



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“-ВАРНА
ФАКУЛТЕТ ПО МЕДИЦИНА
КАТЕДРА ПО ПРОПЕДЕВТИКА НА ВЪТРЕШНИТЕ БОЛЕСТИ**

Д-р Мария Благоева Костуркова

**Честота и клинично-имунологични корелации
на някои C1q-SNPs при пациенти с РА и СЛЕ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

за присъждане на образователна и научна степен „доктор“

Специалност: „Вътрешни болести“

Научен ръководител:

Доц. д-р Таня Кирилова Шивачева, д.м.

Доц. Мария Атанасова Раданова, д.б.

Официални рецензенти:

Проф. д-р Златимир Коларов, дмн

Проф. д-р Христо Цеков, дмн

Варна
2022

Дисертационният труд съдържа 202 страници, онагледен е с 31 таблици и 88 фигури. Книгописът включва 440 заглавия, 5 от които на кирилица и 435 на латиница.

Докторантът е лекар-специалист по ревматология и асистент към Катедра по пропедевтика на вътрешните болести, Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна.

Дисертационният труд е обсъден, приет и насочен към защита пред научно жури от разширен катедрен съвет на Катедрата по пропедевтика на вътрешните болести на Медицински университет „Проф. Д-р Параскев Стоянов“ – Варна с протокол №2022 г.

Председател: доц. д-р Цветослав Георгиев, дм

Членове: проф. Златимир Коларов, дмн
проф. Христо Цеков, дмн
доц. Кирил Яблански, дм
доц. Мария Раданова, дб

Резервни членове: доц. Цветанка Петранова, дм
доц. Мария Димова - Милева, дм

Защитата на дисертационния труд ще се състои на
От..... часа на онлайн-заседание на научното жури
Материалите по защитата са публикувани на интернет страницата на медицински университет „Проф. Д-р Параскев Стоянов“ – Варна на адрес: www.mu-varna.bg

СЪДЪРЖАНИЕ

I. ВЪВЕДЕНИЕ	7
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	10
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	12
1. ОБЕКТ И ДИЗАЙН НА ПРОУЧВАНЕТО.....	12
2.. МЕТОДИ	14
2.1. Социо-демографски и клинични показатели при пациентите с РА	14
2.2. Социо-демографски и клинични показатели при пациентите със СЛЕ	15
2.3. Стандартни лабораторни изследвания.....	15
2.4. Стандартни имунологични изследвания.....	16
2.4.1. Стандартни имунологични изследвания при пациентите с РА	16
2.4.2. Стандартни имунологични изследвания при пациентите със СЛЕ.....	16
2.5. Хистоморфологични изследвания.....	16
2.6. Изследване на C1q	17
2.7. Генетични изследвания – идентификация на SNPs	17
2.7.1. Изолиране на геномна ДНК	17
2.7.2. SNP анализ.....	17
2.8. Статистически методи за обработка на резултатите...	18
2.8.1. Анализ на наличието на асоциация със заболяване при случай/контрола дизайн	18

2.8.2. Методи за оценка на неравновесната връзка и хаплотипно конструиране	20
2.8.3. Табличен и графичен метод за представяне на резултатите	21
IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	22
1. БАЗОВИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА УЧАСТНИЦИТЕ В ПРОУЧВАНЕТО	22
1.1. Пациенти с РА	22
1.2. Пациенти със СЛЕ	26
1.3. Контролна група здрави индивиди	36
2. АЛЕЛНИ И ГЕНОТИПНИ ЧЕСТОТИ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ SNPs.....	37
2.1. Съответствие на алелното и генотипното разпределение на изследваните SNPs със закона на Харди-Вайнберг	37
2.2. Алелни и генотипни честоти на изследваните индивиди в сравнение с наличните данни за други кохорти	38
2.3. Алелни и генотипни честоти и асоциация с РА	38
2.4. Алелни и генотипни честоти и асоциация със СЛЕ.	43
2.5. Алелни и генотипни честоти, демонстриращи разлика между РА и СЛЕ	46
3. НИВА НА С1Q ПРИ ИЗСЛЕДВАНИТЕ ИНДИВИДИ.....	47
3.1. Нива на С1q у пациентите с РА	47
3.1.1. Плазмени нива на С1q и клинични, лабораторни и имунологични характеристики на болните с РА.....	48

3.1.2. Плазмени нива на C1q и провеждана терапия при РА ...	48
3.2. Нива на C1q у пациентите със СЛЕ	48
3.2.1. Плазмени нива на C1q и клинични характеристики на СЛЕ	48
3.2.2. Плазмените нива на C1q и лабораторни характеристики на СЛЕ	50
3.2.3. Плазмени нива на C1q и имунологични характеристики на СЛЕ	50
3.2.4. Плазмени нива на C1q и провеждана терапия при пациентите със СЛЕ	52
3.2.5. Хистопатологични характеристики на ЛН.....	52
3.3. Нива на C1q в контролната група здрави доброволци	52
3.4. Сравнение на плазмените нива на C1q между болните с РА и контролната група здрави доброволци.....	52
3.5. Сравнение на плазмените нива на C1q между болните със СЛЕ и контролната група здрави доброволци.....	53
3.6. Сравнение на плазмените нива на C1q между болните с РА и болните със СЛЕ	54
4. ГЕНОТИПНИ ЧЕСТОТНИ РАЗПРЕДЕЛЕНИЯ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ SNPs И НИВА НА C1Q	54
4.1. Пациенти с РА	54
4.1.1. rs665691	55
4.1.2. rs682658	55
4.1.3. rs294179	56
4.1.4. rs172378 и rs292001	57

4.2. Пациенти със СЛЕ	57
4.3. Контролна група здрави индивиди	57
5. АЛЕЛНИ И ГЕНОТИПНИ ЧЕСТОТНИ РАЗПРЕДЕЛЕНИЯ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ SNP И РА	57
5.1. Алелни и генотипни честотни разпределения на изследваните SNPs и демографски характеристики на пациентите с РА	57
5.2. Алелни и генотипни честотни разпределения на изследваните SNPs и клинични характеристики на пациентите с РА	57
5.3. Алелни и генотипни честотни разпределения на изследваните SNPs и лабораторни и имунологични характеристики на пациентите с РА	58
5.3.1. rs665691	58
5.3.2. rs294179	60
5.3.3. rs682658, rs172378 и rs292001	60
6. АЛЕЛНИ И ГЕНОТИПНИ ЧЕСТОТНИ РАЗПРЕДЕЛЕНИЯ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ SNPs И СЛЕ	62
6.1. Алелни и генотипни честотни разпределения на изследваните SNPs и демографски характеристики на пациентите със СЛЕ	62
6.1.1. rs665691	62
6.1.2. rs682658	63
6.1.3. rs292001	64
6.2. Клинични характеристики	65
6.2.1. Възраст на дебют	65

6.2.2. Клинични форми	67
6.2.2.1. Бъбречно ангажиране	67
6.2.2.2. Ставна, кожна, хематологична, неврологична форма и серозит.....	68
6.3. Лабораторни характеристики	68
6.3.1. Креатинин.....	69
6.4. Имунологични характеристики.....	71
6.4.1. Антитела срещу двойноверижна ДНК.....	71
6.4.2. Фактори на комплемента.....	72
6.5. Хистоморфологични характеристики на подгрупата пациенти с ЛН.....	73
7. НЕРАВНОВЕСНА ВРЪЗКА, ХАПЛОТИПЕН АНАЛИЗ.....	75
7.1. Неравновесна връзка между подобрите SNPs в изследваната кохорта.....	75
7.2. Хаплотипен анализ на всички изследвани индивиди.....	80
7.3. Анализ на хаплотипните асоциации с РА.....	81
7.4. Хаплотипен анализ и асоциация със СЛЕ.....	82
7.4.1. С-G-G-T.....	82
7.4.2. G-A-T-C.....	83
7.4.3. С-G-T-C.....	83
V. ОГРАНИЧЕНИЯ НА ПРОУЧВАНЕТО, ОЧЕРТАВАЩИ ПЕРСПЕКТИВИ ЗА БЪДЕЩИ ИЗСЛЕДВАНИЯ.....	85
VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	87
VII. ОБОБЩЕНИ ОСНОВНИ ИЗВОДИ	89

VIII. ПРИНОСИ	93
IX. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	96

I. ВЪВЕДЕНИЕ

През последните десетилетия честотата на автоимунните заболявания стабилно се повишава (Lohi, 2007). Ревматоидният артрит (РА) и системният лупус еритематодес (СЛЕ) са едни от знаковите в тази група заболявания, засягащи предимно хора в активна възраст и са извор на болестност, инвалидизация, влошено качество на живот и не на последно място – по-ранна смъртност. И при двете етиологията е комплексна, мултифакторна, а патогенезата – ненапълно изяснена. Понастоящем е прието, че множество гени в организма взаимодействат с хормонални, инфекциозни и различни фактори на средата, увеличавайки риска от заболяване. Такива заболявания се наричат още мултифакторни или полигенни. За тях е характерно, че различни гени могат да допринесат за предразположението към болест като индивидуалния риск на всеки от тях е сравнително малък. Когато се унаследят достатъчно рискови алели или гени се надхвърля т.нар. „праг на генетично предразположение“ и може да се развие заболяване.

Идентифицирането на рискови гени и алели е важно за оценка на генетичното предразположение, както и за откриването на генетични разлики между болните от едно и също заболяване с различно клинично протичане или терапевтичен отговор.

Една от стратегиите за откриване на такива гени е изследването на единични нуклеотидни полиморфизми (SNPs) в гените и анализирането на техните асоциации. SNPs представляват унаследяема замяна на една нуклеотидна база във ДНК веригата. Те са широко разпространени – повече от 10 милиона, стабилни и пръснати из целия геном (Frazer KA, 2007). Често нямат никаква фенотипна изява и не са нито задължителни, нито достатъчни, за да се развие болест, но в някои случаи могат да се свържат с предразположение към заболяване, или с по-добър/по-лош отговор на лечение. Могат

да бъдат маркер на ген, повишаващ болестния риск. Една от стратегиите за откриване на такива свързани със заболяване SNPs са т. нар. болест-асоциирани проучвания (disease-association studies), обичайно със „случай/контрола“ дизайн.

От особено интерес при автоимунните състояния са гените, контролиращи имунния отговор. Според една от хипотезите имунната реакция към собствените антигени води до клетъчна смърт, а самите автоимунни заболявания са резултат от нарушения в процесите на имунологично тихата апоптоза и генериране на „сигнали за опасност“ (т.нар. danger model) (Matzinger, 2002).

Много важен регулатор на апоптозата и имунологичния толеранс, както и своеобразен мост между адаптивния и вродения имунитет, е системата на комплемента и в частност C1q компонента на класическия ѝ път. Те играят двойствена роля в патогенезата на СЛЕ и РА като от една страна намаляват риска от автоимунна реакция, а C1q подтилка автоантитялогенезата и улеснява имунологично „тихото“ отстраняване на апоптотични и увредени клетки, както и на имунни комплекси. От друга страна, активираният комплемент директно индуцира цитотоксична увреда в тъканите, подпомага възпалителния процес като привлича левкоцити и индуцира производство на проинфламаторни цитокини.

След задълбочен обзор на литературата се оформиха следните изводи:

1. Автоимунните заболявания (в това число СЛЕ и РА) са многофакторни по своята природа, полигенно обусловени и тясно свързани с регулацията на имунния отговор.

2. Системата на комплемента и в частност C1q компонента ѝ са от изключителна важност за имунологичната толерантност и патогенезата на авотимунните заболявания.

3. Проучванията на генетичните асоциации и предразположения на СЛЕ и РА с локуси в гените, кодиращи C1q, са малко и противоречиви.

Тези изводи залегнаха в основата на асоциативно проучване от типа случай-контрола на някои избрани SNP в генния клъстер на C1q с РА и СЛЕ, което би спомогнало за откриването на нови диагностични и прогностични маркери, както и за разграничаване на генотипно и фенотипно (а дори и патогенетично) обособени групи в рамките на заболяванията. Чисто практически това би дало възможност за индивидуализиране на терапевтичния подход и мониториране, а научно-теоретично би допринесло за разкриването на полиморфната природа на авотимунните заболявания, давайки нови насоки за научни търсения.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата дисертация е изследване на българска кохорта болни от РА и СЛЕ и контролна група здрави индивиди за наличие на пет единични нуклеотидни полиморфизма (rs665691, rs682658, rs172378, rs294179 и rs292001) в гените за С1q, анализ на асоциациите им с плазмените нива на С1q и с характерните за двете заболявания клинично-имунологични прояви.

За изпълнението на така поставената цел си поставихме следните **изследователски задачи**:

1. Да се конструира и характеризира детайлно българска кохорта болни от РА и СЛЕ и да се подбере и характеризира контролна група здрави индивиди, сходни по демографски показатели с болните.
2. Да се изследват пет единични нуклеотидни полиморфизма в гените за С1q: rs665691, rs292001; rs172378, rs682658, rs294179 и да се потърсят асоциации с РА и СЛЕ.
3. Да се определят нива на С1q при болни и здрави доброволци. Да се сравнят изследваните групи по този показател и да се потърсят евентуални корелации с останалите характеристики на изследваните индивиди.
4. Да се потърсят асоциации между изследваните полиморфизми и нивата на С1q у изследваните индивиди.
5. Да се изследва връзката между избраните полиморфизми и лабораторни, имунологични, клинични и демографски характеристики при болни от РА.
6. Да се изследва връзката между избраните полиморфизми и лабораторни, имунологични,

клинични и демографски характеристики при болни от СЛЕ.

7. Да се оцени неравновесната връзка между изследваните полиморфизми, да се осъществи хаплотипна реконструкция и да се оценят асоциациите на различните хаплотипове с РА и СЛЕ, с нивата на С1q и останалите характеристики на изследваните индивиди.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. ОБЕКТ И ДИЗАЙН НА ПРОУЧВАНЕТО

Дизайн – едномоментно крос-секционно проучване от типа случай/контрола.

