

БЪЛГАРСКА АСОЦИАЦИЯ ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ
BULGARIAN ASSOCIATION FOR CLINICAL IMMUNOLOGY



Годишник на БАКИ 2014



**Издателство „Лице“
София, 2015**

© Издателство „Лице“, 2015
e-mail: litse@abv.bg
0888 56 54 39

ISSN 1313-47-52

СЪДЪРЖАНИЕ

СТРАНИЦА НА ПРЕДСЕДАТЕЛЯ НА УПРАВИТЕЛНИЯ СЪВЕТ НА СДРУЖЕНИЕ „БЪЛГАРСКА АСОЦИАЦИЯ ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ“	5
ПРОГРАМА ЗА ДЕЙНОСТТА НА СДРУЖЕНИЕ „БЪЛГАРСКА АСОЦИАЦИЯ ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ“ ПРЕЗ 2015 ГОДИНА	8
МЕЖДУНАРОДНО УЧИЛИЩЕ ПО ИМУНОЛОГИЯ „ЧЕРНО МОРЕ“ – ИНИЦИАТИВА, КОЯТО ТРЯБВА ДА ПРОДЪЛЖИ <i>Мария Николова</i>	10
ПЪРВИЧНИТЕ ИМУННИ ДЕФИЦИТИ В БЪЛГАРИЯ – ПОСТИЖЕНИЯ И ПРЕДИЗВИКАТЕЛСТВА НА БЪЛГАРСКАТА АСОЦИАЦИЯ ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ <i>Елисавета Наумова, Мариана Мурджева, Марта Балева, Мария Спасова, Пенка Переновска</i>	16
ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ НА МЕДИЦИНСКИТЕ СПЕЦИАЛИСТИ (UEMS) И УЧАСТИЕТО НА БЪЛГАРСКАТА АСОЦИАЦИЯ ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ (БАКИ) <i>Искра Алтънкова</i>	22
НОВИТЕ ТЕХНОЛОГИИ И РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ ВЪНШНАТА ОЦЕНКА НА КАЧЕСТВОТО <i>Дора Попова, Росица Владимирова, Елена Викентиева</i>	28
ХРОНИЧНА ЛИМФОЦИТНА ЛЕВКЕМИЯ – КЛИНИЧНИ И БИОЛОГИЧНИ ПРОГНОСТИЧНИ ФАКТОРИ <i>Росица Владимирова, Дора Попова, Елена Викентиева</i>	35
ПЕРИФЕРНИ КРЪВНИ МОНОНУКЛЕАРНИ КЛЕТКИ, ИЗОЛИРАНИ ОТ ЗДРАВИ ХОРА, ПОКАЗВАТ НАМАЛЕНА СПОСОБНОСТ ЗА АКТИВАЦИЯ СЛЕД КУЛТИВИРАНЕ СЪС СРЕДА ОТ КЛЕТЪЧНИ КУЛТУРИ, ПОЛУЧЕНИ ОТ ГЛИОБЛАСТОМА МУЛТИФОРМЕ <i>Калина Тумангелова-Юзеир, Екатерина Иванова-Тодорова, Цветелина Великова, Емануил Найденов, Севдалин Начев, Доброслав Кюркчиев</i>	48

МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ГЕННА И БЕЛТЪЧНА ЕКСПРЕСИЯ НА
ЦИТОКИНИ В ЧРЕВНА ЛИГАВИЦА

Цветелина Великова, Илия Караколев, Зоя Спасова, Екатерина Иванова-Тодорова, Доброслав Кюркчиев, Искра Алтънкова, Спаска Станилова..... 58

СТАНДАРТИЗАЦИЯ НА МЕТОДИТЕ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА
АВТОАНТИТЕЛА, ИЗПОЛЗВАНИ В РЕВМАТОЛОГИЯТА –
ПРОБЛЕМИ И ПЕРСПЕКТИВИ

Марта Балева, Красимир Николов..... 71

СТРАНИЦА НА ПРЕДСЕДАТЕЛЯ НА УПРАВИТЕЛНИЯ СЪВЕТ НА СДРУЖЕНИЕ „БЪЛГАРСКА АСОЦИАЦИЯ ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ“

Уважаеми колеги имунолози,

В сдружение „Българска асоциация по клинична имунология“ (БАКИ) членуват 74 лекари и специалисти с немедицинско образование. През изтеклата година новоприетите членове са 6, от които 2 лекари – специализанти по клинична имунология, 1 специализант по лабораторна имунология, 1 биолог и 2 лекари, специалисти по детски болести. Тези данни показват, че организацията ни е жизнена и се развива, като все повече се „отваря“ и към специалисти от други области на медицината, тясно свързани с клиничната имунология. Бих искала да приветствам с добре дошли новите членове на сдружението:

проф. д-р Пенка Переновска
д-р Гергана Петрова
д-р Димитър Момчилов Енчев
Иван Юриев Павлов
Стела Николаева Петкова
д-р Мария Владо Ивановска

и да благодаря на проф. д-р П. Переновска, д-р Г. Петрова и д-р М. Спасова за ползотворното сътрудничество. Колаборацията ни със сходните дисциплини е от особена важност за нашата специалност и ние трябва да продължаваме да работим в тази посока.

Трябва да се отбележи, че сайтът на БАКИ, от създаването му през 2006 година досега, не е реконструиран сериозно съгласно актуалните тенденции в интернет технологиите. Време е да се разработи нов, който да отразява по-адекватно дейността ни и да я представя в качествено нов аспект. Във връзка с това е създадена работна група (състав: проф. д-р Виктория Сарафян, д-р Цветелина Младенова и Цветелин Луканов), която да изготви алгоритъм и предложи структура за новия облик на сайта.

През отчетния период беше честван Международният ден на имунологията – 29 април, в съчетание с различни мероприятия, свързани със седмицата на ПИД (22–29 април 2014). В УМБАЛ „Александровска“ – София, и Медицински университет – Пловдив, бяха организирани пресконференции в присъствието на големи български медии (телевизия и печатни издания). Проведоха се информационни кампании в електронните медии (радио, интернет, вестници и телевизионни интервюта и репортажи) за насочване вниманието на обществеността към най-честите симптоми на ПИД, за запознаване със структурните звена, в които се извършва диагностиката и лечението на ПИД, както и за насърчаване

на граждани и медицински специалисти да търсят специализираната диагностика. В рамките на ПИД седмицата бяха прегледани безплатно повече от 100 възрастни и деца от цялата страна.

На 2–5 октомври 2014 г. в Златни пясъци, Варна, се проведе Национален конгрес по имунология, организиран съвместно със секция „Имунология“ към СУБ. Конгресът бе най-голямото имунологично мероприятие през миналата година и се проведе под мотото „Имунология за всички“. На Конгреса бяха изнесени 22 пленарни доклада, 24 устни презентации и 36 постери. Присъствието на около 150 участници, сред които 6 водещи чуждестранни учени от Европа, безспорно е едно много добро представителство. Забележително бе участието с устни доклади и постери на голям брой млади изследователи. Организаторите се постараха да предложат атрактивна научна и социална програма с акценти върху основните направления на фундаменталната и клинична имунология, представени от български, европейски и световни авторитети в областта на клиничната, лабораторната и експерименталната имунология. Конгресът предостави уникална възможност участието на младите учени да се съчетае с осъществяването на полезни професионални контакти и поставяне основи на бъдещо сътрудничество между имунолозите в национален и международен план. Незабравими спомени ще остави сърдечното веселие, което цареше при социалните мероприятия, както и награждаването на млади учени с призове, учредени от БАКИ.

През м. октомври в Златни пясъци, Варна, се проведе и първото международно училище по имунология (BSIS2014), непосредствено преди Националния конгрес по имунология. Тази образователна инициатива на Секция „Имунология“ при СУБ бе подкрепена, включително и финансово, от European federation of Immunological Societies (EFIS). Училището премина на високо европейско ниво, при значима посещаемост и това бе отбелязано както от организаторите, така и от лекторите и студентите.

Външната оценка на качеството е една от важните дейности на БАКИ. През 2014 г. са проведени всички предвидени схеми за ВОК по имунология. Резултатите се отчетоха и анализираха на 9-ата Конференция по качеството в имунологията. Качественият контрол се провежда систематизирано в съответствие с утвърдилата се вече традиция благодарение на отличната работа на организаторите.

Медицинският стандарт „Клинична имунология“ беше преработен през 2013 година и одобрен от комисия в МЗ на 05.12.2013 г. За съжаление, вече една година той стои в Юридическия отдел на МЗ и поради това тази инициатива все още не е приключила. Актуализираният медицински стандарт „Имунологична подготовка за трансплантация на органи, тъкани и клетки“ е публикуван в Наредба № 18 от 1 август 2014 г., ДВ, бр. 70 от 22 август 2014 г.

Една от важните задачи на БАКИ, като професионална организация, е подобряване на диагностиката и лечението на имуномедираните болести, в т.ч. на първичните и вторичните имунни дефицити. Тази година се чества 10 години

от т.нар. J Project, обединяващ страните от Източна и Централна Европа, Азия и Африка по проблема на първичните имунни дефицити. Във връзка с това се изготви декларация, която призовава за бързи и адекватни мерки за подобряване на ранната диагноза чрез въвеждане на обучение на лекарите и обществеността, вкл. скрининг на новородените за ПИД, генетични изследвания и навременно адекватно лечение. Призивът е декларацията да се подпише не само от лекарите, работещи в тази област, но и от представители на регулаторните органи, като Министерство на здравеопазването и други. Друга важна стъпка е обозначаване на експертните центрове за ПИД в регистъра на МЗ чрез Комисията за регистриране на редките болести съгласно Наредба 16 от 30 юли 2014 г. Целта е бъдещото включване на тези експертни центрове в европейски референтни мрежи за диагностика, консултация и терапия.

През последните години БАКИ се отвори към другите сходни национални и международни организации. Представителството на БАКИ в Секция „Лабораторна медицина“ на UEMS позволява добра информираност, създаване на важни за нашата имунологична общност контакти и възможност за пълноценно участие на БАКИ, респективно на България, в работата на UEMS. БАКИ е в постоянна колаборация с Националния алианс по редки болести, EFI, Дружеството по хематология, Дружеството по педиатрия и СБМС, с които съвместно се организират научни и обществено значими форуми.

Бъдещите насоки за работата на БАКИ през 2015 година са отразени в програмата за дейността ѝ. Главен акцент се поставя на активиране на връзките ни със сходни организации, като ISAC, CIS, ESID и други. Новото лице на БАКИ зависи изключително и от разработването на съвременен интернет сайт. Разбира се, не на последно място са активността и конструктивните предложения на всички членове на нашето сдружение. Целта е да направим клиничната имунология още по-разпознаваема и атрактивна за младите специалисти (лекари, биолози и др.) и да привлечем по-голям брой съмишленици.

*проф. д-р Елисавета Наумова, д.м.н.
Председател на УС на БАКИ*

ПРОГРАМА

за дейността на сдружение „Българска асоциация по клинична имунология“ през 2015 година

1. ОРГАНИЗАЦИОННА ДЕЙНОСТ

1.1. Провеждане на заседание на УС на 3 месеца, а при необходимост често.

1.2. WEB страница на БАКИ

- През 2015 г. ще продължи отразяването на дейността на БАКИ, в т.ч. информация за национални и международни форуми в областта на имунологията, трансплантологията, печатни издания и други новини.
- Ще се публикува информация, насочена към младите специалисти, желаещи да специализират и да придобият специалност в България, както и информация за награди и стипендии за участие в национални и международни форуми.
- Ежедневно проверяване на електронната поща.
- Изграждане на нов сайт или реконструкция на настоящия по алгоритъм, изготвен от комисия в състав: проф. Виктория Сарафян, д-р Цветелина Великова и Цветелин Луканов.

1.3. Набиране на нови членове, включително и от други специалности.

2. ПУБЛИКАЦИОННА ДЕЙНОСТ

- Издаване на годишник – 8-и брой на Асоциацията – с информация за проведените курсове и конференции през 2014 година.

Материалите да се предадат до 15 март 2015 година.

3. ВОК:

- Продължаване на схемите:

Схема 1 за определяне на имуноглобулини (Г, А, М, Е), С3 и С4 фракции на комплемента, СРП – 2 цикъла с по 3 проби;

Схеми 2А (АНА и анти-ДНК антители), 2Б (ЕНА антители); 2В (АНЦА), 2Г – антикардиолипинови и β 2-GP антители – 1 цикъл с 3 проби; 2Д-ССР6, РФ – 1 цикъл с 2 проби от INSTANT и по възможност 1 наша.

Схема 3 – определяне на HLA-B27 – 1 цикъл с 5 проби.

4. ПРОВЕЖДАНЕ НА КОНФЕРЕНЦИИ:

4.1. Честване на **Международния ден на имунологията** (29 април) и седмицата на ПИД (22–29 април) през 2015 г. по места с различни прояви.

4.2. Училище по имунология – тема „**Last generation Tools for Immunology Research**“, 15–17 октомври 2015, София.

4.3. Тематична среща „Имунология и хранене“ съвместно с фирмите, имащи отношение към проблема – 11–12 септември 2015, с. Белчин.

4.4. Десета национална конференция за оценка на качеството в имунологията, м. декември 2015 год., София.

5. ВРЪЗКИ СЪС СРОДНИ МЕЖДУНАРОДНИ ОРГАНИЗАЦИИ

- Продължава участието на проф. Алтънкова като представител на БАКИ в срещите на секция „Лабораторна медицина“, дивизия „Имунология“ към UEMS през 2015 г.
- ISAC– определяне на контактни лица.
- ESID, CIS.

6. ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С МЗ – НЗОК – БЛС

- Предложение до МЗ за създаване на пакет „Клинична имунология“ в СИМП, включващ консултативен преглед и имунологични диагностични процедури (ВСМД).
- Предложение за включване на нови лекарства за лечение на ПИД в нормативните документи за реимбурсация.
- Клинична пътека: Диагностика и лечение на имуномедирирани репродуктивни нарушения при жената.
- Клинични процедури:
 - Лабораторен диагностичен алгоритъм за доказване на първични имунни дефицити;
 - Провеждане на заместителна терапия при първични имунодефицити.
- Предложение в МЗ за обозначаване на експертните центрове за ПИД в Регистъра на МЗ чрез Комисията за регистриране на редките болести“ съгласно Наредба 16 от 30 юли 2014 г.

7. НАГРАДИ И СТИПЕНДИИ ЗА УЧАСТИЕ В НАЦИОНАЛНИ И МЕЖДУНАРОДНИ ФОРУМИ

- Стипендии за участие в национални форуми;
- Награди за постери;
- Стипендия за участие в международни форуми; краткосрочни специализации в чужбина.

МЕЖДУНАРОДНО УЧИЛИЩЕ ПО ИМУНОЛОГИЯ „ЧЕРНО МОРЕ“ – ИНИЦИАТИВА, КОЯТО ТРЯБВА ДА ПРОДЪЛЖИ

Мария Николова

„Във времето на свръхспециализация в областта на медицината... имунологията привлича със способността си да свързва специалности и концепции.“

(из есето на един участник)

На 1 и 2 октомври 2014 г. в курорт „Златни пясъци“ се състоя **Първото международно училище по имунология „Черно море“**, организирано от секция „Имунология“ към СУБ и Българската асоциация по клинична имунология, с щедрата подкрепа на Европейската федерация на имунологичните дружества (EFIS) и списание European Journal of Immunology. Целта на тази образователна инициатива е развитието на отворена система за обучение в областта на фундаменталната, приложната и клиничната имунология с участието на академични, научни и здравни институции от България и съседните географски региони.

Първото издание на училището премина под мотото „Имунология за всички“ и беше насочено към младите хора с вкус към научноизследователската работа в областта на биомедицинските науки, които желаят да разширят своите теоретични познания и практически умения по имунология. Програмата включваше концептуални въпроси на общата и клиничната имунология с акцент: възможности за кариерно развитие на начинаещите имунолози. За привличане на възможно най-широка аудитория условията за участие бяха максимално опростени: авторско резюме за кандидатите с професионален опит или есе от 150 думи на тема „Защо имунология“ за абсолютно начинаещите.

Бяха разгледани и одобрени общо 60 кандидатури (Таблица 1), в т.ч. студенти – бакалаври и магистри по специалностите биология и молекулярна биология, хуманна и ветеринарна медицина от съответните университети в София, Пловдив, Варна и Стара Загора, докторанти и постдокторанти по имунология, молекулярна биология и сродни специалности от СУ „Кл. Охридски“, МУ – София, МУ – Пловдив, НЦЗПБ, институти на БАН (ИмБ, ИБИР, ИПАЕМ, лекари – специализанти и асистенти от университетските болници в София, Варна и Пловдив. Сред одобрените участници бе и д-р Алба Грифони, току-що защитила докторантура по специалност „Имунология и приложна биотехнология“ към университета „Тор Вергата“, Рим (Таблица 1).

Лекционният материал бе разработен и представен от международен екип, включващ утвърдени специалисти от Австрия, България, Италия, Унгария и Франция (Таблица 2). С много енергия и ентузиазъм лекторите осъществиха 8-часовата интерактивна и интензивна програма. Апелът, отправен към ауди-

торията, бе „Участвайте в лекциите, не се страхувайте да задавате въпроси, споделяйте идеите си, възползвайте се от дискусиите!“.

Темите бяха изключително добре балансирани между общата имунология („Имунната система – приятел или враг“, Шрини Кавери, Франция, „Параметри, повлияващи имунния отговор“, Жан-Марк Кавайон, Франция, „Пластичност и неопределеност в имунната система“, Чавдар Василев, България, „Инструктивната роля на вродения имунитет“, Ана Ердей, Унгария); клиничната имунология („Автоимунитет – ключови факти и парадокси“, Мариана Мурджева, България; Имунобиология на трансплантациите, Анастасия Михайлова, България); и имунологичната методология („Как да се възползваме максимално от флоуцитометрията“, Мария Николова, България; „Миши модели в имунологията“, Адрей Чорбанов, България, и „Имуноинформатика в геномната ера“, Масимо Амикосанте, Италия.) Наред с това бяха разгледани и обсъдени изключително интересни практически въпроси, засягащи кариерата на младите учени („Организация и предизвикателства на докторантурите“, Виктория Сарафян, България; „Учебната програма по имунология според Европейския борд на Съюза на Европейските медицински дружества“, Герхард Злабингер, Австрия; „Научноизследователски проекти за начинаещи имунолози – как да кандидатстваме и да получим финансиране“, Мариана Мурджева, България, и „Кандидатстване за международно финансиране: предложенията на EFIS“, Ана Ердей, Унгария).

В края на програмата както студентите, така и преподавателите, бяха единодушни, че училището е една инициатива, която трябва да продължи. „Ние сондирахме мнението на младите хора за имунологията и получихме изключително позитивен вот“, обобщил съпредседателят на секция „Имунология“ проф. М. Николова. Следващите издания на училището се предвиждат в по-тесен формат, организирани около конкретна тема, със съответен практически модул. Организаторите отчетоха като основно бъдещо предизвикателство популяризирането на училището в международен план, привличането на студенти и лектори от съседни държави и на тази база – стимулиране на регионалното проектно сътрудничество.

Таблица 1. Участници¹ в Първото международно училище по имунология „Черно море“ – разпределение по образователна степен и специалности

Образователно ниво	Специалности	Институции	Брой
Студенти бакалаври	Молекулярна биология	БФ, „СУ Климент Охридски“	11
Дипломирани бакалаври	Молекулярна биология	БАН, ИмБ „Стефан Ангелов“	5

¹ Средна възраст на участниците: 27,2 г., общ брой 60, от които: 17 мъже и 43 жени.

Студенти магистри	Хуманна медицина Ветеринарна медицина	МФ, СУ „Климент Охридски“ МФ, МУ – Варна, Тракийски у-т – Ст. Загора	6
Дипломирани магистри	Биология Медицина	ПУ „П. Хилендарски“, МУ – Пловдив, МУ – София, ИБИР – БАН, УМБАЛ „Александровска“, УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна	8
Лекари специализанти	Клинична имунология	УМБАЛ „Александровска“, УМБАЛ „Св. Ив. Рилски“	2
Докторанти	Имунология	ИБИР – БАН, ИмБ – БАН, НЦЗПБ, МУ – София, МУ – Пловдив	22
Постдокторанти	Имунология, приложни биотехнологии	НЦЗПБ, МБАЛ „Пирогов“, УМБАЛ „Александровска“, У-т „Тор Вергата“, Рим, ИПАЕМ – БАН	6

Средна възраст на участниците – 27,2 г., общ брой – 60, от които: 17 мъже и 43 жени

Таблица 2. Факултет на Първото международно училище по имунология

Ана Ердей	<i>професор, доктор Катедра по имунология, Университет „Л. Йотвош“, Будапеща, Унгария anna.erdei@freemail.hu</i>
Анастасия Михайлова	<i>професор, доктор по имунология Клиника „Клинична имунология“ УМБАЛ „Александровска“, София immunology@abv.bg</i>
Андрей Чорбанов	<i>доцент, доктор по имунология Институт по микробиология „С. Ангелов“, Българска академия на науките, София tchorban@microbio.bas.bg</i>
д-р Виктория Сарафян	<i>професор, доктор на науките Специалности: медицинска биология, клинична имунология Р-тел на катедра „Медицинска биология“, Медицински ф-т, МУ – Пловдив</i>

д-р Герхард Злабингер	<i>професор, доктор по имунология Отдел „Клинична и експериментална имунология“, Институт по имунология; Център по патофизиология, инфектология и имунология, Виена, Австрия gerhard.zlabinger@meduniwien.ac.at</i>
Жан-Марк Кавайон	<i>професор, доктор екип „Цитокини & Възпаление“, INSERM Институт „Пастьор“, Париж, Франция jean-marc.cavaillon@pasteur.fr</i>
д-р Мариана Мурджева	<i>професор, доктор по имунология Специалности: микробиология, клинична имунология Р-тел катедра „Микробиология и имунология“, Фармацевтичен ф-т МУ – Пловдив, mmurdjeva@yahoo.com</i>
д-р Мария Николова	<i>професор, доктор на науките Специалност: клинична имунология Зав. отдел „Имунология и алергология“, Национален център по заразни и паразитни болести, София mstoimenova@ncipd.org</i>
Масимо Амикосанте	<i>доктор по имунология, доцент по обща и клинична патология Катедра „Биомедицина и профилактика“, Университет „Тор Вергата“, Рим, Италия massimo.amicosante@uniroma2.it</i>
д-р Чавдар Василев	<i>професор, доктор на науките Институт по микробиология „С. Ангелов“, Българска академия на науките, София vassilev@microbio.bas.bg</i>
Шрини Кавери	<i>доктор по имунология екип „Имунопатология и терапевтични имуоинтервен- ции“ INSERM, Научноизследователски център Cordeliers, Париж, Франция, srini.kaveri@crc.jussieu.fr</i>



Снимка 1. д-р Масимо Амикосанте



Снимка 2. проф. Ана Ердей



Снимка 3. д-р Шринни Кавери



**Снимка 4. Участниците и преподавателите
Факултет на Първото международно училище по имунология „Черно море“ –
визитни картички**

ПЪРВИЧНИТЕ ИМУННИ ДЕФИЦИТИ В БЪЛГАРИЯ – ПОСТИЖЕНИЯ И ПРЕДИЗВИКАТЕЛСТВА НА БЪЛГАРСКАТА АСОЦИАЦИЯ ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ

***Елисавета Наумова¹, Мариана Мурджева², Марта Балева¹,
Мария Спасова³, Пенка Переновска⁴***

*¹УМБАЛ „Александровска“ – София, Клиника по клинична имунология,
Медицински университет – София, Медицински факултет, Катедра по
клинична лаборатория и клинична имунология*

*²Катедра „Микробиология и имунология“, Фармацевтичен факултет, МУ –
Пловдив*

³Клиника по педиатрия и медицинска генетика, УМБАЛ „Св. Георги“ – Пловдив

*⁴УМБАЛ „Александровска“ – София, Клиника по детски болести, Медицински
университет – София, Медицински факултет, Катедра по детски болести*

ВЪВЕДЕНИЕ

Една от главните задачи на Българската асоциация по клинична имунология (БАКИ) от самото ѝ основаване през 2005 г. е да повиши вниманието на обществото, специалистите, правителствените структури и НЗОК към първичните имунни дефицити (ПИД) – хетерогенна група от вродени дефекти в имунната система с повишена склонност към остри, рецидивиращи, хронични инфекции, автоимунни и онкологични заболявания. През изминалите години усилията на голяма част от българските клинични имунолози бяха насочени към подобряване на диагностиката и лечението на ПИД. Липсата на диагностика на скрит имунен дефицити зад клиниката на рецидивиращи тежки настинки, отити, синусити, пневмонии и гастроинтестинални болести води до прилагане на повтарящи се антибиотични курсове с малък ефект. Пропускането на основната причина – ПИД, предизвиква и социално-икономически последици: чести хоспитализации, необосновани разходи за лечение на симптомите, отсъствие от училищни занимания и работа. Ангажираността на обществото, общопрактикуващите лекари и специалистите хематолози, педиатри, клинични имунолози, отоларинголози, алерголози, генетици, държавни институции и неправителствени организации е изключително важна за подобряване на диагнозата, ранното откриване и осигуряване на достъп до адекватна терапия на децата и възрастните с ПИД, чиято прогноза в миналото беше песимистична. Тези болести изискват тясна колаборация между лекари с различни специалности, пациенти и администратори за поставяне на точна диагноза и започване на навременно лечение.

НАЧАЛОТО

Първият случай на ПИД в България (20-годишен мъж с над 50 пневмонии) е съобщен от пловдивския педиатър – професор Вапцаров, през 1965 г. Състоянието е описано като дисагамаглобулинемия с липса на серумни ИгА и ИгМ при намалени ИгГ.

Първото наблюдение на наследствен ангиоедем (НАЕ) в България е направено от проф. Б. Божков, проф. П. Кирчев и д-р И. Владимиров през 1973 г. и е представено на II национален конгрес по оториноларингология, Пловдив, през 1975 г. [1, 2]. Определянето на C1 естеразния инхибитор при двама болни (майка и син) е извършено от проф. Lachmann в Hammersmith Hospital, Лондон.

Към 1993 г. са описани 72 фамилии с 1238 членове, 283 от които болни от НАЕ [3]. Извършени са имунологични и генетични проучвания на болните с НАЕ от проф. Б. Божков, проф. М. Балева, проф. И. Кременски, проф. В. Ганев, доц. А.Савов, доц. К. Николов, д-р. М. Угърчински и доц. М. Стаевска в МУ – София [4, 5, 6, 7, 12].

