разглежданите оплаквания са на границата с неспецифичните такива; наблюдава се асоциация на броя оплаквания с високите титри на АНА в цялата извадка, както и асоциация на нарастване броя

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

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

Измежду останалите рисковите фактори – (актуално) тютюнопушене и прием на естрогенни препарати, изследвани по така описаните методи - не се установява асоциация с някой от другите изследвани показатели, вкл. клиничните. Отдаваме това на сравнително малката извадка и липсата на проследяване, тъй като окончателна интерпретация относно възможен техен дял в етиопатогенезата би била възможна единствено при развитие на болест у някои от изследваните. Разбира се, както бе описано в литературния обзор, нито един от тези външни фактори не е доказано еднозначно свързан с повишен риск от развитие на болест.

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

Накратко, представеното проучване потвърждава досегашните литературни данни за особеното имунологично място на роднините първа степен на болните със СЛЕ, като поставя известен акцент върху интерпретирането на ранни клинични оплаквания (макар и неспецифични) в светлината на налични АНА, затвърждава разбирането на ролята на имунната регулация в антиялогенезата и патогенезата на СЛЕ, и също така повдига някои въпроси относно мястото на Epstein-Barr инфекцията в разпространението на АНА сред общата популация. За доизясняване и потвърждаване или отхвърляне на оформящите се закономерности са необходими както увеличаване броя изследвани лица, така и проследяването им във времето.

За да могат да бъдат разбрани описаните при роднините и при здравите контроли промени, трябва да бъдат разгледани феномените на автореактивност, автоимунитет (продължителна или патологична автореактивност) и автоимунна болест. Въпреки че липсва общоприета терминология, се касае за три различни действителности. *Автореактивността* по своята същност представлява

разпознаване и реакция на имунната система към собствени структури на организма [126]. Това е нормален и задължителен процес, особено в етапите на създаване на имунната система, но и постоянно протичащ; така тя се „учи“ да разпознава „своето“ от „чуждото“. Тази автореактивност остава във физиологични граници благодарение на механизмите на имунния толеранс; в него централна роля играят обсъжданите нееднократно регулаторни цитокини – IL-10 и TGF- β . В контекста на СЛЕ и АНА, пример за функциониращи нормално механизми на имуен толеранс е именно описаното почистване чрез опсонизация и последваща фагоцитоза на екстернализираните вследствие на апоптоза интрацелуларни антигени в условията на „имунологична тишина“ – т.е. без това да индуцира реакция на специфичната имунна защита. Важно е да се отбележи, че в този случай ЕИА са разпознати като чужди, но без патологични последици. *Патологичната автореактивност или автоимунитетът* се състоят в разгръщане и утвърждаване във времето на специфичен имуен отговор вследствие на нарушение на един или повече от механизмите на имунния толеранс и се изразяват в наличие на автореактивни Т- и В-клетки и автоантитела [1]. В контекста на горния пример, т.е. екстернализирането на вътреклетъчни антигени, когато клетъчната смърт е надмерна или има дефекти в опсонизацията, или в друг механизъм на фагоцитозата, ЕИА не са очистени своевременно и могат да станат обект на антигенно представяне чрез механизъм от няколко последователни процеса [90]. Веднъж представени от съответния тип АПК, те стават причина за активиране на Т-клетките, които от своя страна стимулират автореактивни В-клетки, диференциращи се в плазматични и секретирани антитела срещу ЕИА, част от които са всъщност АНА. Т.е., вследствие на външни за имунната система обстоятелства (повишена клетъчна смърт) и/или нарушения във нормалното функциониране на имунитета (опсонизация, фагоцитоза, активиране на АПК и др.) се стига не само до разпознаване като чужди на собствени структури от имунната система, но и до разгрънатата специфична реакция срещу тях. В рамките на описвания пример, илюстрация на това е детекцията на повишени серумни АНА при лице без автоимунна (ревматична) болест: в този случай най-често се касае за т.нар. инфекциозни или тумор-индуцирани АНА, или АНА вследствие на различни процеси, водещи до надмерна клетъчна смърт и тогава обикновено АНА изчезват с изчезване и на „външната“ причина за повече ЕИА. Важно е обаче да се отбележи, че за повишеното образуване на АНА в тези случаи е необходима и „имунологична компонента“ – т.е. нарушения в някои от описаните механизми, водещи до известна недостатъчност на имунния толеранс. За разлика от

физиологичната автореактивност и патологичната такава (наричана още автоимунитет), при *автоимунната болест* е налице комбинация от нарушения в механизмите на имунитета, водеща до самовъзпроизвеждане на автоимунния процес и последващи тъканни увреди. В разглеждания пример към описаните нарушения, се прибавят и други, особено ключовото в патогенезата на СЛЕ продължително оцеляване на автореактивните В-клетки (при повишен BAFF), които освен антиялопродукция осъществяват и антигенно представяне. Стига се до значително повишени нива на АНА и самите те, залавяйки се за ЕИА, индуцират реакция, което води до нова клетъчна смърт с екстернализация и респ. репродукция на цялата каскада. Т.е., за да говорим за автоимунна болест, трябва да са налице автореактивни клетки, автоантитела и патогенетично свързани с тях тъканни увреди.

Така, в контекста на гореизложеното, установяването на повишени АНА при лице от общата популация би следвало да се третира като следствие от автоимунна болест (настояща или „задаваща се“) или друга причина свързана с надмерна клетъчна смърт (инфекции, неоплазии и т.н.). Все пак обаче, на популационно ниво честотата на повишени АНА при случайно подбрани лица, особено и в нашето изследване, далеч не може винаги да се обясни с някоя от тези два вида причини (автоимунна болест или клетъчна разруха) [102 – 105]. Следователно, може да се допусне, че сред общата популация са налице разпространени състояния на лекостепенна патологична персистираща автореактивност (автоимунитет), която никога не достига такива размери, че да доведе до автоимунна болест, или поне не в „нормални“ условия. За това твърдение са доказателство именно изследваните от нас роднини първа степен на болни със системен лупус: те нямат никаква видима неимунологична причина за прояви на патологична автореактивност, но я проявяват в по-голяма степен от общата популация, и то трайно. Доказателства за наличието на тази автореактивност са повишените АНА – ИИФ и специфични ААт, промените в цитокиновите нива, вероятно и по-високите титри на anti-EBV антитела при повишени АНА, цитокиновите промени, а неизключено и повечето им клинични оплаквания. Като единствена причина за проявената от РПС автореактивност остава споделеният с болните им роднини генетичен терен: споделен дотолкова, че повечето от тях да останат на ниво „глееща“ автореактивност и никога да не стигнат до болест, а само 0,1% от всички роднини да се разболеят сред всички 30% с повишени АНА сред тях [8 - 12, 101].

Оттук можем да разберем и защо повишените АНА не са самостоятелен предиктивен фактор за развитие на СЛЕ, дори сред роднини на болните, въпреки

факта че те предхождат появата на заболяването [122]. Както стана ясно, повишените АНА не са „само автоимунитет“ [90] – те могат да се дължат и на други причини, макар дори тогава имунната система да има своя дял. Но, дори когато са с „чисто“ автоимунна генеза, АНА могат не само да са „не още автоимунна болест“ [пак там], т.е. етап от предклиничното ѝ развитие, но могат и да са „*просто* автореактивност“, която никога няма да се развие. До този момент, както многократно бе отбелязано, предиктори за развитие на болест, т.е. за вероятността проявите на автореактивност да са етап от развитие, а не състояние, са данните за по-кардинални имунологични промени – превалиране на проинфламаторни и/или недостатъчност на регулаторни цитокини. Тези данни могат на пръв поглед да дискредитират рутинното изследване на АНА като лишени от прогностична стойност. Това не би било оправдано по две причини. Първо, АНА са част от класификационните критерии (т.е. приетите по статистически данни за същностни белези) за СЛЕ и другите СЗСТ; второ, АНА остават единственото рутинно изследване в ежедневната практика, което би могло да се свърже с прояви на автореактивност.