В проучването са включени 111 пациента над 18 годишна възраст (от които 58 с РА и 53 пациенти със СЛЕ) и контролна група от 67 здрави доброволци. Участниците са набирани при хоспитализирането им в УМБАЛ „Св. Марина“ - Варна (Клиника по ревматология и Клиника по вътрешни болести) и в Клиника по нефрология на УМБАЛ „Царица Йоанна - ИСУЛ“ – София. След получаване на положителна оценка от КЕНИ към МУ-Варна с протоколи №73/29.03.2018г и №9/23.07.2009г, пациентите и контролната група здрави доброволци са подробно информирани за целите и методологията на планираното проучване, за евентуалните неудобства при включване (травматично изживяване при взимане на кръв, допълнително време за провеждане на клиничен преглед, разговор и предоставяне на наличната медицинска документация) и подписват собственоръчно декларации за информиране съгласие.

Критерии за включване на пациентите в проучването

- Пациенти на възраст над 18г;
- Пациенти с поставени диагноза РА или СЛЕ според класификационните критерии на ACR, съответно за РА от 1987г и за СЛЕ – 1982г, ревизирани 1997г;
- Ало- и автопсихично ориентирани пациенти, способни да прочетат, разберат и подпишат собственоръчно формуляра за информирано съгласие;
- Пациенти, изявили желание за участие в проучването и в последствие собственоръчно подписали формуляр за информирано съгласие.

Исключващи критерии за пациентите

- Пациенти, ненавършили 18г възраст;

- Пациенти без поставена диагноза РА или СЛЕ по гореспоменатите класификационни критерии или такива с неясна или спорна диагноза;

- Пациенти с клинично и/или имунологично припокриване между РА и СЛЕ;

- Неграмотни, ало- и автопсихично дезориентирани, неспособни да прочетат, разберат и подпишат собственоръчно информираното съгласие;

- Пациенти с диагностицирано преди < 5г злокачествено заболяване, нелекувано или активно към момента на включване в проучването.

На всички участници е взета еднократно кръв за анализ на единичните нуклеотидни полиморфизми в С1q генния клъстер, както и за изследване на нивата на С1q, центрофугирана е и отделената кръвна плазма е съхранявана на -20°С до изследването ѝ. Медицинската документация на всички болни е подробно прегледана като са събрани клиничните, лабораторни и имунологични данни, използвани в анализите.

Контролна група здрави доброволци

Контролната група здрави доброволци се състои от 67 клинично здрави индивида, без анамнестични данни за автоимунни заболявания.

Критерии за включване на здрави доброволци в проучването

- Лица навършили 18г възраст;

- Лица без придружаващи автоимунни заболявания;

- Грамотни, ало- и автопсихично ориентирани индивиди, способни да прочетат, разберат и собственоръчно да подпишат формуляр за информирано съгласие;

- Лица без диагностицирани преди <5г злокачествени заболявания, нелекувани или активни в момента на включването в проучването;

- Лица, изявили желание за участие в проучването и подписали собственоръчно формуляр за информирано съгласие.

Изключващи критерии за здрави доброволци

- Лица, ненавършили 18г възраст;
- Лица с диагностицирани автоимунни или злокачествени заболявания;
- Неграмотни лица и/или ало- и автопсихично дезориентирани и неспособни да прочетат, разберат и собственоръчно да подпишат формуляр за информирано съгласие;
- Лица, изявили несъгласие за участие в проучването.

2. МЕТОДИ

2.1. Социо-демографски и клинични показатели при пациентите с РА

В групата пациенти с РА подробно е събрана и анализирана информация за:

- пол
- възраст
- давност на заболяването
- възраст на дебют
- провеждано в лечение към момента на включване в проучването
- недостатъчен ефект от лечението с ксБПАРС (конвенционални синтетични болестопроменящи антиревматични средства)
- тютюнопушене
- наличие на ерозии
- рентгенов стадий.

Наличието на ерозии бе преценено на стандартна РА (postero-anterior) рентгенография на китки, длани и пръсти, рутинно осъществявана при всеки пациент при

хоспитализацията му или налична в медицинската документация и болничната база данни. На същите рентгенографии бе определен и рентгеновия стадий на РА по Steinbrocker.

Ефекта от лечението с ксБПАРС бе преценяван от лекуващия всеки конкретен пациент екип и всеки пациент, вече провеждащ биологично лечение или насочен за започване на такова, бе класифициран в групата болни с недостатъчен ефект от лечението с ксБПАРС.

2.2. Социо-демографски и клинични показатели при пациентите със СЛЕ

В групата пациенти със СЛЕ подробно е събрана и анализирана информация за:

- пол
- възраст
- давност на заболяването
- възраст на дебют
- провеждано в лечение към момента на включване в проучването
- клинични форми на СЛЕ
- индекс за активност на СЛЕ BILAG (British Isles Lupus Assessment Group)
- индекс за увреда SLICC/ACR damage index (Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index).

2.3. Стандартни лабораторни изследвания

При всички пациенти се събра информация за направените при хоспитализацията и съответно преди включването в проучването стандартни лабораторни изследвания – острофазови показатели (СУЕ, CRP). При пациентите със СЛЕ допълнително се оцениха кръвна картина, общ белтък, албумин, креатинин; изчисли се скоростта на гломерулната филтрация (eGFR), събраха се данни за

протеинурия и уринен седимент за оценка на активността на ЛН.

2.4. Стандартни имунологични изследвания

2.4.1. Стандартни имунологични изследвания при пациентите с РА

При пациентите с РА стойността на ревматоидния фактор е определяна рутинно при постъпване в болницата по стандартната за лабораторията методика – латекс аглутинация в IU/ml. Същото важи и за стойностите на АСРА, който се измерват с ELISA тест за количествено определяне на hs anti-CCP2. Горна граница на нормата за RF е 12 IU/ml, а за АСРА – 20 IU/ml.

2.4.2. Стандартни имунологични изследвания при пациентите със СЛЕ

При пациентите със СЛЕ са изследвани по преценка на лекуващия екип антинуклеарни антитела (ANA), антитела срещу двойноверижната ДНК (anti-dsDNA), срещу екстрахируеми нуклеарни антигени (ENA), антифолсфолипидни антитела и С3 и С4 фракции на комплемента при приемането им в болница. Тъй като болните са набирани в два центъра и съответно стандартните имунологични изследвания са осъществявани в две различни имунологични лаборатории - Лаборатория по клинична имунология на УМБАЛ – Св. Марина и Централна имунологична лаборатория на Клиниката по клинична лаборатория на УМБАЛ „Александровска“, при анализите на имунологичните характеристики на пациентите със СЛЕ ние ги разглеждаме единствено като бинарни променливи, без да взимаме предвид титрите/стойностите им.

2.5. Хистоморфологични изследвания

Всички хистоморфологични изследвания са осъществени на материал от пункционни бъбречни биопсии в Отделение по Патологична анатомия на УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ” и Имуноморфологична лаборатория на Катедра по патологична

анатомия на Медицински университет, гр. София. Диагнозата ЛН е поставяна на базата на минимум 6 гломерула, изследвани в хистологичния материал. За определяне на хистологичните промени и класа на ЛН са използвани критериите на International Society of Nephrology (ISN) и Renal Pathology Society (RPS).

Освен стандартната хистологична класификация на ЛН са изчислени и индексите за активност и хроничност според широко прилаганата схема на National Institute of Health (НИ), базирана на проучванията на Austin и Muenz.

2.6. Изследване на C1q

ELISA за определяне нивото на C1q в плазмата на изследваните здрави доброволци и пациенти е проведен в Лабораторията по нутригеномика, функционални храни и нутрацевтици при Катедрата по биохимия, молекулна медицина и нутригеномика, МУ – Варна като е използван human C1q platinum Elisa (eBioscience Affymetrix, eBioscience, UK) кит. Като референтни стойности на C1q са зададени 59 - 178 µg/ml.

2.7. Генетични изследвания – идентификация на SNPs

2.7.1. Изолиране на геномна ДНК

Изолира се геномна ДНК от 200 µл плазма с помощта на DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany; Cat. No./ID: 69504) според инструкциите на производителя.

2.7.2. SNP анализ

Чрез TaqMan SNP анализ (TaqMan® Assays SNP Genotyping, ThermoFisher Scientific) на Real Time PCR System7500 бе извършен SNP анализ за наличие на петте полиморфизма в гените за C1q (rs665691, rs682658, rs172378, rs294179 и rs292001). Реакциите са проведени в 10 µl обем с помощта на амплификационен протокол за 50°C за 2 мин, 95°C за 10 мин, последвани от 40 цикъла на 95°C за 15 сек, след което 60°C за 1 мин. Опитите са проведени в Лабораторията по

нутригеномика, Катедра по биохимия, молекулна медицина и нутригеномика, МУ – Варна.

2.8 Статистически методи за обработка на резултатите

Статистическата обработка на получените резултати бе извършена със следните софтуерни пакети: GraphPad Prism 9.2.0, SPSS, Excel, SNPStats (<https://www.snpstats.net/>) и Naploview 4.2. Предварително е заложено ниво на статистическа значимост $p < 0.05$.

Проведен е вариационен анализ на количествените променливи – средна стойност, стандартно отклонение (SD) за показателите с нормално разпределение и медиана с минимална и максимална стойност за показателите с разпределение, различно от нормалното.

Променливите с нормално разпределение на стойностите са анализирани с параметрични тестове (Т-тест за съпоставка на данните за две независими групи, еднофакторен дисперсионен анализ, корелационен анализ на Pearson), а тези, при които разпределението е различно от Гаусовото – с непараметрични (тест на Mann-Whitney, корелационен анализ на Spearman, Тест на Kruskal-Wallis).

2.8.1. Анализ на наличието на асоциация със заболяване при случай/контрола дизайн

За откриване на не-случайни асоциации между две категорийни променливи се използва точен тест на Фишер (two-tailed Fisher's exact test).

За да изследваме асоциациите на различните генотипове с изследваните заболявания и техните клинични форми, всеки полиморфизъм бе разгледан като категорийна променлива, в която възможните генотипи са отделните категории. За референтната категория се прие генотипа, хомозиготен по дивия тип (т.е. алела, който е предаден непроменен в поколенията, неполиморфния). След това данните се попълват в кръстосани таблици и се изчислява отношението на шансовете (odd ratio - OR) в 95% доверителен интервал (95% CI

– confidence interval) и p-value като се взимат предвид възможните модели на унаследяване.

Модели на унаследяване, използвани за анализ на асоциация със заболяване/клинична форма.

модел	X – вариантен алел; Y – див тип
Алелен	X/Y
Рецесивен	XX/YY+XY
Доминантен	XX+XY/YY
Кодоминантен	XY/YY XX/YY
Свръхдоминантен	XY/YY+XX
Адитивен	2.XX+XY/YY

Алелният модел измерва асоциацията на вариантния алел с наличието на болест/клинична форма.

При *рецесивния модел* на унаследяване са необходими две копия от вариантния алел, за да се промени риска, т.е. с различна степен на риск се свързва единствено хомозиготното носителство на вариантния алел.

При *доминантния модел* на унаследяване носителството на едно копие на вариантния алел е достатъчно, за да модифицира риска, т.е. хетерозиготите имат еднакъв риск с хомозиготите по вариантния алел.

Характерно за *кодоминантния модел* на унаследяване е, че всеки генотип определя различен риск, отделно от другите, без сумиране. При него веднъж се сравняват хетерозиготите с хомозиготите по дивия тип и отделно се сравняват хомозиготите по вариантния алел с хомозиготите по дивия тип.

При *свръхдоминантния модел* на унаследяване хетерозиготите са носители на различен риск от двата хомозигота.

За адитивния модел е характерно, че всяко копие от вариантния алел модифицира само по себе си риска, като при наличието на две копия ефектите им се сумират.

2.8.2. Методи за оценка на неравновесната връзка и хаплотипно конструиране

С помощта на софтуерен пакет Haploview 4.2 се изчисли неравновесната връзка (наричана също и неравновесна скаченост; LD – linkage disequilibrium) между изследваните SNPs и се анализираха честотите на различните хаплотипове и асоциацията ми с наличието на заболяване и/или клинична форма или лабораторна/имунологична характеристика. Отново се изчислиха OR, 95% CI p-value.

За количествена оценка на неравновесната връзка се използват три показателя:

1/ D' представлява абсолютната стойност на D – нормализираната стойност на ковариация за дадена двойка маркери:

$D' = 0$ означава, че двата локуса се унаследяват в пълно равновесие (т.е. изцяло независимо един от друг);

$D' = 1$ (напълно неравновесна връзка) означава, че двата SNP не се разделят при унаследяване чрез рекомбинация;

Междинните стойности сочат различни степени на рекомбинация.

Само стойности на D' , близки до 1 са достоверна мярка за LD. По-ниските стойности са изключително трудни за интерпретация, тъй като величината на D' е силно зависима от големината на извадката (Lewontin, 1988);

2/ LOD (logarithm of the odds) – изчислява се като десетичен логаритъм от отношението между вероятността резултата да се дължи на скачено унаследяване на два локуса и резултата да се дължи на случайност (т.е. двата локуса да не се унаследяват скачено). LOD се изчислява за различни нива на рекомбинация и максималната му стойност е мярка за степен

на скачено унаследяване. $LOD \geq 3$ се приема като наличие на пълно скачено унаследяване. LOD , също като D' зависи от броя генотипизирани индивиди – колкото по-малка е групата, толкова по-трудно е да се уловят неравновесни унаследявания. $3/ r^2$ - квадратът на корелационния коефициент между два локуса. За SNP, които не са разделени от рекомбинация (т.е. са скачени) $r^2 = 1$. По-ниските стойности на SNP r^2 сочат по-ниска степен на LD, т.е. била е осъществена рекомбинация (Hill WG, 1966). Стойностите на r^2 зависят от честотата на маркерите, но не се влияят от размера на извадката. За по-точно анализиране използвахме и трите. Конструира се LD plot, в който различните степени на неравновесна връзка са цветно кодирани по следната схема.

Цветово кодиране на показателите на неравновесната връзка според Haploview 4.2

	$D' < 1$	$D' = 1$
LOD < 2	бяло	Синьо
LOD \geq 2	Нюанси на розово/червено	Ярко червено

2.8.3. Табличен и графичен метод за представяне на резултатите

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. БАЗОВИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА УЧАСТНИЦИТЕ В ПРОУЧВАНЕТО

1.1. Пациенти с РА

В проучването са включени 58 пациенти с РА, пролежали в УМБАЛ „Св. Марина“, чиито базови клинични характеристики са представени по-долу в таблична форма.