През 1997 г. е диагностициран първият случай у нас с общ вариабилен имунен дефицит (Common variable immunodeficiency-CVID) от проф. Е. Наумова при 51 г. жена с хипоагамаглобулинемия, чести синопулмонарни инфекции, гастроинтестинална симптоматика и хепатоспленомегалия.

През 2005 г. България се включва в т.нар. J project за ПИД, координиран от проф. Ласло Мароди от Дебрецен, Унгария. Участието в J проекта подпомогна да се насочи вниманието на медицинската общност към съществуването на ПИД, възможностите за диагностика и лечение на пациентите с ПИД и повишаване на обществената ангажираност към тези заболявания в страните участнички. БАКИ, съвместно с други организации, е била домакин на четири работни срещи по проекта, проведени в София, Цигов чарк, Слънчев бряг, Златни пясъци. Присъстваха и чуждестранни гост-лектори, водещи специалисти по проблема – проф. Л. Мароди от Унгария, проф. К. Варнац от Германия, и д-р К. Пикард от Франция и други.

Активността на БАКИ относно ПИД е свързана и с участията на българските имунолози в инициативите на Института по редки болести в Пловдив. Включването чрез тази организация на пловдивски имунолози и специалисти по редки болести в работната мрежа за НАЕ (NAENETWORK project) през периода 2005–2008 г. позволи добри професионални контакти с проф. Хенриета Фаркас от Унгарския център по наследствен ангиоедем при Института „Земелвайс“ в Будапеща. В рамките на Националните конференции по редки болести в Пловдив през 2009, 2010, 2012 и 2013 г. бяха организирани поредица от работни срещи и кръгли маси на БАКИ за ПИД. През септември 2012 г. на 3-ата Национална конференция по редки болести в Пловдив се обсъдиха възможностите за изграждане на Експертни центрове за ПИД в страната.

Създадоха се и пациентските организации за НАЕ (с председател Йорданка Павлова) и Общ вариабилен имунен дефицит (с председател отец Стоил Лазаров), чиито представители участват активно във всички мероприятия, свързани с ПИД.

ОСНОВНИ ПОСТИЖЕНИЯ В ДИАГНОСТИЧНО-ЛЕЧЕБНАТА ДЕЙНОСТ НА ПИД В СТРАНАТА

Усилията на БАКИ през изминалия десетгодишен период доведоха до следните резултати в съвременната диагностика и терапия на ПИД:

1. Националната работна група за ПИД, създадена през 2010 г., започна разработване на алгоритми за диагностика и лечение на основните ПИД.

2. Създаде се и се актуализира периодично Националният регистър за ПИД. Това позволява както събирането на данни за честотата на ПИД в страната, така и мониториране на състоянието на болните.

3. Добра колаборация с пациентските организации.

4. Лечението на пациенти с доказани ПИД – деца и възрастни, се покрива от НЗОК чрез Клинична пътека 306, разработена от група имунолози и педиатри и утвърдена с Постановление № 5 на МЗ от 10.01. 2013 г. [8].

5. Извънболничното заместително лечение на пациентите с наследствени имунофедичити се осигурява по изисквания на НЗОК с протоколи на комисии от специалисти. Общо по клиничната пътека и в извънболничната помощ са обхванати 40 пациенти.

6. Изградиха се два експертни центъра за ПИД в страната – в УМБАЛ „Александровска“ – София и УМБАЛ „Св. Георги“ – Пловдив [9]. В тях обединяват компетенциите си специалисти имунолози, педиатри и алерголози за прегледи, консултации, назначаване на изследвания и предписване на лечение на болни деца и възрастни с ПИД. Уточняват се болните, подлежащи на заместителна терапия, и критериите за нейното започване и продължаване и се изготвят експертни становища за пациентите.

7. Въведе се обучение на пациенти и родители за провеждане на терапия със субкутанен гамаглобулин в Клиниките по педиатрия в София и Пловдив и Клиниката по клинична имунология в София. Дискусиите на работните срещи и конференции за ПИД, както и публикациите от членове на БАКИ за диагностиката и лечението на тези болести, спомагат за обучението на ОПЛ и специалистите по проблема [10–15].

8. Ангажираността на обществото за каузата ПИД се повиши чрез организираните пресконференции в медицинските университети и болниците в София, Пловдив и Плевен на 29 април 2014 г. по случай Международната имунологична седмица, посветена на ПИД.

ПРЕДИЗВИКАТЕЛСТВАТА, ИЛИ QUO VADIS?

Какво предстои като бъдещи задачи пред БАКИ за подобряване диагностиката и терапията на ПИД?

1. Въвеждане на скрининг програма при новородените (TREC screening) за тежки имунни дефицити (SCID) и Т-клетъчна лимфопения.

2. Изграждане на други експертни центрове за ПИД в страната с цел улесняване достъпа на пациентите.

3. Въвеждане на реимбурсирането на други скъпоструващи медикаменти за заместителна терапия на ПИД – напр. интерферон-гама и GM-CSF.

4. Създаване на клинични процедури за високоспециализирана диагностика и лечение на ПИД, с продължителност 12 до 24 часа и на по-ниска цена от КП. Те биха покрили лабораторните изследвания, необходими за протокола за заместителна терапия в извънболничната помощ; проследяването и обучението на пациентите, които реално се извършват в болничната, а не в извънболничната среда. Подобна дейност съществува за пациенти с хемофилии и таласемии.

5. Регистриране на съществуващите експертни центрове за ПИД и създаване на референтна мрежа за ПИД съгласно Наредба № 16 на МЗ от 30 юли 2014 г. [16].

6. Съобразяване с политиката на трансгранично национално сътрудничество според Директива 2011/24/ЕС за правата на пациентите при трансгранично здравно обслужване. В условията на липсваща генетична диагноза за ПИД в страната е необходимо БАКИ да предоставя надеждна информация на пациентите относно достъпа и възстановяването на разходи за здравно обслужване в друга страна от ЕС. Информацията за безопасността на пациентите и качеството на медицинските грижи, осигурена от националните центрове за контакт, ще им позволи да направят информиран избор, преди да отидат да се лекуват в чужбина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Първичните имунни дефицити са редки заболявания. Досега в България са регистрирани 157 пациенти, което означава честота 2/100 000. Като се вземе предвид, че ИгА дефицитът е с честота 1/500, а общият вариабилен ИД се среща средно 1/30 000, може да се направи заключение, че има голям процент недиагностицирани случаи, а следователно и нелекувани. Ето защо е необходимо активно взаимодействие с другите медицински дружества, Сдружението на общопрактикуващите лекари, НЗОК, МЗ и други организации с оглед осигуряване на достъп до ранна и адекватна диагноза и лечение на деца и възрастни с първични имунни дефицити.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Кирчев, П., Б. Божков, И. Владимирев. Трудове на II национален конгрес по оториноларингология, Пловдив 30.IX–2.X.1975 г.
2. Божков, Б., К. Николов. Наследствен ангиоедем – диагностични проблеми и лечение с описание на случаи. – Проблеми на вътр. мед 1982; 10 (1): 56 – 63.
3. Божков, Б., М. Балева, К. Николов, М. Угърчински, В. Ганев, И. Стоилов. Двадесет години проучвания на наследствения ангиоедем в България. – Алергология клинична имунология, 1993; 16 (4): 1–5.
4. Божков, Б., К. Николов, М. Балева. Фамилни проучвания на болни с наследствен ангиоедем. – Вътрешни болести, 1988; 27 (4): 62–65.

5. Ганев, В., Б. Божков, М. Угърчински, М. Балева. Генетични аспекти на наследствения ангиоедем. – Съвременна медицина, 1990; 41 (5): 8–10.
6. Божков, Б., М. Балева, К. Николов. Фракции на комплемента при болни с наследствен ангиоедем. – Дерматологична венерология, 1991; 30 (1): 17–20.
7. Стаевска, М., А. Савов, В. Ганев, И. Кременски, М. Балева, Б. Божков. Полиморфизъм на C1 инхибиторния ген, изследван у здрави и болни от наследствен ангиоедем – предварителни резултати от генетичните проучвания. – Съвременна медицина, 1997; 48 (6): 17–21.
8. Постановление № 5 на МЗ от 10.01. 2013 г. за приемане на обемите и цените на медицинската помощ по чл. 55, ал. 2, т. 2 от Закона за здравното осигуряване за 2013 г., обн. в ДВ, бр. 5 от 18.01. 2013 г.
9. Информация за научна сесия „ПИД експертни центрове в България“. 4-та Национална конференция за редки болести и лекарства сираци, 13–14.09.2013 г., Пловдив. Годишник на БАКИ, 2013, 58–59.
10. Наумова, Е. Приложение на IVIG's при имунодефицитни състояния. Годишник на БАКИ, 2009, 15–18.
11. Балева, М., К. Николов. Нежелани ефекти от лечението с интравенозни имуноглобулинови препарати. Годишник на БАКИ, 2009, 40–47.
12. Николов, К., М. Балева. Наследствен ангиоедем – клиника, диагноза, терапия. Годишник на БАКИ, 2009, 51–55.
13. Балева, М., М. Мурджева, К. Николов. Участие на вродените имунни дефицити на комплемента при някои инфекциозни и автоимунни болести. Годишник на БАКИ, 2012, 55–63.
14. Младенова, Цв., С. Михайлова, З. Спасова, Д. Кюркчиев, А. Михайлова, И. Алтънкова, Е. Наумова. Клиничен случай на пациент с общ вариабилен имунодефицит и гастроинтестинални прояви. Годишник на БАКИ, 2012, 78–86.
15. Халачева, Кр. Клиничен случай на преходен ИгА дефицит. Годишник на БАКИ, 2013, 50–57.
16. Наредба № 16 на МЗ от 30 юли 2014 г. за условията и реда за регистриране на редките заболявания и за експертните центрове и референтните мрежи за редки заболявания.

Таблица 1. Регистър на пациентите с ПИД в България

Диагноза	Брой пациенти – 157
HAЕ	77
CVID	19
XLA	5
Transient hypogammaglobulinemia	3
Selective IgA deficiency	14
Hypogammaglobulinemia	5
Hyper-IgE syndrome (Job's syndrome)	3

Omenn's syndrome	1
SCID	2
MHC class II deficiency	1
Predominant T-cell deficiency	1
22q11.2deletion syndrome	5
Ataxia telangiectasia	5
Nijmegen breakage syndrome	3
HGD ,LAD	4
ALPS	1
PFAPA	1
други	7

ЕВРОПЕЙСКИ СЪЮЗ НА МЕДИЦИНСКИТЕ СПЕЦИАЛИСТИ (UEMS) И УЧАСТИЕТО НА БЪЛГАРСКАТА АСОЦИАЦИЯ ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ (БАКИ)

проф. д-р Искра Алтънкова, д.м.н., член на УС на БАКИ

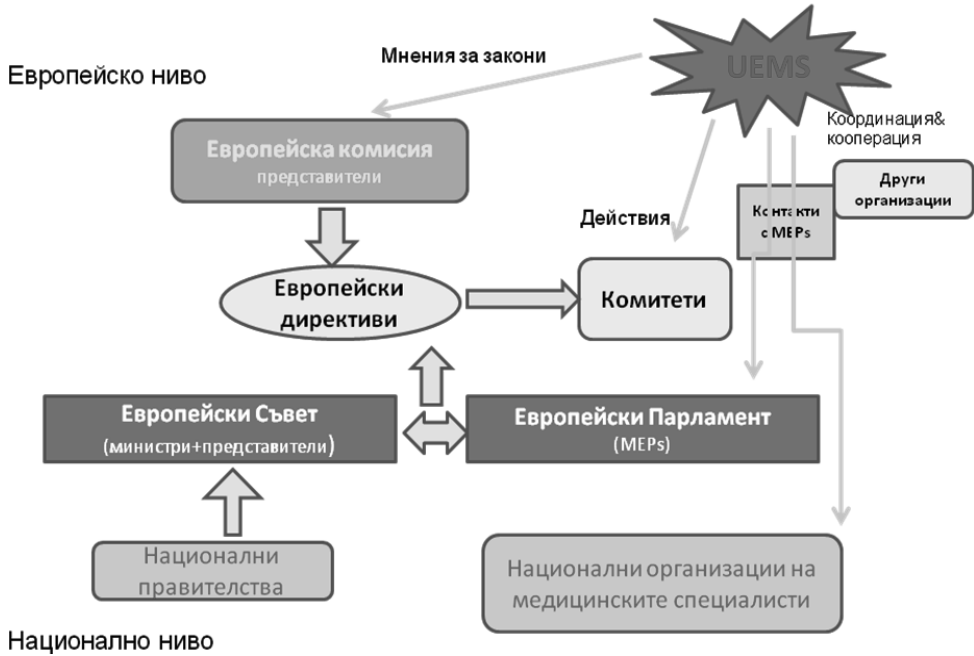
Съюзът на европейските медицински специалисти (UEMS) е създаден на 20 юли 1958 г., когато започва оформяне на професионални организации в Европейските страни. Първоначално участват 6 страни: Италия, Франция, Германия, Бенелюкс. Понастоящем участват 36 страни, вкл. България. Целта е да се дискутират данни, предоставени от Националните здравни организации, и да се опита да се хармонизират различните ситуации и закони в Европейските страни. UEMS включва над 1.5 милиона лекари и е най-старата медицинска организация. Има т.нар. Докторска директива – ЕС4, 2006 г., която създава Европейския регистър на лекарите – професионалисти, вкл. и по Clinical Biopathology. Схематично основните структури и взаимоотношения на UEMS са представени на Фигура 1.



Фигура 1. Структури и взаимоотношения на UEMS

Основните начини и механизми на взаимодействие са: делегирано участие в различни структури на Европейско и национално ниво, редовни контакти и взаимодействия между тях, лобиране (Фигура 2).

Механизми на действие – лобиране



Фигура 2. Механизми на взаимодействия и влияние на UEMS

Структурни звена на UEMS, които представляват различните медицински специалности, са секциите, често обединени по няколко специалности (дивизии) в една секция. Представителството там е на база официално делегиране до 2 членове от страна на Националните съюзи на медицинските специалисти като членове на секцията и по 1 делегат от страна – като членове на съответната дивизия по специалностите в дадената секция. От 2010 г. БАКИ, чрез своя представител проф. Искра Алтънкова, е официален делегат на Дивизията по имунология на Секцията по лабораторна медицина.

СЕКЦИЯ „ЛАБОРАТОРНА МЕДИЦИНА/МЕДИЦИНСКА БИОПАТОЛОГИЯ“

Тя е създадена през 1992 г. в Брюксел и включва 5 специалности: Поливалентна медицинска биопатология/Лабораторна медицина, Клинична микробиология, Клинична химия, Трансфузиология и Хематология, Имунология. В последните години бе включена и дивизия „Медицинска генетика“, а дивизия

„Микробиология“ излезе и основа самостоятелна секция. Тогава се сформира и Европейският борд по медицинска биопатология, който действа в следните направления:

- препоръчва стандарти за специализациите
- прави предложения за качеството и съдържанието на програмите
- препоръчва процедури за свободно движение на биопатолози в ЕС
- препоръчва критерии, на които да отговарят обучителните центрове
- проучва съдържанието и качеството на специалностите в различните страни на ЕС
- осигурява обмяна на специалисти между различни обучителни центрове
- институционализира признаване на качество и компетентност чрез Fellowship of the European Board of Medical Biopathology (F.E.B.M.B)
- Продължителното обучение, както и E-learning като дейности на UEMS са много важни и се разработват усилено. Тези въпроси засега са обект на друга структура, но все повече ще са обект и на отделните секции.
- Организиране на съвместни конгреси на UEMS и EFCC по Лабораторна медицина – първият беше в Лисабон през 2010 г., вторият – в Дубровник през 2012 г. и третият конгрес бе в Ливърпул, 2014 г.

От 2013 г. официално името на секцията е „Лабораторна медицина“ към UEMS и макар че решенията и на този етап не са задължителни за отделните европейски страни, те са добър ориентир при създаването на националните програми и хармонизирането им с Европейските изисквания. Настоящият Президент на секцията е д-р Lena Norlun, Швеция, а Президент на Борда е д-р Augusto Machado, Португалия, Секретар е проф. Gerhard Zlabinger, Виена. Шеф на Дивизията по имунология (Convener) е проф. Siraj Misbah, UK.

Европейският борд по лабораторна медицина управлява 5-те дивизии по споменатите по-горе медицински специалности. Всички специалности са равнопоставени в секцията. Препоръчаната продължителност на специализацията е 4 + 1 години и е една до две години задължително обучение в клиника (препоръка на UEMS). Обучението по имунология за поливалентната специалност (отдел, който фигурира в курикулума) трябва да се води от моновалентни специалисти – имунолози в специализирани (акредитирани) центрове/лаборатории.

Активности на UEMS Дивизията по имунология са:

- създаване на курикулум на специалността „Имунология“, публикуван в Immunology letters, vol 96, 2005, 305–310, и в т.нар. Синя книга на UEMS, съдържаща курикулума за обучението по имунология, изискванията към учебните бази, контрола на придобитите знания и умения и др.
- широка дискусия и активни мероприятия за утвърждаване на ролята на лабораторния лекар
- активно привличане на нови страни – делегати в структурата на дивизията
- продължаващата следдипломна квалификация, ЕАССМЕ и др.

УЧАСТИЕ НА БАКИ В ДЕЙНОСТТА НА СЕКЦИЯ „ЛАБОРАТОРНА МЕДИЦИНА“ НА UEMS

През 2008 г. от УС на БАКИ бе взето решение да се установят връзки с различни европейски и световни подобни организации с цел да се легитимира и популяризира дейността на БАКИ. Бяха разпратени писма до ръководства на различни организации, но за съжаление ефективни контакти не се получиха. Затова се взе решение да се изпрати представител (И. Алтънкова) на Втория европейски конгрес по имунология в Берлин, където бе предвидено специално разширено заседание по въпроси за състоянието на европейските структури и обучението на специалистите по клинична имунология. На място влязохме във връзка с европейски структури по имунология и клинична имунология, като EFIS, ESID, UCLA, национални асоциации по имунология – германска, холандска, френска, английска и др, както и FOCIS. На организираната кръгла маса от EFIS на тема „За европейската мрежа от свързани с имунологията организации и как да се промотира обмен на научни знания между имунолози и клиницисти в полето на имунологията“, която бе председателствана от проф. С. Fridman, организацията бе представена като „чадърна“ организация на 28 национални имунологични общества, с повече от 12 000 членове, която финансира издаването на списанията *Immunological Letters* и *European Journal of Immunology* и от това финансира и дейността си. Понастоящем в EFIS може да членува само по една организация от дадена страна и това от България е Секцията по имунология към СУБ, така че афилирането на БАКИ не бе възможно.

Заседанието, организирано от UEMS и председателствано от проф. Gerhard Zlabinger от Виена, бе посветено на структуриране на Европейска програма за обучение по клинична имунология. Няколко важни теми бяха обсъдени и които, както се оказа по-късно, бяха в основата на дейността на Дивизията по имунология към Секцията по лабораторна медицина на UEMS:

- Опити за хармонизиране на курикулума за специализация по имунологичния за Европа, какъвто към този момент липсва.
- Беше предложено в курикулума да се включат новите тенденции, като нови имунодефицити, терапевтични антители, експериментално използване на Иг; важно е да се защити мястото на лабораторната диагностика.
- Предложи се организирането на европейски висококачествени курсове за специализиращи, тъй като в рамките на отделните държави има сравнително малко специализанти.
- Специално внимание бе отделено на важността на начините за проверка на знанията и уменията на специализантите на две нива – проверка на придобитите знания и проверка на уменията на работното място.

Получихме покана за следващата среща на Секцията по биопатология/ лабораторна медицина на UEMS, в Levi/Финландия, 2009 г., но успяхме да се „класираме“ за следващото редовно заседание на Секция *Clinical Biopathology* към UEMS в Копенхаген през май, 2010 г. Там проф. Искра Алтънкова бе приета като редовен делегат към Дивизията по имунология на Секцията по биопатология. Президент на секцията тогава бе Dr. Utz P. Merten.

Секцията по лабораторна медицина (и респективно Дивизията по имунология), се събира на редовни двудневни заседания 2 пъти годишно, обикновено м. април и м. октомври. УС на БАКИ единодушно гласува и финансира редовното участие на представителя си проф. д-р Искра Алтънкова в тях. Досега тя е взела активно участие в 8 редовни срещи, а една от тях – през октомври 2012 г. – се състоя в София. Домакин и организатор от българска страна бе БАКИ. Срещата се състоя в Грандхотел „София“. По наша преценка и тази на ръководството на Секцията по лабораторна медицина на UEMS условията и организаторската дейност изпълниха всички изисквания и осигуриха едно отлично ниво на провеждането.

Първото заседание на Секцията се състоя на 14. 10. 2011 г. започна с приветствия от доц. д-р Тодор Попов, в качеството си на Президент на Българския съюз на медицинските специалисти и проф. Елисавета Наумова, като Председател на БАКИ. След това бе представена кратка презентация за състоянието на лабораторната диагностика в България, която беше приета много добре. Бе подчертано, че курикулумът на българската програма за специализация по клинична имунология в много голяма степен изпълнява европейските изисквания, и това срещна голямо одобрение от членовете на секцията и многократно след това бе подчертавано като постижение на БАКИ. Осигурен бе полудневен автобусен тур за разглеждане на София с екскурзовод на английски език и официална вечеря в ресторант „Воденицата“.

През 2012 г. ръководството на Секцията по лабораторна медицина бе обновено и д-р Lena Norlund стана неин Президент. Започна доста по-активна дейност, очертана в Стратегическия план за действие. Той е базиран на UEMS Стратегията (2007–2012). Всички членове на секцията бяха разпределени в групи, които да работят по задачите. В плана са очертани следните насоки за действие:

- Издигане и популяризиране на ролята на лекаря в лабораторната медицина – важен въпрос, който изисква активни действия. Основата бе поставена от д-р Siraj Misbah и активното сътрудничество на членовете на секцията, които приготвиха и публикуваха актуална статия в *British Medical Journal*, 2012, която срещна изключително положителен отзвук сред съсловие то по света. Този подход бе оценен високо и някои членове на секцията активно разработват подобни статии и от областите на другите специалности.
- Осъвременяване на подновяване на листа със специалностите, курикулуми на специалностите, оформя се ново понятие – *particular qualification* – напр. онкологията – произлиза от други специалности.
- Активно се търсят и реализират връзки със сходни по дейности европейски организации. Вече успешно са организирани 3 съвместни конгреса по лабораторна медицина между UEMS и IFCC: Лисабон, 2010; Дубровник, 2012; Ливърпул, 2014 г.
- Ще се работи по създаването и разпространяването на Правила и стан-

дарт (Guidelines) за качеството на медицинската практика и в частност в областта на лабораторната медицина, които да са препоръчителни в европейските страни.

КАКВО ПРАКТИЧЕСКИ ДОПРИНЕСЕ НАШЕТО УЧАСТИЕ В СЕКЦИЯТА ПО ЛАБОРАТОРНА МЕДИЦИНА ЗА ДЕЙНОСТТА НА БАКИ

1. Редовното участие на делегирания представител на БАКИ в работата на Секцията по лабораторна медицина и Дивизията по имунология, както и личните контакти с водещи европейски специалисти, позволява да сме в течение на протичащите в Европейския съюз съвременни процеси, касаещи лекарските специалности клинична имунология, имунология, лабораторна медицина и другите съставни специалности в Секцията по лабораторна медицина. Това значително улеснява хармонизирането им с европейските стандарти.

2. Хармонизирахме и легитимирахме съдържанието на нашите програми за специализация по Клинична имунология и Лабораторна имунология с Европейските препоръки, отразени в т.нар. Синя книга.

3. Изготвихме и обсъдихме Дневник на специализанта по клинична имунология (т.нар. Log book), напълно съобразен с европейските изисквания. Дневникът е необходим (и задължителен по европейските препоръки) документ за регистрация и доказване на практическата подготовка на специализанта и представлява задължителен атрибут в портфолиото от документи, необходими за явяване на окончателния държавен изпи. Българският вариант на Дневник на специализанта по клинична и лабораторна имунология е готов за внедряване.

3. В предстоящото текущо осъвременяване на българските Програми за специализация по клинична имунология и по лабораторна имунология ще бъдат съобразени и включени най-актуалните европейски изисквания и тези на новата Наредба 1 за специализациите на българските лекари.

В заключение, БАКИ счита, че бе правилно и полезно включването на български представител в Дивизията по имунология на Секцията по лабораторна медицина на UEMS и прякото му участие в изработването на Европейския курикулум на специалността „Имунология“ и другите развивани инициативи. Участието в този форум позволява директно да се черпи европейския опит, да предоставяме информация за нашите структури и действия в областта на имунологията, но също и да следим развитието на останалите лабораторно-диагностични специалности на европейско ниво. Участието на България бе оценено положително и ни бе оказана честта БАКИ да бъде домакин на среща на Секцията по лабораторна медицина в София през 2011 г. Организацията на тази среща бе оценена много висока от Ръководството на секция „Лабораторна медицина“ на UEMS.

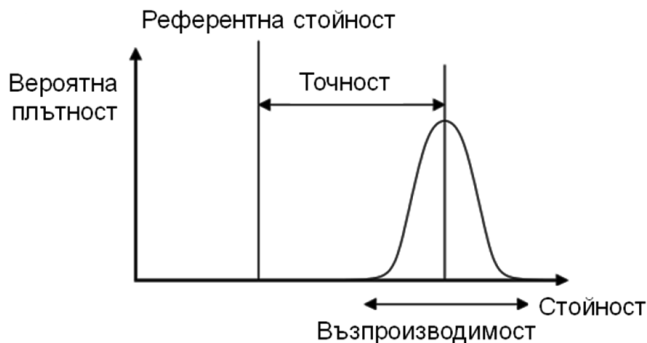
НОВИТЕ ТЕХНОЛОГИИ И РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ ВЪНШНАТА ОЦЕНКА НА КАЧЕСТВОТО

Дора Попова, Росица Владимирова, Елена Викентиева

Военномедицинска академия, София

В имунологичната практика се използва широк арсенал от методи за индуциране, характеристика и оценка на имунния отговор. В последните години, във връзка с нарастващите изисквания към лабораторната медицина, в имунологичната клинично-лабораторна практика навлизат все повече автоматизирани платформи. Те работят с добре стандартизирани реагенти, високочувствителни методи за отчитане на измерваните анализи (белтъци, клетки и др.) дори когато последните са в ниски концентрации и с капацитет да анализират в кратко време висок брой клинични проби с автоматично подаване на получените резултати, запазвани в паметта на съответната апаратура. Рутинната диагностична и научноизследователска дейност на клиничния имунолог се придържа към високите стандарти за добра лабораторна практика. Качеството на резултатите от лабораторните изследвания зависи от използвания метод, т.е. от неговата аналитична надеждност, както и от повлияването му от интерфериращи фактори. Аналитичната надеждност на количествените методи се характеризира със следните критерии:

- **точност**: способността на метода да определи действителната („истинската“) стойност на измервания параметър (Фигура 1).