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

6. ИЗВОДИ

- 6.1.** В нашите резултати, както и в тези на световната литература, роднините първа степен на болни със системен лупус еритематозус се оформят като група със специфичен имунологичен облик: отличават се от здравите с тенденция към по-висока честота на наличие на завишени антинуклеарни антитела в серума, по-високите им титри и честотата на наличие на специфичен тип имунофлуоресцентно светене според International Consensus of ANA Patterns, както и по междинни (спрямо здрави и болни) стойности на серумните нива на регулаторния цитокин TGF- β . Техният специфичен облик ясно се изразява и с демонстрираните налични само сред тяхната група зависимости между изследваните показатели.
- 6.2.** Нашите резултати насочват към възможността роднините първа степен да се характеризират и с повече, макар и неспецифични, клинични оплаквания от здравите и тези оплаквания да стоят във връзка с нивата на антинуклеарните антитела в серума.
- 6.3.** Данните за изразена по сила и права по посока корелация между нивата на витамин D2/D3 и тези на TGF- β единствено в групата на РПС насочват към разбирането, че това е група с двояк потенциал – за развитие на болест или оставане в състояние на здраве.
- 6.4.** Преди всичко, поредното доказване на имунологични промени сред значим процент от рисковата популация на роднините първа степен, значително надвишаващ процента, който по статистически данни би развил заболяване, насочва към разбирането за персистираща патологична автореактивност като относително разпространен феномен.
- 6.5.** Предвид установените по-високи спрямо литературните данни стойности на антинуклеарните антитела в серума както при здравите, така и при роднините на болни със системен лупус еритематозус, нашите резултати могат да са основание за разбирането, че референтните граници за нивата на антинуклеарните антитела в серума, изследвани по имунофлуоресцентен метод, могат да варират в известни граници сред различните популации.

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

7. ПРИНОСИ

7.1. Научно-теоретични

- за първи път в света е проведено изследване на антинуклеарни антитела при болни, роднини и здрави по метода на индиректната имунофлуоресценция според ICAP и е демонстрирана неговата значимост;
- потвърждават се в българската популация световните литературни данни за заеманото в имунологично отношение междинно място на РПС спрямо болните със СЛЕ и здравите. Доколкото ни е известно, настоящото проучване е едно от малкото в света, изследващо цитокинов профил на РПС, освен АНА;
- потвърждава се значимостта на регулаторния цитокин TGF- β както в патогенезата на болестта, така и в процесите на автореактивност и генеза на антинуклеарни антитела;
- демонстрира се значимостта на нивата на серумния витамин D2/D3 като протективен фактор срещу автоимунитет сред предразположените индивиди, каквито са групата на роднините на болните;
- демонстрира се зависимост между титъра и имунофлуоресцентното светене на АНА от една страна, и титъра на антителата срещу капсидния антиген на вируса на Epstein-Barr, от друга;
- затвърждава се разбирането за разпространени в популацията различни по степен увреди във функциите на имунната система, водещи до персистираща автореактивност.

7.2. Методични

- настоящото проучване е първото, обследващо *заедно* рискови фактори, клинични белези и имунологичен профил у РПС
- съставен е подробен скринингов въпросник за системни заболявания на съединителната тъкан с висока чувствителност.

7.3. Научно-приложни

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

- потвърждава се значимостта на рутинното изследване на АНА като надежден показател за автореактивност/автоимунитет;
- за първи път в нашата страна е започнат клиничен и имунологичен скрининг на роднини на болни със СЛЕ и е започната програма за тяхното системно проследяване.

8. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Alspaugh, M., Talal, N., & Tan, E. (1976). Differentiation and characterization of autoantibodies and their antigens in sjögren's syndrome. *Arthritis & Rheumatism*, 19(2), 216-222. <https://doi.org/10.1002/art.1780190214>
2. Swaak, A., Huysen, V., Nossent, J., & Smeenk, R. (1990). Antinuclear antibody profiles in relation to specific disease manifestations of systemic lupus erythematosus. *Clinical Rheumatology*, 9(S1), 82-95. <https://doi.org/10.1007/bf0220555>
3. Alba, P. (2003). Anti-dsDNA, anti-Sm antibodies, and the lupus anticoagulant: significant factors associated with lupus nephritis. *Annals Of The Rheumatic Diseases*, 62(6), 556-560. <https://doi.org/10.1136/ard.62.6.556>
4. Petri, M. (2012). Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, 64(8), 2677–2686
5. Aringer, M. (2019). 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis & Rheumatology*, 71(9), 1400–1412. <https://doi.org/DOI.10.1002/art.40930>
6. Leuchten, N., Milke, B., Winkler-Rohlfing, B., Daikh, D., Dörner, T., Johnson, S., & Aringer, M. (2018). Early symptoms of systemic lupus erythematosus (SLE) recalled by 339 SLE patients. *Lupus*, 27(9), 1431-1436. <https://doi.org/10.1177/0961203318776093>
7. Cervera, R. (1993). Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. The European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus. *Medicine (Baltimore)*, 72, 113–124.
8. Feldman, C., Hiraki, L., Liu, J., Fischer, M., Solomon, D., & Alarcón, G. et al. (2013). Epidemiology and sociodemographics of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis among US adults with Medicaid coverage, 2000-2004. *Arthritis & Rheumatism*, 65(3), 753-763. <https://doi.org/10.1002/art.37795>

9. Lim, S., Bayakly, A., Helmick, C., Gordon, C., Easley, K., & Drenkard, C. (2014). The Incidence and Prevalence of Systemic Lupus Erythematosus, 2002-2004: The Georgia Lupus Registry. *Arthritis & Rheumatology*, 66(2), 357-368. <https://doi.org/10.1002/art.38239>
10. Somers, E., Marder, W., Cagnoli, P., Lewis, E., DeGuire, P., & Gordon, C. et al. (2014). Population-Based Incidence and Prevalence of Systemic Lupus Erythematosus: The Michigan Lupus Epidemiology and Surveillance Program. *Arthritis & Rheumatology*, 66(2), 369-378. <https://doi.org/10.1002/art.38238>
11. Ferucci, E., Johnston, J., Gaddy, J., Sumner, L., Posever, J., & Choromanski, T. et al. (2014). Prevalence and Incidence of Systemic Lupus Erythematosus in a Population-Based Registry of American Indian and Alaska Native People, 2007-2009. *Arthritis & Rheumatology*, 66(9), 2494-2502. <https://doi.org/10.1002/art.38720>
12. Rees, F., Doherty, M., Grainge, M., Lanyon, P., & Zhang, W. (2017). The worldwide incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus: a systematic review of epidemiological studies. *Rheumatology*, 56(11), 1945-1961. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kex260>
13. Danchenko, N., Satia, J., & Anthony, M. (2006). Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus*, 15(5), 308-318. <https://doi.org/10.1191/0961203306lu2305xx>
14. Mccarty, D., Manzi, S., Medsger, T., Ramsey-Goldman, R., Laporte, R., & Kwoh, C. (1995). Incidence of systemic lupus erythematosus race and gender differences. *Arthritis & Rheumatism*, 38(9), 1260-1270. <https://doi.org/10.1002/art.1780380914>
15. Arbuckle, M., McClain, M., Rubertone, M., Scofield, R., Dennis, G., James, J., & Harley, J. (2003). Development of Autoantibodies before the Clinical Onset of Systemic Lupus Erythematosus. *New England Journal Of Medicine*, 349(16), 1526-1533. <https://doi.org/10.1056/nejmoa021933>
16. McMurray, R., & May, W. (2003). Sex hormones and systemic lupus erythematosus: Review and meta-analysis. *Arthritis & Rheumatism*, 48(8), 2100-2110. <https://doi.org/10.1002/art.11105>
17. Costenbader, K., Feskanich, D., Stampfer, M., & Karlson, E. (2007). Reproductive and menopausal factors and risk of systemic lupus erythematosus in women. *Arthritis & Rheumatism*, 56(4), 1251-1262. <https://doi.org/10.1002/art.22510>
18. Bernier, M., Mikaeloff, Y., Hudson, M., & Suissa, S. (2009). Combined oral contraceptive use and the risk of systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, 61(4), 476-481. <https://doi.org/10.1002/art.24398>