Базови характеристики на пациентите с РА

ХАРАКТЕРИСТИКИ, 58 пациенти	ПАЦИЕНТИ С РА
Пол, n (%)	
Жени	49 (84%)
Мъже	9 (16%)
Възраст, години, средно (обхват)	56 (22 - 81)
Продължителност на заболяването, години, средно (обхват)	9 (0,1 - 33)
Възраст на дебют на заболяването, години, средно (SD)	49,2 (15,4)
Наличие на ерозии, n (%)	
Без ерозии	26 (44,8%)
Наличие на ерозии	32 (55,2%)
Рентгенов стадий, n (%)	
I	3 (5%)
II	23 (40%)
III	21 (36%)
IV	11 (19%)
Недостатъчен ефект от ксБПАРС, n (%)	
Не	27 (46,6%)
Да	31 (53,4%)
Тютюнопушене, n (%)	
Не	26 (44,8%)
Да	32 (55,2%)
RF IU/ml, средно (обхват)	35.5 (4 - 180)
RF (+) положителни	40 (69%)

RF (-) отрицателни	18 (31%)
АСРА IU/ml , средно (обхват)	23 (0.4 - 1000)
АСРА (+) положителни	30 (52%)
АСРА (-) отрицателни	28 (48%)
СУЕ mm/1ч , средно (обхват)	46 (2 – 120)
Повишена, n (%)	39 (67%)
Нормална, n (%)	19 (33%)
CRP mg/l , средно (обхват)	8 (0,12 - 147)
Повишен, n (%)	37 (64%)
Нормален, n (%)	21 (36%)
С1q µg/ml , средно (обхват)	89,8 (68 - 121)

Легенда: ксБПАРС – конвенционални синтетични болестопроменящи антиревматични средства; RF – ревматоиден фактор (rheumatoid factor); АСРА – антитела срещу цитрулинирани пептиди/протеини (anti-citrullinated peptide/protein antibodies); CRP – С-реактивен протеин (C-reactive protein); СУЕ – скорост на утаяване на еритроцитите. Лабораторните и имунологичните резултати са дефинирани като повишен/нормален според референтните граници на Клинична лаборатория УМБАЛ“Св. Марина“.

В проучването са включени 49 (84%) жени и 9 (16%) мъже с РА, което съответства приблизително на разпределение 5:1 в полза на жените. Подобно полово разпределение на РА (4,8:1) е докладвано и от други автори, особено във възрастовата група 30 - 49г, след което женския пол вече преобладава по-слабо и в по-късната възраст отношението достига 2:1 (Uhlig T, 1998).

Пациентите са на средна възраст 56г (обхват: 22 - 81) като статистическото разпределение на възрастта не е нормално (тест на Колмогоров-Смирнов, $p < 0,001$). А според възрастовото разпределение на СЗО (<https://www.who.int/health-topics/ageing>) в млада възраст (18 - 44г) са 10 (17%), в средна/зряла възраст

(45 - 59г) са 30 (52%), възрастни (60 - 74г) са 14 (24%), а в старческа възраст (75 - 89г) – 4 (7%) човека.

Пациентите са с поставена диагноза РА по критериите на ACR от 1987г, а давността на заболяването им е определена по анамнестични данни и след детайлен преглед на медицинската документация. Средната продължителност (обхват) на болестта е 9г (0,1-33). Средна (SD) възраст на дебют на заболяването е 49,2 (15,4) години.

Към момента на включване в изследването при 26 човека (44,8%) не се откриват ерозии на стандартна РА рентгенография на китки, длани и пръсти, докато при 32 (55,2%) – има една или повече ерозии с различен размер. Разпределението според рентгеновия стадий е както следва: Най-голям процент от пациентите са във II (40%) и III (36%) рентгенов стадий, значително по-малко болни са с оформени вече костни анкилози (IV рентгенов стадий) – 19%, а най-малко са болните в първи рентгенов стадий (5%). В проучването не участват болни без рентгенографски промени.

От включените в проучването РА пациенти 26 (44,8%) са пушачи, докато другите 32 (55,2%) не са.

С помощта на болничната документация и детайлна анамнеза се установи медикаментозния профил на кохортата болни от РА. Провежданата терапия на пациентите с РА е представена детайлно в таблица.

Провеждано лечение при пациентите с РА

Терапия	Пациенти, n (%)
ксБНАРС	31 (53,5%)
MTX монотерапия	15 (26%)
LFN монотерапия	4 (6,9)
CHLOROQUINE/HYDROXICHLOROQUINE	10 (17,2%)
SSZ	1 (1,7%)
AZA	1 (1,7%)
БИОЛОГИЧНИ СРЕДСТВА	16 (27,6%)

TNFi общо	8 (13,8%)
TNFi монотерапия	2 (3,4%)
TNFi+MTX	5 (8,6%)
TNFi+LFN	1 (1,7%)
RITUXIMAB	5 (8,6%)
RITUXIMAB монотерапия	2 (3,4%)
RITUXIMAB+MTX	3 (5,2%)
TOCILIZUMAB	3 (5,2%)
НСПВС	31 (53,5%)
ГКС	45 (77,6%)
Без ПГ терапия	2 (3,5%)

Легенда: ксБПРАС – конвенционални синтетични болестопроменящи антиревматични средства; MTX – Methotrexate; AZA – Azathioprine; TNFi – tumor necrosis factor alfa inhibitors; LFN – Leflunomide; SSZ – Sulfasalazine; НСПВС – нестероидни противовъзпалителни средства; ГКС – глюкокортикоиди; ПГ – патогенетична

От всички пациенти с РА, включени в изследването само двама (3,5%) не провеждат никакво лечение, като при единия са налице придружаващи заболявания (непозволяващи включването на допълнителни медикаменти), а другият е с новооткрито заболяване и му предстои преценка на по-нататъшното поведение. Повече от една четвърт от пациентите са лекувани с метотрексат като монотерапия (25,9%), 17,2% приемат хлороквин или хидроксихлороквин, 6,9% - лефлуномид, само един пациент – сулфасалазин. Процентът на лекуваните с биологични средства е 27,6% общо, от които 8 (13,8% от всички пациенти) приемат TNFi, 5 (8,6% от всички пациенти) - Rituximab и трима (5,2% от всички) – Tocilizumab. Освен гореизброените базисни медикаменти, Azathioprin приема един пациент (1,7%).

Към момента на включването им в изследването 31 болни (53,45%) са преценени като подходящи за биологично лечение

(поради недостатъчен ефект от прилаганото лечение с ксБПАРС) или провеждат вече такова.

45 (77,6%) пациенти провеждат ГКС лечение в ниски (<7,5мг преднизон еквивалент/дневно) и средно високи дози (>7,5мг, но <30мг преднизон еквивалент дневно). Средната приемана доза на ГКС е 10 мг преднизон еквивалент дневно (3 – 20 мг) като 17 (37,8%) пациенти приемат 10мг дневно, 20 (44,5%) пациента приемат 5 мг дневно, петима (11,1%) приемат 15 мг дневно и по един пациент (2,2%) съответно 3, 7 и 20 мг дневно.

Нестероидни противовъзпалителни средства по време на включването в изследването приемат малко повече от половината пациенти – 31 човека (53,5%).

Значителна част от болните от РА са серопозитивни според RF (69%) и само около половината (52%) АСРА положителни. Голям дял са с повишени острофазови показатели - 67% според СУЕ и 64% според CRP.

АСРА са със средна стойност (обхват) 23 (0,4-1000) IU/ml. Патологично повишени стойности се приемат > 20 IU/ml. Такива са стойностите на АСРА при 30 (52%) пациента, докато другите 28 (48%) са с <20 IU/ml.

1.2. Пациенти със СЛЕ

В проучването участват 53 пациенти със СЛЕ, чиито базови характеристики са отразени в таблица.

Базови характеристики на пациентите със СЛЕ

ХАРАКТЕРИСТИКИ, 53 пациенти	ПАЦИЕНТИ СЪС СЛЕ
Пол, n (%)	
Жени	45 (85%)
Мъже	8 (15%)
Възраст, години – средно (обхват)	42 (21 - 64)
Възраст на дебют на заболяването*, години – средно (SD)	28 (10 - 54)

Продължителност на заболяването* , години – средно (SD)	11,6 (7,9)
Ставно ангажиране* , n (%)	33 (70%)
Кожно ангажиране* , n (%)	25 (53%)
Серозит* , n (%)	6 (13%)
Бъбречно ангажиране , n (%)	40 (75,5%)
Неврологично ангажиране* , n (%)	1 (2%)
Хематологично ангажиране* , n (%)	18 (38%)
BILAG score²	
A	13 (27%)
B	11 (23%)
C	14 (29%)
D	10 (21%)
SLICC/ACR damage index^{^^} , точки – средно (обхват)	1 (0 – 4)
0, n (%)	7 (20%)
1, n (%)	15 (43%)
2, n (%)	3 (9%)
3, n (%)	6 (17%)
4, n (%)	4 (11%)
Левкоцити[~] , $\times 10^9/l$ – средно (SD)	7,15 (2,62)
Понижени, n (%)	4 (8%)
Анемия[~] , n (%)	
Да	14 (29%)
Хемоглобин[~] , g/l – средно (SD)	129 (22)
Еритроцити[~] , $\times 10^9/l$ – средно (SD)	4,36 (0,61)
Тромбоцити[~] , $\times 10^9/l$ – средно (SD)	249 (83)
Понижени, n (%)	3 (6%)
Креатинин[~] , $\mu\text{mol/l}$ – средно (обхват)	84 (43 - 519)
Повишен, n (%)	15 (31%)
eGFR[~] , ml/min/1.73sqm – средно (SD)	74,5 (31,6)
≥ 90 , n (%)	19 (38,8%)
60 – 89, n (%)	14 (28,6%)
30 – 59, n (%)	12 (24,5%)
15 – 29, n (%)	3 (6,1%)
< 15 , n (%)	1 (2%)
СУЕ[~] mm/1h – средно (SD)	27 (17)
Повишена СУЕ, n (%)	11 (25%)

CRP¹ , повишен, n (%)	11 (39%)
ANA^{**} (+) положителни, n (%)	29 (72,5%)
Anti-dsDNA^{***} (+) положителни, n (%)	20 (49%)
Anti-Sm§ , (+) положителни n (%)	2(10,5%)
SS-A/Ro§§ (+) положителни, n (%)	4 (22%)
SS-B/La§§§ (+) положителни, n (%)	1 (6%)
APL§ (+) положителни, n (%)	4 (21%)
С3 комплементен компонент ^ - понижен, n (%)	4 (8%)
С4 комплементен компонент ^ - понижен, n (%)	33 (63,5%)
Хипокомплементемия ^, n (%)	36 (69%)
Нива на С1q , µg/ml – средно (SD)	72 (21)
Понижени, n (%)	14 (26%)
Нормални, n (%)	39 (74%)

Легенда: * - информация налична за 47 пациента; ** - информация налична за 40 пациента; *** - информация налична за 41 пациента; § - информация налична за 19 пациента; §§ - информация налична за 18 пациента, §§§ - информация налична за 17 пациента; ^ - информация налична за 52 пациента. Само един пациент (1/52) е с понижени нива едновременно на С3 и С4; ^^ - информация налична за 35 пациента; ~ - информация налична за 49 пациента; ~ - информация налична за 45 пациента; ¹ - информация налична за 28 пациента; ² - информация налична за 48 пациента. Анемията е дефинирана като намалени нива (под референтната лабораторна граница) на хемоглобина и/или еритроцитите. СУЕ е дефинирана като повишена/нормална според референтната лабораторна граница (виж Материали и методи, глава 4.2.2.1). BILAG – индекс за активност на СЛЕ (British Isles Lupus Assessment Group) SLICC/ACR damage index – индекс за увреда (Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index). eGFR – estimated glomerular filtration rate – изчислена скорост на гломерулна филтрация

Както в подробности се разгледа в Литературен обзор, C1q е централна молекула в ефикасното почистване на имунни комплекси и клетъчен дебрис. Вероятно именно поради този факт генетичните му дефицити, макар и редки, са тясно свързани с развитието на СЛЕ. Установено е, че особено важна роля играе C1q, неговите функции, както и автоантителата, които е възможно да се синтезират срещу него, в патогенезата на ЛН. Освен това се натрупват все повече литературни данни за асоциацията на някои C1q-SNP с ЛН (Radanova M, 2015; Mosaad YM, 2015). Имено затова разгледахме по-подробно групата на пациентите с ЛН – 40 болни от общо 53. При 32 болни с лупусен нефрит бе налична инфомация и от проведена диагностична биопсия – клас на лупусния нефрит, индекси на активност и хроничност. В подгрупата на тези болни съответно се осъществиха допълнителни анализи.

Базови характеристики на подгрупата пациенти с лупусен нефрит (ЛН)

ХАРАКТЕРИСТИКИ, 40 пациента	ПАЦИЕНТИ С ЛН
Възраст на дебют на заболяването*, години – средно (SD)	27,45 (10)
Продължителност на заболяването* - средно (SD)	12,8 (8,1)
Давност на ЛН*, месеци – средно (SD)	145,2 (99)
Уринен седимент, n (%)	
Активен	12 (33%)
Неактивен	24 (67%)
Протеинурия*, g/l – средно (обхват)	1,115 (0,067 – 5,8)
≥0.5г/л, брой (%)	21 (62%)
<0.5г/л, брой (%)	13 (38%)
Нива на C1q, µg/ml – средно (SD)	68,2 (22,5)
Понижени, n (%)	14 (35%)
Нормални, n (%)	26 (65%)
Хистологичен клас лупусен нефрит**	

II	8 (25%)
III	1 (3%)
IV	17 (53%)
V	6 (19%)
Хистопатологичен индекс на активност*** , точки, средно (обхват)	2 (1 - 15)
1, n (%)	8 (36,4%)
2, n (%)	6 (27,3%)
5, n (%)	1 (4,5%)
7, n (%)	2 (9,1%)
10, n (%)	1 (4,5%)
12, n (%)	2 (9,1%)
13, n (%)	1 (4,55%)
15, n (%)	1 (4,55%)
Хистопатологичен индекс на хроничност*** , точки, средно (обхват)	1,5 (0 - 8)
0, n (%)	8 (36,4%)
1, n (%)	3 (13,6%)
2, n (%)	5 (22,7%)
3, n (%)	3 (13,6%)
4, n (%)	1 (4,5%)
6, n (%)	1 (4,5%)
8, n (%)	1 (4,5%)

*Легенда: Неактивен уринен седимент се приема при <8еритр/мкл, <8левкоцита/мкл и липса на цилиндри, с изключение на хиалинни. * - информация налична за 34 пациента; ** - информация налична за 32 пациента; *** - информация налична за 22 пациента*

В проучването са включени 45 (85%) жени и 8 (15%) мъже със СЛЕ, което съответства приблизително на съотношение 6:1 в полза на женския пол.