Фигура 1. Схематично представяне за точност и възпроизводимост на измерването [1]

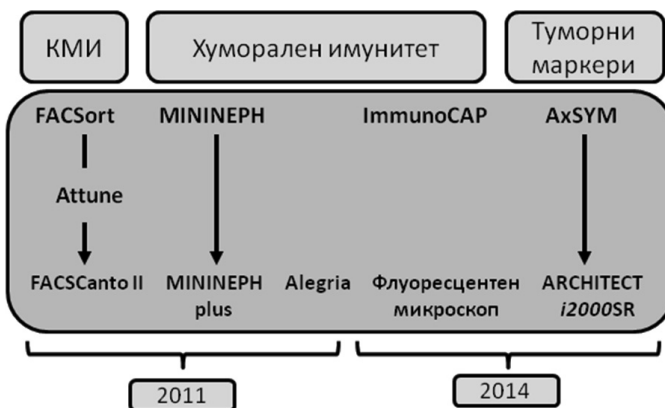
- **възпроизводимост**: отразява близостта на резултатите при многократно изследване на един и същ материал. Възпроизводимост в серия – повторемостта на резултатите от n-броя измервания на даден материал в един и същ ден и цикъл при еднакви условия. Възпроизводимост във време – съответствието на резултатите от измерването, проведено в

различни дни. Ако един метод е прецизен, то случайната вариация при повторните измервания е ниска (Фигура 1).

- **специфичност**: способността на метода да определя само този показател, за който е предназначен. Измерва пропорцията на действително положителните проби, които коректно са идентифицирани като такива. Това предполага нисък дял на фалшиво положителни резултати.
- **чувствителност**: минималната промяна в измерваната величина, спрямо която методът е чувствителен, показва прага на чувствителност, а долната граница на чувствителност е гаранция за откриваемост на даденото вещество. Измерва пропорцията на действително отрицателните проби, които коректно са идентифицирани като такива. Това предполага нисък дял на фалшиво отрицателни резултати.

Лабораторният контрол на качеството има за цел да подобри качеството на лабораторните резултати, като определи, намали и коригира проблемите във вътрелaborаторния аналитичен процес преди предаването на лабораторните резултати. Оценката на качеството е мярка на възпроизводимостта, или колко успешно измерващата система възпроизвежда един резултат. Ако се приеме, че в една лаборатория реагентите, които се използват, техническото оборудване и лабораторният персонал са постоянни величини, вътрешният лабораторен контрол е мярка на възпроизводимостта във времето. Външната оценка на качеството (ВОК) отчита влиянието и на различните условия за провеждане на пробата върху възпроизводимостта на резултатите.

Имайки предвид всичко това, си поставихме въпроса дали с въвеждането на нова лабораторна апаратура резултатите от външната оценка на качеството се променят. За периода 2009–2014 г. в Отделението по клинична имунология във Военномедицинска академия (ВМА) са доставени апарати от по-ново поколение, представени във Фигура 2:



Фигура 2. Нова апаратура в Отделение по клинична имунология – ВМА

Това позволи участие по отношение на клетъчно-медиирания имунитет (КМИ) във външната оценка на качеството (БАКИ) за определяне на основните лимфоцитни популации и субпопулации (ТВНК), включително в проби с ниски CD4+ лимфоцити, както и CD34+ клетки.

Обсъжданите по-нататък резултати за серумните имуноглобулинови нива и туморните маркери са от участие в независимата Национална система за ВОК (НСВОК).

За оценка на лабораторните резултати е използван процентът на отклонение (% d), изчислен като:

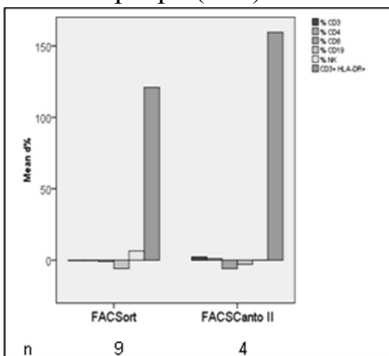
$$\% d = \frac{X_1 - \overline{X_{гр.}}}{\overline{X_{гр.}}} \times 100$$

където: % d – % отклонение
 X_1 – собствен резултат
 $\overline{X_{гр.}}$ – средна стойност на групата

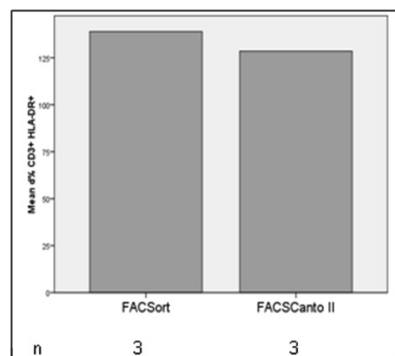
Поради малкия годишен брой кръгове на ВОК получените резултати не позволяват провеждането на задълбочен статистически анализ. Обобщенията показват само набелязани тенденции.

КЛЕТЪЧНО-МЕДИИРАН ИМУНИТЕТ – ФЛОУЦИТОМЕТРИЯ

За определяне на флоуцитометричните параметри на клетъчния имунитет са използвани флоуцитометрите FACSort с един лазер (3 цвята) и двулазерен апарат FACSCanto II (Becton Dickinson) с възможност за отчитане на 8 флоу-ресцентни маркера (5+3).



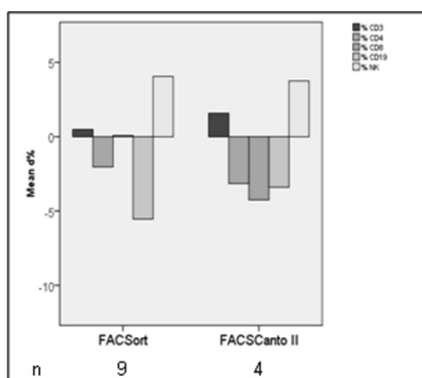
Фигура 3. Среден % на отклонение за основните лимфоцитни популации и субпопулации (CD3+, CD4+, CD8+, CD19+ и NK-клетки, определени като CD3–CD16/CD56+) и активирани T-лимфоцити (HLA-DR+)



Фигура 4. Среден % на отклонение за HLA-DR+ T-лимфоцити

С н е отбелязван броят на участията във ВОК със съответната апаратура

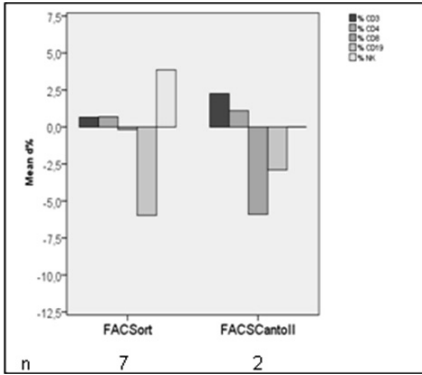
От фигури 3 и 4 е видно, че HLA-DR-положителните Т-лимфоцити показват значително отклонение. Известно е, че този показател зависи от множество фактори като клон на моноклоналното антитяло, флуоресцентен маркер, комбинация с други антигени [2]. Не случайно този параметър не е включван винаги в параметрите, подлежащи на ВОК.



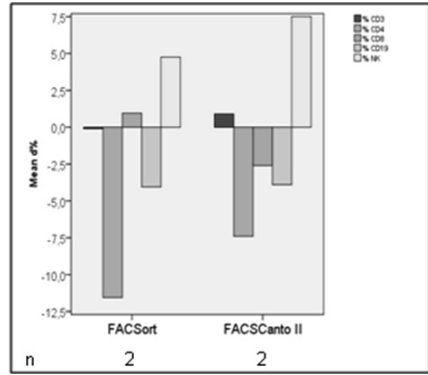
Фигура 5. Среден % на отклонение за основните лимфоцитни популации и субпопулации

Заслужава внимание фактът, че ако се изключат активираните Т-лимфоцити (HLA-DR+), флоцитометрично определените лимфоцитни популации от Т-лимфоцити (CD3+), В-лимфоцити (CD19+) и NK-клетки (CD3– CD16/CD56+), както и Т-клетъчните субпопулации (CD3+ CD4+ и CD3+ CD8+), показват отклонения, които не надхвърлят 5,5% независимо от използвания апарат (Фигура 5). Тези резултати недвусмислено са свързани със специфичните реагенти (моноклонални антитела), отлично подготвен и опитен персонал и стандартизиран аналитичен подход.

Подобни резултати се получават за отчитаните проценти в пробите с предпологаем дял на CD4+ лимфоцити в референтни граници (Фигура 6). Малко по-голямо е разсейването за процентните стойности на пробите с ниски CD4+ клетки (Фигура 7) и за абсолютния брой на двете групи (Фигури 8 и 9).

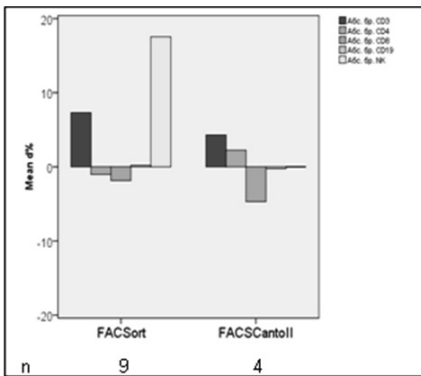


Фигура 6. Среден % на отклонение за основните лимфоцитни популации и субпопулации за проби с предполагаем дял на CD4+ клетки в референтни граници – проценти

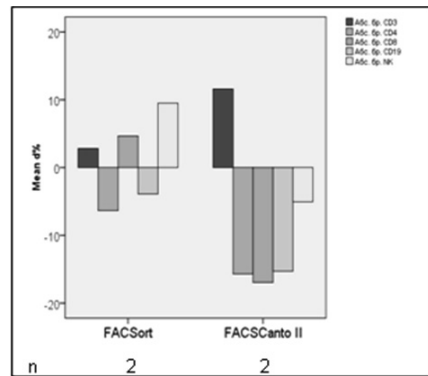


Фигура 7. Среден % на отклонение за основните лимфоцитни популации и субпопулации за проби с ниски CD4+ клетки – проценти

Прави впечатление, че наблюдаваните максимални отклонения се отнасят до различни лимфоцитни популации, няма предимство на едната пред другата платформа използвани флоуцитометри.

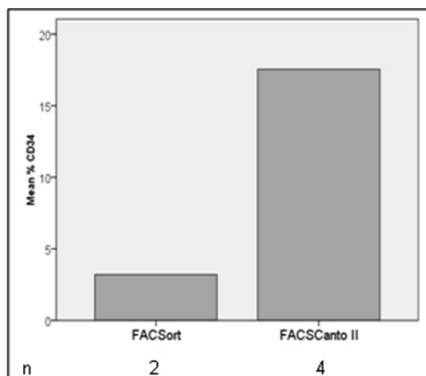


Фигура 8. Среден % на отклонение за основните лимфоцитни популации и субпопулации за проби с предполагаем дял на CD4+ клетки в референтни граници – абсолютен брой клетки

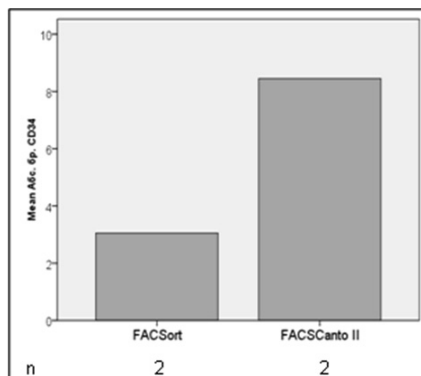


Фигура 9. Среден % на отклонение за основните лимфоцитни популации и субпопулации за проби с ниски CD4+ клетки – абсолютен брой клетки

Изненадващо, при много малкия брой проби, отклоненията за CD34+ клетки са по-големи, отчетени на FACSCanto II (Фигура 10).



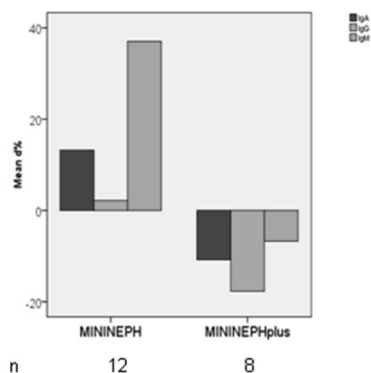
Фигура 10. Среден % на отклонение за CD34+ клетки – проценти



Фигура 11. Среден % на отклонение за CD34+ клетки – абсолютен брой

СЕРУМНИ ИМУНОГЛОБУЛИНИ – ЛАЗЕРНА НЕФЕЛОМЕТРИЯ

Допустимите отклонения (% d) за серумните имуноглобулини са 12% за IgA, 8% за IgG и 12% за IgM. Поради системно повишеното отклонение, наблюдавано за IgA и IgM, е осъществена смяна на апарата MININEPH с MININEPH-plus (The Binding Site). При MININEPH-plus най-високо е отклонението за IgG – имуноглобулин, чието измерване в подготвителната фаза изисква мануално разреждане (Фигура 12).

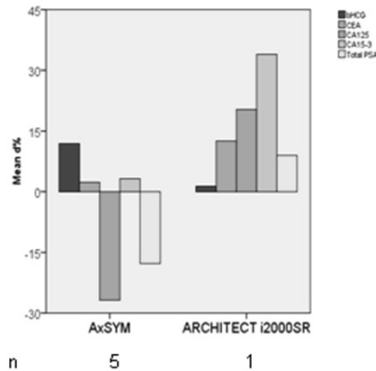


Фигура 12. Среден % на отклонение за серумните имуноглобулинови нива – IgA, IgG, IgM

ТУМОРНИ МАРКЕРИ

През 2014 г., поради преустановяване производството на реактиви за апарата AxSYM, е доставен ARCHИТЕКТ *i2000SR* (Abbott Diagnostics). AxSYM използва микропартикулен имуноензимен анализ (MEIA) с отчитан флуоресцентен маркер. ARCHИТЕКТ *i2000SR* се основава на хемилуминисцентен микропартикулен имуноанализ.

Анализът на резултатите от единствения засега кръг на ВОК с ARCHИТЕКТ *i2000SR* показва значително отклонение за СА15-3 (33,94%) (Фигура 13). Според справката с НСВОК, СА15-3 е туморният маркер с най-високо разсейване на резултатите – до 68% [3]. Получените във ВМА резултати (51,3 U/ml) влизат в интервала от стойности на участващите в посочения контролен кръг 9 апарата ARCHИТЕКТ *i2000SR* (48–72 U/ml). Допълнителният критерий z -score < 2 също определя получения резултат като приемлив.



Фигура 13. Среден % на отклонение за изследваните туморни маркери: β -hCG (човешки β -хорионгонадотропин), CEA (карциноембрионален антиген), CA125 (карциномен антиген 125), CA15-3 (карциномен антиген 15-3), Total PSA (общ простато-специфичен антиген)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

- липсата на повторяемост в максимално отклоняващите се параметри при две изследвани аналитични платформи е свързана по-скоро със случайна, отколкото със системно допускана грешка.
- флоуцитометричният метод осигурява изключително възпроизводими резултати за основните изследвани параметри на клетъчния имунитет.
- получените резултати показват, че използването на апаратура от по-старо поколение осигурява достатъчно надеждни аналитични резултати.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Accuracy and precision. Достъпно от: http://en.wikipedia.org/wiki/Accuracy_and_precision
2. Popova, D., G. Todorov, V. Markov, E. Hadjiev, G. Jotov, P. Apostolov, R. Oucheva. Parallel determination of leukocyte antigens. First Interbalkan FACS / CAS Users' meeting, Varna, Bulgaria, 19–21.10.1995.
3. Slev PR, Rawlins ML, Roberts WL. Performance characteristics of seven automated CA 15–3 assays. Am J Clin Pathol. 2006 May; 125(5):752–7.

ХРОНИЧНА ЛИМФОЦИТНА ЛЕВКЕМИЯ – КЛИНИЧНИ И БИОЛОГИЧНИ ПРОГНОСТИЧНИ ФАКТОРИ

Росица Владимирова, Дора Попова, Елена Викентиева

Лаборатория по клинична имунология, Военномедицинска академия, София

ВЪВЕДЕНИЕ

Хроничната лимфоцитна левкемия (ХЛЛ) е най-често срещаната левкемия, засягаща основно възрастни индивиди, от кавказката раса, със средна възраст при диагнозата 70 години, но не е необичайно диагнозата да бъде поставена и при по-млади хора. Честотата на заболяемост нараства рязко с увеличаването на възрастта. Клиничната хетерогенност на ХЛЛ е уникална сред малигнените хематологични заболявания, при някои пациенти заболяването е рефрактерно на лечение, с летален изход в рамките на две-три години, докато при други е с индолентно протичане и без нужда от терапия преживяемостта достига десетилетия. По тази причина клиничните, генетичните и биологичните параметри в съвкупност се използват за характеристика на отделния пациент с цел индивидуализирана оценка на риска. Специфичните хромозомни нарушения (делеция 17p, делеция 11q, тризомия 12), мутационният статус на гените, кодиращи имуноглобулиновите тежки вериги (IGHV), мутациите на TP53, NOTCH1, SF3B1 и BIRC3 гените, а също така и експресионните нива на ZAP-70, CD38 и CD49d с установен праг на прогностична значимост са важни параметри, подпомагащи индивидуалната оценка на риска. Биологичните прогностични маркери са функционално активни молекули с роля в междуклетъчните взаимодействия на малигнения лимфоцит с клетките, формиращи тъканната микросреда на левкемичната клетка.

КЛИНИЧНИ ПРОГНОСТИЧНИ ФАКТОРИ

Стадиращи системи: Пациентите с ХЛЛ се категоризират в прогностични групи, основани на клинични стадиращи системи, разработени от K. R. Rai и сътр. [1] и J. L. Binet и сътр. [2]. Тези системи определят клиничния стадий чрез наличието на анемия и/или тромбоцитопения, броя на регионите с увеличени лимфни възли, палпаторната хепатомегалия и/или спленомегалия. Тромбоцитният брой, определящ Binet стадий С и Rai стадий IV, е еднакъв: $< 100 \times 10^9/l$. Разлика се намира в хемоглобиновите нива, определящи анемията с праг от 100 g/l при Binet стадий С и 110 g/l при Rai стадий III (Таблица 1). Двете стадиращи системи предлагат добър подход при оценка на прогнозата. Средната преживяемост при пациентите в стадий А по Binet и стадий по Rai 0 (нисък риск) е над 10 години, 5–7 години при стадий по Binet В и стадий по Rai I–II (среден риск) и 2–3,5 години при наличие на анемия и/или тромбоцитопения – Binet стадий С и Rai стадий III–IV (висок риск) [2, 3].

Таблица 1: Съпоставка на Rai и Binet стадиращите системи за оценка на риска при ХЛЛ

СТАДИРАЩА СИСТЕМА ПО RAI		РИСК	СТАДИРАЩА СИСТЕМА ПО BINET	
СТАДИЙ	ПОКАЗАТЕЛИ		ПОКАЗАТЕЛИ	СТАДИЙ
0	лимфоцитоза	НИСЪК	Hb \geq 100 g/l, Plt \geq 100 x10 ⁹ /l. Ангажиране на < от 3 лимфни области	A
I	лимфоцитоза и лимфаденомегалия	МЕЖДИНЕН	Hb \geq 100 g/l, Plt \geq 100 x10 ⁹ /l. Ангажиране на \geq от 3 лимфни области	B
II	лимфоцитоза и спленомегалия и/или хепатомегалия \pm лимфаденомегалия			
III	лимфоцитоза и анемия (Hb < 110 g/l или Hct < 0,33) \pm лимфаденомегалия или органомегалия	ВИСОК	Hb < 100 g/l и/или Plt < 100 x10 ⁹ /l. Независимо от лимфаденомегалията или органомегалията	C
IV	лимфоцитоза и тромбоцитопения (Plt < 100 x10 ⁹ /l)			

Лимитиращ фактор на двете стадиращи системи е невъзможността за оценка на риска при пациенти в ранен стадий (Binet A и Rai 0). Това е и причината, поради която усилията на изследователите в последните години са насочени към търсене на нови прогностични фактори.

Морфология на ХЛЛ лимфоцитите: Първите прогностични маркери, допълващи клиничните стадиращи системи, се базират на морфологията на левкемичните клетки в кръвта и костния мозък: атипична морфология, повишен брой на големи пролимфоцитни клетки или cleaved лимфоцити се асоциират с лоша прогноза [4]. Обратно, повишеният брой гумпрехтови сенки предполага добра прогноза [5].

Време на удвояване на лимфоцитите: Времето на удвояване на лимфоцитите се определя като период от време, през които абсолютният лимфоцитен брой се удвоява, като този показател е отражение на активността на заболяването. Време на удвояване на лимфоцитите, по-малко от 12 месеца, се свързва със значимо понижение на свободната от прогресия преживяемост и общата преживяемост [6]. Повишение на лимфоцитния брой с повече от 50% за 2 месеца или време на удвояване на лимфоцитите по-малко от 6 месеца са критерии за активност на заболяването и изискват лечение. Приемането на времето на удвояване на лимфоцитите като критерий за започване на терапия или като прогностичен фактор се препоръчва само при лимфоцитен брой над

30 x 10⁹/l [7]. Ограниченията при употребата на фактора време на удвояване на лимфоцитите за започване на лечение произтичат от ретроспективната му природа и промяната за период от време, освен това динамиката на ХЛЛ не винаги рефлектира върху лимфоцитния брой. Доказано е, че някои пациенти със стабилен абсолютен лимфоцитен брой имат висок пролиферационен потенциал, над 1% от левкемичния клон за ден [8].

Костномозъчна инфилтрация: Степента и видът на костномозъчната инфилтрация също имат прогностично значение и корелират с клиничния стадий [9]. Пациентите в ранен клиничен стадий се подразделят на две прогностични групи на базата на костномозъчната хистология, като тези с дифузна инфилтрация прогресират значително по-бързо. В последните години се приема, че значението на костномозъчната инфилтрация е редуцирано в клиничната практика поради наличието на други, по-информативни прогностични фактори [7].

СЕРУМНИ МАРКЕРИ

Най-важните серумни прогностични маркери понастоящем са: серумен β_2 -микроглобулин ($s\beta_2m$), серумна тимидин киназа 1 ($sTK1$), и разтворим CD23 ($sCD23$). За разлика от други лимфоидни неоплазии, нивата на серумната лактатдехидрагеназа (LDH) имат по-слабо значение при ХЛЛ (Фигура 1) [10].



Фигура 1: Схематично представяне на най-често използваните биохимични и имунологични маркери и причините за отклонение от референтните граници

Серумен β_2 -микроглобулин: Серумният β_2m е екстрацелуларен протеин, нековалентно свързан към α -веригата на молекулата от клас I от главния комплекс на тъканната съвместимост (МНС I). При ХЛЛ повишените нива на $s\beta_2m$ корелират с лоша прогноза, напреднал клиничен стадий, голям туморен обем, наличие на bulky формация, повишена костномозъчна инфилтрация, значимо

съкратено време на свободна от прогресия преживяемост и обща преживяемост [10,11,12]. Нивата му корелират с експресията на CD38 и zeta-асоциирания протеин от 70 kDa (Zap-70), два други значими прогностични фактора [13, 14].

Серумна тимидин киназа: Клетъчният ензим sTK1 участва в ДНК синтеза и се измерва с радиоимунологичен метод [15]. Основната форма на ензима се намира в дялящи се клетки и липсва в неделящи се клетки. Това прави sTK1 полезен маркер за пролиферативна активност, свързана с бърза прогресия и напреднал стадий на заболяването [15]. При пациенти в Binet стадий А повишените концентрации на sTK1 корелират с други прогностични маркери като време на удвояване на лимфоцитите, експресията на CD38, Zap-70, цитогенетичните находки и при нива на sTK1 $>15,0$ U/l с мутационния статус на *IGHV* гените [16, 17]. sTK1 е независим прогностичен маркер, показващ различни нива при пациенти с тлеещи и бързо развиващи се форми на заболяването. sTK1 концентрация над 7,0 U/l разделя пациентите в стадий А по Binet на две групи със средна, свободна от прогресия преживяемост съответно 9 и 49 месеца [18].

Разтворим CD23: CD23 е ниско афинитетен рецептор за IgE, физиологично експресиран върху зрелите В-лимфоцити. Неговата разтворима форма корелира с дифузна костномозъчна инфилтрация, туморния обем, кратко време на удвояване на лимфоцитите, прогресия на заболяването в ранен стадий и намалена преживяемост [19]. При изследване на 56 новодиагностицирани и нелекувани пациенти в стадий А по Binet се намира, че времето на удвояване на концентрацията на sCD23 корелира с времето до началото на терапия и средната преживяемост [20].

Лактатдехидрогеназа: LDH е ензим, участващ в гликолитичния път, който се отделя при клетъчната деструкция. Повишаването на LDH е неспецифично, корелира с туморния обем и дава информация за прогресия на заболяването [21]. Проучване върху 141 пациенти с ХЛЛ показва, че концентрациите на серумната LDH и β_2 m при пациенти в стадий Binet C са значително по-високи от тези при пациенти в стадий Binet A. Стадий Binet C и високи нива на LDH се свързват със скъсена обща преживяемост [22].