19. Costenbader, K., Kim, D., Peerzada, J., Lockman, S., Nobles-Knight, D., Petri, M., & Karlson, E. (2004). Cigarette smoking and the risk of systemic lupus erythematosus: A meta-analysis. *Arthritis & Rheumatism*, 50(3), 849-857. <https://doi.org/10.1002/art.20049>
20. Bae, S., Kim, S., & Sung, M. (2002). Impaired antioxidant status and decreased dietary intake of antioxidants in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology International*, 22(6), 238-243. <https://doi.org/10.1007/s00296-002-0241-8>
21. Costenbader, K., Feskanich, D., Holmes, M., Karlson, E., & Benito-Garcia, E. (2007). Vitamin D intake and risks of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in women. *Annals Of The Rheumatic Diseases*, 67(4), 530-535. <https://doi.org/10.1136/ard.2007.072736>
22. Hiraki, L., Munger, K., Costenbader, K., & Karlson, E. (2012). Dietary intake of vitamin D during adolescence and risk of adult-onset systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Care & Research*, 64(12), 1829-1836. <https://doi.org/10.1002/acr.21776>
23. Evans, A. (2021) Clinical syndromes associated with EB virusinfection. *Adv Intern Med*, 18, 77–93, 2021;1041–7. <https://doi:10.1542/9781610025225-appendix006>
24. James, J., Kaufman, K., Farris, A., Taylor-Albert, E., Lehman, T., & Harley, J. (1997). An increased prevalence of Epstein-Barr virus infection in young patients suggests a possible etiology for systemic lupus erythematosus. *Journal Of Clinical Investigation*, 100(12), 3019-3026. <https://doi.org/10.1172/jci119856>
25. James, J., Neas, B., Moser, K., Hall, T., Bruner, G., Sestak, A., & Harley, J. (2001). Systemic lupus erythematosus in adults is associated with previous Epstein-Barr virus exposure. *Arthritis & Rheumatism*, 44(5), 1122-1126. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200105\)44:5<1122::aid-anr193>3.0.co;2-d](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200105)44:5<1122::aid-anr193>3.0.co;2-d)
26. Moon, U., Park, S., Oh, S., Kim, W., Park, S., & Lee, S. et al. (2004). *Arthritis Research & Therapy*, 6(4), R295. <https://doi.org/10.1186/ar1181>
27. Draborg, A., Duus, K., & Houen, G. (2012). Epstein-Barr Virus and Systemic Lupus Erythematosus. *Clinical And Developmental Immunology*, 2012, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2012/370516>
28. Poole, B., Gross, T., Maier, S., Harley, J., & James, J. (2008). Lupus-like autoantibody development in rabbits and mice after immunization with EBNA-1 fragments. *Journal Of Autoimmunity*, 31(4), 362-371. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2008.08.007>
29. Ulf-Moller, C., Nielsen, N., Rostgaard, K., Hjalgrim, H., & Frisch, M. (2010). Epstein-Barr virus-associated infectious mononucleosis and risk of systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*, 49(9), 1706-1712. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keq148>

30. Yao, Q., Rickinson, A., & Epstein, M. (1985). A re-examination of the Epstein-Barr virus carrier state in healthy seropositive individuals. *International Journal Of Cancer*, 35(1), 35-42. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910350107>
31. Burdin, N., Péronne, C., Banchereau, J., & Rousset, F. (1993). Epstein-Barr virus transformation induces B lymphocytes to produce human interleukin 10. *Journal Of Experimental Medicine*, 177(2), 295-304. <https://doi.org/10.1084/jem.177.2.295>
32. Henderson, S., Huen, D., Rowe, M., Dawson, C., Johnson, G., & Rickinson, A. (1993). Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 90(18), 8479-8483. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.18.8479>
33. McClain, M., Rapp, E., Harley, J., & James, J. (2003). Infectious mononucleosis patients temporarily recognize a unique, cross-reactive epitope of Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Journal Of Medical Virology*, 70(2), 253-257. <https://doi.org/10.1002/jmv.10385>
34. McClain, M., Heinlen, L., Dennis, G., Roebuck, J., Harley, J., & James, J. (2004). Early events in lupus humoral autoimmunity suggest initiation through molecular mimicry. *Nature Medicine*, 11(1), 85-89. <https://doi.org/10.1038/nm1167>
35. Tsokos, G. (1983). Epstein-Barr virus induces normal B cell responses but defective suppressor T cell responses in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol*, 131(4), 1797-801. Retrieved 28 July 2021, from.
36. Goodnow, C. (1996). Balancing immunity and tolerance: deleting and tuning lymphocyte repertoires. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 93(6), 2264-2271. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.6.2264>
37. Kang, I., Quan, T., Nolasco, H., Park, S., Hong, M., & Crouch, J. et al. (2004). Defective Control of Latent Epstein-Barr Virus Infection in Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal Of Immunology*, 172(2), 1287-1294. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.2.1287>
38. Fritsch, R., Shen, X., Illei, G., Yarboro, C., Prussin, C., & Hathcock, K. et al. (2006). Abnormal differentiation of memory T cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, 54(7), 2184-2197. <https://doi.org/10.1002/art.21943>
39. Cuomo L, Cirone M, Di Gregorio AO, Vitillo M, Cattivelli M, Magliocca V, et al. (2014) Elevated antinuclear antibodies and altered anti-Epstein-Barr virus immune responses. *Virus Research*. 2015;195:95–9. <https://doi:10.1016/j.virusres.2014.09.014>

40. Besson C, Amiel C, Le-Pendeven C, Brice P, Fermé C, Carde P, et al. (2006) Positive correlation between Epstein-Barr virus viral load and anti-viral capsid immunoglobulin G titers determined for Hodgkin's lymphoma patients and their relatives. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006;44(1):47–50. <https://doi:10.1128/jcm.44.1.47-50.2006>
41. Vista ES, Weisman MH, Ishimori ML, Chen H, Bourn RL, Bruner BF, et al. (2017) Strong viral associations with SLE among Filipinos. *Lupus Science & Medicine*. 2017;4(1). <https://doi:10.1136/lupus-2017-000214>
42. Parks, C., Cooper, G., Nylander-French, L., Sanderson, W., Dement, J., & Cohen, P. et al. (2002). Occupational exposure to crystalline silica and risk of systemic lupus erythematosus: A population-based, case-control study in the Southeastern United States. *Arthritis & Rheumatism*, 46(7), 1840-1850. <https://doi.org/10.1002/art.10368>
43. Finckh A, Cooper GS, Chibnik LB, Costenbader KH, Watts J, Pankey H, et al. (2006) Occupational silica and solvent exposures and risk of systemic lupus erythematosus in urban women. *Arthritis & Rheumatism*. 2006;54(11):3648–54. <https://doi:10.1002/art.22210>
44. Parks, C., & Cooper, G. (2006). Occupational exposures and risk of systemic lupus erythematosus: a review of the evidence and exposure assessment methods in population-and clinic-based studies. *Lupus*, 15(11), 728-736. <https://doi.org/10.1177/0961203306069346>
45. Parks, C., & De Roos, A. (2014). Pesticides, chemical and industrial exposures in relation to systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 23(6), 527-536. <https://doi.org/10.1177/0961203313511680>
46. Tedeschi, S., Bermas, B., & Costenbader, K. (2013). Sexual disparities in the incidence and course of SLE and RA. *Clinical Immunology*, 149(2), 211-218. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2013.03.003>
47. Ghodke-Puranik, Y., & Niewold, T. (2015). Immunogenetics of systemic lupus erythematosus: A comprehensive review. *Journal Of Autoimmunity*, 64, 125-136. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.08.004>
48. Denny, M., Yalavarthi, S., Zhao, W., Thacker, S., Anderson, M., & Sandy, A. et al. (2010). A Distinct Subset of Proinflammatory Neutrophils Isolated from Patients with Systemic Lupus Erythematosus Induces Vascular Damage and Synthesizes Type I IFNs. *The Journal Of Immunology*, 184(6), 3284-3297. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902199>
49. Mavragani, C., Sagalovskiy, I., Guo, Q., Nezos, A., Kapsogeorgou, E., & Lu, P. et al. (2016). Expression of Long Interspersed Nuclear Element 1 Retroelements and Induction of Type I Interferon in Patients With Systemic Autoimmune Disease. *Arthritis & Rheumatology*, 68(11), 2686-2696. <https://doi.org/10.1002/art.39795>