По различни литературни източници съотношението жени:мъже за СЛЕ варира в различните части на света от 4,3:1

до 13,6:1 (Petri, 2002), т.е. нашата кохорта е съизмерима по този признак с други такива, докладвани в световен мащаб.

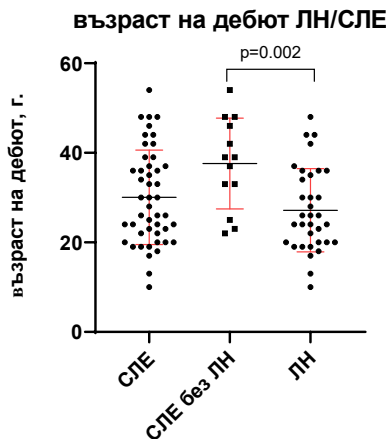
Стойностите на възрастта на пациентите със СЛЕ не следват нормално разпределение. Средната възраст (обхват) е 42г (21 - 64).

Според възрастовото разпределение на СЗО (<https://www.who.int/health-topics/ageing>) в млада възраст (18 - 44г) са 30 човека (56,6%), в средна/зряла възраст (45 - 59г) са 21 (39,6%), а възрастни (60 - 74г) са 2 (3,8%). В старческа възраст (75 - 89г) няма нито един пациент със СЛЕ в проучването.

Пациентите са с поставена диагноза СЛЕ по ревизираните 1997г критерии на ACR преди да бъдат включени в проучването, а давността на заболяването им е определена по анамнестични данни и след детайлен преглед на медицинската документация. Въпреки това при шест пациента не се установи достоверно възрастта на дебют, съответно давността на заболяването. Те са изключени от анализите, свързани с този показател.

Средната възраст (обхват) на начало на заболяването е 28 (10 - 54). Продължителността на заболяването в нашата кохорта е средно 11,6 (SD 7,9).

Възрастта на дебют на заболяването в подгрупата пациенти с ЛН е средно 27,45г (SD 10) и е сходна с възрастта на дебют на цялата група пациенти със СЛЕ, която е средно (обхват) 28 (10-54), $p=0,21$. Има значима разлика обаче между възрастта на дебют при пациентите с ЛН и тези без ЛН ($p=0,002$) като пациентите с ЛН дебютират в значително по-млада възраст от тези без – 37,6г (SD 10,1) срещу 27,2г (SD 9,3).



Възраст на дебют в групата на ЛН спрямо останалите пациенти със СЛЕ

Разпределението на болните със СЛЕ по клинични форми е предствено графично по-долу.



Клинични форми при пациентите със СЛЕ

Отново за 6 пациенти не бе получена достатъчно медицинска информация за достоверна преценка на клиничните прояви и те са изключени от съответните анализи.

Като кожно ангажиране се дефинира наличието някога на „пеперудообразен” еритем, дискоидни лезии, фоточувствителност и/или улцерации в устната кухина. По силата на тази дефиниция кожно ангажиране имат 25 от 47 пациента (53%) и съответно 22/47 (47%) – нямат и не са имали такава.

Ставното ангажиране се дефинира като наличие на неерозивен артрит и/или артралгии. Такова е налице при 33 от 47 пациенти (70%) и не се открива при 14 (30%).

Серозит (плеврит и/или перикардит) е налице или е бил наличен в някой момент на заболяването при 6 от 47 пациенти (13%), докато при останалите 41 (87%) такъв не е наблюдаван.

По отношение на засягането на бъбреците от автоимунния процес налице бе информация за всички 53 пациенти, включени в проучването. Бъбречно ангажиране, дефинирано като персистираща протеинурия $\geq 0,5\text{g/l/24h}$ и/или цилиндрурия – клетъчни и/или еритроцитни цилиндри и/или хистологично потвърден лупусен нефрит, е установено при 40 или 75,5%, като при останалите съответно 13 (24,5%) не се наблюдава засягане на бъбрека. При 32 от пациентите с бъбречно ангажиране има информация за проведена диагностична бъбречна биопсия и са налични резултатите от такава, включително хистологичния клас и индексите на активност и хроничност. В тази група пациенти се проведе подгрупов анализ, включващ съответните релевантни показатели.

В нашата кохорта пациенти със СЛЕ имаше само един пациент (1/47 – 2%) с неврологично ангажиране, дефинирано като психоза, множествен мононеврит, миелит, периферна или краниална невропатия.

Хематологично ангажиране бе дефинирано като наличие на хемолитична анемия, $\text{Hb} < 85\text{g/l}$ и/или левкопения $< 3\text{g/l}$ и/или лимфопения $< 1,5\text{g/l}$ и/или тромбоцитопения $< 100\text{g/l}$. По така заложената дефиниция 18 от 47 пациенти са с хематологично ангажиране (38%), а останалите 29 (62%) – нямат такава.

Степента на увредена, причинена от заболяването, се оцени чрез SLICC/ACR DI. Според този индекс почти половината от пациентите, при които бе изчислен (35 на брой) имат x1 точка – 15 (43%), 7 пациента (20%) нямат нито една точка, трима (9%) имат 2 точки, 6 (17%) – 3 и само 4 пациента (11%) имат 4 точки. В подгрупата пациенти с ЛН SLICC/ACR е изчислен при 22 болни - 11 човека (50%) имат 1 точка, четирима (18%) нямат нито една точка, по трима (14%) имат съответно 2 и 3 точки и само един пациент (4%) има 1 точка.

По отношение на болестната активност пациентите със СЛЕ, включени в изследването, са сравнително равномерно разпределени. За 5 пациента BILAG score не е изчислен, поради липса на достатъчно данни. Разпределението на останалите пациенти според активността на СЛЕ е както следва: 13 (27%) с високо активно заболяване, 11 (23%) – с умерено-активно, 14 (29%) – с леко заболяване и 10 (21%) – без клинична активност в момента.

Провежданата терапия на болните със СЛЕ е предствена таблично по-долу.

Провеждано лечение при болните със СЛЕ

Терапия	Пациенти
Chloroquine/Hydroxychloroquine	14 (26%)
Cyclophosphamide	31 (58,5)
AZA	10 (19%)
Belimumab	2 (4%)
IVIg	1 (2%)
ГКС	52 (98%)
Без лечение	1 (2%)

Легенда: ГКС – глюкокортикостероиди; IVIG – intravenous immunoglobulins (интравенозни имуноглобулини); AZA – Azathioprine

Само един от пациентите със СЛЕ, включени в изследването, не провежда системно лечение, тъй като е новодиагностициран и такова предстои да се прецизира. Всички останали приемат кортикостероидно, имunosупресивно и имуномодулиращо лечение в различни комбинации като ГКС приемат 100% от болните на лечение (или 98% от всички болни със СЛЕ в изследването). Един пациент приема единствено ГКС при включването си, тъй като самоволно в дома е спрял приема на базисния си медикамент (Chloroquine).

При двама пациенти (4%) към стандартно получаваната терапия е добавен Belimumab, а при един (2%) – интравенозни имуноглобулини. Десет от пациентите (19%) приемат Azathioprine, а 14 (26%) - Chloroquine или Hydroxychloroquine.

31 пациенти (58.5%) получават Cyclophosphamide, повечето под формата на пулс-терапии. Поради непълна информация кумулативната доза на Cyclophosphamide не бе изчислена при всички пациенти, а само при 26 – средно 7,9г (SD 7,5).

Предвид че една голяма част от пациентите получават ГКС под формата на пулс-терапия или мини пулс-терапия и липсва информация за точния брой и доза на пулсовете, средна доза на ГКС не бе изчислявана.

По отношение на стандартните лабораторни изследвания, прави впечатление, че около една трета от всички болни са с повишени острофазови показатели и много нисък процент са с хематологично засягане.

С повишени стойности на креатинина са 15 (31%) пациенти, като максималната му стойност е 519 μ mol/l. Всичките 15 пациенти с повишен креатинин попадат в групата болни с лупусен нефрит.

Всички пациенти, освен двама, при които eGFR е пониска от 90ml/min/1,73sqm, отново са от групата на ЛН. В зависимост от изчислената скорост на гломерулна филтрация

при пациентите се оформиха 5 групи: 19 (38,8%) пациента са с $eGFR \geq 90 \text{ ml/min/1,73sqm}$, 14 (28,6%) имат скорост на гломерулната филтрация 60 – 89, 12 (24,5%) – между 59 и 30, трима болни (6,1%) са с $eGFR$ между 15 и 29 и един болен (2%) с $eGFR < 15\text{ml/min/1,73sqm}$.

При 72,5% пациенти са установени ANA в патологично повишен титър ($> 1:80$) при включването им в проучването и при близо половината – anti-dsDNA, а при останалите 11 (27,5%) – не. При общо 36 (69%) болни със СЛЕ е понижен поне единия комплементен компонент, а при 1 пациент (2%) са понижени едновременно С3 и С4.

При пациентите с ЛН се обобщиха и данните за протеинурията и уринния седимент. От тях става ясно, че повече от половината болни (63%) са с патологични стойности на протеинурията, докато с активен уринен седимент са едва 1/3 (33%).

Разпределението на пациентите с ЛН и поставена хистологична диагноза (32 на брой) е както следва: 8 пациента (25%) са с клас II ЛН, 1(3%) – с клас III, 17 (53%) – клас IV и 6 (19%) човека – в клас V ЛН. Това показва, че с пролиферативен ЛН (клас III+IV) са повече от половината болни - 18 (56%), а с непролиферативни форми – 14 (44%) човека.

Хистопатологични индекси на активност и на хроничност са изчислени при 22 болни с ЛН. От тях става ясно, че при повечето пациенти не са значително напреднали хроничните промени, както и че няма много болни, включени в нашето проучване, при които да се налице много и тежки хистологични показатели за активност.

1.3. Контролна група здрави индивиди

Групата на здравите индивиди се състои от 57 (85%) жени и 10 (15%) мъже или съотношение жени:мъже около 6:1. По полово разпределение здравите индивиди са сходни с пациентите с РА и СЛЕ ($p>0,99$).

Стойностите на възрастта при здравите следват нормално разпределение като средната възраст е 49,9г (SD 11,4). Контролната група е сходна по възраст с групата на болните с автоимунни заболявания (РА+СЛЕ) – 49,9г (SD 11,4) срещу 48,6г (SD 13,9), $p=0,41$.

Според възрастовото разпределение на СЗО в млада възраст (18 - 44г) са 22 човека (32,8%), в средна/зряла възраст (45 - 59г) са 29 (43,3%), а възрастни (60 - 74г) са 16 (23,9%). В старческа възраст (75 - 89г) няма включен нито един здрав доброволец.

2. АЛЕЛНИ И ГЕНОТИПНИ ЧЕСТОТИ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ SNPs

2.1. Съответствие на алелното и генотипното разпределение на изследваните SNPs със закона на Харди-Вайнберг

Повечето SNPs удовлетворяват закона за равновесието на Харди-Вайнберг (Hardy-Weinberg equilibrium - HWE), според който алелите се унаследяват независимо, при което алелните и генотипните честоти се запазват непроменени в поколенията (Hardy, 1908) (Weinberg, 1908). Отклонения от това равновесие могат да се обяснят с естествен отбор, инбридинг, грешка в експеримента, характерна структура на популацията и т.н. Обичайно SNPs, които се отклоняват сигнификантно от HWE в групата на здравите при проучвания от типа случай-контрола, се изключват от изследването. Ако такова отклонение е налично само в групата на пациентите или когато се разглеждат всички участници като цяло, уместно е да се приеме, че най-вероятно се дължи на изразена асоциация на SNP с изследваното заболяване или някоя негова характеристика. На базата на тази особеност дори са разработени методики за откриване на асоциация в даден локус чрез търсене на отклонения в HWE (Song K, 2006).

В нашето изследване четири от SNPs (rs665691, rs682658, rs294179 и rs292001) удовлетворяват принципа на Харди-

Вайнберг с $p > 0,05$. Rs172378 се подчинява на закона на Харди-Вайнберг за контролната група, но не и за изследваната кохорта като цяло, което вероятно е в пряка зависимост от факта, че този SNP показва силна асоциация с РА и още по-силна със СЛЕ.

Стойности на p-value от проведен exact test за съответствие със закона за независимото унаследяване на Hardy-Weinberg

Група/SN P	Rs66569 1	Rs68265 8	Rs17237 8	Rs29417 9	Rs29200 1
КГ	0,8	1	0,74	1	0,42
СЛЕ	0,15	0,78	0,052	0,18	1
РА	1	0,59	0,3	0,3	0,3
ОБЩО	0,29	0,65	0,0048	0,88	1

2.2. Алелни и генотипни честоти на изследваните индивиди в сравнение с наличните данни за други кохорти

За да установим доколко получените от нас резултати биха били сравними с такива от други кохорти сравнихме алелните и генотипните честоти на изследваните индивиди с тези, докладвани за други раси и нации, в базата данни на 1000 Genome Project (<https://www.internationalgenome.org>) и с единствените в литературата данни за друга българска кохорта на Radanova et al. (Radanova M., 2015). Сходното честотно разпределение на изследваните индивиди и докладваните българска и европейски кохорти дава сигурност и че демонстрираните по-долу асоциации не могат да се обяснят със специфичност на популационната структура.

2.3. Алелни и генотипни честоти и асоциация с РА

Честотното разпределение по алели и генотипове на проучваните SNPs при болните с РА и контролната група здрави доброволци са представени на таблица.