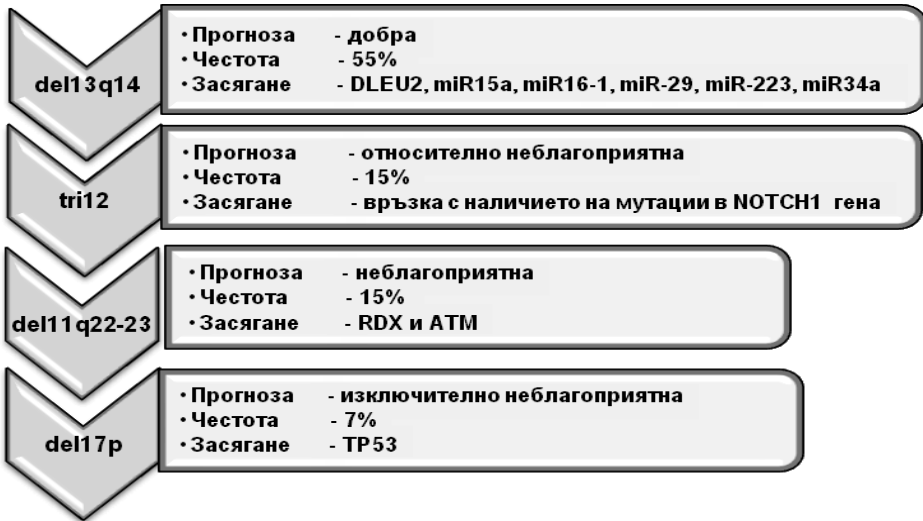
Имуноглобулини: Пациентите с ХЛЛ са засегнати в различна степен от имунодефицитни състояния, сред които най-често срещана е хипогамаглобулинемията, засягаща до 85% от случаите [23]. Серумните нива на имуноглобулините могат да бъдат понижени и при други лимфоидни неоплазии, но при ХЛЛ супресията е значително по-силна. Степента на хипогамаглобулинемията зависи от стадия и продължителността на заболяването и се отчита независимо от мутационния статус на *IGHV*. Серумният IgA е описан като първия редуциран имуноглобулин, следван от IgM и IgG [23]. Голям процент от пациентите имат понижени нива на трите класа имуноглобулини, като нивото, под което се повишава рискът от инфекция, е по-високо при ХЛЛ, в сравнение със състоянията на първична хипогамаглобулинемия [24]. Начални нива на общия имуногло-

булинов пул под 7,0 g/l корелират със скъсена преживяемост при пациентите с ХЛЛ; понижени начални нива на IgG под 6,0 g/l и IgA под 0,8 g/l, но не и IgM, се свързват с понижена преживяемост, като само ниските нива на IgA се отчитат като значим прогностичен фактор [25]. Съществува мнение, че при пациенти с ХЛЛ, чиито нива на IgG са под 4,0 g/l, трябва да се прилага субституираща интравенозна имуноглобулинова терапия [26].

Основното предимство на серумните прогностични маркери е лесният начин на изследване, но прогностичният праг може да варира между различни лаборатории в зависимост от използвания метод. Ограничение е и фактът, че стойностите им се влияят от различни фактори извън основното заболяване. Нивата на β_2m зависят от гломерулната филтрация [11]. Вирусни инфекции и витамин В12 дефицит повишават нивата на sTK1 [27, 28]. Въпреки това прогностичното значение на β_2m в напреднал стадий на ХЛЛ и sTK1 в ранен стадий се подкрепя в литературата [29].

ЦИТОГЕНЕТИЧНИ ПРОГНОСТИЧНИ МАРКЕРИ

С адаптацията на флуоресцентната *in situ* хибридизация (FISH) към клиничната практика се създава група от специфично дефинирани хромозомни нарушения с прогностично значение за хода и изхода на ХЛЛ (Фигура 2) [30].



Фигура 2: Схематично представяне на най-често срещаните хромозомни нарушения, прогностичната им значимост, честотата и засегнатите гени

Делеция 13q14: Делецията 13q14 е най-често срещаната генетична аномалия при ХЛЛ [31]. Намира се по-често при пациенти с мутирани IGHV гени и се свързва с добра прогноза [32].

Критичните гени за miR15a и miR16-1 представляват малки участъци в DLEU2 гена, който е делетиран при по-голяма част от пациентите с ХЛЛ [33]. Това са гени, кодиращи малки молекули рибонуклеинова киселина (miR), които променят матричната РНК (мРНК), като я деградираат или инхибират трансляцията до протеин. miR молекулите действат върху голям брой таргетни мРНК и проучването върху прогностичната им роля продължава. Поради голямото разнообразие на таргетни мРНК за всяка miR, нейното действие би могло да доведе до различен краен ефект (miR могат да функционират като онкогени или тумор-супресорни гени). Последствието от делецията на miR15a/16-1 клъстера на хромозома 13 е стимулация на BCL2 гена и повишена продукция на Bcl-2 протеина. Този клъстер регулира продукцията на Bcl-2 и загубата му прави ХЛЛ клетките резистентни на апоптоза [34]. При експериментални проучвания, след делетиране на miR15a/16-1 или определения минимален регион на загуба, обхващащ DLEU2, или по-голяма делеция, включваща двата региона, се развиват CD5+ левкемии, наподобяващи ХЛЛ [35, 36]. Агресивността на туморното развитие пряко зависи от големината на генетичната загуба, тъй като регионът miR15/16-1 контролира и пролиферацията [35, 36]. Пациенти с моноалелна делеция на 13q14 са с повишена обща преживяемост, сравнени с пациентите с нормален FISH анализ. Намерени са и други miR с прогностична роля при ХЛЛ, като miR-29, 223 [37, 38] и miR34a [39]. Тези miR корелират с други прогностични маркери като немутирали IGHV гени, или в по-късна фаза на заболяването с del(17p), загуба на p53 функция, рефрактерност и прогресия [30].

Тризомия 12: Пациентите с ХЛЛ и тризомия 12 (tri12) са приблизително 15%. Тази група се характеризира със скъсена обща преживяемост, в сравнение с пациентите с нормален анализ при FISH панела. Съществува връзка между tri12 и наличието на мутации в NOTCH1 гена, които удължават полуживота на протеина. Пациентите с NOTCH1 мутации са със скъсено време до терапия и обща преживяемост [40, 41]. Левкемичните клетки с комбинирани мутации tri12 и NOTCH1 са по-резистентни на апоптоза и пациентите са с по-неблагоприятна прогноза [42, 43].

Делеция 11q22–23: Делеция 11q22–23 (del11q22–23) се установява при 15% от случаите с ХЛЛ, често се извява с bulky аденопатия, агресивно клинично протичане и скъсена преживяемост [31]. Въпреки че тези пациенти могат да отговорят на химио/имунотерапия, заболяването рецидивира [44]. Минималният регион на делеция на 11q22.3–23.1 често засяга гените Radixin (RDX) и Ataxia telangiectasia mutated (ATM) [44]. ATM генът е изключително важен за възстановяването на веригата на дезоксирибонуклеиновата киселина (ДНК), неговата делеция води до увеличаване на левкемичния клон и еволюция на заболяването вследствие на нови геномни увреди [45,46,47].

Делеция 17p: Делеция 17p (del17p) засяга 7% от пациентите с ХЛЛ, като заболяването има силно агресивен ход [31] поради загубата на TP53. Мутациите на TP53 на друг алел се намират при приблизително 80% от пациентите и водят до изключително скъсена преживяемост [39]. Тази делеция е първият индикатор за клонална еволюция и повишаване на агресивността на протичане на заболяването.

МУТАЦИОНЕН СТАТУС НА ГЕНИТЕ, КОДИРАЩИ *IGHV* НА В-КЛЕТЪЧНИЯ РЕЦЕПТОР (БКР)

Клиничното значение на *IGHV* мутационния статус е установено в редица проучвания и е доказана корелацията на немутирания *IGHV* статус със скъсената преживяемост и добра прогноза при наличието на мутации в *IGHV* гените. Биологичното значение на този прогностичен фактор при ХЛЛ е свързано със структурата на БКР, наличието или отсъствието на значим брой *IGHV* мутации [32], употребата на специфични *IGHV* гени, което не винаги е свързано с мутационния статус [48] и наличието на стереотипни БКР структури. Доказано е, че БКР има аминокиселинни структури, които в третия комплементарност определящ регион (CDR) на вариабилната част на тежката имуноглобулинова верига (HCDR3) са изключително подобни при всички пациенти с ХЛЛ поради употребата на едни и същи членове на *IGHV* фамилията [49, 50, 51].

При нормалните В-лимфоцити мутациите в гените на *IGHV* са нормален процес, осигуряващ специфична БКР структура с висок афинитет към специфичен антиген. Моноклоналните В-клетки със соматични мутации при пациентите с ХЛЛ предполагат благоприятен клиничен ход поради невъзможността да свързват автоантигени, което води до апоптоза в резултат на липсата на БКР сигнали, необходими на В-лимфоцитите да останат живи [52]. БКР без соматични мутации е в състояние да свързва широк кръг от антигенни епитопи, включително автоантигени [53], почти винаги с нисък афинитет. БКР стимулацията е причината, поради която при пациентите без соматични мутации нараства неопластичният клон и ходът на болестта е неблагоприятен [54]. С изключение на автоимунните заболявания, Т-лимфоцитите, които инициират соматична мутация, са толерантни към автоантигени, експресирани от В-клетките и антиген-презентиращите клетки. Поради това се предполага, че при пациенти със стереотипни БКР, и особено тези с немутирани гени, свързването на автоантигените и екзоантигените е Т-клетъчно независимо [52]. Сигналите на БКР са неразривно свързани с биологията на ХЛЛ, прогресията на заболяването и прогнозата [55, 56].

ФЛОУЦИТОМЕТРИЧНИ ПРОГНОСТИЧНИ ФАКТОРИ

Експресия на CD38: Рецепторът CD38 провежда и модулира серия от вътреклетъчни сигнали, инициирани от клетките на средата. Процентът на клетките в ХЛЛ клона, експресиращи CD38, е индикатор на актуалната степен на клетъчна активация, клетките с по-висока експресия на CD38 са по-добри приематели на активационни сигнали и следователно по-агресивната част от малигнените лимфоцити. При анализ на пациенти с ХЛЛ чрез инкорпорация *in vivo* на деутериум (^2H) под формата на тежка вода ($^2\text{H}_2\text{O}$) в клетъчната ДНК е доказано, че CD38⁺ лимфоцитите имат повишена пролиферация в сравнение с CD38⁻ клетки [57]. Експресиращите CD38 В-лимфоцити имат по-ефективен отговор при свързването на повърхностните имуноглобулини (sIg) [58,59], като в процеса участва и Zap-70.

Лигандът на CD38 – CD31, се експресира от клетките на съдовия ендотел и подпомага клетъчната адхезия. Агресивността на CD38⁺ лимфоцити се опосредства от възможността им да мигрират и взаимодействат с клетките на микросредата. CD38 и Zap-70 са функционално свързани и определят клетките с висок миграционен потенциал [60]. Експресията на CD38 при по-голямата част от пациентите с ХЛЛ не надвишава прага от 30%, който определя клона като позитивен, при малкия процент пациенти с положителна експресия на CD38 заболяването прогресира [61]. По-високият пролиферативен потенциал на тези лимфоцити предполага нови геномни нарушения и клонална еволюция [62,63], което се подкрепя от по-високата честота на намерените 11q и 17r делеции [64].

Експресия на CD49d: Нивото на CD49d (VLA-4) положителните В-лимфоцити е независим прогностичен фактор при ХЛЛ. Експресия, по-висока от 30% върху моноклоналните лимфоцити, корелира с по-ниска обща преживяемост. CD49d е α -интегриновата субединица ($\alpha 4$) формираща с CD29 ($\beta 1$ субединица) интегрин $\alpha 4\beta 1$, свързващ фибронектина и съдовата клетъчна адхезионна молекула 1 (vascular cell adhesion molecule 1 – VCAM-1). Подобно на другите интегрини, $\alpha 4\beta 1$ опосредства адхезията на клетките към екстрацелуларния матрикс, първата стъпка на клетъчна миграция. CD49d и CD38 участват в образуването на голям макромолекулен комплекс, включващ CD49d, CD38, CD44v и матриксната металопроотеиназа-9 (MMP-9), намерен при ХЛЛ клетки без соматични мутации [65]. Физичната и функционална връзка на CD49d/CD29 с CD38 е доказана при ХЛЛ [66].

Експресия на Zap-70: Вътреклетъчна експресия на протеина Zap-70 $\geq 20\%$, отчетена флоуцитометрично, е важен индикатор за времето до терапията и общата преживяемост при ХЛЛ [67]. Процентът на експресия на протеина в малигнените клетки корелира с *IGHV* мутационния статус и експресията на CD38 [68]. Нивата на Zap-70 са независим прогностичен маркер за хода на болестта. Клиничното протичане е във връзка с усилените вътреклетъчни сигнали, провеждани чрез БКР [69]. Проучвания през последните години показват, че Zap-70 забавя интернализацията на sIgM и CD79b, което води до пролонгирани сигнали през БКР пътя. Моноклоналните клетки, експресиращи Zap-70 с по-голяма честота, експресират адхезионни молекули и хемокинови рецептори [70], подпомагащи миграцията [60] и инхибиращи апоптозата [71].

Експресията на CD38, CD49d и Zap-70 от ХЛЛ лимфоцитите дава ценна прогностична информация за хода на заболяването. Комбинирането на тези флоуцитометрични маркери прецизира имунофенотипната прогноза поради комплексния характер на взаимодействията между тях и сигналите на микросредата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Прогностичните фактори основно са насочени към оценка на риска при асимптоматични пациенти за преценяване на времето от диагнозата до първоначалната терапия и средната преживяемост, или при провеждана терапия – за оценка на терапевтичния отговор и свободната от прогресия преживяемост при

различните терапевтични подходи. Редица добре характеризирани прогностични маркери се доразвиват непрекъснато, но към момента няма универсален маркер за оценка тежестта на заболяването при всеки пациент. Продължаващата оценка на настоящите прогностични фактори и търсенето на нови биологично активни молекули за прогностично групиране е цел на съвременния персонализиран подход при това хетерогенно протичащо заболяване.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Rai KR. *Chronic Lymphocytic Leukemia: Recent Progress and Future Directions*. (eds Gale, R. P. & Rai, K. R.) 253–64 (Alan R. Liss, 1987).
2. Binet JL, Caligaris-Cappio F, Catovsky D, et al. Perspectives on the use of new diagnostic tools in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2006; 107: 859–61.
3. Cramer P, Hallek M. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia – what do we need to know? *Nat Rev Clin Oncol*. 2011; 8: 38–47.
4. Dighiero G, Maloum K, Desablens B, et al. Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 1998; 338: 1506–14.
5. Oscier D, Matutes E, Copplestone A, et al. Atypical lymphocyte morphology: an adverse prognostic factor for disease progression in stage A CLL independent of trisomy 12. *Br J Haematol*. 1997; 98: 934–9.
6. Wierda W, O'Brien S, Wang X, et al. Characteristics associated with important clinical end points in patients with chronic lymphocytic leukemia at initial treatment. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 1637–43.
7. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008; 111(12): 5446–56.
8. Molica, S, Alberti A. Prognostic value of the lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 1987; 60: 2712–6.
9. Nowakowski G, Hoyer J, Shanafelt T, et al. Percentage of smudge cells on routine blood smear predicts survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 1844–9.
10. Bergmann M, Eichhorst B, Busch R, et al. Prospective evaluation of prognostic parameters in early stage chronic lymphocytic leukemia (CLL): results of the CLL1-protocol of the German CLL Study Group (GCLLSG) [abstract]. *Blood*. 2007; 110, a625.
11. Delgado J, Pratt G, Phillips N, et al. Beta2-microglobulin is a better predictor of treatment-free survival in patients with chronic lymphocytic leukemia if adjusted to glomerular filtration rate. *Br J Haematol*. 2009; 145: 801–5.
12. Gentile M, Cutrona G, Neri A, et al. Predictive value of beta2-microglobulin (beta2-m) levels in chronic lymphocytic leukemia since Binet A stages. *Haematologica*. 2009; 94: 887–8.
13. Heintel D, Schwarzingger I, Chizzali-Bonfadin C, et al. Association of CD38 antigen expression with other prognostic parameters in early stages of chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma*. 2001; 42: 1315–21.
14. Schroers R, Griesinger F, Trumper L, et al. Combined analysis of ZAP-70 and CD38

- expression as a predictor of disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2005; 19(5): 750–8.
15. Konoplev S, Fritsche H, O'Brien S, et al. High Serum Thymidine Kinase 1 Level Predicts Poorer Survival in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia. *Am J Clin Pathol*. 2010; 134 (3): 472–7.
 16. Hallek M, Wanders L, Ostwald M, et al. Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk. Lymphoma*. 1996; 22: 439–47.
 17. Magnac C, Porcher R, Davi F, et al. Predictive value of serum thymidine kinase level for Ig-V mutational status in B-CLL. *Leukemia*. 2003; 17(1): 133–7.
 18. Hallek M, Langenmayer I, Nerl C, et al. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease-progression in early, nonmolding chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999; 93: 1732–7.
 19. Schwarzmeier JD, Shehata M, Hilgarth M, et al. The role of soluble CD23 in distinguishing stable and progressive forms of B-chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2002; 43, 549–54.
 20. Meuleman N, Stamatopoulos B, Dejeneffe M, et al. Doubling time of soluble CD23: a powerful prognostic factor for newly diagnosed and untreated stage A chronic lymphocytic leukemia patients. *Leukemia*. 2008; 22: 1882–90.
 21. Shwartz M. Enzymes tests in cancer. *Clin Lab Med*. 1982; 2: 479–91.
 22. Shen QD, Yu H, Li L, et al. Prognostic significance of lactate dehydrogenase and beta2-microglobulin in chronic lymphocytic leukemia. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2007; 6:1305–9.
 23. Hamblin TJ. Chronic lymphocytic leukaemia. *Balliere's Clin Haematol*. 1987; 1, 449–91.
 24. Tsiodras S, Samonis G, Keating MJ, et al. Infection and immunity in chronic lymphocytic leukemia. *Mayo Clin Proc*. 2000; 75: 1039–54.
 25. Rozman C, Montserrat E, Vinolas N. Serum immunoglobulins in B-chronic lymphocytic leukemia. Natural history and prognostic significance. *Cancer*. 1988; 61: 279–83.
 26. Egerer G, Hensel M, Ho AD. Infectious complications in chronic lymphoid malignancy. *Curr Treat Options Oncol*. 2001; 2: 237–44.
 27. Hallek M, Wanders L, Strohmeyer S, et al. Thymidine kinase: a tumor marker with prognostic value for non-Hodgkin's lymphoma and a broad range of potential clinical applications. *Ann. Hematol*. 1992; 1: 1–5.
 28. O'Neill K, Buckwalter M, Murray B. Thymidine kinase: diagnostic and prognostic potential. *Expert Rev Mol Diagn*. 2001; 1(4): 89–94.
 29. Zhou J, He E, Skog S. The proliferation marker thymidine kinase 1 in clinical use. *Mol Clin Oncol*. 2013; 1: 18–28.
 30. Chiorazzi N. Implications of new prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *ASH Education Book*. 2012; 1: 76–87.
 31. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000; 343(26):1910–6.
 32. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, et al. Unmutated Ig VH genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999; 94(6): 1848–54.
 33. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; A99(24):15524–9.

34. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102(39):13944–9.
35. Klein U, Lia M, Crespo M, et al. The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*. 2010; 17 (1): 28–40.
36. Lia M, Carette A, Tang H, et al. Functional dissection of the chromosome 13q14 tumor-suppressor locus using transgenic mouse lines. *Blood*. 2012; 119(13): 2981–90.
37. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005; 353(17): 1793–801.
38. Fulci V, Chiaretti S, Goldoni M, et al. Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2007; 109(11): 4944–51.
39. Zenz T, Eichhorst B, Busch R, et al. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2010; 28(29): 4473–9.
40. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2011; 475(7354): 101–5.
41. Fabbri G, Rasi S, Rossi D, et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med*. 2011; 208(7): 1389–401.
42. Balatti V, Bottoni A, Palamarchuk A, et al. NOTCH1 mutations in CLL associated with trisomy 12. *Blood*. 2012; 119(2): 329–31.
43. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2010; 376(9747): 1164–74.
44. Stilgenbauer S, Bullinger L, Lichter P, et al. Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V(H) gene mutation status in pathogenesis and clinical course. *Leukemia*. 2002; 16(6): 993–1007.
45. Gunnarsson R, Mansouri L, Isaksson A, et al. Array-based genomic screening at diagnosis and during follow-up in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2011; 96(8): 1161–9.
46. Braggio E, Kay NE, Vanwier S, et al. Longitudinal genomewide analysis of patients with chronic lymphocytic leukemia reveals complex evolution of clonal architecture at disease progression and at the time of relapse. *Leukemia*. 2012; 26(7): 1698–701.
47. Knight SJ, Yau C, Clifford R, et al. Quantification of subclonal distributions of recurrent genomic aberrations in paired pre-treatment and relapse samples from patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2012; 26 (7): 1564–75.
48. Tobin G, Thunberg U, Johnson A, et al. Somatic mutated IgV(H)3–21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002; 99(6): 2262–4.
49. Messmer BT, Albesiano E, Efremov DG, et al. Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2004; 200(4): 519–25.
50. Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, et al. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood*. 2007; 109(1): 259–70.
51. Murray F, Darzentas N, Hadzidimitriou A, et al. Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for the role of antigen selection in leukemogenesis. *Blood*. 2008; 111(3): 1524–33.

52. Chiorazzi N, Ferrarini M. B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol.* 2003; 21: 841–94.
53. Herve M, Xu K, Ng YS, et al. Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemias derive from self-reactive B cell precursors despite expressing different antibody reactivity. *J Clin Invest.* 2005; 115(6): 1636–43.
54. Chu CC, CATERA R, Zhang L, et al. Many chronic lymphocytic leukemia antibodies recognize apoptotic cells with exposed nonmuscle myosin heavy chain IIA: implications for patient outcome and cell of origin. *Blood.* 2010; 115(19): 3907–15.
55. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2005; 352(8): 804–15.
56. Stevenson FK, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood.* 2004; 103(12): 4389–95.
57. Messmer BT, Messmer D, Allen SL, et al. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest.* 2005; 115(3): 755–64.
58. Morabito F, Cutrona G, Gentile M, et al. Prognostic relevance of in vitro response to cell stimulation via surface IgD in Binet stage a CLL. *Br J Haematol.* 2010; 149(1): 160–3.
59. Pepper C, Brennan P, Alghazal S, et al. CD38+chronic lymphocytic leukaemia cells coexpress high levels of ZAP-70 and are functionally distinct from their CD38- counterparts. *Leukemia.* 2006; 20(4): 743–4.
60. Deaglio S, Vaisitti T, Aydin S, et al. CD38 and ZAP-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential. *Blood.* 2007; 110(12): 4012–21.
61. Malavasi F, Deaglio S, Dalmè R, et al. CD38 and chronic lymphocytic leukemia: a decade later. *Blood.* 2011; 118(13): 3470–8.
62. Ouillette P, Collins R, Shakhani S, et al. Acquired genomic copy number aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2011; 118(11): 3051–3061.
63. Zhang L, Znoyko I, Costa LJ, et al. Clonal diversity analysis using SNP microarray: a new prognostic tool for chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet.* 2011; 204(12): 654–65.
64. Kröber A, Seiler T, Benner A, et al. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2002; 100(4): 1410–6.
65. Buggins AG, Levi A, Gohil S, et al. Evidence for a macromolecular complex in poor prognosis CLL that contains CD38, CD49d, CD44 and MMP-9. *Br J Haematol.* 2011; 154(2): 216–22.
66. Zucchetto A, Vaisitti T, Benedetti D, et al. The CD49d/CD29 complex is physically and functionally associated with CD38 in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia.* 2012; 26(6): 1301–12.
67. Rassenti LZ, Jain S, Keating MJ, et al. Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2008; 112(5): 1923–30.
68. Crespo M, Bosch F, Villamor N, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2003; 348(18): 1764–75.
69. Chen L, Huynh L, Apgar J, et al. ZAP-70 enhances IgM signaling independent of its kinase activity in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2008; 111(5): 2685–92.

70. Calpe E, Codony C, Baptista MJ, et al. ZAP-70 enhances migration of malignant B lymphocytes toward CCL21 by inducing CCR7 expression via IgM-ERK1/2 activation. *Blood*. 2011; 118(16): 4401–10.
71. Messmer D, Fecteau J-F, O'Hayre M, et al. Chronic lymphocytic leukemia cells receive RAFdependent survival signals in response to CXCL12 that are sensitive to inhibition by sorafenib. *Blood*. 2011; 117(3): 882–9.

ХРОНИЧНА ЛИМФОЦИТНА ЛЕВКЕМИЯ – КЛИНИЧНИ И БИОЛОГИЧНИ ПРОГНОСТИЧНИ ФАКТОРИ

Росица Владимирова, Дора Попова, Елена Викентиева

Лаборатория по клинична имунология, Военномедицинска академия, София

Хроничната лимфоцитна левкемия (ХЛЛ) е заболяване с изключително вариабилно протичане с преживяемост от няколко месеца до много години. През последното десетилетие се установиха редица нови прогностични маркери на основата на генетични, фенотипни и молекулярни характеристики на левкемичните В-клетки. Клиничното значение на тези нови маркери, определящи прогнозата (генетични нарушения, отчетени чрез FISH и/или други молекулярни техники, експресията на специфични протеини от ХЛЛ лимфоцитите, като CD38, CD49d и ZAP-70, както и IGHV мутационния статус на клона), сами по себе си или в комбинация помежду си, както и с клиничните прогностични маркери, все още е в процес на проучване.

Ключови думи: *хронична лимфоцитна левкемия, прогноза.*

CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA – CLINICAL AND BIOLOGICAL PROGNOSTIC FACTORS

Rositsa Vladimirova, Dora Popova, Elena Vikentieva,

Military Medical Academy, Sofia

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) follows an extremely variable course with survival ranging from months to decades. Several prognostic markers based on genetic, phenotypic, and molecular characteristics of chronic lymphocytic leukemia B cells have emerged in the past decade. The clinical utility of these newer prognostic indicators: genetic abnormalities quantified by FISH and/or defined by exploratory sensitive molecular techniques, expression of specific proteins in or on CLL cells CD38, CD49d and ZAP-70, and the IGHV mutation status of a CLL clone, alone or in combination with each other and other clinical predictive systems, is still being determined.