50. Lood, C., Blanco, L., Purmalek, M., Carmona-Rivera, C., De Ravin, S., & Smith, C. et al. (2016). Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nature Medicine*, 22(2), 146-153. <https://doi.org/10.1038/nm.4027>
51. Fairhurst, A., Xie, C., Fu, Y., Wang, A., Boudreaux, C., & Zhou, X. et al. (2009). Type I Interferons Produced by Resident Renal Cells May Promote End-Organ Disease in Autoantibody-Mediated Glomerulonephritis. *The Journal Of Immunology*, 183(10), 6831-6838. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900742>
52. Flür, K., Allam, R., Zecher, D., Kulkarni, O., Lichtnekert, J., & Schwarz, M. et al. (2009). Viral RNA Induces Type I Interferon-Dependent Cytokine Release and Cell Death in Mesangial Cells via Melanoma-Differentiation-Associated Gene-5. *The American Journal Of Pathology*, 175(5), 2014-2022. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080585>
53. Gehrke, N., Mertens, C., Zillinger, T., Wenzel, J., Bald, T., & Zahn, S. et al. (2013). Oxidative Damage of DNA Confers Resistance to Cytosolic Nuclease TREX1 Degradation and Potentiates STING-Dependent Immune Sensing. *Immunity*, 39(3), 482-495. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.004>
54. Azevedo, P., Murphy, G., & Isenberg, D. (2014). Pathology of Systemic Lupus Erythematosus: The Challenges Ahead. *Methods In Molecular Biology*, 1-16. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0326-9_1
55. Llorente, L., Richaud-Patin, Y., García-Padilla, C., Claret, E., Jakez-Ocampo, J., & Cardiel, M. et al. (2000). Clinical and biologic effects of anti-interleukin-10 monoclonal antibody administration in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, 43(8), 1790-1800. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200008\)43:8<1790::aid-anr15>3.0.co;2-2](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200008)43:8<1790::aid-anr15>3.0.co;2-2)
56. Hakkim, A., Furnrohr, B., Amann, K., Laube, B., Abed, U., & Brinkmann, V. et al. (2010). Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 107(21), 9813-9818. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909927107>
57. Illei, G., Shirota, Y., Yarboro, C., Daruwalla, J., Tackey, E., & Takada, K. et al. (2010). Tocilizumab in systemic lupus erythematosus: Data on safety, preliminary efficacy, and impact on circulating plasma cells from an open-label phase I dosage-escalation study. *Arthritis & Rheumatism*, 62(2), 542-552. <https://doi.org/10.1002/art.27221>
58. Furie, R., Petri, M., Zamani, O., Cervera, R., Wallace, D., & Tegzová, D. et al. (2011). A phase III, randomized, placebo-controlled study of belimumab, a monoclonal antibody that inhibits B lymphocyte stimulator, in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, 63(12), 3918-3930. <https://doi.org/10.1002/art.30613>
59. Lande, R., Ganguly, D., Facchinetti, V., Frasca, L., Conrad, C., & Gregorio, J. et al. (2011). Neutrophils Activate Plasmacytoid Dendritic Cells by Releasing Self-DNA-Peptide Complexes in Systemic Lupus

- Erythematosus. *Science Translational Medicine*, 3(73), 73ra19-73ra19. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001180>
60. Kahlenberg, J., Carmona-Rivera, C., Smith, C., & Kaplan, M. (2012). Neutrophil Extracellular Trap-Associated Protein Activation of the NLRP3 Inflammasome Is Enhanced in Lupus Macrophages. *The Journal Of Immunology*, 190(3), 1217-1226. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202388>
61. Knight, J., Subramanian, V., O'Dell, A., Yalavarthi, S., Zhao, W., & Smith, C. et al. (2014). Peptidylarginine deiminase inhibition disrupts NET formation and protects against kidney, skin and vascular disease in lupus-prone MRL/lpr mice. *Annals Of The Rheumatic Diseases*, 74(12), 2199-2206. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-205365>
62. Gupta, S., & Kaplan, M. (2016). The role of neutrophils and NETosis in autoimmune and renal diseases. *Nature Reviews Nephrology*, 12(7), 402-413. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2016.71>
63. Menon, M., Blair, P., Isenberg, D., & Mauri, C. (2016). A Regulatory Feedback between Plasmacytoid Dendritic Cells and Regulatory B Cells Is Aberrant in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity*, 44(3), 683-697. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.012>
64. Sang, A., Zheng, Y., & Morel, L. (2014). Contributions of B cells to lupus pathogenesis. *Molecular Immunology*, 62(2), 329-338. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.11.013>
65. Jacobi, A., Odendahl, M., Reiter, K., Bruns, A., Burmester, G., & Radbruch, A. et al. (2003). Correlation between circulating CD27^{high}plasma cells and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, 48(5), 1332-1342. <https://doi.org/10.1002/art.10949>
66. Wither, J., Roy, V., & Brennan, L. (2000). Activated B Cells Express Increased Levels of Costimulatory Molecules in Young Autoimmune NZB and (NZB × NZW)F1 Mice. *Clinical Immunology*, 94(1), 51-63. <https://doi.org/10.1006/clim.1999.4806>
67. Zeng, D., Lee, M., Tung, J., Brendolan, A., & Strober, S. (2000). Cutting Edge: A Role for CD1 in the Pathogenesis of Lupus in NZB/NZW Mice. *The Journal Of Immunology*, 164(10), 5000-5004. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.10.5000>
68. Blair, P., Noreña, L., Flores-Borja, F., Rawlings, D., Isenberg, D., Ehrenstein, M., & Mauri, C. (2010). CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Immunity*, 32(1), 129-140. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.11.009>
69. Iwata, Y., Matsushita, T., Horikawa, M., DiLillo, D., Yanaba, K., & Venturi, G. et al. (2011). Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*, 117(2), 530-541. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-07-294249>

70. Kil, L., & Hendriks, R. (2013). Aberrant B Cell Selection and Activation in Systemic Lupus Erythematosus. *International Reviews Of Immunology*, 32(4), 445-470. <https://doi.org/10.3109/08830185.2013.786712>
71. Shlomchik, M., Craft, J., & Mamula, M. (2001). From T to B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease. *Nature Reviews Immunology*, 1(2), 147-153. <https://doi.org/10.1038/35100573>
72. Moulton, V., & Tsokos, G. (2015). T cell signaling abnormalities contribute to aberrant immune cell function and autoimmunity. *Journal Of Clinical Investigation*, 125(6), 2220-2227. <https://doi.org/10.1172/jci78087>
73. Rother, N., & van der Vlag, J. (2015). Disturbed T Cell Signaling and Altered Th17 and Regulatory T Cell Subsets in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *Frontiers In Immunology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00610>
74. Crispín, J., Oukka, M., Bayliss, G., Cohen, R., Van Beek, C., & Stillman, I. et al. (2008). Expanded Double Negative T Cells in Patients with Systemic Lupus Erythematosus Produce IL-17 and Infiltrate the Kidneys. *The Journal Of Immunology*, 181(12), 8761-8766. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.12.8761>
75. Li, Y., Harada, T., Juang, Y., Kyttaris, V., Wang, Y., & Zidanic, M. et al. (2007). Phosphorylated ERM Is Responsible for Increased T Cell Polarization, Adhesion, and Migration in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal Of Immunology*, 178(3), 1938-1947. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.3.1938>
76. Lu, Q., Kaplan, M., Ray, D., Ray, D., Zacharek, S., Gutsch, D., & Richardson, B. (2002). Demethylation of ITGAL (CD11a) regulatory sequences in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, 46(5), 1282-1291. <https://doi.org/10.1002/art.10234>
77. Deng, C., Lu, Q., Zhang, Z., Rao, T., Attwood, J., Yung, R., & Richardson, B. (2003). Hydralazine may induce autoimmunity by inhibiting extracellular signal-regulated kinase pathway signaling. *Arthritis & Rheumatism*, 48(3), 746-756. <https://doi.org/10.1002/art.10833>
78. Kaplan, M., Lu, Q., Wu, A., Attwood, J., & Richardson, B. (2004). Demethylation of Promoter Regulatory Elements Contributes to Perforin Overexpression in CD4+ Lupus T Cells. *The Journal Of Immunology*, 172(6), 3652-3661. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.6.3652>
79. Oelke, K., Lu, Q., Richardson, D., Wu, A., Deng, C., Hanash, S., & Richardson, B. (2004). Overexpression of CD70 and overstimulation of IgG synthesis by lupus T cells and T cells treated with DNA methylation inhibitors. *Arthritis & Rheumatism*, 50(6), 1850-1860. <https://doi.org/10.1002/art.20255>