Алелно и генотипно честотно разпределение на изследваните SNPs и асоциация с РА

SNP	МАФ ПРОУЧВАНИ	ЧЕСТОТНО РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ КОНТРОЛНА ГРУПА, брой (честота)	ЧЕСТОТНО РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ ПАЦИЕНТИ С РА, брой (честота)	МОДЕЛИ	OR (95%CI)	P-VALUE
rs665691	0,46 (G)	C – 79 (0,59) G – 55 (0,41) CC – 24 (0,36) CG – 31 (0,46) GG – 12 (0,18)	C – 57 (0,49) G – 59 (0,51) CC – 14 (0,24) CG – 29 (0,50) GG – 15 (0,26)	Алелен (G/C)	1,49 (0,90-2,45)	0,121
				Кодоминантен C G GC CC	1,60 (0,70-3,68) 0,265 0,137 2,14 (0,78-5,86)	
				Доминантен (GG+CG/CC)	1,75 (0,80-3,83)	0,159
				Рецесивен (GG/CG+CC)	1,60 (0,68-3,77)	0,284
				Свръхдоминантен (CG/CC+GG)	1,16 (0,57-2,35)	0,677
				Адитивен	1,47 (0,89-2,43)	0,13
rs682658	0,47 (G)	T – 68 (0,51) G – 66 (0,49) TT – 17 (0,25) TG – 34 (0,51) GG – 16 (0,24)	T – 64 (0,55) G – 52 (0,45) TT – 19 (0,33) TG – 26 (0,45) GG – 13 (0,22)	Алелен (G/T)	0,84 (0,51-1,38)	0,485
				Кодоминантен TG/TT GG/TT	0,68 (0,30-1,57) 0,370 0,524 0,73 (0,27-1,94)	
				Доминантен (GG+TG/TT)	0,70 (0,32-1,52)	0,364
				Рецесивен (GG/TG+TT)	0,92 (0,40-2,12)	0,846
				Свръхдоминантен (TG/GG+TT)	0,79 (0,39-1,60)	0,509

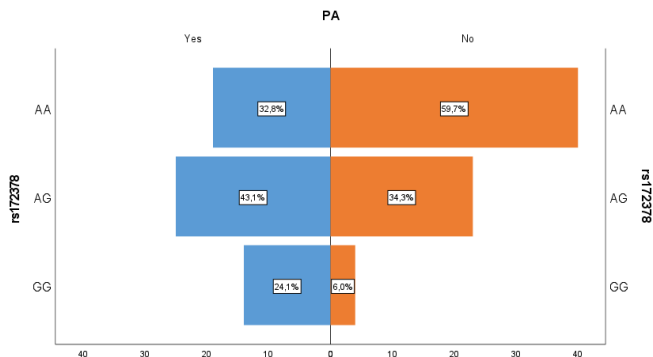
				Аддитивен	0,84 (0,52-1,38)	0,49
rs172378	0,34 (G)	A-103 (0,77) G-31 (0,23) AA-40 (0,60) AG-23 (0,34) GG-4 (0,06)	A-63 (0,54) G-53 (0,46) AA-19 (0,33) AG-25 (0,43) GG-14 (0,24)	Алелен (G/A)	2,80 (1,62-4,81)	-0,0002
				Кодоминантен AG/AA GG/AA	2,29 (1,04-5,03) 7,37 (2,14-25,42)	-0,039 0,002
				Доминантен (GG+AG/AA)	3,04 (1,46-6,34)	-0,002
				Рецесивен (GG/AG+AA)	5,01 (1,55-16,24)	-0,007
				Свръхдоминантен (AG/AA+GG)	1,45 (0,70-2,99)	-0,315
				Аддитивен	2,57 (1,49-4,43)	<-0,0001
rs294179	0,48 (C)	T-72 (0,54) C-62 (0,46) TT-19 (0,28) TC-34 (0,51) CC-14 (0,21)	T-57 (0,49) C-59 (0,51) TT-16 (0,28) TC-25 (0,43) CC-17 (0,29)	Алелен (C/T)	1,20 (0,73-1,98)	-0,469
				Кодоминантен T C CT TT	0,87 (0,38-2,03) 1,44 (0,55-3,81)	-0,752 0,460
				Доминантен (CC+TC/TT)	1,04 (0,47-2,27)	-0,924
				Рецесивен (CC/TC+TT)	1,57 (0,69-3,55)	-0,279
				Свръхдоминантен (TC/CC+TT)	0,74 (0,36-1,49)	-0,394
				Аддитивен	1,19 (0,73-1,94)	-0,480
rs292001	0,40 (A)	G-88 (0,66) A-46 (0,34) GG-27 (0,40) GA-34 (0,51) AA-6 (0,09)	G-63 (0,54) A-53 (0,46) GG-19 (0,33) GA-25 (0,43) AA-14 (0,24)	Алелен (A/G)	1,61 (0,97-2,68)	-0,068
				Кодоминантен		

				GA/GG AA/GG	1,04 (0,48 – 2,28) 3,32 (1,08 – 10,18)	0,912 0,036
				Доминантен (AA+GA/GG)	1,39 (0,66 – 2,89)	0,384
				Рецесивен (AA/GA+GG)	3,23 (1,15 – 9,08)	0,026
				Свърхдоминантен (GA/GG+AA)	0,74 (0,36 – 1,49)	0,394
				Аддитивен	1,61 (0,96 – 2,70)	0,068

Легенда: SNPs, които се асоциират с РА и съответните OR and p-values са дадени в потъмнен шрифт. MAF (minor allele frequency) – честотата на втория по честота алел.

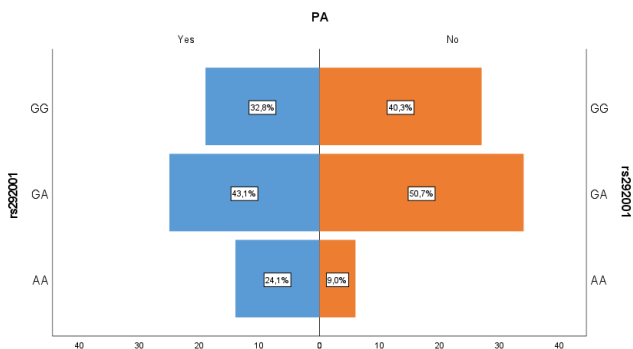
Rs665691, rs682658 and rs294179 SNPs демонстрират сходно разпределение в двете изследвани групи (контролна група здрави доброволци и болни с РА) ($p > 0,05$).

По отношение на rs172378 се установява сигнификантна разлика в честотата на вариантия алел G между двете групи – 46% при болните от РА и 23% при здравите доброволци (OR=2,80; 95% CI: 1,62–4,81; $p=0,0002$). Още повече, че в групата на болните от РА GG-генотипът е много по-чест, отколкото в контролната група (24% срещу 6%) (фиг. 5.2.4) и се асоциира с РА в повечето от тестваните генетични модели на унаследяване (рецесивен модел OR=5,01; 95% CI: 1,55-16,24; $p=0,007$; доминантен модел OR 3,04; 95% CI: 1,46–6,34, $p=0,003$; кодоминантен модел OR респективно 2,29; 95% CI: 1,04–5,03, $p=0,039$ и 7,37; 95% CI: 2,14–25,42, $p=0,002$; адитивен модел OR 2,57; 95% CI: 1,49–4,43, $p < 0,001$).



Генотипно разпределение на rs172378 при пациенти с РА и здрави индивиди

Подобно, установява се значима асоциация на AA-генотипа на rs292001 с РА (рецесивен модел OR=3,23; 95% CI: 1,15-9,08; p=0,026; кодоминантен AA/GG модел OR 3,32; 95% CI: 1,08–10,18, p=0,036) като в групата на болните честотата му е 24%, за разлика от 9% в контролната група здрави индивиди. Забелязва се и разлика в честотата на вариантния А-алел между двете групи (46% за РА-групата срещу 34% у контролната група), която обаче не достига статистическа значимост (p=0,068).



Генотипно разпределение на rs292001 при пациенти с РА и здрави индивиди

2.4. Алелни и генотипни честоти и асоциация със СЛЕ

Честотното разпределение по алели и генотипове на проучваните SNPs при болните с СЛЕ и контролната група здрави доброволци са представени на таблица.

Алелно и генотипно честотно разпределение на изследваните SNPs и асоциация със СЛЕ

SNP	МАФ ПРОУЧВАНИ ПАЦИЕНТИ	ЧЕСТОТНО РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ КОНТРОЛНА ГРУПА, брой (честота)	ЧЕСТОТНО РАЗПРЕДЕЛЕНИЕ ПАЦИЕНТИ СЪС СЛЕ, брой (честота)	МОДЕЛИ	OR (95%CI)	P- VALUE
rs665691	0,40 (G)	C – 79 (0,59) G – 55 (0,41) CC – 24 (0,36) CG – 31 (0,46) GG – 12 (0,18)	C – 66 (0,62) G – 40 (0,38) CC – 23 (0,43) CG – 20 (0,38) GG – 10 (0,19)	Алелен (G/C)		
				Кодоминантен C G		
				Доминантен (GG+CG/CC)		
				Рецесивен (GG/CG+CC)		
				Свръхдоминантен (CG/CC+GG)		
				Аддитивен		
rs292001	0,33 (A)	G – 88 (0,66) A – 46 (0,34) GG – 27 (0,40) GA – 34 (0,51) AA – 6 (0,09)	G – 72 (0,68) A – 34 (0,32) GG – 24 (0,45) GA – 24 (0,45) AA – 5 (0,09)	Алелен (A/G)		
				Кодоминантен GA/GG AA/GG		
				Доминантен (AA+GA/GG)		
				Рецесивен (AA/GA+GG)		
				Свръхдоминантен (GA/GG+AA)		
				Аддитивен		
rs172378	0,38 (G)	A – 103 (0,77) G – 31 (0,23)	A – 47 (0,44) G – 59 (0,56)	Алелен (G/A)		

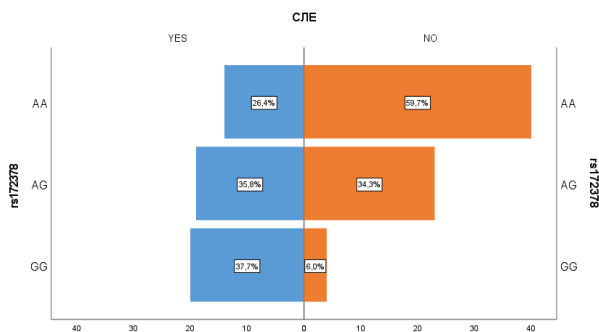
		AA – 40 (0,60) AG – 23 (0,34) GG – 4 (0,06)	AA – 14 (0,26) AG – 19 (0,36) GG – 20 (0,38)			
				Кодоминантен AG/AA GG/AA		
				Доминантен (GG+AG/AA)		
				Рецесивен (GG/AG+AA)		
				Свърхдоминантен (AG/GG+TT)		
				Аддитивен		
Rs682658*	G	T – 68 (0,51) G – 66 (0,49) TT – 17 (0,25) TG – 34 (0,51) GG – 16 (0,24)	T – 57 (0,58) G – 41 (0,42) TT – 17 (0,35) TG – 23 (0,47) GG – 9 (0,18)	Алелен		
				Кодоминантен TG/TT GG/TT	0,68 (0,29-1,59) 0,56 (0,20-1,62)	0,37 0,29
				Доминантен (TG+GG/TT)	0,64 (0,29-1,43)	0,28
				Рецесивен	0,72 (0,29-1,79)	0,48
				Свърхдоминантен (TG/TT+GG)	0,86 (0,41-1,80)	0,69
				Аддитивен	0,74 (0,44-1,26)	0,26
rs294179	0,48 (C)	T – 72 (0,54) C – 62 (0,46) TT – 19 (0,28) TC – 34 (0,51) CC – 14 (0,21)	T – 54 (0,51) C – 52 (0,49) TT – 11 (0,21) TC – 32 (0,60) CC – 10 (0,19)	Алелен (C/T)	1,12 (0,67-1,86)	0,67
				Кодоминантен T C	1,63 (0,67-3,94) 1,23 (0,41-3,71)	0,28 0,71
				Доминантен (CC+TC/TT)	1,51 (0,65-3,54)	0,34
				Рецесивен (CC/TC+TT)	0,88 (0,36-2,18)	0,78
				Свърхдоминантен (TC/CC+TT)	1,48 (0,71-3,07)	0,29
				Аддитивен	1,13 (0,66-1,94)	0,65

Легенда: SNPs, които се асоциират с РА и съответните OR and p-values са дадени в потъмнен шрифт. MAF (minor allele

frequency) – честотата на втория по честота алел. * - 4 пациента със СЛЕ не са генотипизирани за rs682658

Rs665691, rs682658, rs292001 и rs294179 SNPs имат сходно разпределение в двете изследвани групи (контролна група здрави доброволци и болни със СЛЕ) ($p > 0,05$).

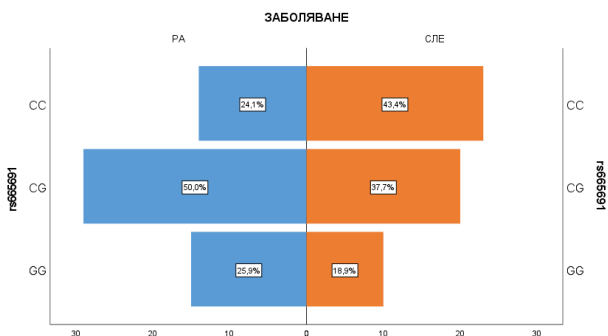
По отношение на rs172378 се установява сигнификантна разлика в честотата на вариантния алел G между двете групи: тя е 56% при болните със СЛЕ, докато в групата на здравите доброволци този процент е 23% (OR=4,17, 95%CI=2,39-7,27; $p < 0,0001$). Освен това, в групата на болните от СЛЕ GG-генотипът е много по-чест, отколкото в контролната група (38% срещу 6%) и се асоциира със СЛЕ в повечето от генетичните модели (кодоминантен модел AG/AA OR=2,36, 95%CI: 1,0-5,58, $p = 0,05$; GG/AA OR=14,29, 95%CI 4,16-49,07, $p < 0,0001$; доминантен модел OR=4,13, 95%CI: 1,89-9,02, $p = 0,0004$; рецесивен модел OR=9,55, 95%CI: 3,01-30,24, $p = 0,0001$; адитивен OR=3,40, 95%CI: 1,95-5,91, $p < 0,0001$).