Keywords: *Chronic lymphocytic leukemia, prognosis.*

ПЕРИФЕРНИ КРЪВНИ МОНОНУКЛЕАРНИ КЛЕТКИ, ИЗОЛИРАНИ ОТ ЗДРАВИ ХОРА, ПОКАЗВАТ НАМАЛЕНА СПОСОБНОСТ ЗА АКТИВАЦИЯ СЛЕД КУЛТИВИРАНЕ СЪС СРЕДА ОТ КЛЕТЪЧНИ КУЛТУРИ, ПОЛУЧЕНИ ОТ ГЛИОБЛАСТОМА МУЛТИФОРМЕ

*Калина Тумангелова-Юзеир¹, Екатерина Иванова-Тодорова¹,
Цветелина Великова¹, Емануил Найденов², Севдалин Начев³,
Доброслав Кюркчиев¹*

¹Лаборатория по клинична имунология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, Катедра по
клинична лаборатория и клинична имунология, МУ – София

²Клиника по неврохирургия, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“,

³Лаборатория по клинична патология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“

ВЪВЕДЕНИЕ

Глиобластомът мултиформе (ГБМ) е най-малигният от групата на астроцитните тумори. Той е и най-често срещаният мозъчен тумор с честота 12–15% от всички вътречерепни неоплазии и 50–60% от всички астроцитни тумори. Средната продължителност на живот на пациенти с това заболяване в световен мащаб е 10–13 месеца [1, 2], докато за нашата страна средната преживяемост остава едва 8 месеца. Този тумор се отличава с висока пролиферативност, способност бързо да инвазира околната нормална мозъчна тъкан, хетерогенен клетъчен състав, устойчивост на радио- и химиотерапия и супресия на локалния и системен имунен отговор [1, 3].

Една от най-новите концепции за възникване на този тумор е свързана с туморните стволови клетки и дисрегулацията на имунния отговор, която те причиняват. Предполага се, че те произхождат от неврални стволови клетки и експресират в различна степен маркери, характерни за неврални стволови клетки, като GFAP, Nestin, Sox-2, Musashi-1, CD133, CD44 [4, 5]. Счита се, че туморните стволови клетки могат да възникнат и при дедиференциация на туморни клетки, които придобиват отново възможности на стволови клетки. Двата вида вероятно кореспондират с произхода на двата основни типа ГБМ – първичен (*de novo*) и вторичен (от астроцитом при дедиференциация на туморните клетки). Туморните стволови клетки медиират съдовата пролиферация в тумора чрез секреция на vascular endothelial growth factor (VEGF) и осигуряват устойчивост на радио- и химиотерапия [4, 5, 6].

Описани са много механизми, чрез които ГБМ потиска ефикасния имунен отговор. Един от механизмите се свързва със секреция на цитокини и други имunosупресивни фактори, като interleukin 6 (IL-6), interleukin 10 (IL-10), vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor β (TGF- β) и prostaglandin E2 (PGE2). Туморните клетки могат да експресират и имunosупресивни молекули, като indoleamine 2,3 dioxigenase (IDO), programmed death ligand-1,2

(PD-L1,2), cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4), NKG2A и galectin-1. Друг описан механизъм е повишаването броя на толерантогенните клетки – макрофаги/микроглия, миелоидни супресорни клетки (MDSCs), T-регулаторни клетки (Tregs), толерогенните дендритни клетки (tDCs) и/или функционално увреждане на антиген представящите клетки (DCs и макрофаги/микроглия) [1, 3, 7, 8, 9].

Под действието на секретирани от ГБМ фактори върху клетките на имунната система се потиска секрецията на цитотоксични цитокини (IL-2 и IFN γ) и се увеличава тази на инхибиторния IL-10, секретирани от DCs и Tregs. Намалва и чувствителността на имунните клетки към действието на митогени. Има данни, че фактори, като IL-6, IL-10 и галектин-1, подпомагат индукцията на Tregs, както и появата на tDCs [10, 11].

Важен аспект в предизвикването на толеранс към нововъзникнали тумори е потискане на активността на T-лимфоцити [12]. Тази понижена активност може да бъде отчетена чрез изследване на способността за активация на T-лимфоцитите след стимулацията им с РНА митоген, използван специфично за активиране на T-лимфоцити в човешка периферна кръв.

Борбата на организма с ГБМ до голяма степен е неефективна поради потиснатия имуноен отговор, който този тумор причинява. Въпреки натрупаните данни за потискане на имунната система, все още не е докрай известно кой или кои секреторни фактори причиняват наблюдавания имуноен толеранс. Изследването на влиянието на хуморалните фактори, отделяни от ГБМ, както и възможността те да бъдат определени, е важно не само за да се обогати информацията относно патогенетичния механизъм на заболяването, но и за откриване на таргети при терапия на ГБМ. Целта на нашето изследване беше да установим промяната в способността за активация на периферни мононуклеарни клетки (PBMCs) и конкретно T-лимфоцитите след култивирането им със среда от клетъчни култури, получени от ГБМ.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Пациенти и материали

Изолирахме и култивирахме клетки от свежа тъкан на 8 последователни хистологично доказани ГБМ, получени след рутинни оперативни интервенции в УМБАЛ „Св. Иван Рилски“. Бяха подбрани и 8 здрави донори, от които бе взета периферна кръв. Всички лица, участващи в изследването, подписаха Информационно съгласие.

Клетъчни култури от GBM

Клетъчни култури приготвихме по следния начин: изолирани бяха клетки от ГБМ, като парче тъкан с размер 3–4 см се хомогенизира механично, след което бяха инкубирани на 37°C за 1 час с колагеназа тип I (Sigma, USA). Сместа премина през сито 70 μ m (BD, USA). Така получената клетъчна суспензия беше

посята в среда DMEM (PAA, Austria) +10%, FBS (PAA, Austria) + 20ng/ml FGF и 20ng/ml EGF (Sigma, USA), следвайки описания протокол [13].

РВМСs

За всяка култура от ГБМ беше подбран по един здрав донор, от чиято периферна кръв бяха отделени периферни кръвни мононуклеарни клетки (РВМСs) чрез фиколева сепарация.

Клетъчно култивиране

На следващ етап култивирахме изолираните РВМСs в среда от ГБМ култура за 60 часа. Средата от ГБМ културата не беше сменяна последните 48 часа с цел наличие на максимално количество секреторни фактори, отделяни от тумора. Като контрола използвахме РВМСs отглеждани в контролна среда (EGF, FGF, DMEM, FBS 10%). Стимулирахме третираните със среда от ГБМ култивирани клетки РВМСs и третираните с контролна среда РВМСs с фитохемаглутинин (РНА) – 10 µl РНА към 1 ml ресуспендирани РВМСs.

Флоуцитометрия

Определихме експресията на клетки, ко-експресиращи маркери за активирани Т-лимфоцити – CD3 и CD69, чрез флоуцитометър FACSCalibur (BD) и анализ с програма CellQuest. Беше определен индексът на стимулация като съотношение между процент спонтанно активирани към процент активирани с РНА клетки за всяка група РВМСs – третираните със среда от ГБМ култивирани клетки и третираните с контролна среда.

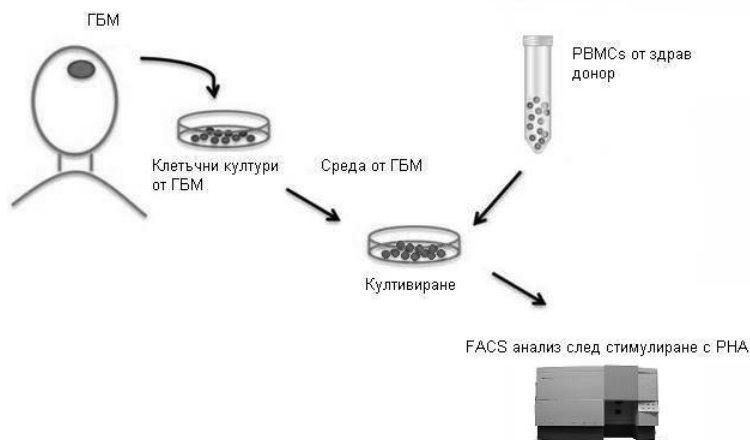
Имуноензимни методи

Наличието на секретирани цитокини при 60-часови кондиционирани среди от ГБМ, както и при съответстващите им контроли беше изследвано чрез ELISA. За целта бяха използвани търговски китове, като за всеки кит бяха спазени инструкциите на производителя: IL-4 (Arcus Biologicals, Italy); IL-6, IL-10, IL-12, TNF α , IFN γ , IL-8, IL-18, IL-17A, IL-23, TGF β , sPECAM, sICAM (всеки със съответен кит на Gen-probe Diaclone SAS, France).

Статистически методи

Статистическият анализ на суровите данни беше извършен с програма Software package for statistical analysis (SPSS®), IBM 2009, версия 19 (2010) и Excel (v. 2010). Използвахме непараметричен метод на Mann-Whitney. Графичните изображения, представящи статистическите данни, са изготвени основно с помощта на Excel и на SPSS v.19. Обобщен, дизайнът на проучването е представен на Фигура 1.

Фигура 1. Дизайн на проучването



РЕЗУЛТАТИ

Чрез стимулиране на PBMCs, изолирани от здрави донори, с PHA установихме, че третираните с контролна среда мононуклеарни клетки се активират нормално. Средните стойности на индекса им на стимулация беше 26.53, стойност, близка до получената от нас при създаването на референтните граници за стимулиране на периферна кръв [14].

За разлика от тях обаче, PBMCs, престояли 60 часа в среда от ГБМ, загубват способността си да се активират в пълни размери и индексът на стимулация (средно 13.18) е значимо по-нисък от тези на групата на нетретираните без изключения. На Таблица 1 сме представили индексите на стимулация на PBMCs, третираните със среда от съответния ГБМ и третираните с контролна среда.

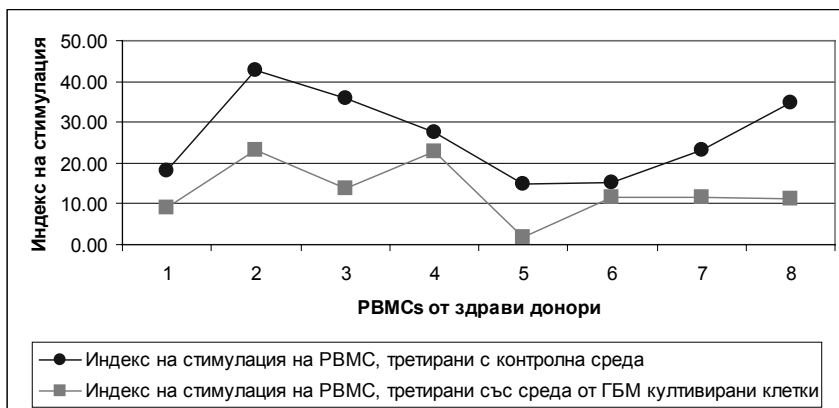
Таблица 1. Индекси на стимулация на PBMCs, съответно третираните с контролна среда и със среда от ГБМ култивирани клетки

	Индекс на стимулация на PBMCs, третираните с контролна среда	Индекс на стимулация на PBMCs, третираните със среда от ГБМ култивирани клетки
ГБМ 1/Здрав донор 1	18,10	9,09
ГБМ 2/Здрав донор 2	42,79	23,35
ГБМ 3/Здрав донор 3	36,00	13,90
ГБМ 4/Здрав донор 4	27,50	23,00
ГБМ 5/Здрав донор 5	14,70	1,90
ГБМ 6/Здрав донор 6	15,10	11,50

ГБМ 7/Здрав донор 7	23,15	11,60
ГБМ 8/Здрав донор 8	34,90	11,08
Средна стойност на индекс на стимулация	26,53	13,18

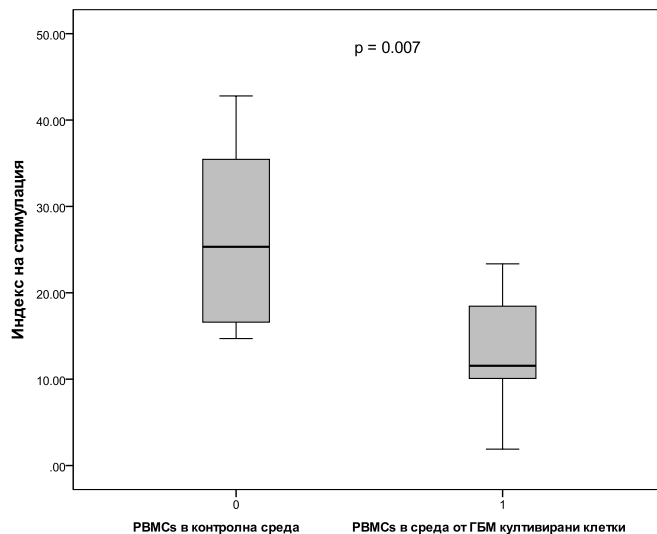
Описаната тенденция е представена нагледно на Фигура 2, на която се забелязва, че при някои донори на PBMCs третираните с ГБМ култивирани клетки и третираните с контролна среда имат близък индекс на стимулация (например номер 4 и 6). Въпреки това обаче по-ниски остават индексите на стимулация на PBMCs, култивирани в среда от ГБМ.

Фигура 2. Индекси на стимулация на PBMCs, получени от здрави донори и отбелязани като поредни числа, съответно третиран с контролна среда и третиран със среда от ГБМ култивирани клетки



При сравняване на средните стойности на индекса на стимулация в групата на PBMCs, третиран с контролна среда, и в групата на третиран със среда от ГБМ култивирани клетки, установихме значима разлика между тях ($p=0.007$) в полза на третираните само с контролна среда (Фигура 3).

Фигура 3. Средни нива на индекса на стимулация на PBMCs, третирани със среда от ГБМ култивирани клетки и третирани с контролна среда



Нашият екип установи секреция на IL-6 (средно 116,05 pg/ml) и IL-8 (средно 858,1 pg/ml) в супернатантите на ГБМ култивирани клетки, но не и на IL-4, IL-10, IL-12, IFN γ , TNF α , IL-18, IL-17A, IL-23, TGF β , sPECAM, sICAM.

ДИСКУСИЯ

Целта на настоящото изследване беше да се проследят някои от механизмите, чрез които ГБМ потиска имунната система, а именно чрез хуморални фактори, секретирани от туморните клетки. В литературата данните за влиянието на секрецията от клетки от ГБМ върху клетките на имунната система е слабо проучено.

При култивиране с Epidermal growth factor (EGF), Fibroblast growth factor (FGF) и Fetal bovine serum (FBS) клетките от ГБМ прилепват на дъното на плаката и растат като адхерентни клетки, образуващи монослой. При изследването им за фенотипни маркери, характерни за туморните стволови клетки, неотдавна установихме, че над 90% от ГБМ култивирани клетки експресират Nestin, Sox-2, CD44, GFAP [13]. Сравнителното изследване на клетките, изолирани и култивирани от ГБМ, и мезенхимните стволови клетки показва множество аналогии, касаещи морфология, клоногенност, способност за остеогенна диференциация и експресия на фенотипни маркери (CD45-CD34-CD90+CD73+CD29+CD105+HLA-I+CD146+) [15]. Цитокиновият профил на културите от ГБМ също показва сходство с мезенхимните стволови клетки, а именно – установихме секреция само на IL-6 и IL-8, но липса на секреция на всички останали изследвани цитокини [15].

В литературата няма данни за потискащо действие на цитокините IL-6 и

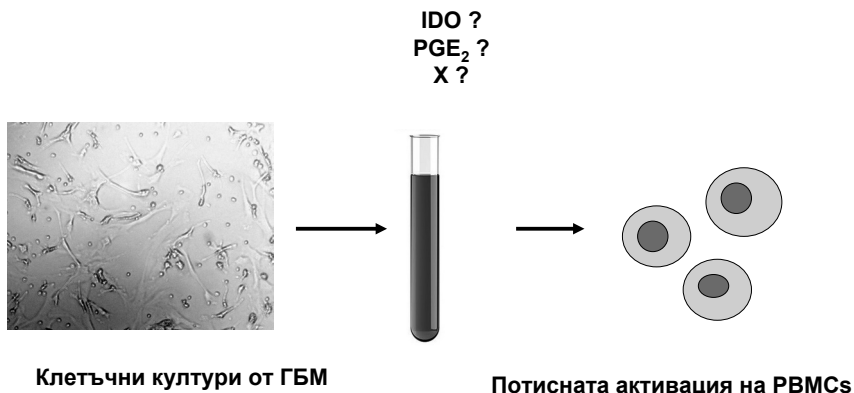
IL-8 върху Т-клетките. Поради това допускаме, че други са факторите, които потискат активацията на Т-клетките. Нашата хипотеза, в опит да се обяснят наблюдаваните резултати, се свързва с възможността хуморален фактор в средата на клетъчни култури от ГБМ да потиска активацията и пролиферацията на мононуклеарните клетки (Фигура 4). Кой точно е този фактор, с който може да се спекулира. Съдейки по данните за мезенхимните стволони клетки, които имат аналогии с ГБМ клетките [15], възможни са няколко фактора с такова действие – TGF β 1, IL-10, IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase), PGE₂ (простагландин E₂) [16]. Нашите изследвания за цитокиновата секреция в супернатанти от ГБМ клетъчни култури изключиха наличие на IL-10 или TGF β 1 в тях. Триптофан катаболизиращият ензим IDO притежава (освен антимикробни) и имуносупресивни свойства – той е един от ключовите имунорегулатори, секретирани от мезенхимните стволони клетки, туморите и по време на бременността [16]. Повишена експресия на IDO се наблюдава при активирани мезенхимни стволони клетки (175), а IDO експресията води до диференциация на IL-10 секретирани CD206+ имуносупресивни M2 макрофаги, които подпомагат Т-клетъчната супресия [17]. Катаболната активност на IDO, отделен от мезенхимните стволони клетки, може директно да потиска Т-лимфоцитите като резултат на бързо разграждане на триптофан [16].

Наред с IDO, PGE₂ е друга основна молекула, отговорна за имунорегулаторните функции на мезенхимните стволони клетки [18]. Продукт на арахидоновата киселина от действието на индуцируемата циклооксигеназа 2 (COX2) [19], PGE₂ действа като молекула-посредник паракринно и аутокринно. Клетъчният таргет за PGE₂ са PBMCS, NK клетки, моноцити, макрофаги, незрели дендритни клетки, като основният описан ефект е системно антиинфламаторно действие чрез намаляване нивата на TNF α , IL-6 и съдовата пропускливост при експериментални модели на сепсис [20]. PGE₂ директно може да потисне активираните PBMCS чрез съществено намаляване на IFN γ секрецията, а върху Т-клетките влиянието е към увеличаване продукцията на IL-4 и индукция на регулаторни IL-10, секретирани Т-лимфоцити [18].

По аналогия с механизмите на супресия при мезенхимните стволони клетки не е изключена ролята на IDO или PGE₂ като възможни фактори, които да потискат активацията на PBMCS, отглеждани в среда от ГБМ. Разбира се, възможно е да действа различен и неописан към момента фактор или няколко фактора (Фигура 4), което подсказва, че научните търсения в областта би следвало да продължат.

Фигура 4. Хипотеза, обясняваща възможните механизми на потискане на РВМС посредством хуморални фактори, отделяни от глиобластомните клетки в клетъчни култури

Супернатанта от клетъчна култура от ГБМ:



Като принос на описаното изследване трябва да се посочи, че такова не е извършвано за нашата страна, още повече този дизайн на експеримент не е публикуван в световната литература.

Благодарности: Проучването беше осъществено с финансовата подкрепа на Медицински университет – София, изследователски проект № 17-Д/2014.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Louis DN, et al. In: Greenfield's Neuropathology (ed. S. Love, D.N. Louis, D.W. Ellison), Hodder Arnold, 2008, p. 1821–2001.
2. WHO, In: Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System (ed. P. Kleihues, L.H. Sobin), Lyon, IARC Press, 2000, p. 9–54.
3. Kmiecik, J, et al. Elevated CD3+ and CD8+ tumor-infiltrating immune cells correlate with prolonged survival in glioblastoma patients despite integrated immunosuppressive mechanisms in the tumor microenvironment and at the systemic level. J Neuroimmunol 2013; 264 (1–2): 71–83.
4. Schiffer, D, et al. Glioblastoma cancer stem cells: Basis for a functional hypothesis. Stem Cell Discovery 2012; 2: 122–131.
5. Gürsel DB, et al. Glioblastoma Stem-Like Cells-Biology and Therapeutic Implications. Cancers (Basel) 2011; 3(2): 2655–2666.
6. McLendon RE and Rich JN. Glioblastoma Stem Cells: A Neuropathologist's View. J Oncol 2011; 2011: 1–8.
7. Abe B T and Macian F. Uncovering the mechanisms that regulate tumor-induced T-cell anergy. OncoImmunology 2013; 2(2): e22679.
8. Lohr J et al. Effector T-Cell Infiltration Positively Impacts Survival of Glioblastoma Patients and Is Impaired by Tumor-Derived TGF-β. Clin. Cancer Res 2011; 17(13): 4296–4308.
9. De Souza AP and Bonorino C. Tumor immunosuppressive environment: effects on

- tumor-specific and nontumor antigen immune responses. *Expert Rev Anticancer Ther* 2009; 9(9): 1317–1332.
10. Piperi C et al. Role of Cytokines in the Regulation of Glioma Tumour Growth and Angiogenesis. *Am J Immunol* 2005; 1: 106–113.
 11. Verschuere T et al. Galectin-1 and immunotherapy for brain cancer. *Expert Rev Neurother* 2011; 11: 533–543.
 12. Van Duivenvoorde LM et al. Dendritic cells: vehicle for tolerance induction and prevention of autoimmune diseases. *Immunobiology*; 2006; 211(6–8): 627–632.
 13. Kyurkchiev D, Naydenov E, Tumangelova-Yuzeir K, et al. Cells Isolated from Human Glioblastoma Multiforme Express Progesterone-Induced Blocking Factor (PIBF). *Cell Mol Neurobiology* 2014; 34: 479–489.
 14. Младенова Цв, Михайлова С, Спасова З и сътр. Случай на пациент с общ вариабилен имунодефицит и гастроинтестинални прояви. *Годишник на БАКИ* 2012: 78–85.
 15. Тумангелова-Юзеир, Т., Е. Найденов, Е. Иванова-Тодорова, Ц. Младенова, С. Начев, М. Мурджева и Д. Кюркчиев. Клетки, изолирани и култивирани от глиобластома мултиформе, имат прилики с мезенхимни стволови клетки. – *Български медицински журнал*, 2013; 7(3): 56–60.
 16. Kyurkchiev, D, Bochev I, Ivanova-Todorova E, et al. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells* 2014; 6(5): 552–570.
 17. François M, Romieu-Mourez R, Li M, Galipeau J. Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Mol Ther* 2012; 20: 187–195.
 18. Hsu WT, Lin CH, Chiang BL, et al. Prostaglandin E2 potentiates mesenchymal stem cell-induced IL-10+IFN- γ +CD4+ regulatory T cells to control transplant arteriosclerosis. *J Immunol* 2013; 190: 2372–2380.
 19. Crofford LJ. COX-1 and COX-2 tissue expression: Implications and predictions. *J Rheumatol Suppl* 1997; 49: 15–19.
 20. Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* 2009; 15: 42–49.

**ПЕРИФЕРНИ КРЪВНИ МОНОНУКЛЕАРНИ КЛЕТКИ, ИЗОЛИРАНИ
ОТ ЗДРАВИ ХОРА, ПОКАЗВАТ НАМАЛЕНА СПОСОБНОСТ ЗА
АКТИВАЦИЯ СЛЕД КУЛТИВИРАНЕ СЪС СРЕДА ОТ КЛЕТЪЧНИ
КУЛТУРИ, ПОЛУЧЕНИ ОТ ГЛИОБЛАСТОМА МУЛТИФОРМЕ**
*Калина Тумангелова-Юзеир, Екатерина Иванова-Тодорова, Цветелина
Великова, Емануил Найденов, Севдалин Начев, Доброслав Кюркчиев*

Глиобластомът мултиформе (ГБМ) е най-често срещаният и агресивно протичащ първичен мозъчен тумор. Характеризира се с неконтролируема клетъчна пролиферация, засилена апоптоза, инвазивност и неоангиогенеза, което го прави изключително труден за лечение. Туморът вероятно произхожда от неврални стволови клетки, трансформирани в туморни стволови клетки, които вероятно имат способността да потискат имунната система подобно на мезенхимните стволови клетки. Все още малко се знае за процесите, случващи се в микросредата на ГБМ, както и подлежащите механизми

на потискане на имунната система. **Целта на изследването** беше да определим степента на активация от фитохемаглутинин (РНА) на периферни мононуклеарни клетки (РВМС) след култивирането им в среда от клетъчни култури на ГБМ. **Материали и методи.** Изолирахме и култивирахме клетки от 8 хистологично доказани ГБМ, както и РВМС от 8 здрави донори. На следващ етап култивирахме изолираните РВМС в среда от ГБМ култивирани клетки и ги стимулирахме с РНА, за да определим индекса им на стимулация чрез флоуцитометрично изследване. Като контролна група използвахме РВМС, култивирани в контролна среда. Супернатантата от ГБМ култивирани клетки беше тествана за наличие на редица цитокини чрез ELISA. **Резултати.** РВМС, култивирани със среда от ГБМ култивирани клетки, показаха намален индекс на активация в сравнение с контролни такива ($p=0.007$). В супернатантите на ГБМ клетъчните култури установихме наличие на IL-6 и IL-8. **Заклучение.** Наблюдаваният имunosупресивен ефект върху РВМС показва, че има секреторни фактори в средата на ГБМ клетъчните култури, които потискат активацията на Т-лимфоцитите и може би имат отношение към избягването на имунния контрол от този вид тумор.

Ключови думи: глиобластомът мултиформе, имунна регулация, фитохемаглутинин, индекс на стимулация, РВМС.

PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS ISOLATED FROM HEALTHY DONORS SHOW DECREASED CAPACITY OF ACTIVATION AFTER CULTURING WITH GLIOBLASTOMA MULTIFORME CELL CULTURES MEDIA

Kalina Tumangelova-Yuzeir, Ekaterina Ivanova-Todorova, Tsvetelina Velikova, Emanuel Naydenov, Sevdalin Nachev, Dobroslav Kyurkchiev

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common and aggressive brain tumour characterized by uncontrolled cell proliferation, increased apoptosis, invasiveness and neo-angiogenesis, which make it very difficult for treatment. Probably the tumour descends from neural stem cells transformed into cancer stem cells which can suppress the immune system in similarity to mesenchymal stem cells. However the pathogenic processes occurred in the GBM microenvironment remain unclear, as well as the mechanisms of immune suppression. **The aim of the study** was to study the activation capacity of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), treated with GBM cell cultures media, after stimulation with phytohemagglutinin (PHA) – mitogen used for T-lymphocyte activation. **Material and methods.** Our team isolated and cultured 8 histologically proven GBM, and PBMCs from 8 healthy donors. In the next step we cultured isolated PBMCs in GBM cell supernatants for 60 hours. We stimulated treated PBMCs with phytohemagglutinin (PHA) and assessed the stimulation index by flow cytometry. PBMCs, treated with control media and also stimulated with PHA, were used as controls. Supernatants of the GBM cell cultures were tested for some cytokines by ELISA. **Results.** The PBMCs cultured with GBMs cell media showed decreased activation index, as opposed to the control cells ($p=0.007$). We detected IL-6 and IL-8 in GBM cell cultures media. **Conclusion.** We observed that GBM cell cultures media contain humoral factors which can inhibit T-lymphocytes activation and which factors may be related to the GBM escape from the immune system control.