80. Alarcón-Segovia, D., & Fishbein, E. (1972). Serum Immunoglobulins in Systemic Lupus Erythematosus. *Clinical Science*, 43(1), 121-131. <https://doi.org/10.1042/cs0430121>
81. Mietzner, B., Tsuiji, M., Scheid, J., Velinzon, K., Tiller, T., & Abraham, K. et al. (2008). Autoreactive IgG memory antibodies in patients with systemic lupus erythematosus arise from nonreactive and polyreactive precursors. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 105(28), 9727-9732. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803644105>
82. Szabó, K., Papp, G., Szántó, A., Tarr, T., & Zeher, M. (2015). A comprehensive investigation on the distribution of circulating follicular T helper cells and B cell subsets in primary Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus. *Clinical & Experimental Immunology*, 183(1), 76-89. <https://doi.org/10.1111/cei.12703>
83. Thien, M., Phan, T., Gardam, S., Amesbury, M., Basten, A., Mackay, F., & Brink, R. (2004). Excess BAFF Rescues Self-Reactive B Cells from Peripheral Deletion and Allows Them to Enter Forbidden Follicular and Marginal Zone Niches. *Immunity*, 20(6), 785-798. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.05.010>
84. Guerrier, T., Youinou, P., Pers, J., & Jamin, C. (2012). TLR9 drives the development of transitional B cells towards the marginal zone pathway and promotes autoimmunity. *Journal Of Autoimmunity*, 39(3), 173-179. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2012.05.012>
85. Shivakumar, S. (1989). T cell receptor alpha/beta expressing double-negative (CD4-/CD8-) and CD4+ T helper cells in humans augment the production of pathogenic anti-DNA autoantibodies associated with lupus nephritis. *J. Immunol.*, 143, 103–112. PMID: 2525144.
86. Crispín, J., & Tsokos, G. (2009). Human TCR- $\alpha\beta$ + CD4- CD8- T Cells Can Derive from CD8+ T Cells and Display an Inflammatory Effector Phenotype. *The Journal Of Immunology*, 183(7), 4675-4681. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901533>
87. Lesley, R., Xu, Y., Kalled, S., Hess, D., Schwab, S., Shu, H., & Cyster, J. (2004). Reduced Competitiveness of Autoantigen-Engaged B Cells due to Increased Dependence on BAFF. *Immunity*, 20(4), 441-453. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(04\)00079-2](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(04)00079-2)
88. Amanna, I., Dingwall, J., & Hayes, C. (2003). Enforced bcl-xL Gene Expression Restored Splenic B Lymphocyte Development in BAFF-R Mutant Mice. *The Journal Of Immunology*, 170(9), 4593-4600. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.9.4593>
89. Conrad K, Fritzler MJ, Hiepe F, Schöbner W. (2015) Autoantibodies in systemic autoimmune diseases a diagnostic reference. *Lengerich: Pabst Science Publishers*; 2015.

90. Иванова-Годорова, Е. (2018). Имунофлуоресцентно определяне на антинуклеарни антитела, „златният стандарт“ (първо издание, стр. 14-44). ЦМБ, 2018.
91. Andrade, L., Klotz, W., Herold, M., Conrad, K., Rönnelid, J., & Fritzler, M. et al. (2018). International consensus on antinuclear antibody patterns: definition of the AC-29 pattern associated with antibodies to DNA topoisomerase I. *Clinical Chemistry And Laboratory Medicine (CCLM)*, 56(10), 1783-1788. <https://doi.org/10.1515/cclm-2018-0188>
92. Damoiseaux, J., Andrade, L., Carballo, O., Conrad, K., Francescantonio, P., & Fritzler, M. et al. (2019). Clinical relevance of HEp-2 indirect immunofluorescent patterns: the International Consensus on ANA patterns (ICAP) perspective. *Annals Of The Rheumatic Diseases*, 78(7), 879-889. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-214436>
93. Wijeyesinghe, U., & Russell, A. (2008). Outcome of high titer antinuclear antibody positivity in individuals without connective tissue disease: a 10-year follow-up. *Clinical Rheumatology*, 27(11), 1399-1402. <https://doi.org/10.1007/s10067-008-0932-y>
94. Eriksson, C., Kokkonen, H., Johansson, M., Hallmans, G., Wadell, G., & Rantapää-Dahlqvist, S. (2011). Autoantibodies predate the onset of systemic lupus erythematosus in northern Sweden. *Arthritis Research & Therapy*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/ar3258>
95. Heinlen, L., McClain, M., Merrill, J., Akbarali, Y., Edgerton, C., Harley, J., & James, J. (2007). Clinical criteria for systemic lupus erythematosus precede diagnosis, and associated autoantibodies are present before clinical symptoms. *Arthritis & Rheumatism*, 56(7), 2344-2351. <https://doi.org/10.1002/art.22665>
96. Niewold, T. (2012). Interferon alpha as a primary pathogenic factor in human lupus. *Rheumatology: Current Research*, 02(03). <https://doi.org/10.4172/2161-1149.s1.005>
97. Niewold, T., Hua, J., Lehman, T., Harley, J., & Crow, M. (2007). High serum IFN- α activity is a heritable risk factor for systemic lupus erythematosus. *Genes & Immunity*, 8(6), 492-502. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364408>
98. Weckerle, C., Franek, B., Kelly, J., Kumabe, M., Mikolaitis, R., & Green, S. et al. (2011). Network analysis of associations between serum interferon- α activity, autoantibodies, and clinical features in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, 63(4), 1044-1053. <https://doi.org/10.1002/art.30187>
99. Munroe, M., Lu, R., Zhao, Y., Fife, D., Robertson, J., & Guthridge, J. et al. (2016). Altered type II interferon precedes autoantibody accrual and elevated type I interferon activity prior to systemic lupus erythematosus classification. *Annals Of The Rheumatic Diseases*, 75(11), 2014-2021. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2015-208140>

100. Lu, R., Munroe, M., Guthridge, J., Bean, K., Fife, D., & Chen, H. et al. (2016). Dysregulation of innate and adaptive serum mediators precedes systemic lupus erythematosus classification and improves prognostic accuracy of autoantibodies. *Journal Of Autoimmunity*, 74, 182-193. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2016.06.001>
101. Alarcón-Segovia, D., Alarcón-Riquelme, M., Cardiel, M., Caeiro, F., Massardo, L., Villa, A., & Pons-Estel, B. (2005). Familial aggregation of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other autoimmune diseases in 1,177 lupus patients from the GLADEL cohort. *Arthritis & Rheumatism*, 52(4), 1138-1147. <https://doi.org/10.1002/art.20999>
102. Wandstrat, A., Carrjohnson, F., Branch, V., Gray, H., Fairhurst, A., & Reimold, A. et al. (2006). Autoantibody profiling to identify individuals at risk for systemic lupus erythematosus. *Journal Of Autoimmunity*, 27(3), 153-160. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2006.09.001>
103. Satoh M, Chan EK, Ho LA, Rose KM, Parks CG, Cohn RD, et al. (2012) Prevalence and sociodemographic correlates of antinuclear antibodies in the United States. *Arthritis & Rheumatism*. 2012;64(7):2319–27. <https://doi:10.1002/art.34380>
104. Li X, Liu X, Cui J, Song W, Liang Y, Hu Y, et al. (2019) Epidemiological survey of antinuclear antibodies in healthy population and analysis of clinical characteristics of positive population. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2019;33(8). <https://doi:10.1002/jcla.22965>
105. Slight-Webb, S., Smith, M., Bylinska, A., Macwana, S., Guthridge, C., & Lu, R. et al. (2020). Autoantibody-positive healthy individuals with lower lupus risk display a unique immune endotype. *Journal Of Allergy And Clinical Immunology*, 146(6), 1419-1433. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.04.047>
106. Pollak, V., Mandema, E., & Kark, R. (1960). Antinuclear factors in the serum of relatives of patients with systemic lupus erythematosus. *The Lancet*, 276(7159), 1061-1063. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(60\)92133-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(60)92133-4)
107. Pollak, V., & Kark, R. (1962). Semi-quantitative investigation on the presence of antinuclear factors in patients and relatives of patients with disseminated lupus erythematosus. *Ned Tijdschr Geneesk.*, 106, 755-8.
108. Larsen, R., & Solheim, B. (1972). Family studies in systemic lupus erythematosus. V. Presence of antinuclear factors (ANTFs) in relatives and spouses of selected SLE probands. *Acta Med Scand Suppl.*, 543:55-64.
109. DeHoratius, R., Pillarisetty, R., Messner, R., & Talal, N. (1975). Anti-nucleic acid antibodies in systemic lupus erythematosus patients and their families. Incidence and correlation with lymphocytotoxic antibodies. *Journal Of Clinical Investigation*, 56(5), 1149-1154. <https://doi.org/10.1172/jci108190>