Генотипно разпределение на rs172378 при пациенти със СЛЕ и здрави индивиди

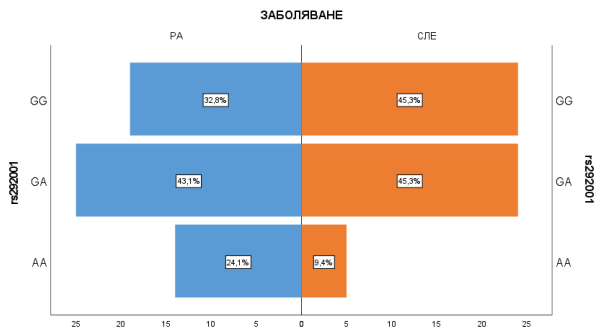
2.5. Алелни и генотипни честоти, демонстриращи разлика между РА и СЛЕ

След като стана ясно, че съществува полиморфизъм в гена за C1q (rs172378), който се асоциира и с РА, и със СЛЕ, ние решихме да сравним алелните и генотипните честоти на всички изследвани SNPs между двете групи пациенти с различни заболявания. Два от полиморфизмите демонстрираха статистически значима разлика в честотата си между болните от РА и тези от СЛЕ - rs665691 и rs292001.



Генотипно разпределение на rs665691 при пациенти с РА и СЛЕ

За rs665691 честотата на вариантния G алел е значимо по-висока в групата на болните с РА отколкото при болните от СЛЕ – 59% срещу 40%, макар и 95%-ният доверителен интервал на съотношението на шансовете за СЛЕ спрямо РА да допира до единица - OR 0,59 (95%CI: 0,34-1), $p=0,05$. От друга страна, на генотипно ниво има значителна разлика в честотите на CG и GG генотипите при болните с РА и СЛЕ. 50% от болните със РА са носители на CG-генотип и 25,9% на GG-генотип срещу 37,7% и 18,9% съотв. за болните с СЛЕ. OR на съдържащите алела G генотипи (доминантен модел на унаследяване) е 0,42 (95%CI: 0,18-0,93), $p=0,03$, т.е. отношението на шансовете на тези болни е в полза на развитие на РА.



Генотипно разпределение на rs292001 при пациенти с РА и СЛЕ

При rs292001 честотата на вариантия алел също е значимо по-висока при пациентите с РА от тези със СЛЕ – 46% срещу 32% като съотношението на шансовете отново е под единица за СЛЕ (т.е. в полза на РА) - OR 0,56 (95%CI: 0,32-0,97), $p=0,04$. Аналогично, OR, изчислени по рецесивен (AA/GA+GG), кодоминантен (AA/GG) и адитивен (2AA+GA/GG) модел, са сигнификантни – съответно 0,33 (95%CI: 0,11-0,98), 0,28 (95%CI: 0,09-0,93), 0,58 (95%CI: 0,34-0,99), $p=0,04$.

Честотното разпределение на останалите три SNPs не се различава значимо между пациентите с РА и тези със СЛЕ.

3. НИВА НА C1q ПРИ ИЗСЛЕДВАНИТЕ ИНДИВИДИ

3.1. Нива на C1q у пациентите с РА

У пациентите с РА средното плазмено ниво на C1q е 89,8 μ g/ml като стойностите варират между 68 и 121 μ g/ml, т. е. в рамките на нормата (59 - 178 μ g/ml). Не се установява разлика в плазмените нива на C1q между жени и мъже ($p=0,68$), нито пък в различните възрастови групи по СЗО ($p=0,96$).

3.1.1. Плазмени нива на С1q и клинични, лабораторни и имунологични характеристики на болните с РА

При пациентите с РА установените плазмени нива на С1q не демонстрират значима корелация с нито една от клиничните, лабораторните или имунологичните характеристики на заболяването.

3.1.2. Плазмени нива на С1q и провеждана терапия при РА

Не се установява разлика в плазмените нива на С1q между пациентите приемащи и не приемащи НСПВС, ($p=0,95$), нито между пациентите, провеждащи лечение с ксБПАРС и тези на биологично лечение ($p=0,5$).

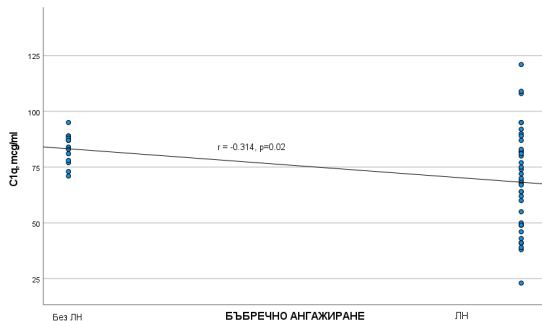
Няма разлика и между лекувани и нелекувани с ГКС, както и между лекувани само с ГКС и лекувани с комбинация от друго патогенетично лечение и ГКС (тест на Kruskal-Wallis, $p=0,80$).

3.2. Нива на С1q у пациентите със СЛЕ

У пациентите със СЛЕ плазмените нива на С1q следват нормално разпределение (тест на Колмогоров-Смирнов, $p>0,1$). Средното плазмено нива на С1q в тази група е $72\mu\text{g/ml}$, със стандартно отклонение (SD) $\pm 21\mu\text{g/ml}$. При някои от пациентите прави впечатление, че нивата са по-ниски от референтните граници ($59-178\mu\text{g/ml}$). По-точно 26% (14 болни от общо 53) имат плазмени нива на С1q под долна граница на нормата, докато при останалите 74% (39/53 болни) нивата на С1q са в границите на нормата. Между групата на жените и тази на мъжете със СЛЕ няма статистически значима разлика в плазмените нива на С1q ($p=0,33$). Няма такава и в различните възрастови групи по СЗО ($p=0,26$).

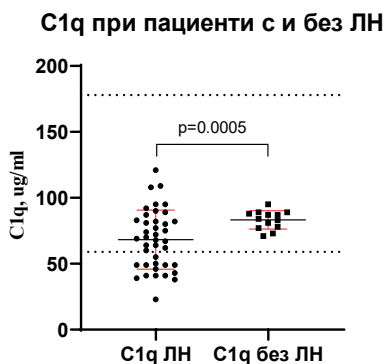
3.2.1. Плазмени нива на С1q и клинични характеристики на СЛЕ

Нивата на С1q корелират негативно с бъбречното ангажиране у пациентите със СЛЕ, коефициент на бисерийна корелация (point biserial correlation) $r=-0,314$, $p=0,02$.



Бисерийна корелация (point biserial correlation) между нивата на C1q и бъбречното ангажиране у пациенти със СЛЕ

При сравняване на групата пациенти с ЛН и групата без бъбречно ангажиране се демонстрира статистически значима разлика ($p=0,0005$) като пациентите с ЛН имат по-ниски средни (SD) нива на C1q в сравнение с тези без нефрит: 68,2 (SD 22,5) $\mu\text{g/ml}$ срещу 83,2 (SD 7,0) $\mu\text{g/ml}$. Следва да се отбележи също, че всички пациенти без бъбречно ангажиране имат стойности на C1q в референтните граници, т.е. само пациенти с ЛН имат плазмени нива на C1q под референтните граници.



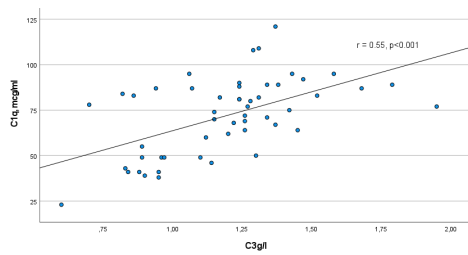
Нива на C1q при пациенти с ЛН и такива със СЛЕ без ЛН. Пунктирните линии представят референтните граници на нормата.

3.2.2. Плазмени нива на С1q и лабораторни характеристики на СЛЕ

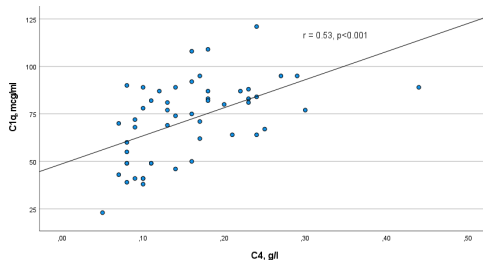
В нашето прочуване не се установи асоциация между плазмените нива на С1q и показателите на кръвната картина или острофазовите показатели (СУЕ и CRP).

3.2.3. Плазмени нива на С1q и имунологични характеристики на СЛЕ

Корелация се установи между плазмените нива на С1q и нивата на другите изследвани фактори на комплемента – С3 и С4 с корелационни коефициенти съответно $r=0,55$ и $r=0,53$, $p<0,001$.



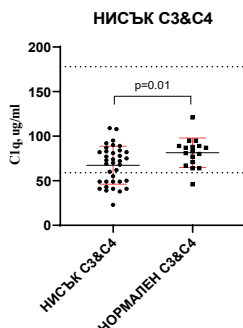
Корелация между нивата на С1q и С3-комплементен фактор у болни със СЛЕ



Корелация между нивата на С1q и С4-комплементен фактор у болни със СЛЕ

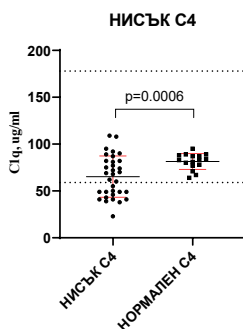
При пациентите с установена понижена стойност на поне един от факторите на комплемента се демонстрират по-ниски

средни (SD) плазмени нива и на C1q, съответно – 67,4 μ g/ml (SD 21,2) срещу 81,4 μ g/ml (SD 16,5). Сравнителният t-тест, проведен с корекция на Welch, показва статистически значима разлика от 14 ± 5.3 при $p=0,01$.



Нива на C1q според стойностите на комплементните протеини C3 и C3. Пунктираните линии представляват референтните граници на нормата.

Аналогично, при пациентите с понижени стойности на C4 се установяват по-ниски средни (SD) плазмени нива на C1q – 65,3 μ g/ml (SD 22) срещу 81,4 μ g/ml (SD 8,5), $p=0,0006$. Още повече, че всички пациенти, при които са установени ниски стойности на C1q имат и понижен C4.



Нива на C1q според стойностите на C4. Пунктираните линии представляват референтните граници на нормата.

3.2.4. Плазмени нива на C1q и провеждана терапия при пациентите със СЛЕ

Не се установиха значими различия в нивата на C1q при пациентите, приемащи различно лечение, тест на Kruskal-Wallis, $p=0,57$.

3.2.5. Хистопатологични характеристики на ЛН

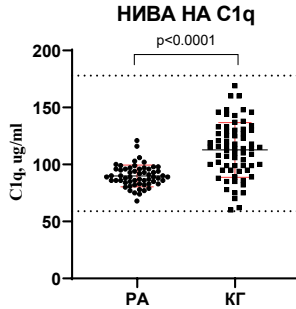
Не се установяват различия в нивата на C1q при различните хистопатологични класове ЛН (Brown-Forsythe and Welch ANOVA, $p=0,94$), нито пък когато се сравнят пролиферативни с непролиферативни форми на ЛН (Welch's correction t-test, $p=0,87$), нито между групите пациенти с различни хистопатологични индекси на активност и на хроничност.

3.3. Нива на C1q в контролната група здрави доброволци

При контролната група здрави доброволци плазмените нива на C1q следват нормално разпределение. Средното плазмено ниво на C1q е $113 \mu\text{g/ml}$, със стандартно отклонение (SD) $\pm 24 \mu\text{g/ml}$. При всички индивиди от тази група плазмените нива на C1q са в рамките на нормалните граници ($59-178 \mu\text{g/ml}$). Не се установяват различия между жени и мъже (Welch's correction t-test, $p=0,67$), нито в различните възрастови групи (ANOVA test, $p=0,64$).

3.4. Сравнение на плазмените нива на C1q между болните с РА и контролната група здрави доброволци

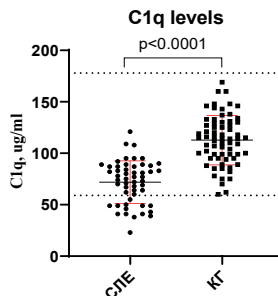
За да сравним нивата на C1q в двете групи – РА и контроли, използвахме непараметричен (разпределението на плазмените нива в групата на болните с РА не е нормално) Mann-Whitney тест, според който между двете сравнявани групи има значителна разлика ($p<0,0001$) като при пациентите с РА се установяват сигнификантно по-ниски нива в сравнение с контролната група.



Нива на C1q при болни от РА и контролната група здрави доброволци. Пунктираните линии представляват референтните граници на нормата.

3.5. Сравнение на плазмените нива на C1q между болните със СЛЕ и контролната група здрави доброволци

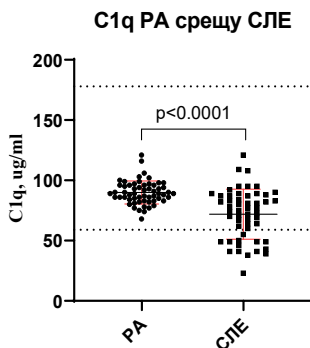
Плазмените нива на C1q сравнихме като използвахме t-test (предвид че и в двете групи разпределението на стойностите е нормално), според който се установи значителна разлика между двете сравнявани групи ($p < 0,0001$) като при пациентите със СЛЕ нивата на C1q са сигнификантно по-ниски от тези на контролната група здрави доброволци.



Нива на C1q при болни от СЛЕ и контролна група здрави доброволци. Пунктираните линии представляват референтните граници на нормата.

3.6. Сравнение на плазмените нива на C1q между болните с РА и болните със СЛЕ

Сигнификантна разлика се установи и между средните плазмени нива на C1q при пациенти с РА и със СЛЕ ($p < 0,0001$). Болните с РА имат значимо по-високи средни (SD) нива на C1q от тези със СЛЕ: 89,9 μ g/ml (SD 9.5) срещу 71,9 μ g/ml (20,8).