Keywords: Glioblastoma multiforme, immune regulation, phytohemagglutinine, index of stimulation, PBMCs.

МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ГЕННА И БЕЛТЪЧНА ЕКСПРЕСИЯ НА ЦИТОКИНИ В ЧРЕВНА ЛИГАВИЦА

*Цветелина Великова¹, Илия Караколев², Зоя Спасова³, Екатерина Иванова-Тодорова¹, Доброслав Кюркчиев¹, Искра Алтънкова⁴,
Спаска Станилова²*

¹ Клинична лаборатория с дейност Имунология – УМБАЛ „Св. Иван Рилски“,
София, Медицински университет – София

² Катедра по молекулярна биология, имунология и медицинска генетика,
Медицински факултет – Тракийски университет, Стара Загора

³ Клиника по гастроентерология – УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, София,
Медицински университет – София

⁴ Университетска болница „Лозенец“ – Софийски университет, София

ВЪВЕДЕНИЕ

В ерата на постоянно усъвършенстване на нови технологии през последните години молекулярно-генетичните подходи предложиха нови данни за възпалителните механизми и участващите в тях гени, клетки, цитокини и други [4]. Те могат да бъдат различни мукозни и сурогатни молекули, които медиират възпалителните отговори. Това още повече важи за хроничните възпалителни чревни заболявания (ХВЧЗ) – болест на Крон и улцерозен колит, при които чревното възпаление е основен патофизиологичен субстрат. И тъй като чревното възпаление се развива в мукозата, то тя е най-логичният материал за изследване на биомаркери при ХВЧЗ [4]. Про- и антиинфламаторните отговори при ХВЧЗ могат да бъдат изследвани чрез редица геномни, протеомни, метаболомни и т.н. подходи [5, 6, 9]. Те позволяват изследването на генни експресии, транскрипционни фактори, белтъци и техните посттранслационни промени и крайни метаболитни продукти на участващи в патогенезата молекули. Всичко това съвкупно дава възможност за получаване на уникален индивидуален специфичен профил за всеки пациент с ХВЧЗ [4].

По тези причини си поставихме за цел да изследваме основни маркери в засегнатата лигавица на гастроинтестиналния тракт при пациентите с ХВЧЗ. В пилотно проучване изследвахме Th17 и Treg лимфоцитните субпопулации в чревната лигавица (възпалена и незасегнатата лигавица) чрез проучване на генната и белтъчната експресия на цитокини, които са свързани с тяхната диференциация и ефекторни функции – IL-17A, TGFβ1, IL-10, IL-6, IL-23, както и транскрипционния фактор FoxP3, характерен за регулаторните Т-лимфоцити.

За да определим нивото на генна експресия на тези цитокини, локално в гастроинтестиналния тракт адаптирахме Real-time PCR методология за генна експресия на цитокини в биопсични проби от чревна лигавица на пациенти с

ХВЧЗ. Изследвахме биопсични проби от 37 пациенти с ХВЧЗ и 12 лица без ХВЧЗ. От първоначално изолираната тотална РНК от паралелни биопсични проби (от засегнатата лигавица и от прилежащата ѝ нормално изглеждаща лигавица) получихме копиДНК, която тестирахме за генна експресия на FoxP3, IL-10, IL-17A, IL-23, IL-6 и TGFβ1. Изявата на генна експресия на таргетната ДНК отразява и нивото на матрична РНК, която е била синтезирана първоначално локално в чревната лигавица [7, 8]. Определихме и протеиновите нива на изброените цитокини локално в лигавицата посредством ELISA. Този подход е използван от редица изследователи с цел характеризизиране на локалния възпалителен процес [3].

ПРОТОКОЛ 1 – СЪБИРАНЕ НА БИОЛОГИЧЕН МАТЕРИАЛ

Пациентите бяха събрани от хоспитализирани в Клиниката по гастроентерология към УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ и проследявани диспансерно с диагноза ХВЧЗ в периода 06.2011–06.2013 г. Диагнозата на всички пациенти е поставена по стандартните критерии на ECCO Consensus за БК (2010) и УК (2012) от специалистите в клиниката. Критериите на ECCO Consensus за поставяне на диагнозата УК и БК включват комплекс от анамнестични, клинични, лабораторни и инструментални изследвания (Published ECCO Guidelines: <https://www.ecco-ibd.eu/publications/ecco-guidelines-science/published-ecco-guidelines.html>). Всички участници в изследванията са подписали писмено Информирано съгласие, според изискванията на Комисията по етика на научните изследвания към МУ – София.

Биопсичните проби от дебелочревна лигавица (по около 30 mg за всеки пациент) бяха взимани, надписвани, картотекирани и съхранявани според изискванията за добра лабораторна практика и според инструкциите на търговските китове. Биопсичните проби са осигурени чрез диагностично или контролно проведени едно или повече ендоскопски изследвания в рамките на хоспитализацията на пациентите и след подписано Информирано съгласие от всеки пациент. За целта на изследването от лицата с ХВЧЗ бяха взети двойки биопсичен материал – от болестно променена лигавица и от нормалната ѝ подлежаща лигавица, а от контролната група лица без ХВЧЗ – единичен биопсичен материал от лигавица. За разграничаването ѝ бяха описани следните ендоскопски критерии:

§ Засегната (възпалена) тъкан – ендоскопски с лека до изразена еритема, заличени до липсващи съдови рисунъци, наличие на ерозии, спонтанно кървене, улцерации.

§ Подлежаща нормално изглеждаща тъкан – без еритема, ясно видими съдови рисунъци, без спонтанно кървене и улцерации.

Биопсичните материали бяха замразявани веднага на -70°C . Преди да бъдат тествани, пробите бяха размразени напълно на стайна температура.

За определяне на белтъчната експресия бяха приготвени екстракти от биопсични проби от засегнатата лигавица на 6 пациенти с ХВЧЗ и 2 патологични контроли (пациенти с хроничен колит). Чрез накълцване и нарязване всяка

биопсична проба бе раздробявана, след което към всяка проба бяха прибавени по 1200 µl PBS с миксиране на Вортекс (модел Sartorius) за 1 минута и центрофугиране на 3000 оборота за 20 минути, супернатантите бяха декантирани, разфасовани и замразени на -70°C до момента на изследването им. Преди да бъдат тествани, пробите бяха размразени напълно на стайна температура.

ПРОТОКОЛ 2 – МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ГЕННИ ЕКСПРЕСИИ НА ЦИТОКИНИ В БИОПСИИ

За да определим нивото на генна експресия на някои цитокини, локално в гастроинтестиналния тракт извършихме изследване на следните етапи. Първоначално изолирахме тоталната РНК от биопсични проби на пациентите с ХВЧЗ (проба от засегнатата лигавица и проба от подлежащата ѝ нормално изглеждаща лигавица) чрез колонна хроматография. Получената РНК превърнахме в копиДНК чрез верижна полимеразна реакция с обратна транскрипция (RT-PCR). На третия етап извършихме сравнителен количествен PCR в реално време за наличие на генна експресия на дадена таргетна ДНК (за определен цитокин) чрез TaqMan детекционна система. Изявата на генна експресия на таргетната ДНК отразява и нивото на матрична РНК, която е била синтезирана първоначално локално в чревната лигавица.

ПРОТОКОЛ 2А – ИЗОЛИРАНЕ НА РНК ОТ ЧРЕВНИ БИОПСИИ

Изолирането на тотална РНК от чревните биопсии извършихме с GeneJET RNA purification kit за 50 проби (Fermentas, Thermo Scientific, Латвия).

Използвани реагенти: Предоставени в кита: Протеиназа К, Лизис буфер, Wash buffer 1, Wash buffer 2, вода, чиста от нуклеази, пречистващи колонки, епруветки от 1,5 и от 2 ml. *Допълнително необходими реагенти:* 96%-ен етилов алкохол, 14.3-бета-меркаптоетанол, ТЕ буфер (10 mM Tris HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA). *Използвана апаратура:* Аналитична везна Ohaus® (Precision Standard), Ротор-хомогенизатор (Tissue Tearor™, Biospec products, 5000-32,000 r.p.m.), Центрофуга Biofuge Stratos (Heraeus 2003, Germany), Спектрофотометър GeneQuant 1300 (GE Healthcare UK Limited).

Изпълнение на метода: Спазвахме всички общи препоръки за избягване на контаминация с РНА-за съгласно инструкциите в кита. Събраните и замразени на -70°C биопсии бяха поетапно размразявани по реда на събирането им и използването им. При изпълнение на метода следвахме стриктно инструкциите на производителя, приложени в кита.

Предварителна подготовка на реагентите: Wash buffer 1 и Wash buffer 2 се подготвят, като към съответните концентрирани опаковки се прибави 10 ml и 39 ml 96%-ен етанол. След добавянето на етанола, опаковката се маркира на приложеното място на етикета. Необходимият работен Лизис буфер се приготвя чрез добавяне на 20 µl от 14.3-бета-меркаптоетанол към всеки 1 ml обем от опаковката Лизис буфер, включен в кита. Необходимото количество Протеиназа К-разтвор се получава чрез

разреждане на 10 µl от концентрираната Протеиназа К към 590 µl от ТЕ буфера.

Процедурен протокол: Измерихме всички размразени проби на аналитична везна, като теглото им варираше от 5 mg до 42 mg за проба. Цялата биопсична тъкан внесохме във фиолка от 2 ml, добавихме по 150 µl от Лизис буфера и посредством ротор-хомогенизатора материалът се раздробява на няколко серии по 10–20 секунди до пълно хомогенизиране на суспензията. След това добавихме и останалите 150 µl от Лизис буфера и отново хомогенизирахме. След пълното хомогенизиране на всяка проба, добавихме по 600 µl Протеиназа К. Пробите престояха на стайна температура 15 минути. Центрофугирахме на 12 000 g за 10 минути на охлаждаща високооборотна центрофуга. След центрофугирането супернатантата пренесохме в нова РНА-за – чиста центрофужна епруветка от 2 ml. Добавихме по 450 µl 96%-ен етанол, разбърква се добре чрез пипетиране. Натоварването на пречистващата колонка извършихме по следния начин. Първоначално пренесохме по 700 µl от лизата към колонка, поставена в колекторната епруветка. Центрофугирахме за 1 минута на 12 000g. Отстранихме преминалата течност и върнахме колонката обратно в колекторната епруветка. Стъпката беше повтаряна, докато целият лизат премине през колонката и се центрофугира. Колонката пренесохме в нова 2 ml колекторна епруветка. Добавихме 700 µl работен Wash Buffer 1 към колонката и центрофугирахме за 1 минута на 12 000g. Отстранихме преминалата течност и върнахме колонката обратно в колекторната епруветка. Добавихме по 700 µl работен Wash Buffer 2 към колонката и центрофугирахме за 1 минута на 12 000g. Отстранихме преминалата течност и върнахме колонката обратно в колекторната епруветка. Добавихме по 250 µl Wash Buffer 2 към всяка колонка и центрофугирахме за 2 минута на 12 000g. В случай че в колонката се вижда остатъчна течност, центрофугирахме за още 1 минута. След измиването колонките бяха пренесени в нови 1,5 ml стерилни чисти от РНА-аза микроцентрофужни епруветки. За елуиране на РНК добавихме по 50 µl вода, чиста от нуклеаза, в колонката. Центрофугирахме за 1 минута на 12000g. За добиване на максимално количество РНК повторихме елуиращата стъпка с добавяне на допълнително 50 µl вода, чиста от нуклеаза, и центрофугиране на колонката в нова 1,5 ml центрофужна епруветка. Пречистващата колонка беше отстранена, а елуираната РНК остана в 1,5 ml центрофужна епруветка върху лед.

Измереното количество елуирана РНК измерихме посредством спектрофотометър, като количеството получена РНК варираше между 0,053 – 0,633 µg/µl.

ПРОТОКОЛ 2Б: PCR С ОБРАТНА ТРАНСКРИПЦИЯ (RT-PCR)

За обръщането на изолираната тотална РНК в копиДНК използвахме архивиращ кит First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Thermo Scientific, Латвия).

Използвани реагенти, предоставени в кита: M-MuLV Reverse Transcriptase, RiboLock RNase Inhibitor, 5x Reaction Buffer (250 mM Tris-HCl pH=8,3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT), 10 mM dNTP Mix, Oligo(dT)₁₈ Primer, Random

Hexamer Primer, Forward GAPDH Primer (5`-CAAGGTCATCCATGACAАCT TTG-3`), Reverse GAPDH Primer (5`-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3`), Control GAPDH RNA (1.3 kb 3`-poly(A) tailed RNA transcript), чиста от нуклеази вода. *Използвана апаратура:* RT-PCR апарат GeneAmp® PCR Systems 9700 (Applied Biosystems, Singapore).

Изпълнение на метода:

След размразяване и миксиране на всички компоненти от кита, изготвихме реакционната смес съгласно инструкциите на производителя на кита (Таблица 1). RT-PCR извършихме при условия, показани на Таблица 2.

Таблица 1. Компоненти за извършване на RT-PCR върху темплейтите РНК, получени от биопсичните проби

Компонент	Изходна концентрация	Крайна концентрация	Количество за 1 проба <30 µl краен обем>
РНК	> 2 µg		18 µl
5X Reaction Buffer	5x	1x	6 µl
10 mM dNTP Mix	10 mM mix	1 mM	2 µl
RiboLock RNase Inhibitor	20 u/µl	20 u/rxn	1 µl
Random hexamer primer	100 µmol	0,2 µg/ µl	1 µl
M-MuLV Reverse Transcriptase (20 u/µl)	20 u/µl	40 u/rxn	2 µl
Краен обем:			30 µl

Таблица 2. Условия за извършване на PCR с обратна транскрипция (RT-PCR)

Стъпка	T, C	Време	Брой цикли
Първоначална денатурация	25°	5 минути	1
Денатурация	37°	120 минути	35
Изпичане	70°	5 минути	
Удължаване	4°	∞	

ПРОТОКОЛ 2В: СРАВНИТЕЛЕН КОЛИЧЕСТВЕН PCR В РЕАЛНО ВРЕМЕ (REAL-TIME QPCR) ЗА ЕКСПРЕСИЯТА НА ГЕНИТЕ ЗА FOXP3, IL-10, IL-17A, IL-23, IL-6 И TGFBI

Сравнителен количествен PCR в реално време (qRT-PCR) извършихме с апарат Real-Time PCR System и TaqMan детекционна система.

Използвани реагенти: Валидирани праймери и TaqMan MGB сонди, белязани с 6FAM на Applied Biosystems (Singapore) и Primerdesign (Southampton, United Kingdom) (Таблица 3), Ендогенна контрола – еукариотна 18S рибозомална РНК, Мастър микс – TaqMan Universal PCR Master Mix (Thermo Scientific Fermentas™, Latvia), ROX, H₂O, чиста от нуклеази. *Използвана апаратура:* Апарат 7500 Real-

Time PCR System (Applied Biosystems, Singapore).

Таблица 3. Праймери, използвани за сравнителен количествен RT-PCR в реално време

Ген	Номер /Assay ID/	Дължина на ампликона / бази/	Сенс праймер	Антисенс праймер	Производител
18S рРНК	Hs99999901_s1	187	–	–	Applied Biosystems*
FoxP3	Hs00203958_m1	64	–	–	Applied Biosystems*
IL-10	Hs00174086_m1	119	–	–	Applied Biosystems*
IL-23A	Hs00372324_m1	107	–	–	Applied Biosystems*
IL-17A	NM_002190	94	CCTCAGATTA CTACAA CCGATCC	CACTTTGCCT CCCAGATCAC	Primerdesigns
IL-6	NM_000600	116	GCAGAAAA CAACCTGAA CCTT	ACCTCAAAC T CCAAAA GACCA	Primerdesigns
TGFβ1	NM_000660	83	CACTCCCACT CCCTCTCTC	GTCCCCTGT GCCTTGATG	Primerdesigns

***Последователностите на сенс и антисенс праймерите са търговска тайна на производителя**

Изпълнение на метода: Миксовете от праймери и проби за генните експресии на Primerdesign бяха доставени в лиофилизирана форма и възстановени непосредствено преди употребата им според инструкциите на производителя с по 330 µl вода, чиста от нуклеази, като престояха 1 час преди използването им. Пробите от кДНК бяха разредени 1:3 (30 µl кДНК + 60 µl вода, чиста от нуклеази). За всяка генна експресия приготвихме мастер микс (qPCR микс) съгласно протокола на производителя (Таблица 4), като температурните условия на извършения qRT-PCR са представени на Таблица 5.

Таблица 4. Компоненти, използвани за извършване на PCR в реално време (qRT-PCR)

Компонент	Количество за 1 проба (реакция)
кДНК	5 µl
H ₂ O, чиста от нуклеази	4 µl
Master Mix	10 µl
ROX	0,12 µl
Primers and probes	1 µl
Краен обем: 20 µl	

Таблица 5. Температурните условия за извършване на PCR в реално време (qRT-PCR)

	50°C	95°C	60°C
Времетраене	2 минути	0:15 минути	1 минута
Повторения	–	45 цикъла	

Данните от амплификацията на таргетните гени след qRT-PCR бяха представени като стойността на Ct (Threshold cycle) – цикъл от амплификационния процес, при който се наблюдава статистическо значимо увеличение на флуоресценцията. Стойността на Ct е обратнопропорционална на първоначалния брой копия, т.е. колкото по-висока е Ct, толкова по-ниска е генната експресия. Стойностите на Ct на всеки ген за всички проби бяха анализирани чрез програмен продукт Sequence Detection System Software, v. 1.3.1. Беше направен сравнителен количествен анализ на генната експресия на ниво мРНК чрез $\Delta\Delta Ct$ метод. Стойностите ΔCt за всеки ген са получени след нормализиране спрямо Ct стойността на ендогенната контрола. Бяха сравнени ΔCt нивата на гените при нормално изглеждаща и болестно засегната лигавица при всеки един от пациентите (с болест на Крон или с улцерозен колит), както и сравнение на ΔCt на пациентите спрямо ΔCt на контролната група лица, които нямат ХВЧЗ. Резултатите са представени и в относителни количествени единици (RQ relative quantification unit = $2^{-\Delta\Delta Ct}$) като пъти увеличение/понижение на генната експресия спрямо различните калибратори.

ПРОТОКОЛ 3 – КОЛИЧЕСТВЕНО ОПРЕДЕЛЯНЕ НА БЕЛТЪЧНОТО НИВО НА ЦИТОКИНИ В БИОПСИЧНИ ПРОБИ

За количествено определяне на IL-17A, IL-6, IL-10, IL-23 и TGFβ1 в серуми и екстракти от биопсични проби (описани в Протокол 1) използвахме търговски китове Human ELISA kit (Gene probe, Diaclone, France).

СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ

Статистическият анализ на суровите данни беше извършен с програма Software package for statistical analysis (SPSS®), IBM 2009, версия 19 (2010) и Excel (v. 2010). Бяха използвани дескриптивни методи, тестове за определяне на нормалността на разпределението, параметрични и непараметрични тестове за свързани и несвързани извадки, корелационен анализ.

ОЧАКВАНИ РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

За да определим нивото на генна експресия на някои цитокини, локално в гастроинтестиналния тракт извършихме изследване на лигавични проби, като първоначално бе изолирана тотална РНК от биопсични проби (проба от засегнатата лигавица и проба от подлежащата ѝ нормално изглеждаща лигавица), която превърнахме на следващ етап в копиДНК. На последващия етап извършихме сравнителен количествен PCR в реално време за наличие на генна експресия на таргетна ДНК за FoxP3, IL-10, IL-17A, IL-23, IL-6 и TGFβ1. Изявата на генна експресия на таргетната ДНК отразява и нивото на матрична РНК (mRNA), която е била синтезирана първоначално локално в чревната лигавица.

В таблица 6 са представени таргетните гени и съответната им генна експресия при пациентите с ХВЧЗ, като средна стойност на нормализираните към ендогенната контрола стойности на Ct (Δ Ct). От получените данни е видно, че при пациентите с ХВЧЗ експресия на таргетните гени (за FoxP3, IL-10, IL-17A, IL-23, IL-6 и TGFβ1) се наблюдава при по-голям брой пациенти повече в болната тъкан, отколкото в прилежащата ѝ нормална тъкан. При най-много пациенти са експресирани гените за TGFβ1 (в болна тъкан при 76% от пациентите и в здрава тъкан при 57% от тях), следвани от тези за FoxP3, IL-10, IL-6, IL-23 и най-рядко (при най-малък брой пациенти) са експресирани гените за IL-17A (в болна тъкан при 47% от пациентите и в здрава тъкан при 29% от лицата) (Таблица 6).

Таблица 6. Разпределение на стойностите на Δ Ct – брой пациенти (процент), при които се наблюдава генна експресия за съответния ген, и средна стойност на Δ Ct и размах при пациенти с хронични възпалителни чревни заболявания

Експресия на таргетни гени	Брой (%) пациенти, в които генът е експесиран до 45-ти цикъл на qRT-PCR	Средна стойност на Δ Ct \pm SD (Размах)
FoxP3		
болна тъкан	37 (76%)	14.64 \pm 2.54 (9.97–19.37)
нормална тъкан	27 (55%)	15.86 \pm 2.41 (11.45–20.01)
IL-10		
болна тъкан	29 (59%)	16.83 \pm 1.89 (11.72–20.16)
нормална тъкан	24 (49%)	17.55 \pm 1.42 (15.49–20.3)

IL-23	болна тъкан	23 (47%)	17.58±3.80 (5.42–22.53)
	нормална тъкан	16 (33%)	18.02±2.63 (14.42–22.76)
IL-17A	болна тъкан	23 (47%)	18.45±3.41 (7.05–23.64)
	нормална тъкан	14 (29%)	19.97±2.48 (16.06–23.96)
IL-6	болна тъкан	27 (55%)	17.09±2.44 (10.53–20.83)
	нормална тъкан	13 (27%)	19.80±2.33 (13.51–21.99)
TGFβ1	болна тъкан	37 (76%)	8.43±4.32 (2.26–16.97)
	нормална тъкан	28 (57%)	8.99±4.41 (2.27–16.71)

Според средната стойност на ΔCt експресиите на гените се подреждат в следния ред – от най-силно към най-слабо експресирани: TGFβ1 > FoxP3 > IL-10 > IL-23 > IL-6 > IL-17A.

Що се отнася до данните за контролната група лица без ХВЧЗ, данните за експресията на таргетните гени са представени на Таблица 7.

Таблица 7. Разпределение на нормализираните към ендогенната контрола стойности на Ct (ΔCt) – брой лица, при които се наблюдава генна експресия за съответния ген, средна стойност на ΔCt и размах при контролната група лица без ХВЧЗ

Таргетни гени	Брой лица, при които генът е експресиран	Средна стойност на ΔCt +/- SD (Размах)
FoxP3	12/12	16.94±1.65 (13.54–20.40)
IL-10	12/12	16.67±3.61 (9.22–21.38)
IL-23	6/12	17.93±1.73 (15.01–19.49)
IL-17A	6/12	19.48±2.68 (14.83–21.74)
IL-6	5/12	20.79±0.69 (20.10–21.73)
TGFβ1	12/12	9.21±3.23 (5.21–16.71)

От таблицата е видно, че при всички лица без ХВЧЗ има експресия на TGFβ1, FoxP3 и IL-10, докато останалите гени за IL-23, IL-17A и IL-6 са експресирани само при около половината лица. Според средната стойност на ΔCt експресиите на гените се подреждат в следния ред – от най-силно експресирани (с най-ниско средно ΔCt) към най-слабо експресирани (с най-високо средно ΔCt): TGFβ1 > IL-10 > FoxP3 > IL-23 > IL-17A > IL-6.

Преобладаващо активирани във възпалената лигавица на пациентите с ХВЧЗ бяха гените за FoxP3, TGFβ1 и IL-10, като установихме статистически значимо по-висока експресия на гените за FoxP3 и IL-6 във възпалената тъкан в сравнение с прилежащата нормална лигавица при пациентите с ХВЧЗ, както и спрямо лигавица на лица без ХВЧЗ. За да проследим процеса от генна в mRNA

експресия, трансляция в белтъчен продукт и секреция, изследвахме нивата на изучаваните цитокини в екстракти от лигавичната тъкан и в серума на болни с ХЗВЧ и контролни лица без ХВЧЗ. В нашето пилотно изследване на болни с ХВЧЗ установихме значително по-високи концентрации на цитокините IL-6, IL-17A и IL-10 във възпалената лигавица, в сравнение със серума на същите болни. Eastaff-Leung и сътр. също установяват повишени белтъчни нива на IL-17A в интестинална мукоза на пациенти с ХВЧЗ, както и повишен брой на Th17 клетки в периферна кръв [2, 3], подобно на други изследователи [1]. Ние установихме сигнификантно повишена генна експресия едновременно на IL-6 и на TGFβ1 цитокините във възпалената тъкан ($p < 0.05$), т.е. данни, подкрепящи тезата за диференциацията на наивните Т-клетки в проинфламаторната ефекторна субпопулация Th17. В потвърждение на тази хипотеза е и намерената от нас повишена генна експресия на IL-17A при болните с ХВЧЗ. Нивата на mRNA IL-17A бяха повишени в засегнатата тъкан спрямо подлежащата нормална на същите пациенти, както и спрямо лигавицата на лицата без ХВЧЗ, макар и да не достигнаха статистическа значимост (RQ 7.06, 5.69 съответно, $p > 0.05$). Не при всички наши болни установихме експресия на IL-17A, като основно секретирани от Th17 лимфоцитната субпопулация, вероятно поради провеждана терапия при част от нашите болни. В същото време FoxP3, експресиран конститутивно от Tregs, беше сигнификантно повишена, което индиректно означава присъствие на регулаторни Т-лимфоцити, които по литературни данни може да бъдат и нефункционални в присъствие на IL-6. Tregs секретират IL-10, чиято експресия беше повишена (макар и с гранична сигнификантност). Самите Tregs могат да бъдат както CD4+, така и наскоро описаните CD8+ FoxP3+ Tregs [2]. На база нашите резултати за транскрипционния фактор FoxP3 не можем да определим дали Т-регулаторните клетки са CD4+ или CD8+ лимфоцити. Подобни на нашите данни за едновременно присъствие на реципрочните по своята диференциация и функции Th17 и Tregs клетките са намерени и от други автори [2, 3]. Широко дискутираната роля на IL-6 в чревното възпаление показва по-скоро неговата роля като регулаторен цитокин, тъй като от неговото присъствие или отсъствие в най-голяма степен зависи дали наивните Т-лимфоцити ще се тласнат съответно към Th17 или Tregs [10].