110. Isenberg, D., Shoenfeld, Y., Walport, M., Mackworth-Young, C., Dudeney, C., & Todd-Pokropek, A. et al. (1985). Detection of cross-reactive anti-DNA antibody idiotypes in the serum of systemic lupus erythematosus patients and of their relatives. *Arthritis & Rheumatism*, 28(9), 999-1007. <https://doi.org/10.1002/art.1780280907>
111. Williams, W., & Isenberg, D. (1996). A cross-sectional study of anti-DNA antibodies in the serum and IgG and IgM fraction of healthy individuals, patients with systemic lupus erythematosus and their relatives. *Lupus*, 5(6), 576-586. <https://doi.org/10.1177/096120339600500604>
112. Mohan, C., Liu, F., Xie, C., & Williams Jr, R. (2001). Anti-subnucleosome reactivities in systemic lupus erythematosus (SLE) patients and their first-degree relatives. *Clinical & Experimental Immunology*, 123(1), 119-126. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2001.01417.x>
113. van der Linden, M. (2001). Autoantibodies within families of patients with systemic lupus erythematosus are not directed against the same nuclear antigens. *J Rheumatol*, 28(2), 284-7.
114. Heinlen, L., McClain, M., Kim, X., Del-Rio, A., James, J., Harley, J., & Scofield, R. (2003). Letter to the Editor. *Lupus*, 12(4), 335-337. <https://doi.org/10.1191/0961203303lu377xx>
115. Reichlin, M., Harley, J., & Lockshin, M. (1992). Serologic studies of monozygotic twins with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, 35(4), 457-464. <https://doi.org/10.1002/art.1780350416>
116. Lastrup, H., Heegaard, N., Voss, A., Green, A., Lillevang, S., & Junker, P. (2004). Autoantibodies and self-reported health complaints in relatives of systemic lupus erythematosus patients: a community based approach. *Lupus*, 13(10), 792-799. <https://doi.org/10.1191/0961203304lu2015oa>
117. Langkilde, H., Voss, A., Heegaard, N., & Lastrup, H. (2016). Autoantibodies persist in relatives to systemic lupus erythematosus patients during 12 years follow-up. *Lupus*, 26(7), 723-728. <https://doi.org/10.1177/0961203316676378>
118. Marin, G., Cardiel, M., Cornejo, H., & Viveros, M. (2009). Prevalence of Antinuclear Antibodies in 3 Groups of Healthy Individuals. *JCR: Journal Of Clinical Rheumatology*, 15(7), 325-329. <https://doi.org/10.1097/rhu.0b013e3181bb971b>
119. Zarmbinksi, M. (1992). Anti-dsDNA antibodies in laboratory workers handling blood from patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.*, 19(9), 1380-4.
120. Alan M. Rosenberg, Karen M. Semchuk. (1999). Prevalence of Antinuclear Antibodies in a Rural Population. *Journal Of Toxicology And Environmental Health, Part A*, 57(4), 225-236. <https://doi.org/10.1080/009841099157674>

121. Bruner, B., Guthridge, J., Lu, R., Vidal, G., Kelly, J., & Robertson, J. et al. (2012). Comparison of autoantibody specificities between traditional and bead-based assays in a large, diverse collection of patients with systemic lupus erythematosus and family members. *Arthritis & Rheumatism*, 64(11), 3677-3686. <https://doi.org/10.1002/art.34651>
122. Munroe, M., Young, K., Kamen, D., Guthridge, J., Niewold, T., & Costenbader, K. et al. (2017). Discerning Risk of Disease Transition in Relatives of Systemic Lupus Erythematosus Patients Utilizing Soluble Mediators and Clinical Features. *Arthritis & Rheumatology*, 69(3), 630-642. <https://doi.org/10.1002/art.40004>
123. Karlson EW, Sanchez-Guerrero J, Wright EA, Lew RA, Daltroy LH, Katz JN, et al. (1995) A connective tissue disease screening questionnaire for Population Studies. *Annals of Epidemiology* ; 5(4):297–302. [https://doi:10.1016/1047-2797\(94\)00096-c](https://doi:10.1016/1047-2797(94)00096-c)
124. Pascual, V., Banachereau, J., & Palucka, A. (2003). The central role of dendritic cells and interferon- α in SLE. *Current Opinion In Rheumatology*, 15(5), 548-556. <https://doi.org/10.1097/00002281-200309000-00005>
125. Mao Y-M, Zhao C-N, Liu L-N, Wu Q, Dan Y-L, Wang D-G, et al. (2018) Increased circulating interleukin-8 levels in systemic lupus erythematosus patients: A meta-analysis. *Biomarkers in Medicine*;12(11):1291–302. <https://doi:10.2217/bmm-2018-0217>
126. Наумова, Е. (2021). Клинична имунология, ръководство за студенти (първо издание, стр. 48-52, 151-163). ЦМБ.
127. Harel M. Predicting and preventing autoimmunity, myth or reality? *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1069(1):322–45. <https://doi:10.1196/annals.1351.031>
128. Herold M, Klotz W, Andrade LEC, Conrad K, de Melo Cruvinel W, Damoiseaux J, et al. (2018) International consensus on antinuclear antibody patterns: Defining negative results and reporting unidentified patterns. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 56(10):1799–802. <https://doi:10.1515/cclm-2018-0052>
129. Cheng C-F, Shih M-C, Lan T-Y, Li K-J. (2021) Anti-DFS70 antibodies for differentiating systemic autoimmune rheumatic disease in patients with positive ANA tests: A systematic review and meta-analysis. *Diagnostics*.;11(9):1592. <https://doi:10.3390/diagnostics11091592>
130. Radway-Bright, EL. (2000) The prevalence of antibodies to anionic phospholipids in patients with the primary antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus and their relatives and spouses. *Rheumatology*.;39(4):427–31. <https://doi:10.1093/rheumatology/39.4.427>

131. Theofilopoulos AN, Kono DH, Baccala R. (2017) The multiple pathways to autoimmunity. *Nature Immunology*.;18(7):716–24. <https://doi:10.1038/ni.3731>

132. Brütting C, Stangl GI, Staeger MS. Vitamin D, Epstein-Barr virus, and endogenous retroviruses in multiple sclerosis - facts and hypotheses. *J Integr Neurosci*. 2021 Mar 30;20(1):233-238. <https://doi:10.31083/j.jin.2021.01.392>. PMID: 33834708

9. ПРИЛОЖЕНИЕ

9.1. Скринингов въпросник за СЗСТ по Karlson и сътр. (Connective tissue Screening Questionnaire)

Табл. 58. Скринингов въпросник за СЗСТ, по Karlson и сътр., 1995 г.

Паспортна и демографска част		
Пол	мъж	жена
Година на раждане		
Расова принадлежност	американски индианец или жител на Аляска черен или арфо-американец кавказец латино хаваец или островитянин от пасифика	
Симптоми		
Смятате ли, че сте със смесен расов произход?	да	не
Ако смятате, че сте със смесен расов произход, моля посочете различните групи и приблизителния дял на всяка.		
Смятате ли, че сте с друг етнически произход? Ако да, моля отбележете.		
Откъде са родителите Ви?		
Откъде са Вашите баби и дядовци?		
Откъде са Вашите прабаби и прадядовци?		
Имали ли сте артрит или ревматизъм за повече от 3 месеца?	да	не
Имали ли сте сутрешна скованост в ставите за повече от 6 седмици?	да	не
Имали ли сте възли или подутини под кожата около лактите или глезените?	да	не