Нива на C1q при болни от РА и СЛЕ. С пунктирани линии са означени референтните граници на C1q. Пунктираните линии представляват референтните граници на нормата.

4. ГЕНОТИПНИ ЧЕСТОТНИ РАЗПРЕДЕЛЕНИЯ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ SNPs И НИВА НА C1Q

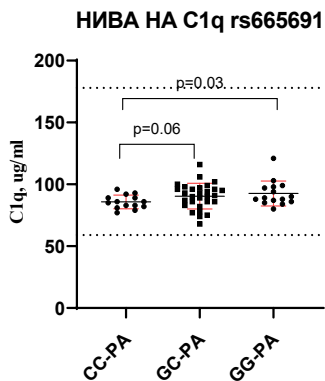
С цел да се прецени доколко наличието на определен полиморфизъм оказва влияние върху биологичната функция на гена (а именно синтеза на C1q), сравнихме нивата на C1q у носителите на различните генотипове за всеки конкретен SNP и в трите изследвани групи – болни от РА, болни от СЛЕ и здрави индивиди.

4.1. Пациенти с РА

При пациентите с РА три от изследваните пет SNPs показаха различия в нивата на C1q между носителите на различните генотипи.

4.1.1. rs665691

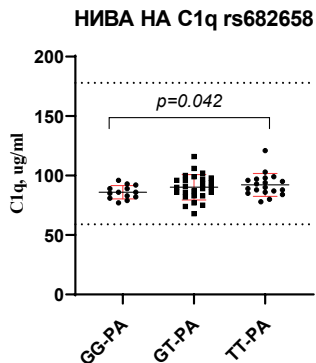
СС-генотипът на rs665691 се асоциира със сигнификантно по-ниски нива на С1q от GG-генотипа – медиана (обхват) 85,5 $\mu\text{g/ml}$ (77-96) срещу 89 $\mu\text{g/ml}$ (80-121); $p=0,034$.



Нива на С1q по генотипове rs665691 при пациенти с РА. Пунктираните линии представляват референтните граници на нормата.

4.1.2. rs682658

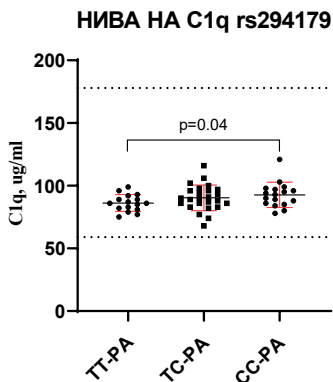
Пациентите, носители на GG-генотип на rs682658 имат по-ниски плазмени нива на С1q в сравнение с носителите на ТТ-генотипа – медиана 86 $\mu\text{g/ml}$ (77-96) vs 90 $\mu\text{g/ml}$ (78-121); $p=0,042$.



Нива на C1q по генотипове rs682658 при пациенти с РА. Пунктираните линии предствляват референтните граници на нормата.

4.1.3. rs294179

Пациентите, носители на ТТ-генотипът на rs294179 се характеризират с по-ниски плазмени нива на C1q от носителите на СС-генотипа – медиана 86 $\mu\text{g/ml}$ (75-99) срещу 93 $\mu\text{g/ml}$ (78-121); $p=0,043$.



Нива на C1q по генотипове rs294179 при пациенти с РА. Пунктираните линии предствляват референтните граници на нормата

4.1.4. rs172378 и rs292001

Разпределението по генотипове по отношение на rs172378 и rs292001 не корелира с нивата на C1q.

4.2. Пациенти със СЛЕ

При пациентите със СЛЕ, включително и когато се разгледа самостоятелно подгрупата пациенти сЛН, не се установяват разлики между плазмените нива на C1q у пациентите, носители на различни генотипове. Единствено по отношение на rs294179 се забелязва тенденция, но тя не достига статистическа значимост.

4.3. Контролна група здрави индивиди

При контролната група здрави индивиди разпределението по генотиповете на изследваните SNPs не повлиява нивата на C1q. Единствено по отношение на rs682658 има набелязана тенденция, но тя не достига статистическа значимост.

5. АЛЕЛНИ И ГЕНОТИПНИ ЧЕСТОТНИ РАЗПРЕДЕЛЕНИЯ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ SNPs И РА

5.1. Алелни и генотипни честотни разпределения на изследваните SNPs и демографски характеристики на пациентите с РА

Не се установиха статистически значими различия в алелните и генотипните честоти на мъжкия и женския пол, както и в различните възрастови групи.

5.2. Алелни и генотипни честотни разпределения на изследваните SNPs и клинични характеристики на пациентите с РА

При петте изследвани SNPs не се установи връзка между честотата на алелите и генотиповете и възрастта на дебют на РА, неговата продължителност, наличието на ерозии, рентгеновия стадий и липсата на ефект от лечение с ксБПАРС.

5.3. Алелни и генотипни честотни разпределения на изследваните SNPs и лабораторни и имунологични характеристики на пациентите с РА

Не се демонстрира асоциация между носителството на определени алели и/или генотипове и нивата на острофазовите показатели СУЕ и CRP.

За преценка на връзката между носителството на различните SNPs и имунологичните показатели пациентите бяха разделени на групи според носителството на автоантитела, съответно RF-положителни срещу RF-отрицателни и АСРА-положителни срещу АСРА-отрицателни. При така проведен анализ RF не демонстрира зависимост от различните генотипи на полиморфизмите, за разлика от АСРА.

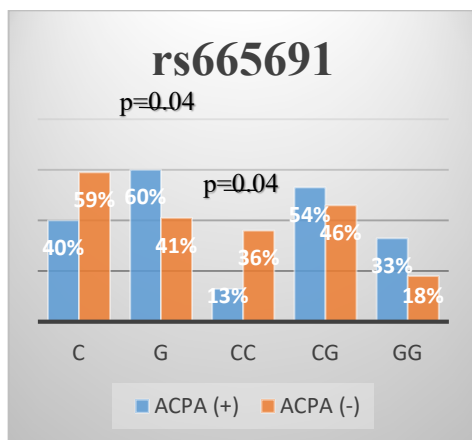
5.3.1. rs665691

Не се установи връзка между носителството на различните алели/генотипове на rs665691 и нивата на IgM-RF.

Установи се, обаче, значима връзка между носителството на различните алели и генотипове на rs665691 и синтеза на АСРА. G-алелът по-често се среща в групата на пациентите, синтезиращи АСРА, като 60% от АСРА положителните пациенти с РА са носители на G-алела срещу 41% от АСРА отрицателните. G-алелът се асоциира с носителство на АСРА с $OR=2,15$ (95%CI 1,03 – 4,52), $p=0,04$. Аналогично, GG-генотипът се асоциира с АСРА носителство в кодоминантния модел на унаследяване с $OR=5$ (95%CI 1,03 – 24,3), $p=0,05$ и още повече в адитивния с $OR=3,9$ (95%CI 1,1. – 13,9), $p=0,036$. Освен това, CC-генотипът е много по-рядък сред пациентите с РА, носители на АСРА – 13% срещу 36% при АСРА-негативните.

Погледнато по друг начин, от всички пациенти с РА, хомозиготите по вариантния G-алел са общо 15. От тях 10 (10/15 или 2/3) са АСРА-положителни, а само 5 (5/15 или 1/3) – АСРА-отрицателни. Обратно, от всички пациенти с РА, хомозиготите по дивия тип (CC-генотип) са 14. От тях 4 (4/14)

са АСРА-положителни, докато останалите 10 (10/14) са АСРА-отрицателни, $p=0.04$.



Разпределение по алели и генотипове на rs665691 на пациентите с РА според носителството на АСРА

Още повече при включването на всичките пет SNP в логистичен регресионен модел за изследване на влиянието им върху синтеза на АСРА, единствено rs665691 има статистически значимо влияние като за GG-генотипа $\text{Exp}(B)=10$ (95%CI 1,8 – 56), $p=0,008$, а за CG-генотипа - $\text{Exp}(B)=4,5$ (95%CI 1,04 – 19,7), $p=0,045$.

При пряко сравнение пациентите с РА, носители на rs665691 CC-генотипа имат сигнификантно по-ниски нива на АСРА – средно (обхват) 10,70 UI/ml (0,4-104) отколкото тези, които са носители на GG-генотипа – средно (обхват) 49 UI/ml (3,1-1000), $p=0,002$.

Предвид литературните данни за връзката между тютюнопушенето и синтеза на АСРА, коригирахме за тютюнопушене, след което статистическата значимост се запази ($p=0,03$).

За да обобщим, като се вземат предвид и резултатите, представени по-горе, може да се отбележи, че много по-голяма част от пациентите, хомозиготни по вариантния G-алел, са АСРА (+), отколкото хомозиготите по дивия тип (СС-генотип). GG-генотипът е носител на десетократно по-висок шанс за носителство на АСРА, а СG-генотипът – на четирикратно. Като цяло хомозиготите по вариантния алел (GG) се характеризират с по-високи плазмени нива на С1q и по-високи нива на АСРА в сравнение с хомозиготите по референтния С-алел.

5.3.2. rs294179

При пряко сравнение на нивата на АСРА между пациентите с различни генотипове по rs294179, също се установи разлика, която запази статистическа значимост след корекция за тютюнопушене ($p=0,02$).

Пациентите, носители на TT-генотипът имат по-ниски нива на АСРА – средно (обхват) 12,35 UI/ml (0,4-398) от носители на СС-генотипа – средно (обхват) 32,10 UI/ml (1,2-1000), $p=0,043$.

Никой от генотиповете на rs294179 обаче не се асоциира с носителство на АСРА изобщо.

Носителите на вариантния С-алел в хомозиготно състояние се характеризират с по-високи плазмени нива на С1q и по-високи нива на АСРА, отколкото хомозиготите по референтния алел Т, но такава разлика не достига статистическа значимост, когато пациентите се разделят на положителни и отрицателни за АСРА.

5.3.3. rs682658, rs172378 и rs292001

Rs682658, rs172378 и rs292001 не демонстрират асоциация с имунологични характеристики на пациентите с РА.

След направените в групата на болните от РА анализи се установи, че няма асоциация между който и да е от подбраните SNPs и наличието на ерозивно заболяване, отговора към

провежданата терапия (биологична или конвенционална), острофазовите показатели и RF.

rs172378 е изследван за връзка с отговор на лечение в онкологията и онко-хематологията. При пациенти с различни видове лимфом, лекувани с биологичен anti-CD20 препарат (Rituximab) в комбинация или не с цитостатици и ГКС (според съотв. протокол), пациентите с AA-генотип на rs172378 имат значително по-дълготраен отговор към лечението и повече време минава преди да настъпи прогресия (Racila E L. B., 2008; Jin X, 2012). Тук може да се крие важна информация за разлики в отговора към лечение с anti-CD20, които да имат приложение и в ревматологията (въпрос, който може би подлежи на самостоятелно изследване със съответен дизайн). В нашето проучване обаче не се демонстрира връзка между rs172378 и отговора към лечение.

Установи се зависимост на АСРА синтеза от генотипното разпределение на rs665691 и rs294179. Според конструирания логистичен регресионен модел GG-генотипа на rs665691 се свързва десетократно по-често с носителство на АСРА, а CG-генотипа – четирикратно. Носителите на вариантния алел на rs294179 в хомозиготно състояние (ТТ-генотип) имат по-високи нива на АСРА от хомозиготите по другия алел (дивия тип, СС-генотип).

В предходната глава стана ясно, че същите тези генотипове са обвързани и с по-високи плазмени нива на С1q.

Тези факти сочат, че РА е хетерогенно по своята природа заболяване (хипотеза, която се изтъква от години в научната литература (Stanich JA, 2009). Очертават се две имунологично и генотипно различни групи сред болните с РА– едните (хомозиготните носители на вариантните алели на rs665691 и rs294179) с по-високи нива на С1q и АСРА от останалите. В изследваната кохорта не се манифестираха други разлики между тези две групи – клинични или пък по отношение отговора на терапията. Това би могло да се дължи на малкия

брой изследвани пациенти и следва да се провери в изследвания на стратифицирани по тежест на протичане и отговор на лечение групи болни.

Интерес буди фактът, че полиморфизмите, влияещи върху АСРА синтеза (rs665691 и rs294179), не са тези, които се асоциират със самото заболяване РА (rs172378 и rs292001). Вероятно вариантите в гените за С1q са поне отчасти комплексно свързани с патогенезата на РА и изразената му хетерогенност.

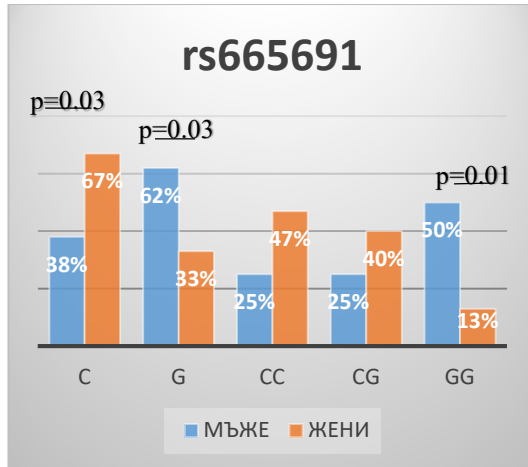
6. АЛЕЛНИ И ГЕНОТИПНИ ЧЕСТОТНИ РАЗПРЕДЕЛЕНИЯ НА SNPS И СЛЕ

6.1. Алелни и генотипни честотни разпределения на изследваните SNPs и демографски характеристики на пациентите със СЛЕ

От петте изследвани полиморфизма три демонстрират изразени полови различия – rs665691, rs682658 и rs292001. Няма разлика в носителството на различни генотипове по възраст.

6.1.1. rs665691

Вариантният G-алел на rs665691 е представен значително повече у индивидите със СЛЕ от мъжки пол – 62% от тях са носители на G-алел срещу 33% от жените, $p=0,03$. Същото важи и за GG-генотипа – той е предствен у 50% от мъжете срещу 13% от жените със СЛЕ, $p=0,01$.