Не установихме координирано наличие на генна експресия в лигавицата и белтъчната продукция локално за IL-6, IL-17A, IL-10, IL-23 и TGFβ1. Възможните причини за това са краткият полуживот на mRNA, както и фактът, че не всички транскрипти се транслират в белтък. Също така не установихме корелация между белтъчния продукт в лигавицата и в серума при едни и същи болни, което е в подкрепа на факта, че локалният процес в червата трудно би могъл да бъде оценяван в периферното кръвообращение.

КРИТИЧНИ ТОЧКИ И ЗАТРУДНЕНИЯ

При обработката на първичния материал срещнахме затруднения основно при хомогенизирането на биопсичните проби за извличане на тотална РНК. В случай на по-трудно хомогенизиране, 300 µl от Протеиназа К бяха добавени към пробата с Лизис буфера. След пълното хомогенизиране бяха добавени още 300 µl от Протеиназа К до достигане на общото количество от 600 µl. Допълнително затруднение беше и различното количество биопсична проба за всеки пациент (съответно от болна и здрава тъкан).

Важно е да отбележим, че при генните експресии на цитокини няма изработени референтни граници за здрави тъкани, а това затруднява интерпретацията им. По тази причина извършихме сравнителен количествен анализ на генната експресия на ниво мРНК чрез $\Delta\Delta C_t$ метод, а именно оценка на генната експресия като повишена/намалена спрямо избран калибратор.

Като ограничение на изследването трябва да отбележим малкия брой лица, при които изследвахме белтъчен продукт в екстракти от лигавична тъкан, но смятаме, че като ориентация тези пилотни данни са интересни за по-нататъшни изследвания.

НЕОБХОДИМО ВРЕМЕ ЗА ИЗВЪРШВАНЕ НА ПРОТОКОЛИТЕ

За изпълнение на протокол 1 – приготвяне на екстракти от биопсични проби – за 10 проби са необходими около 1.5 часа.

По протокол 2 – екстракция на РНК – около 6 часа за всяка серия от 10 проби; PCR – около 3–4 часа, qRT-PCR – около 4–5 часа.

По протокол 3 – ELISA – около 4.5 часа за определяне на всеки цитокин.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оценката на локалния възпалителен процес може да стане както на генетично ниво (експресия на цитокини и транскрипционни фактори), така и на белтъчно ниво, което е истинската ценност на тези изследвания. Така би могло да се определи коя субпопулация лимфоцити преобладава в чревната лигавица в даден момент и при даден пациент, както и дали цитокиновата среда в даден момент е проинфламаторна или антиинфламаторна. Данните от такъв тип изследвания могат да се използват за създаване на индивидуализиран профил при всеки пациент с ХВЧЗ. Такива профили към момента не се правят рутинно в клиничната практика, но те биха могли да бъдат включени към лабораторния алгоритъм на даден етап в бъдеще. Допълването на тази информация от още изследователи и създаване на база данни за пациентите с ХВЧЗ ще даде възможности за проследяване на патологичните процеси в лигавицата на болните, а също не и ефекта от терапевтичния контрол на ниво гени и белтъци в реално време.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Caproni M, Antiga E, Melani L, et al. Serum levels of IL-17 and IL-22 are reduced by etanercept, but not by acitretin, in patients with psoriasis: a randomized-controlled trial. *Journal of clinical immunology* 2009; 29(2): 210–214.
2. Eastaff-Leung N. Regulatory T Cells, Th17 effector cells and cytokine microenvironment in inflammatory bowel disease and coeliac disease. Thesis, 2009.
3. Eastaff-Leung N, Mabarrack N, Barbour A, Cummins A, Barry S. Foxp3+ regulatory T cells, Th17 effector cells, and cytokine environment in inflammatory bowel disease. *J Clin Immunol* 2010; 30(1): 80–89.
4. Florholmen J, Fries W. Candidate mucosal and surrogate biomarkers of inflammatory bowel disease in the era of new technology. *Scand J Gastroenterol* 2011; 46(12): 1407–1417.
5. Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory bowel disease. *Ann Rev Immunol* 2010; 28: 573–621.
6. Neuman MG. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *Transl Res* 2007; 149 (4): 173–186.
7. Roda G, Caponi A, Benevento M, et al. New proteomic approaches for biomarker discovery in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Dis* 2010; 16(7): 1239–1246.
8. Scaldaferrri F, Correale C, Gasbarrini A, Danese S. Mucosal biomarkers in inflammatory bowel disease: key pathogenic players or disease predictors? *World J Gastroenterol* 2010; 16(21): 2616–2625.
9. Torres MI, Rios A. Current view of the immunopathogenesis in inflammatory bowel disease and its implications for therapy. *World J Gastroenterol* 2008; 14(13): 1972–1980.
10. Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* 2006; 116 (5): 1310–1316.

**МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ГЕННА И БЕЛТЪЧНА ЕКСПРЕСИЯ
НА ЦИТОКИНИ В ЧРЕВНА ЛИГАВИЦА**

Цветелина Великова, Илия Караколев, Зоя Спасова, Екатерина Иванова-Тодорова, Доброслав Кюркчиев, Искра Алтънкова, Спаска Станилова

През последните години молекулярно-генетичните подходи предложиха нови данни за различни възпалителни механизми и участващите в тях гени, клетки, цитокини и други. За нас от интерес е възпалението при хроничните възпалителни чревни заболявания (ХВЧЗ) и тъй като чревното възпаление се развива в мукозата, то тя е най-логичният материал за изследване на биомаркери. По тези причини си поставихме за цел да изследваме основни маркери в засегнатата лигавица на гастроинтестиналния тракт при пациентите с ХВЧЗ в пилотно проучване при 37 пациенти с ХВЧЗ и 12 лица без ХВЧЗ. Предлагаме протоколи за изследване на Th17 и Т-регулаторните (Treg) лимфоцитни субпопулации локално в чревната лигавица (възпалена и незасегната)

чрез проучване на генната и белтъчната експресия на цитокини, които са свързани с тяхната диференциация и ефекторни функции – IL-17A, TGF β 1, IL-10, IL-6, IL-23, както и транскрипционния фактор FoxP3, характерен за Tregs. Методологията включва изолиране на тоталната РНК от биопсичните проби; превръщането ѝ в копиДНК; сравнителен количествен PCR в реално време за определяне на mRNA нивата на изброените показатели; приготвяне на екстракти от биопсични проби и определяне на белтъчни нива на параметрите чрез ELISA. Коментирали сме още получените резултати, ограниченията, затрудненията и необходимото време за извършване на протоколите.

A METHOD FOR GENE AND PROTEIN EXPRESSION DETERMINATION OF CYTOKINES IN BOWEL SAMPLES

Tsvetelina Velikova, Iliya Karakolev, Zoya Spassova, Ekaterina Ivanova-Todorova, Dobroslav Kyurkchiev, Iskra Altankova, Spaska Stanilova

Recently molecular genetic approaches have suggested new information about mechanisms of inflammation and participated genes, cells, cytokines. We concentrated our attention on Inflammatory Bowel Disease (IBD) which inflammation happens in the mucosa, therefore the mucosa is the source of biomarkers. We aimed to investigate some immunological markers in inflamed and adjacent normal mucosa obtained from 37 IBD patients and 12 non-IBD controls in a pilot study. We propose three protocols for Th17 and Treg lymphocytes investigation by gene and protein expression of related to their differentiation and functions cytokines – IL-17A, TGF β 1, IL-10, IL-6, IL-23, as well as transcription factor FoxP3, expressed constitutively in Tregs. Methods consist of isolation of total RNA from biopsy samples, cDNA synthesis; qRT-PCR for mRNA levels determination of the enumerated parameters; preparation of biopsy extracts and ELISA assessment of them. We have also discussed the results, limitations, precautions, critical parameters and time consideration of the protocols.

СТАНДАРТИЗАЦИЯ НА МЕТОДИТЕ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА АВТОАНТИТЕЛА, ИЗПОЛЗВАНИ В РЕВМАТОЛОГИЯТА – ПРОБЛЕМИ И ПЕРСПЕКТИВИ

Марта Балева, Красимир Николов

УМБАЛ „Александровска“ – София, Клиника по клинична имунология

Доказването на серумни автоантитела в ревматологията е един от важните критерии за:

1. Постановяне на диагноза
2. Установяване на активността на болестта
3. Постигане на ремисия
4. Включването на различни органи и системи
5. Прогноза на болестта
6. Избор на подходящо лечение и профилактика.

Важността на всеки един от тези въпроси маркира и проблемите за адекватна стандартизация на всеки един от методите за тяхното определяне. Първоначално автоантителата са били изследвани в специализирани диагностични центрове, но с навлизането на мощните автоматизирани системи те все повече се диагностицират в рутинни лаборатории, което налага тяхното по-бързо изследване и преминаването от качествен към количествен начин за изразяване на резултата. Широкото изследване на автоантителата в голям брой лаборатории естествено доведе и до необходимостта от вътрешен и външен качествен контрол на получените данни, до анализ на чувствителността, специфичността и възпроизводимостта на методите и тяхната стандартизация.

1. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА АНТИНУКЛЕАРНИ АНТИТЕЛА (ANA)

През 1948 г. М. Hargraves [1] открива LE феномена. От тогава до сега благодарение на напредъка на имунобиологията, имунохимията, клетъчната и молекулярната биология и въвеждането високочувствителните имуофлуоресцентни, радиоимунологични и имуноензимни методи се установиха антитела към повече от 40 нуклеарни антигена.

Имуофлуоресцентен метод за определяне на антинуклеарните антитела е предложен за пръв път от Е. Holborow [2], като за субстрат е използван плъши черен дроб. Характерът на флуоресценцията може да бъде твърде различен и да се дължи на наличието в серума на антитела (антинуклеарен фактор – ANF), насочени към отделните съставки на ядрото:

- хомогенна – при наличие на антитела към DNA и хистони [3, 4];
- периферна или мембранна (ануларна) – дължаща се на присъствието на DNA антитела;

- пунктирана (speckled) – антители срещу екстрактируеми нуклеарни антигени;
- нуклеоларна – антители към RNA.

Освен плъши черен дроб [2, 4] се използват и други подложки – левкоцити [5, 6], ядра от миши черен дроб [7], кожна биопсия [8]. Като метод с най-висока чувствителност и специфичност се счита имунофлуоресцентният метод с използването на туморната линия HEp-2.

При изследването на големи групи здрави често тестът се позитивира в титри 1:20 – 1:40, а при 5% титърът е дори 1:80 [9], поради което повечето автори предлагат като положителни да се считат титрите над 1:40 [9, 10], дори 1:320 [11]. Подреждайки заболяванията, при които могат да се открият ANA, P. Barland и E. Lipstein [10] представят следната схема:

Титър 1:1280	СЛЕ ССТБ Лекарствено индуциран лупус
↑	РА, особено с извънставно засягане Склеродермия Хроничен автоимунен хепатит
↑	Синдром на Sjogren Миозит Злокачествени новообразувания, особено лимфом HIV
↑	Бактериален ендокардит Дискоиден лупус
Титър 1:40	Здрави жени, особено тези, получавали контрацептиви

Високата честота на ANA при болни от СЛЕ е потвърдена и от други автори [11, 12, 13]. Важно е да се отбележи, че те са един от основните серологични критерии за диагнозата на системния лупус според общоприетите критерии на Американската ревматологична асоциация [14, 15]. Честотата им при другите ревматологични заболявания е различна според различни изследвания: 40% – при ревматподен артрит (РА), 70% – при синдром на Sjogren, 90% – при болните от склеродермия, 25% – 29% – с дермато- и полимиозит [11].

През последните десетилетия традиционните имунофлуоресцентни методи за изследване на ANA все повече се заместват от тестове върху твърда основа с по-висока аналитична чувствителност, с възможност за автоматизация

и изследване на множество показатели [16, 17]. Поставя се въпросът доколко получените резултати с тези нови техники са сравними с данните за клинична специфичност и чувствителност, получени с исторически познатите ни тестове. Някои от тези нови и по-специфични методи имат различна или слаба асоциация на антителата с клиничните симптоми в сравнение с предходните тестове [18]. Използването на новите твърдофазови методики в редица лаборатории, без да е направена подходяща постмаркетингова или интерлабораторна валидация доведе до повишаване на фалшиво отрицателните резултати [21]. Важно заключение на Американския колеж по ревматология (ACR) е, че тези техники не са подходящи да заместят индиректните имуофлуоресцентни методи за определяне на ANA [21], тъй като повече от 35% от болните със СЛЕ не са диагностицирани с ANA ELISA или мултиплексен метод.

Индиректната имуофлуоресценция върху тъкани или HEp-2 клетки и досега се счита за златен стандарт при определяне на ANA [19]. При комбиниране на данните от анамнезата и физикалното изследване с този тест се идентифицират почти всички болни със СЛЕ (чувствителност 95%), но специфичността за СЛЕ е по-ниска (57%) в сравнение с резултатите за други автоимунни болести [20, 21].

2. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА АВТОАНТИТЕЛА

2.1. Аналитични принципи при стандартизацията на методите

2.1.1. Преаналитични изисквания – идентификация на пациента, параметри на вземане на серума, съхранение и транспортиране на серума, състояние на пациента (физиологични вариации, патологични състояния).

2.1.2. Аналитични изисквания – вариабилност на теста, характеристики на антигена, имобилизация на антигена, калибрация и стандартизация, детектираща система.

2.1.3. Постаналитични изисквания – начин на докладване на резултата, мерни единици, cutt-off (анализ на данните от здрави хора по пол и възраст, както и при патологични контроли, като инфекциозно болни, болни с парапротеинемия или хипергамаглобулинемия).

2.2. Методи за определяне на DNA антителата

Методите за определяне на DNA антителата отразяват възможностите на имунологията на всеки етап от нейното развитие. Първоначално се използват методите от т.нар. **първа генерация – хемаглутинационни и комплемент-свързващи**. Първото съобщение е на J. Lowlis през 1958 г. Използват се формализирани еритроцити. Най-често антителата се установяват при пациенти със СЛЕ, като намирането им корелира с активността на заболяването [22].

Освен еритроцити, за аглутинацията могат да се използват бентонитови частици, предварително натоварени с DNA [23]. Комплемент-свързващите методи показват подобна чувствителност на аглутинационните [24].

Методите от **втората генерация включват имунодифузията и електроимунодифузията** [24, 25, 26, 27]. Отбелязва се, че антителата са три вида: реагиращи само с денатурирана DNA; с нативна и денатурирана DNA, и само с нативна DNA (dsDNA). Впоследствие във всички тестове като антиген се използва само dsDNA

Третата генерация методи са високочувствителните имунофлуоресцентни, имуноензимни и радиоимунологични методи.

S. Cassals и сътр. предлагат spot – техниката върху желатинови плаки като специфичен тест за определяне на DNA антителата [5]. В желатиновия гел е включена DNA. След инкубиране на плаките от желатина с подходящо разреждане на серума реакцията се проявява с помощта на флуоресцентен античовешки глобулинов серум.

Следващата група флуоресцентни методи са тези, при които се използват различни паразити, кинетопластът на които съдържа нативна DNA, без наличие на хистони. Така напр. J. Thivolet и сътр. [28] използват *Trypanosoma gambiense*. По-късно A. Aarden и сътр. [29] предлагат вместо нея да се използва *Crithidia luciliae*, тъй като не е патогенна за човека, по-лесна е за култивиране, а кинетопластът ѝ е 6 пъти по-голям от този на трипанозомата. Сравнението между този имунофлуоресцентен тест и радиоимунологичния показват, че последният е по-чувствителен.

С помощта на имунофлуоресцентния тест върху *Crithidia luciliae*, T. Helve и сътр. [30] намират DNA антитела при 26% от пациентите със СЛЕ. По-често антителата се намират при лупус – нефрита.

Сравнявайки резултатите от имуноензимния метод и теста върху *Crithidia luciliae*, E. Eaton и сътр. [31] намират, че при 80% от болните с лупус имуноензимният метод е положителен, 58% са положителни по имунофлуоресцентния метод и 28% – по насрещна електрофореза. От серумите, изследвани по имуноензимния и по имунофлуоресцентния метод, 59% са положителни и по двата, 7% са отрицателни и по двата и 31% са положителни само по ензимния тест, 3% са негативни по ензимния метод и положителни по имунофлуоресцентния. 34% от лупусноболните са положителни по имуноензимния и насрещна електрофореза и 15% са негативни по двата метода, 29% са положителни само имуноензимния и 3% са положителни само по насрещна електрофореза.

При определянето на DNA антителата в серума чрез ELISA възникват редица въпроси: начин на обработка на твърдата фаза, необходимо количество на DNA за натоварване, използван антисерум, конюгиран с ензим, избор на субстрат, начин на изразяване на получения резултат. Някои автори [31, 32] смятат, че предварителната обработка на плаката с протамин сулфат, глутаров

алдехид, желатин, човешки серумен албумин, UV светлина води до повишаване на чувствителността на метода, но има и противоположни мнения [33].

Използвани са различни твърди фази: полистиренови епруветки [34, 35], полистиренови плаки [30, 33], плаки от поливинилхлорид.

Концентрацията на DNA за натоварване е също различна: 1 mg/ml [33, 36], 25 mg/ml [37]. Предпочитат се търговски препарати на DNA поради това, че са стандартизирани, като за елиминирането на DNA (денатурирана) от нативната трябва да се извърши филтриране през нитроцелулозен филтър.

Използват се главно конюгати с пероксидаза [35, 38] или алкална фосфатаза [30, 31, 37]. Първоначално има голямо многообразие по въпроса за начина на изразяване на резултатите: стандартна крива от различни разреждания на гама-глобулин, като се приемат екстинкциите над 0,15 за положителни [35], като данните се съпоставят със стандартната крива, получена от положителен серум с висок титър на DNA антителата; титър, по-висок от 1:500; положителни титри над 1: 500 [39]; резултатът се изразява като разлика между изследвания серум и контролата, в която вместо серум е поставена PBS [30]; отчетената екстинкция на 410 nm като съдържание на DNA антитела в серума [37]. Важно значение при определянето на DNA антителата има използваният буфер. Като най-подходящ се счита Трис буферът [40].

Радиоимунологичните методи са най-чувствителните от третата генерация методи. През 1969 г. за пръв път Т. Pincus и сътр. [41] използват този принцип за определяне на DNA антителата в серума на болни. Вариант на метода е т.нар. *Fag assay*, който е изключително специфичен тест, но е много дълъг, труден е за изпълнение и изисква използването на радиоактивни материали, което ограничава приложението му.

ANA и анти-dsDNA са един от важните имунологични критерии на ACR за поставяне на диагнозата лупус [18, 45].

2.3. Методи за доказване на антитела срещу екстрактируеми нуклеарни антигени (ENA)

През 60-те и 70-те години на миналия век се описва нова група антитела, насочени към екстрактируеми съставки на ядрото. Повечето от тях при изследване с имуофлуоресцентен метод върху различни материали дават т.нар. *speckled* флуоресценция [42, 44]. Първите от тях са антителата срещу Sm и RNP [42, 43, 44]. Sm антигенът е открит през 1965 г. [47], а RNP – през 1971 г. [48]. Sm антигенната детерминанта е асоциирана с полипептиди с м.т. 12–13 kDa. Анти-RNP антитялото разпознава детерминанта, присъстваща само на U1snRNP. Според Е. Tan [46] RNP антителата се намират при 30–40% от лупусно болните и в 95–100% от болните със ССТБ. Подобно е и становището на G. Sharp [43] – високите титри на RNP без Sm антителата са типични за ССТБ, а Sm със или без RNP антителата – за СЛЕ. Антителата срещу Sm са включени в диагностичните критерии на СЛЕ [18, 45].

На следващите таблици са представени изводите на Е. Тап [46] за процентното разпределение на антителата срещу Sm и RNP:

Таблица 1 Sm и RNP антитела

Антиген	Заболяване
Sm	SLE-при 25–30%, маркер на болестта
RNP	1. ССТБ – при 95% от болните във високи титри 2. СЛЕ, склеродермия, дискоиден лупус, синдром на Сьогрен – ниски титри и ниска честота

Първоначално използваните имунодифузионни, електроимунодифузионни и хемаглутинационни методи за определяне на антителата срещу тези антигени [49,50] по-късно се заменят от ELISA тестовете.

Анти-SS-A (Ro) и анти-SS-B (La) са следващите антитела, които също са включени в диагностичните критерии на лупуса [18, 45], но и в диагностичните критерии на синдрома на Сьогрен [51]. М.т. на SS-A [Ro] е 55 kDa, а на SS-B (La) – 45 kDa. Известно е, че при бременни лупусно болни анти- SS-A (Ro) могат да преминат през плацентарния кръвоток и да причинят различни увреждания на сърдечно-съдовата система на плода [3]. При болни със синдрома на Sjogren тези антитела обикновено се свързват с по-чести екстрагландуларни прояви, по-тежко изразена клинична картина и по-лоша прогноза на болестта [52, 53, 54, 55].

Методите за доказване на антителата към тези два антигена първоначално са имунодифузията и насрещната електрофореза, след което в практиката навлизат имуноензимните техники и имуноблотовете [56].

3. АНТИФОСФОЛИПИДНИ АНТИТЕЛА (APHL)

Антифосфолипидните антитела са свързани с диагнозата на т.нар. Антифосфолипиден синдром, главни клинични симптоми на който са спонтанните аборти, артериалните и венозни тромбози, аборти и тромбоцитопенията. След появата на първите публикации върху методите за определяне на антикардиолипиновите антитела (aCL) през 1983–1984 г. [57, 58] тези тестове широко се използват в практиката. През 1983 г. EN Harris и сътр. [57] публикуват радиоимунологичен метод за определяне на aCL. Огромното многообразие от варианти на ELISA методи, които се използват, наложи тяхната стандартизация през следващите години и в периода 1986–1998 г. се провеждат няколко научни конференции, посветени на този проблем [59, 60, 61, 62].

В края на 90-те години на миналия век в резултат на всички тези съвместни проучвания се налага мнението, че е важно практическото използване на определянето на aCL с ELISA методи при диагнозата на АФС и този тест е включен в лабораторните класификационни критерии на синдрома [63]. До

края на столетието [64] обаче няма официална стандартизация на тези методи от общопризната организация (WHO, IUIS, CDC). Редица автори подчертават факта, че в много случаи при изследването на едни и същи серуми в отделните лаборатории не се получават сравними резултати [65, 66, 67].

През 1998–1999 г. работна група под ръководството на А. Tincani [68] изследва серумите на 8 болни с АФС и 2 здрави в 24 лаборатории. Изработва се „consensus value“ и „consensus protocol“ въз основа на болшинството от получените резултати. Авторите на консенсусния протокол предлагат използването на следните параметри на теста: кардиолипин SIGMA C 1649, разреждане с етанол, преинкубация 1 нощ, използване на кладенчета, които не са натоварени, блокиращ буфер PBS с 10% FCS, избрани фирми за стриповете (NUNC 475094, Flow 717205, Greiner 655001, Costar 2595, Corning 25801), буфер за промиване, 3-кратно промиване, разреждане на пробата – 1:50, инкубация на пробата – 1–3 ч., антисеруми, белязани с фосфатаза, инкубация на антисерума – 45 мин. – 3 ч.

По време на IV европейски конгрес на Форума се правят следните препоръки към методите за определяне на антифосфолипидните антитела [69]: 1. Двукратно тестване на всеки серум; 2. Всяка лаборатория трябва да има своя собствена cut-off стойност, дори и в случаите на използване на комерсиални китове. Референтните стойности зависят от параметрите в съответната популация; 3. За определяне на cut-off да се използват персентили; 4. Да се извършва външен контрол на качеството. На следващия V европейски конгрес на Форума се препоръчва отново стриктният качествен контрол и използването на моноклоналните антитела (HCAL, EY2C9), за да се верифицират повторемостта на теста и междулабораторния контрол [70]. Като положителни се смятат стойностите над 40 ед., а тези под 40 ед. – като ниски [71].

През 1990 г. М. Galli и сътр. [72, 73], Н.Р. McNeil и сътр. [74] и Е. Matsuura и сътр. [75] едновременно и независимо един от друг установяват, че свързването на кардиолипина с aCL изисква кофактор, идентифициран като бета-2-гликопротеин I. След няколко години се доказва, че В-2-GPI антителата се установяват и при липса на други фосфолипиди и са свързани с тромботични състояния. Определянето на тези антитела има някои предимства пред това на aCL: те не се влияят от антителата, образувани след инфекциозни заболявания, които са насочени към кардиолипин, не се нуждаят от кофактор, антигенът, към който са насочени, е протеин, а не воднонерастворим фосфолипид, което може да е източник на вариабилност [76]. В рамките на European Forum on Antiphospholipid Antibodies Standardization Group се анализира интерлабораторната вариабилност в резултатите за тези антитела с участието на 21 центъра [77]. Препоръки на Форума са: двойното изследване на серуми, контроли и калибратори, изследване на голям брой здрави за определяне на горна референтна граница и cut-off, както и калкулиране на cut-off, кореспондираща на 95%, 97,5% или 99% от контролите, използването на хуманизирани моноклонални антитела за определяне на позитивните контроли и cut-off. Много от търговските китове за изразяване на резултати използват арбитражни единици, базирани на De Bari Standart

(Pharmacia, Freiburg), или стандарта на Harris (OrGenTec, Mainz). Подчертава се, че резултатът се влияе от плътността на покриващия антиген, начина на получаването му, замърсяването с фосфолипиди или протеини, йонната сила на буфера за разреждане [78].