Имали ли сте подуване на някои от следните стави (продължаващо повече от 6 седмици)?	китка пръст (без ставата до нокътя) лакът коляно	
Правили ли са Ви тест за ревматоиден артрит?	да	не
Ако да, какъв беше резултатът?	положителен	отрицателен
Правили ли са Ви тест за лупус (напр. АНА, ЛЕ клетки и др.)?	да	не
Ако да, какъв беше резултатът?	положителен	отрицателен
Обичайно чувствителни ли са пръстите Ви на студ?	да	не
Променяли ли са пръстите Ви цвета си необичайно на студ?	да	не
Ако да, какъв цвят?	бял _; син _; лилав _; червен _;	
Имали ли сте:		
Ранички в устата или носа, продължаващи повече от две седмици?	да	не
Обрив по бузите за повече от месец?	да	не
Обрив след излагане на слънце (различен от изгаряне)?	да	не
Болка в гърдите, влошаваща се при дълбоко вдишване за повече от няколко дни?	да	не
Бързо опадване на много коса?	да	не
Припадък или гърч?	да	не
Подпухнали или отекли пръсти за повече от месец?	да	не
Задебеляване на кожата на ръцете, краката, лицето, шията или торса?	да	не
Задебеляване или свиване на кожата на пръстите?	да	не
Ранички, оставящи белези по върховете на пръстите?	да	не
Мускулна слабост за повече от 3 месеца?	да	не
Слабост при ставане от седнало положение за повече от 3 месеца?	да	не
Слабост при вчесване за повече от 3 месеца?	да	не
Чувство за чужди тела или „пясък“ в очите?	да	не
Сухота в устата, събужаща Ви да пиете вода?	да	не
Анемия?	да	не
Понижени бели кръвни клетки (левкоцити)?	да	не
Понижени тромбоцити?	да	не

Белтък в урината?	да	не
Дискоиден лупус?	да	не
Белодробна фиброза?	да	не
Завишена креатинфосфокиназа (ензимът на мускулите)?	да	не

9.2. Въпросник за целите на проучването

Проект „Изследване на здрави или с неуточнена симптоматика роднини първа степен (родители, братя и сестри или деца) на пациенти със системен лупус еритематодес (СЛЕ) за антинуклеарни антитела (АНА) и типове АНА имунофлуоресцентно светене”

ВЪПРОСНИК

Указания за попълване: Моля, попълнете внимателно и четливо паспортната част, тъй като тя ще ни послужи при проследяване на състоянието Ви след години. За всеки въпрос следва да отговорите с „да“ или „не“, заграждайки съответното в третата колона със сив фон, озаглавена „отговор“. Ако не сте сигурен/а, оставете съответният въпрос без отговор. След попълването, лекарят ще Ви разпита за подробности и ще ги отбележи в колоната „коментар“.

Име _____ и _____ възраст: _____

.....

.....

Контакти: (мобилен тел., стационарен тел., e-mail)

.....

...

Име _____ и _____ диагноза _____ на _____ роднината: _____

.....

.....

Вътрешен номер на изследвания/ата: (попълва се от лекаря)

.....

.....

Дата на прегледа:

№	въпрос	отговор (заградете вярното)	коментар (попълва се от лекаря)
1.	Имате ли или имал/а ли сте обриви по кожата? - по лицето - по тялото	да не да не	описание (разпространение, изглед, естествен ход) причина естествен ход
2.	Имате ли или имал/а ли сте ранички/язвички в устата или в носа? - в устата - в носа	да не да не	честота естествен ход
3.	Доколкото Ви е известно, досега боледувал/а ли сте от перикардит или плеврит? - перикардит - плеврит	да не да не	изследвания?
4.	Доколкото Ви е известно, досега имал/а ли сте заболявания на бъбреците?	да не	протеинурия еритроцитни цилиндри
5.	Досега имал/а ли сте оплаквания отстрана на нервната система?		изследвания?

	<ul style="list-style-type: none"> - припадъци - неволеви движения на тялото или крайниците - състояния на обърканост - психотични състояния (доколкото Ви е известно) - намалена или липса на чувствителност на места по тялото - тръпнения/мравучкания на места по тялото - слабост на крайници - друго 	<p>да не</p> <p>да не</p> <p>да не</p> <p>да не</p> <p>да не</p> <p>да не</p> <p>да не</p> <p>да не</p>	
6.	<p>Доколкото Ви е известно, досега имал/а ли сте:</p> <ul style="list-style-type: none"> - анемия? - левкопения? - тромбоцитопения? 	<p>да не</p> <p>да не</p> <p>да не</p>	изследвания?
7.	Имате ли или имала ли сте болки по ставите?	да не	кои механични/възпалителни мигриращи естествен ход
8.	Имате ли или имал/а ли сте подуване на стави?	да не	кои ход
9.	При излагане на студ или при емоционално напрежение, или при други обстоятелства		давност

	получавате/л/а ли сте изтръпване на пръстите на ръце/крака придружено с промяна на цвета им (т.нар. синдром на Рейно)?	да не	
10.	Имате ли или имал/а ли сте ранички по върховете на пръстите?	да не	характеристика давност
11.	Имате ли задух или лесна уморяемост при обичайни или малко над обичайните физически усилия?	да не	давност установявани причини досега изследвания
12.	Имате ли или имал/а ли сте: - стомашни киселини? - чувство за връщане на киселини по хранопровода? - трудности при преглъщане? - подуване на корема, газове? - смущения в изхождането?	да не да не да не да не	ФГС/ФКС досега ГЕ изследвания
13.	Имате ли или имал/а ли сте: - чувство за трайна сухота в очите? - чувство за пясък/чужди тела в очите? - нужда често да	да не да не	ежедневно, повече от 3 месеца? повече от три пъти дневно?

	използвате изкуствени сълзи?	да	не	
14.	Имате или имал/а ли сте: - чувство за трайна сухота в устата? - постоянно или често явяващо се подуване на слюнните жлези (напр. тези пред ушите)? - нужда често да приемате течности, за да преглътнете храната?	да	не	ежедневно, повече от 3 месеца?
15.	Доколкото Ви е известно, досега имал/а ли сте: - запушване на съдове (венозна тромбоза, тромбофлебит, запушване на артерии)? - спонтанни аборти?	да	не	доразпитване
16.	Имате ли хронични заболявания, за които е необходим постоянен прием на лекарства?	да	не	какви?
17.	Приемате ли медикаменти към момента? Приемал/а ли сте медикаменти в миналото за период над 3 месеца?	да	не	какви?

	(за жени) Приемате ли или приемала ли сте за период над 3 месеца хормонални противозачатъчни таблетки, вкл. „хапче след“?	да	не	
18.	Досега преживявал/а ли сте: <ul style="list-style-type: none"> - оперативни интервенции? - тежки заболявания? - туберкулоза? - хепатит? 	да	не	
19.	Имате ли косопад (над обичайното)?	да	не	
20.	Получавате ли или получавал/а ли сте обриви при излагане на слънце?	да	не	
21.	Пушите ли или пушил/а ли сте?	да	не	пакетогодини?
22.	Имал/а ли сте температури с неизяснена причина за над 3 седмици?	да	не	
23.	Имате ли или имал/а ли сте други оплаквания с неизяснена причина?	да	не	
24.	Прекарал/а ли сте COVID 19?	да	не	

9.3. Обобщение на най-важните проучвания на АНА и имунологични промени при роднини на болни и в общата популация.

Табл. 59. Обобщение на най-важните проучвания на АНА и имунологични промени при роднини на болни и в общата популация

Име на проучването, година	Метод за изследване на АНА, cut-off титър	Брой и % пациенти	Брой и % РПС	Брой и % контроли	Имунологични и клинични асоциации	Други 1	Други 2
1	2	3	4	5	6	7	8
1.Pollak и сътр., <i>Antinuclear factors...</i> , 1960	Имунофлуоресценция, върху кл. от букална лигавица	51 изследвани, 45 позитивни 88,2 %	(не първа степен!) 50 изследвани, 24 позитивни, 48%	здрави: 40, 0 позитивни, 0% болни от друго: 50, 1 позитивни, 0,5%	-	-	-
2.De Horatius и сътр., <i>ANA in SLE pts...</i> , 1975	Серологично радиобелязване anti-nDNA anti-RNA лимфоцитотоксични Ат	28 – брой болни 68% 82% 82	чл. фам. – 124 (домак. – 94, от тях родст – 74) д– 12%, р – 7% д– 27%, р – 0% д– 73%, р- 50%	76 1% 5% 4%	(видни от данните)	-	-
3. Isenberg и сътр., <i>Detection of cross-reactive anti-DNA antibody idiotypes in the serum of systemic lupus erythematosus patients and of their relatives</i> , 1985	Изследване за антитела срещу dsDNA, идиотип 16/16	40%	24%	4%	-	Счита се, че наличието на такива кръстосано реагиращи антитела (различни антитела със споделение идиотипи) говори за генетично сродство – за гени, произхождащи от една клетъчна линия и разпространени в популацията	