На XIV International congress on antiphospholipid antibodies, който се проведе през 2013 г. в Рио де Жейро (79), се работи в следните няколко секции: хармонизация на тестовете за определяне на aCL и B-2-GPI антителата, лупусен антикоагулант, IgA aCL тестове, антитела срещу отрицателно заредени фосфолипиди и срещу фосфатидилетаноламин, антитела срещу протромбин и протромбин/фосфатидилсерин, тестове за антитела срещу домен I, антифосфолипидните антитела като рисков фактор.

На този форум са изработени поликлонални и моноклонални стандарти за определяне на антителата срещу B-2-GPI. Поликлоналният стандарт е създаден на базата на серумен пул от болни с доказан АФС и високи антитела. Отделя се фракция, пречистена чрез афинитетна хроматография, от която 1 UI е еквивалентна на свързването на 1 $\mu\text{g/ml}$ анти- B-2-GPI. IgG референтният материал съдържа 279 IgG UI анти-B-2-GPI, а IgM материала – 220,3 IgM UI анти-B-2-GPI. Този материал е тестван от няколко компании, произвеждащи китове за определяне на тези антитела. Резултатите са насърчаващи. По подобен начин е направена и оценката на моноклоналния IgG стандарт (клон HСAL-INOVA Diagnostics), който има работна концентрация 133 $\mu\text{g/ml}$ и показва добра корелация с поликлоналния стандарт. Сравнителните изследвания между отделните лаборатории с използването показват съпоставимост за IgG и IgM aCL и анти-B-2-GPI, но по-лоши резултати за IgA антителата. Препоръчва се cut-off да се изчислява като 99 перцентил на референтната група.

По проблема за антителата срещу негативно заредени фосфолипиди и етаноламин се достига до следните заключения [79]:

- Антителата срещу фосфатидил-инозитол (aPI) и фосфатидил-серин (aPS) идентифицират група пациентки с повтарящи се аборти
- Антифосфолипидните антитела (aPhL) са по-специфични от стандартните aCL, тъй като дискриминират по-добре АФС от не-АФС. aPhL трябва да се използват като потвърдителен тест
- Използването на aPhL като алтернатива на aCL се нуждае от повече доказателства
- Повечето от проучванията не потвърждават връзката между антителата срещу етаноламин (aPE) и тромбозата и акушерските проблеми. Все пак са необходими повече изследвания за затвърждаване на такова становище.

Групата достига до следните заключения по проблема aPT [79]:

- Има съществени различия между лабораториите, методите и техниките за изследване на тези антитела
- Повечето резултати са от ретроспективни изследвания
- Не е ясна ролята на тези антитела

- Резултатите се тълкуват различно от отделните автори.

По проблема aPS/aPT се достига до следните изводи [79]:

- Изследването на aPS/aPT може да потвърди наличието на тромбоза
- Изследването на aPS/aPT може да доведе до по-добра идентификация на болните с АФС
- aPS/aPT са независим рисков фактор за тромбоза
- Асоциацията между aPS/aPT и LA се нуждае от повече проучвания.

4. АНТИЦИТРУЛИНОВИ АНТИТЕЛА (АНТИ-ССР)

В периода 2000–2001 г. започва употребата на първата генерация ELISA методи за определяне на anti-citrullinated peptide/protein antibodies (ACPA) [80], като се използват пептиди, отделени от филагрин. Тестът се позитивира при 53% от болните с ревматоиден артрит (РА) и има специфичност 96%. През следващите години се разработват нови генерации на ELISA за определяне на anti-cyclic citrullinated peptides (анти-ССР антителата) [81] – ССР2 (със синтетични циклични цитрулинови пептиди, които са с по-висока специфичност за РА отколкото РФ), ССР3 и ССР3.1 (с използването на допълнителни епитопи). С използването на методи за определяне на ССР от втора генерация чувствителността се увеличава и достига 70%. АCPA са включени в критериите за диагноза на РА от 2010 г. [82]. Това налага допълнителна стандартизация на методите за определянето на тези антитела, включително и използването на международен стандарт на използваните антигени, за да се направи по-добро разграничение между високите и ниските стойности на антителата [83].

Според дефиницията на ARA/EULAR [82] когато резултатите от изследването на RF и/или ССР се изразяват в единици (IU), трябва да се съобразят следните три категории:

- Негативен резултат – стойност на показателя по-малка или равна на горната граница на нормалните стойности за лабораторията или използвания тест
- Ниско положителен резултат – по-висок от горната граница на нормата, но равен или по-малък от тази стойност, умножена по 3
- Високо положителен резултат – по-висок от трикратната стойност на горната граница на нормата.

Описани са и антитела срещу друг цитрулеинов протеин – мутиран цитрулеиниран виментин (anti-MCV). Чувствителността и специфичността на anti-MCV при ревматоидния артрит е съответно 82% и 96–98% и корелира с активността на болестта [84].

5. АНТИНЕУТРОФИЛНИ ЦИТОПЛАЗМЕНИ АНТИТЕЛА (ANCA)

През 1982 г. D.J. Davis и сътр. [85] доказват в серума на болни с огнищен некротизиращ гломерулонефрит антитела, които се свързват с неутрофилите на здрави хора. Три години по-късно F.J. van der Woude и сътр. [86] установяват в серума на болни с Вегенерова грануломатоза антитела, насочени към цитоплазмата на неутрофилите и моноцитите с характерен имунофлуоресцентен образ на грануларно светене. През 1987 г. C.O.S. Savage и сътр. [87] намират, че антинеутрофилните цитоплазмени антитела (ANCA) са характерни не само за Вегенеровата грануломатоза, но и за микроскопския полиартериит. С индиректен имунофлуоресцентен тест (IIF) се определят два вида ANCA: цитоплазмени (cANCA) – с характеристика на грануларно светене на цитоплазмата на неутрофилните клетки. Вторият вид са pANCA – с перинуклеарно светене. С IIF положителни cANCA се откриват при 80–95% от болните с Вегенерова грануломатоза. Според метаанализа на D.Vassilopoulos и G.S. Hoffman [88] чувствителността на този показател е 65%, а специфичността – 95–99%.

Установено е, че cANCA са насочени към 29 kDa серинова протеаза, намираща се в азурофилните гранули на неутрофилите. Именно тези антитела се установяват най-често при болни от Вегенерова грануломатоза. pANCA са насочени към миелопероксидаза. Миелопероксидазни антитела са описани при синдрома на Churg-Strauss и полиартеритис нодоза, както и при припокриващи синдроми, включващи тези заболявания [89].

Авторите на най-мащабното проучване върху ANCA, обхващащо 11 европейски центъра и 566 пациенти [90], с IIF метод доказват тези антитела при 16,4% от лупусно болните, като се установяват позитивни корелационни връзки със серозита, ливедото, венозните тромбози и артритата, но все още е неясна тяхната директна патогенетична роля за съдовите увреди при лупуса. През 1995 г. е направен първият „одит“ на значението на определянето на ANCA антителата в рутинната практика [91]. Заключениеето на авторите е, че тези антитела не могат да бъдат използвани като единствен скрининг тест при васкулитите, но трябва да се включат в една рационална схема на изследване. Интерпретацията на положителните резултати трябва да се съобрази с наличието и на други автоантитела, както и с клиничните симптоми, особено в случаите, когато те не са типични за васкулит. Девет години по-късно друг колектив [92] също подчертава, че определянето на ANCA не е най-подходящият скринингов тест за определяне на вида на системните васкулити. Това се потвърждава и от данните на трета група [93], според която 88% от 2734 изследвани серума са били положителни за ANCA, но нито един от тях не е имал системен васкулит. От друга страна, важно е да се отбележи и фактът, че при някои пациенти със сигурни клинични данни за васкулит, ANCA са били отрицателни [92].

ELISA методите широко се използват при определянето на ANCA. Добре дефинираните антигени – серинова протеаза и миелопероксидаза, определят добрите резултати, получавани от тези тестове.

6. МЕЖДУНАРОДНИ ПРОГРАМИ ЗА СТАНДАРТИЗАЦИЯ НА МЕТОДИТЕ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА АВТОАНТИТЕЛА

Първата подобна инициатива стартира през 80-те години на миналия век [18]. През 2002 г. стартира Европейската инициатива за стандартизация [94], която прави опит за хармонизиране на методите за изследване, включва клиницистите и изследователите, работещи в тези области. През 2009 г. започва работа European Group on Harmonization of Autoantibody Tests [95], която има задача да приготви нови референтни материали в сътрудничество с Института за референтни материали и измервания (IRMM) на изследователския център на Европейската комисия. Изключително много инициативи има по стандартизацията на антителата срещу фосфолипиди, дискутирани по-горе [68, 69, 77, 79].

ЛИТЕРАТУРА:

1. Hargraves M, Richmond M, Morton R. Presentation of two bone marrow elements: the „tart cell“ and the „LE“ cell. *Proc Mayo clinic* 1978; 23: 25–28.
2. Holborow EJ, Weir DM, Johnson GD. A serum factor in LE with affinity for tissue nuclei. *Br Med J* 1957; 2: 732–734.
3. Editorial: Antinuclear antibodies. *Lancet* 1984; 2 (8403): 611–613.
4. Talal N. Antibodies to nucleic acids. In: *Clinical immunology*, Ed F. Bach. 1976.
5. Cassals S. P., G. Friou, L. Myers. Significance of antibody to DNA in SLE. *Arthr Rheum*, 7, 1964, 4, 379–390.
6. Zweifler S, Martines V. Antinuclear factor and chronic articular inflammation. *Clin exp Immunol* 1971; 8 (2): 271–278.
7. Mach P, Piatrier D, Le-Go A et al. Hidden antinuclear antibodies in rheumatic diseases. *Clin exp Immunol* 1980; 39 (2): 538–543.
8. Well J. In vivo anti nuclear antibodies in epithelial in SLE and other connective tissue diseases. *Clin exp Immunol* 1980; 38 (3): 424–435.
9. Egner W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. *J Clin Pathol* 2000; 53: 424–432.
10. Barland P and Lipstein E. Detection and use of laboratory tests in the rheumatic diseases. *Am J Med* 1996; 100 (Supl 2A): 16S–23S.
11. Ward MM. Laboratory testing for rheumatic diseases. *Postgrad med* 1998; 103 (2): 93–103.
12. Cervera R, Khamashta MA, Font J et al. Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patherns of disease expression in a cohort of 1000 patients. *Medicine (Baltimore)*; 1993; 72: 113–24.
13. Moss KE, Yoannou Y, Sultan SM et al. Outcome of a cohort of 300 patients with systemic lupus erythematosus attending a dedicated clinic for over two decades. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 409–413.
14. Tan EM, Cohen AS, Fries JF. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthr Rheum* 1982; 25: 1276–1282.

15. Hochberg MC. Updating the American college of rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthr Rheum* 1997; 40:1725.
16. Fritzler MJ & Fritzler ML. The emergence of multiplexed technologies as diagnostic platforms in systemic autoimmune diseases. *Curr Med Chem* 2006; 13: 2503–2513.
17. Hanly JG, Su L, Parawell V, Fritzler ML. Comparison between multiplexed assays for autoantibody detection in systemic lupus erythematosus. *J Immunol Meth* 2010; 30: 75–80.
18. Meroni PL, Biggioggero M, Pierangeli SS, et al. Standardization of autoantibody testing: a paradigm for serology in rheumatic diseases. *Nature rev Rheumatology* 2014; 10: 35–43.
19. Wiik AS, Holer-Madsen M, Forslid J et al. Antinuclear antibodies: A contemporary nomenclature using HEp-2 cells. *J Autoimmun* 2010; 35: 276–290.
20. Solomon DH et al. Evidence-based guidelines for the use of immunologic testing: ANA. *Arthr Rheum* 2002; 47: 434–444.
21. Meroni PL & Schur PH. ANA screening: an old test with new recommendations. *Ann Rheum Dis* 2010; 69:1420–1422.
22. Jokinen EJ, Julkinen H. DNA hemagglutination test in the diagnosis of SLE. *Ann Rheum Dis* 1965; 24 (5): 477–480.
23. Borisovich J, Nasco J, Kayhoc D. DNA bentonite flocculation test for LE. *Proc Soc Exp Biol Med* 1960; 103 (3): 636–640.
24. Arana R., Seligman M. Antibodies to native and denaturated DNA in SLE. *J Clin Invest* 1967; 46 (11): 1867–1882.
25. Tan E, Schur P, Carr I et al. DNA and antibody to DNA in serum of patients with SLE. *J Clin Invest* 1966; 45 (11): 1732–1740.
26. Davis P., Pescy JS, Russel AS. Correlation between levels of DNA antibodies and clinical disease activity in SLE. *Ann Rheum Dis* 1977; 36 (2): 157–159.
27. Johnson G, Edmonds J, Holborow E. Precipitating antibody to DNA detected by two stage electroimmunodiffusion study in SLE and in RA. *Lancet* 1973; 2 (7834): 883–885.
28. Thivolet J, Monier JC, Lalain F et al. Recherche quantitativesimultsnee des anticorps antinuclaires totaux et anti-acide desoxyribomucleique sur grottie de sang de soursis parasites par Trypanosoma gambiense. *Ann Inst Pasteur* 1965 ; 189 (6): 817–830.
29. Aarden LA, de Groot ER, Feitkamp EE. Immunology of DNA. III Crithidia luciliae – a single substrate for the determination of anti dsDNA with the immunofluorescence technique. *Ann NY Acad Sci* 1957; 254: 505–514.
30. Helve T, Teppo A-M, Kurki P et al. Cicularing DNA antibodies in SLE. *Rheumatol Int* 1982; 2: 103–106.
31. Eaton RB, Schneider G, Schur PN. Enzyme immunoassay for antibodies to native DNA. *Arthr Rheum* 1983; 26 (1): 52–62.
32. Zouali M and Stollar BD. A rapid ELISA for measurement of antibodies to nucleic acid antigens using UV treated polystyrene microplates. *J Immunol Meth* 1986; 90 (1): 105–110.
33. Pisetsky DS and Peters DV. A simple enzyme linked immunosorbent assay for antibodies to DNA. *J Immunol Meth* 1981; 41 (2): 187–200.

34. Gripenberg M, Linder E, Kurki P et al. A solid phase enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for demonstration of antibodies against denaturated, single stranded DNA in patient sera. *Scand J Immunol* 1978; 7 (2): 151–157.
35. Pesce AJ, Mendoza N, Boreisha I et al. Use of enzyme linked antibodies to measure serum anti DNA antibody in systemic lupus erythematosus. *Clin Chem* 1974; 20 (3): 353–359.
36. Engvall E, Periman P. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). III Quantitation of specific antibody enzyme labeled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. *J Immunol* 1972; 109 (1): 129–135.
37. Klotz JL, Minani RM, Teplitz RL. An enzyme linked immunosorbent assay for antibodies to native and denaturated DNA. *J Immunol Meth* 1979; 29 (2): 155–165.
38. Miller TE, Lahita RG, Zarro VJ et al. Clinical significance of anti-double stranded DNA antibodies detected by solid phase enzyme immunoassay. *Arthr Rheum* 1981; 24 (4): 682–684.
39. Pateraki E, Kualamanis E, Kualamanis Ph et al. Detection of dsDNA antibodies by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Rheumatology* 1982; 12 (59/2): 119–123.
40. Pisetsky DS, Semper KF. Influence of assay conditions of ELISA determinations of anti-DNA antibodies. *J Immunol Meth* 1984; 74 (2): 217–227.
41. Pincus T, Schur PH, Rose JA. Measurement of serum DNA binding activity in SLE. *N Engl J Med* 1969; 289 (13): 701–705.
42. Tan E. et al. Relationship of nuclear staining patherns with precipitating antibodies in systemic lupus erythematosus. *J Lab Clin Med* 1967; 70 (5): 800–812.
43. Sharp G, Irwin ES, Tan EM et al. MCTD – an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). *Am J Med* 1972; 52 (2): 148–159.
44. Reyers PA, Tan E. Characterization and differentiation of the nuclear antigens with anti-nuclear antibodies giving speckled staining patherns. *Arthr Rheum* 1972; 15 (1): 120–121.
45. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthr Rheum* 1997; 40: 1725.
46. Tan E. Special antibodies for the study of SLE. An Analysis. *Arthr Rheum* 1982; 25 (7): 753–756.
47. Frenster JH Nuclear polyanions as de-repressor of synthesis of ribonucleic acid. *Nature* 1965; 206 (4985): 680–683.
48. Mathioli M and Rechlin M. Characterisation of a soluble nuclear antigen reactive with SLE sera. *J Immunol* 1971; 107 (5): 1281–1290.
49. Goudreau A, Amor B, Kahn MF et al. Clinical significance of antibodies to soluble extractable nuclear antigens (anti ENA). *Ann Rheum Dis* 1978; 37: 321–327.
50. Nakamura MN, Peebes EL, Tan EM. Microhemagglutination test for the detection of antibodies to nuclear antigens (Sm and RNP) in SLE and related diseases. *Am J Clin Pathol* 1978; 70 (808): 800–807.
51. Shiboski SC et al. American College of Rheumatology classification criteria for Sjögren’s syndrome: a data-driven, expert consensus approach in the Sjögren’s

- International Collaborative Clinical Alliance cohort. *Arthr Care Res* (Hoboken) 2012; 64, 475–487.
52. Ben-Chetrit, E. Anti Ro/La antibodies and their clinical association. *Isr J Med Sci* 1997; 33 (4): 251–253.
 53. Moutsopoulos HM, Zerva LV. Anti-Ro (SS-A)/La (SS-B) antibodies and Sjogren's syndrome. *Clin Rheumatol* 1990; 9 (Suppl.1): 123–130.
 54. Pease CT. et al. Serological and immunogenetic markers of extraglandular primary Sjogren's syndrome. *Br J Rheumatol* 1993; 32 (7): 574–577.
 55. Scofield RH et al. Fine specificity of the autoimmune response to Ro/SSA and La/SSB ribonucleoproteins. *Arthr Rheum* 1999; 42 (2): 199–209.
 56. Kumar Y, Bhatia A, Minz RW. Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: a journey revisited. *Diagnostic Pathology* 2009, 4:1 doi:10.1186/1746-1596-4-1.
 57. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML et al. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1983; 2: 1211–4.
 58. Koike T, Sueishi M, Funaki H et al. Antiphospholipid antibodies and biological false positive serological test for syphilis in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 1984; 56: 193–199.
 59. Harris EN, Ghavari AS, Patel S. Evaluation of the anti-cardiolipin antibody test: report of an international workshop held 4 april 1986. *Clin Exp Immunol*. 1987; 68 (1): 215–222.
 60. Harris EN. The second international anti-cardiolipin antibody standardization workshop. The Kingstone anti-phospholipid antibody study (KAPS) group. *Am J Clin Pathol* 1990; 94 (4): 476–484.
 61. Harris EN, Pierangeli SS, Birch D. Anticardiolipin wet workshop: VI international symposium on antiphospholipid antibodies. *Am J Clin Pathol* 1994; 101 (4): 616–624.
 62. Pierangeli SS, Stewart M, Silva LK, Harris EN. Report of an Anticardiolipin wet workshop during VII th international symposium on antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol* 1998; 25: 156–162.
 63. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthr Rheum* 1999; 42: 1309–11.
 64. Tincani A, Balestrieri G, Allegri F et al. Overview on anticardiolipin ELISA standardization. *J Autoimmunity* 2000; 15: 195–7.
 65. Coulam CB, McIntyre JA, Wagenknecht D, Rote N. Interlaboratory inconsistencies in detection of anticardiolipin antibodies. *Lancet* 1990; 335:865.
 66. Peaceman AM, Silver RK, Mac Gregor SN, Socol ML. Interlaboratory variation in antiphospholipid antibody testing. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166: 1780–1787.
 67. Reber G, Arvieux J, Comby E. Multicenter evaluation of nine kits for quantification of anticardiolipin antibodies. *Thromb Haemost* 1995; 52: 444–452.
 68. Tincani A, Allegri F, Sanmarco M et al. Anticardiolipin antibody assay: a methodological analysis for better consensus in routine determinations. A cooperative project of the European antiphospholipid forum. *Thromb Haemost* 2001; 86: 575–583.
 69. Tincani A, Allegri F, Balestrieri G et al. Minimal requirement for antiphospholipid

- antibodies ELISAs proposed by the European Forum on antiphospholipid antibodies. *Thromb Res* 2004; 114: 553–558.
70. Cervera R, Font J, Tincani A, Boffa MC. V Meeting of the European Forum on antiphospholipid antibodies. *Autoimmunity Res* 2006; 5: 499–507.
 71. Miyakis S, Lockshin M, Atsumi T et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *J Thrombosis Haemost* 2006; 4: 295–306.
 72. Galli M, Comfurius P, Maassen C et al. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to plasma protein cofactor. *Lancet* 1990; 335: 1544–7.
 73. Bevers EM, Galli M. Beta2-glycoprotein I for binding of antibodies to cardiolipin. *Lancet* 1990; 336: 952–953.
 74. McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: β_2 -glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87:4120–4124.
 75. Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M et al. Anticardiolipin cofactor (s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet* 1990; 336: 177–178. Letter.
 76. Arvieux J, Roussel B, Jacob MC, Colomb MG. Measurement of anti-phospholipid antibodies by ELISA using β_2 glycoprotein I as an antigen. *J Immunol Meth* 1991; 143: 223–9.
 77. Reber G, Schousboe I, Tincani A, et al. Inter-laboratory variability of anti- β_2 glycoprotein I measurement. *Thromb Haemost* 2002; 88:66–73.
 78. Tincani A, Filippini M, Scarsi M et al. European attempts for the standartization of the antiphospholipid antibodies. *Lupus* 2009; 18: 913–919.
 79. Bertolaccini ML, Amengual O, Andreoli L et al. 14th congress on antiphospholipid antibodies task force. Report on antiphospholipid syndrome laboratory diagnostics and trends. *Autoimmunity Rev* 2014; <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2014.05.01>.
 80. Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 2000; 43:155–63.
 81. Aggarwal R, Liao K, Nair R et al. Anti-Citrullinated Peptide Antibody Assays and Their Role in the Diagnosis of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatism (Arthritis Care & Research)*. 2009; 61 (11): 1472–1483.
 82. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* 2010; 69 (9): 1580–8.
 83. van Venrooij WJ, van Beers JJBC & Pruijn GJM. Anti-CCP antibodies: the past, the present and the future. *Nature Reviews Rheumatology* 2011; 7: 391–398.
 84. Bang H, Egerer K, Gauliard A, et al. Mutation and citrullination modifies vimentin to a novel autoantigen for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007; 56 (8): 2503–11.
 85. Davis DJ et al. Segmental necrotising glomerulonephritis with antineutrophil antibody: possible arbovirus aetiology? *BMJ* 1982; 285: 606.
 86. Van der Woude FJ et al. Autoantibodies against antineutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1985; 1: 425–429.

87. Savage COS. et al. Prospective study of radioimmunoassay for antibodies against neutrophil cytoplasm in diagnosis of systemic vasculitis. *Lancet* 1987; 1: 1398–1393.
88. Vassilopoulos D and Hoffman GS. Clinical utility of testing for antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6 (5): 645–651.
89. Kallenberg GGM, Mulder AHL, Cohen-Travaert JW. Antineutrophil cytoplasmic antibodies: a still growing class of autoantibodies in inflammatory disorders. *Am J Med* 1992; 93: 675–682.
90. Galeazzi M., G Morozzi, GD Sebastiani et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in 566 European patients with systemic lupus erythematosus: prevalence, clinical associations and correlation with other autoantibodies. European concerted action on the immunogenetics of SLE. *Clin Exp Rheumatol* 1998; 16 (5): 541–546.
91. Edgar JDM, McMillan SA, IN Bruce, Conlan SK. An audit of ANCA in routine clinical practice. *Postgrad Med J* 1995; 71: 605–612.
92. Sinclair D, Saas M, Stevens JM. The effect of a symptom related „gating policy“ on ANCA request in routine clinical practice. *J Clin Pathol* 2004; 57: 131–134.
93. Mc Laren JS, Stimson RH, McRorie ER et al. The diagnostic value of anti-neutrophil cytoplasmic antibody testing in a routine clinical setting. *QJM* 2001; 94: 615–621.
94. European Autoimmunity Standardization Initiative.EASI Network (on line). <http://www.easi-network.com> (2013).
95. Harmonization of Autoantibody Tests (WG-HAT). International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (on line). <http://www.ifcc.org/ifcc-scientific-division/sc-working-groups/harmonization-of-autoantibody-tests-wg-hat> (2013).

СТАНДАРТИЗАЦИЯ НА МЕТОДИТЕ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА АВТОАНТИТЕЛА, ИЗПОЛЗВАНИ В РЕВМАТОЛОГИЯТА – ПРОБЛЕМИ И ПЕРСПЕКТИВИ

Марта Балева, Красимир Николов

УМБАЛ „Александровска“ – София, Клиника по клинична имунология

Доказването на серумни автоантитела в ревматологията е един от важните критерии за: 1. Постановяване на диагноза; 2. Установяване на активността на болестта; 3. Постигане на ремисия; 4. Включването на различни органи и системи; 5. Прогноза на болестта; 6. Избор на подходящо лечение и профилактика. В обзора се дискутират възможностите за унифициране на методите за определяне на автоантителата, проблемите на вътрешния и външен качествен контрол. Анализират се данните за чувствителността и специфичността на методите и тяхната стандартизация.

Ключови думи: автоантитела, стандартизация.

STANDARTIZATION OF THE METHODS FOR AUTOANTIBODY
DETERMINATION IN RHEUMATOLOGY – PROBLEMS
AND PERSPECTIVES

Marta Baleva, Krasimir Nikolov

University Hospital „Alexandrovska“ – Sofia, Department of Clinical Immunology

The determination of the serum autoantibodies in rheumatology is one of the important criteria for: 1. Diagnosis of the disease; 2. Activity of the disease; 3. Remission; 4. Including of different organs and systems; 5. Prognosis; 6. Treatment and prophylaxis. In this review the possibilities for the unifications of the methods for autoantibody determination, problems of intra – and inter – laboratory quality control are discussed. The data of sensitivity and specificity of the test and there standartization are analyzed.

Keywords: autoantibodies, standartization.

**ГОДИШНИК
на БАКИ
2014**

Българска
Първо издание

Книгоиздател ПАВЕЛ СЛАВЯНСКИ
Предпечат МАРИАНА ХРИСТОВА
Коректор СТЕЛА ЗИДАРОВА

Формат 70/100/16
Печатни коли 5,5

© Издателство „Лице“, 2015
e-mail: litse@abv.bg
0888 56 54 39

ISSN 1313-47-52