1	2	3	4	5	6	7	8
4. Williams и Isenberg и сътр., <i>A cross-sectional study of anti-DNA antibodies in the serum ... healthy individuals, patients with systemic lupus erythematosus and their relatives, 1996</i>	anti-ssDNA anti-dsDNA ELISA	35 anti-ssDNA anti-dsDNA IgG и IgM	33 само anti-ssDNA IgM	33 само anti-ssDNA IgM		- Наличието на anti-ssDNA от IgM тип може да насочва за начален автоимунитет, който бива контролиран и не се „затвърждава“ в преминаване в IgG	
5. С. Mohan и сътр., <i>Anti-subnucleosome reactivities in systemic lupus erythematosus (SLE)...</i> 2001	ELISA	40 anti-dsDNA: 52% anti-H1/DNA: 35% anti-H2A/H2B/DNA 72.5% anti-H3/H4/DNA 35%	153 11,8% 9,8% 18.5% 7,8%	45 2.2% 2,2% 2,2% 2,2%	(вж Други 2)	Болните с anti-dsDNA са със значително по-висока честота на ЛН, в сравнение с anti-H2A/H2B/DNA	Болните с anti-dsDNA са със семейства с по няколко АНА+, докато тези с anti-H2A/H2B/DNA са без АНА+ РПС. Това насочва към различни генетични причини между двата
6. van der Linden и сътр., <i>Autoantibodies within families of patients with systemic lupus erythematosus are not directed against the same nuclear antigens,</i> 2001	ELISA Изследвани са специфични антитела	50 74%	154 32%	330 1,5%	не	Антителата у РПС на пациентите не са насочени срещу същите антигени. Предполага се, че се касае за фамилна неспецифична дисфункция на В-Ли	Н.ч. у болните са анти-хистони и анти-Ро, а у РПС - anti-RNP-C и anti-topoI/Scl

1	2	3	4	5	6	7	8
<p>7. Moser KL и сътр., <i>Anti-Ro and anti-nRNP response in unaffected family members of SLE patients</i> 2003</p> <p>*Не е за РПС, а за цели фамилии</p>	<p>двойна имунофиксация за отделните Ат; ИИФ на HEp за АНА; Crithidia за anti-nDNA</p>	<p>200 фамилии със 659 пациенти; фамилиите са с поне двама СЛЕ пациенти!!!</p>	<p>544 роднини (неПС!!!)</p> <p>27 с anti-Ro 9 с anti-nRNP</p>	<p>не са описани</p>	<p>след регресионен анализ – наличието на anti-RNP у болни е сигнификантен фактор за наличието му у роднини; наличието на anti-Ro не е; роднините с anti-Ro често се оказват реално със Съогрен</p>	<p>да не се забравя, че anti-Ro е налично години преди диагнозата, а anti-RNP почти непосредствено преди нея</p>	<p>генетични фактори в по-голяма степен определят anti-RNP, както е видно от изследвания с еднояйчни близнаци, за разлика от anti-Ro</p>
<p>8. H Lastrup и сътр., <i>Autoantibodies and self-reported health complaints in relatives of SLE patients: a community based approach</i>, 2004</p>	<p>IIF HEp-2, <i>cutoff</i> 1:160; изсл. още ACL IgG,M (ELISA), anti-beta2-GPI IgG,M (ELISA), anti-Prothrombin (ELISA), IgM RF, anti-dsDNA</p>	<p>86</p>	<p>226 РПС 1:160 – 23 (10%) 1:80 – 55 (24%) 1:40 – 69 (31%) 49 съпрузи 1:160 – 0 1:80 – 2 (4%) 1:40 – 5 (10%)</p>	<p>контроли (кръводарители) 1:160 – 5 (2,5%) 1:80 – 10 (5%) 1:40 – 20 (10%)</p>	<p>-</p>	<p>1 У контролите АНА+ жени>мъже, но у РПС АНА+ са еднакво разпределение. 2 У пациентите със SLICC DI ≥ 4 значимо повече РПС са пол. на 1:80, подобна е тенденцията и за др. разреждания, на несигн.</p>	<p>В изследваната кохорта не се установява фамилна агрегация на СЛЕ</p>

1	2	3	4	5	6	7	8
8A.(продължение) Langkilde и сътр., <i>Autoantibodies persist in relatives to systemic lupus erythematosus patients during 12 years follow-up</i> , 2016			143 РПС участват 13 починали (от тях 1 с ПМР, 1 с б. на Вегенер) 1:160 са 24% Развили болест: СЛЕ - 1 СЗСТ - 6 РА - 6			1. АНА позитивните в началото остават АНА позитивни и при проследяването 2. Измежду РПС някои развиват ревматични заболявания	
9. Amy E. Wandstrat и сътр., <i>Autoantibody profiling to identify individuals at risk for systemic lupus erythematosus</i> , 2006 <i>*касае АНА в общата популация</i>	ELISA, валидирана чрез сравнение на резултатите на известен брой от пациентите с локалната ИИФ лаборатория; АНА ИИФ 1:20=10 EU АНА 1:40 = 20 EU и т.н Изследвани още Ro (SSA), La (SSB), Sm, RNP, Jo-1, chromatin, SCL-70 and Rib- P на избрани нациенти	73(СЛЕ) + 43(НЛЕ)	32	28 +3470 души от кохорта за изсл. на ССЗ	Неразглеждани по отношение на РПС	ССЗ групата показва ок. 2,5% (90 души) АНА-позитивни с поне 1 стандартно отклонение над средното (между 1:160 и 1:320??). Същите са изследвани за ЕНА и от тях ок. 59 са с едно или повече ЕНА.	-

1	2	3	4	5	6	7	8
10. Guadalupe G и сътр., <i>Prevalence of Antinuclear Antibodies in 3 Groups of Healthy Individuals</i> , 2009	HEp-2 ИИФ, 1:40 до 1:640, anti-DNA (ELISA)	пациенти със СЛЕ и РА (!!), не се посочва броят им	100, 1:40 – 35%, 1:80 – 12,5%, 1:160 – 3,2%, 1:320 – 1,3%, 1:640 – 0,3%	кръводарители и болничен персонал <i>кръводарители:</i> 1:40 – 42%, 1:80 – 8%, 1:160 – 1,5%, 1:320 – 0%, <i>болн. персонал:</i> 1:40 – 26%, 1:80 – 20%, 1:160 – 5%, 1:320 – 1,3%,	неизследвани системно; измежду болничния персонал с високи АНА, поставена диагноза СЛЕ у един и диагноза ПсА у един; трети от РПС с високи АНА и пол. anti-DNA отказал преглед	РПС на болните със СЛЕ значително по-често имат петнисто светене при ниски разрежки в срв. с РПС на болни с РА;	Тенденция за високи АНА у болничния персонал, най-вече у лекарите.
11. Benjamin F. и сътр., <i>Comparison of autoantibody specificities between traditional and bead-based assays in a large, diverse collection of SLE patients and family members</i> , 2012	Сравняване на ИИФ с микросферов тест (ВВ), имунодифузия (И)	1540 пациента със СЛЕ <i>ИИФ:</i> АА: 94% ЕА: 84% И: 86% <i>ВВ:</i> АА 89% ЕА: 73% И: 67%	1,127 роднини (не само ПС!)	906	-	1. При афроамериканците АНА се срещат по-често като цяло 2. АНА срещу хроматина се срещат повече при РПС в сравнение с контролите	3. Преобладава фамилия СЛЕ 4. Фамилияте и изолираните случаи се различават по специфични АНА
12. Munroe и сътр., <i>Soluble Mediators and Clinical Features Discern Risk of Transitioning to Classified Disease in Relatives of Systemic Lupus Erythematosus Patients</i> , 2017	ИИФ (>1:120) ELISA микросферов тест	неясно	409 роднини (не само ПС!)	90 здрави 45 АНА + 45 АНА -	1. АНА + не е самост. предиктивен фактор 2. ↑SCF и ↓TGF-β самост. предиктори 3. Клинични белези (ACR и CTDSQ) - предиктори 4. ↑BLys не е значим предиктивен фактор		