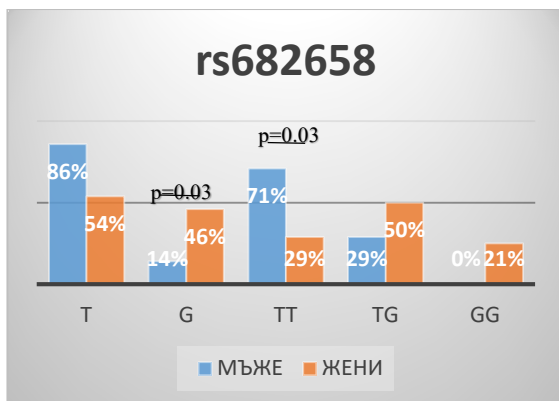


Алелно и генотипно разпределение на rs665691 по полове при пациентите със СЛЕ

Тези зависимости се запазват почти непроменени, ако се вземе предвид и само подгрупата на пациентите с ЛН - съответно $p=0,02$ за G-алела и $p=0,05$ за GG-генотипа (резултатът не е представен отделно графично поради висока степен на сходство).

6.1.2. rs682658

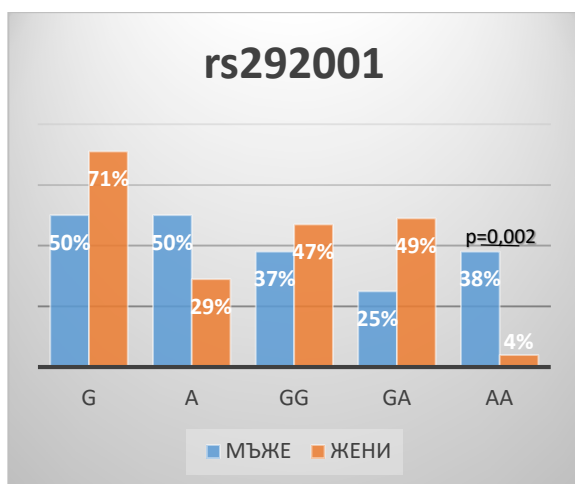
Вариантният (G) алел на rs682658 е представен в много по-голяма степен у пациентите от женски пол – 46% срещу 14% у мъжете, $p=0,03$. Само пациенти от женски пол са носители на GG-генотип - общо 9 на брой (18,4% от всички болни със СЛЕ).



Алелно и генотипно разпределение на rs682658 полове при пациентите със СЛЕ

6.1.3. rs292001

AA-генотипът на rs292001 е много по-чест у мъжете със СЛЕ – 38% от тях са носители на AA-генотип за разлика от 4% от жените, $p=0,002$.



Алелно и генотипно разпределение на rs292001 полове при пациентите със СЛЕ

6.2. Клинични характеристики

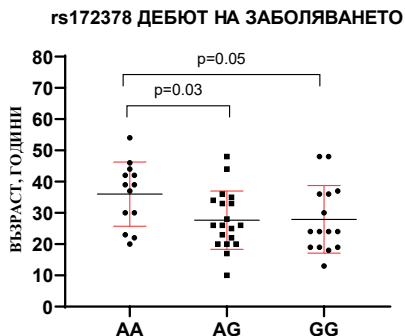
След направените анализи в изследваната популация болни със СЛЕ не се установиха асоциации между носителството на различните генотипове на петте изследвани полиморфизма и индексите за увреда и за активност на заболяването (респ. SLICC/ACR DI и BILAG score). За останалите клинични параметри се установиха представените по-долу асоциации.

6.2.1. Възраст на дебют

Възрастта на дебют на СЛЕ е една от предпоставките за натрупване на трайни органни увреди като е естествено, че при дебют на заболяването в по-ранна възраст по-рано в живота на пациента се очаква да настъпят необратими промени. Доказано е, че на 10 година от началото на СЛЕ около 50% от пациентите вече имат трайна органна увреда (Chambers SA, 2009).

Анализът на изследваните в проучването болни показва, че генотипното разпределение на rs172378 се асоциира с възрастта на дебют. Пациентите, носители на вариантния алел (без значение в хетеро- или в хомозиготно състояние) демонстрират по-ранна възраст на начало на заболяването от останалите с разлика от около 8 години, както следва:

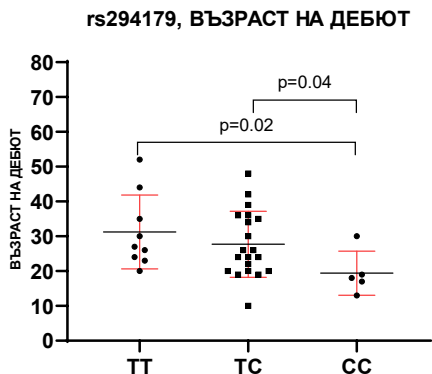
GG-генотип средно (SD) 27,9г (SD 10,8) срещу AA-генотип 36г (SD 10,3), $p=0,05$; AG-генотип средно (SD) 27,7г (SD 9,4) срещу AA-генотип 36г (SD 10,3), $p=0,02$.



Дебют на заболяването по генотипове на rs172378 при пациенти със СЛЕ

Подобна тенденция се наблюдава и по отношение на вариантния С-алел и СС-генотипа на rs294179, но без да достига статистическа значимост ($p=0,08$), вероятно поради малкия брой изследвани болни – пациентите с СС-генотип са със средна възраст на дебют (обхват) 19г (13–48) срещу 30г (20–44) при пациентите с ТТ-генотип.

Тази тенденция достига статистическа значимост, когато в анализа се вземе предвид само групата на пациентите с бъбречно ангажиране.



Възраст на дебют при пациентите с ЛН по генотипове на rs294179

Вижда се, че пациентите с ЛН, носители на СС-генотипа (хомозиготи по вариантния алел) на rs294179 имат значително по-ранна възраст на дебют от останалите два генотипа: средно 19,4г (SD 6,3) срещу 31,2г (SD 10,6) (Welch's correction t-test, $p=0,02$) за СС срещу ТТ-генотипа и срещу 27,7г (SD 9,5) (Welch's correction t-test, $p=0,04$) за СС срещу ТС-генотипа.

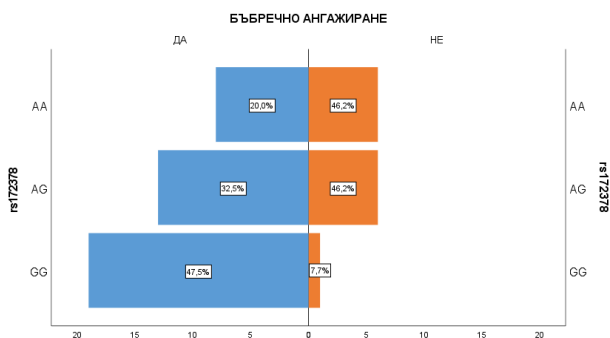
6.2.2. Клинични форми

За да обективизираме евентуална асоциация между носителството на определени алели и/или генотипове и клиничните прояви на СЛЕ, анализирахме алелните и генотипните честоти като за всяка клинична порява разделихме болните на такива, при които тя присъства и такива, при които тя не присъства. Изчислихме OR, 95% CI и стойностите на p като използвахме отново всички модели на унаследяване за по-голяма пълнота.

6.2.2.1. Бъбречно ангажиране

По отношение на бъбречното ангажиране се установи статистически значима асоциация с rs172378, както следва: алелен – OR=3,96 (95%CI 1,53 - 10,23), $p=0,005$; рецесивен -

OR=10,86 (95%CI (1,29 - 91,58), p=0,028; кодоминантен (GG/AA) - OR=14,25 (95%CI 1,47 - 138,28) и адитивен – OR=4,78 (95%CI 1,31 - 17,45), p=0,018. Вариантният G-алел на rs172378 и GG-генотипът се срещат по-често у пациентите с ЛН, отколкото у тези, които нямат бъбречно ангажиране: G-алелът е с честота 64% сред болните с ЛН и 31% сред тези, които нямат ЛН. 48% (19 болни) от пациентите с ЛН са хомозиготни по вариантният алел срещу един пациент без бъбречно засягане (0,08%) хомозиготен носител на G-алела.



Разпределение по генотипове на rs172378 при пациенти със СЛЕ според бъбречното ангажиране

6.2.2.2. Ставна, кожна, хематологична, неврологична форма и серозит

Не се установи асоциация между който и да е от подбраните полиморфизми и кожното, ставното и хематологичното засягане. С неврологична форма е само един от 53-мата пациенти със СЛЕ, а със серозит – шестима. По отношение на серозита се установяват набелязани асоциации с почти всички SNP, които отдаваме на малкия брой пациенти.

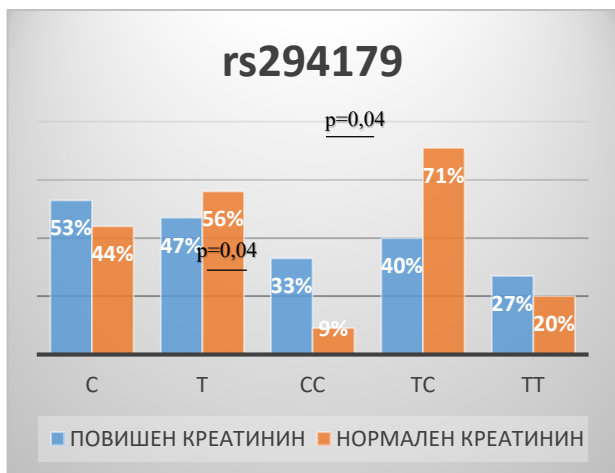
6.3. Лабораторни характеристики

Не се демонстрират асоциации между алелното и генотипното разпределение на петте изследвани SNP и

анализираните лабораторни показатели при пациентите със СЛЕ. Единствената асоциация се установява по отношение на креатинина.

6.3.1. Креатинин

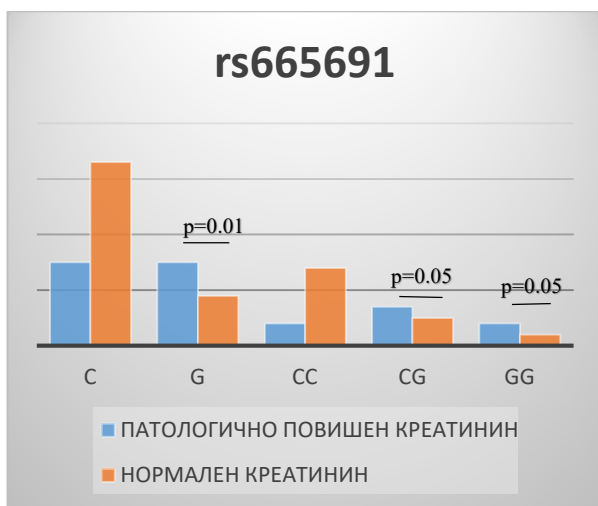
При разделянето на пациентите със СЛЕ на две групи според стойностите на серумния креатинин (пациенти с патологично повишен креатинин ($>97\mu\text{mol/l}$ за жените и $>115\mu\text{mol/l}$ за мъжете, и такива с нормални стойности) се установи зависимост между генотипното разпределение на rs294179 и абнормно повишения креатинин. Значително повече пациенти с повишени стойности на креатинина са носители на СС-генотип (33%) от тези с нормални стойности (9%), $p=0,04$. Обратно, голяма част от пациентите с нормални стойности на креатинина са хетерозиготи по този полиморфизъм (71%) срещу 40% от болните с повишен креатинин, $p=0,04$.



Алелно и генотипно разпределение на rs294179 според нивата на серумния креатинин при болни със СЛЕ

В подгрупата на пациентите с бъбречно ангажиране от СЛЕ (40 от общо 53 болни) тази зависимост се запазва само по отношение на СС-генотипа.

В тази подгрупа обаче се манифестира връзка с друг полиморфизъм –rs665691. По-голяма част от болните, носители на G-алел и GG-генотип на rs665691, са с патологично повишен серумен креатинин за разлика от тези, носители на C-алел и СС-генотип. За алелите процентите са 63% срещу 31%, $p=0,01$, а на генотипно ниво - 22% срещу 58% при тези с CG-генотип ($p=0,05$) и срещу 67% при тези с GG-генотип ($p=0,05$).



Алелно и генотипно разпределение на rs665691 според нивата на серумния креатинин в подгрупата пациенти с ЛН

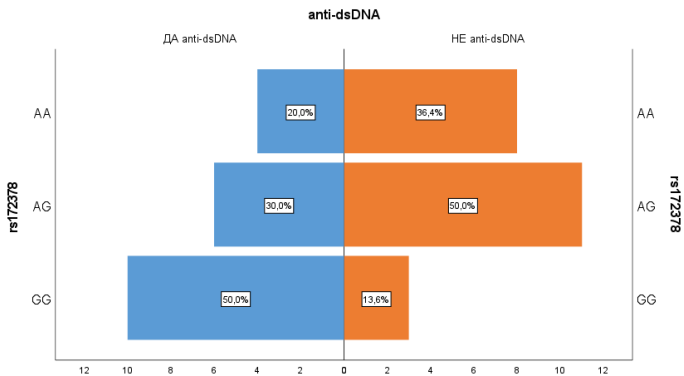
Добавен в анализа като допълнителна ковариационна променлива полът на пациентите не оказва влияние върху горната зависимост, при изчислена статистическа значимост на взаимодействието $p=0,45$, въпреки характерното полово разпределение на rs665691, установено за ЛН.

6.4. Имунологични характеристики

При анализа на имунологичните характеристики, зависимост е установена единствено по отношение на носителството на anti-dsDNA и нивата на C3 и C4 комплементните протеини.

6.4.1. Антитела срещу двойноверижна ДНК

От всички изследвани пет SNPs взаимовръзка с антителата срещу двойноверижната ДНК (anti-dsDNA) демонстрира само rs172378. Честотата на G-алела е значимо по-висока в групата пациенти с патологично повишени стойности на anti-dsDNA антителата в сравнение с пациентите със СЛЕ без такива антитела – 65% срещу 35%. G-алелът се асоциира с носителство на anti-dsDNA антитела с OR=2,95 (95%CI: 1,21 - 7,18), $p=0,017$. Същото важи и за GG-генотипа, за който се изчислиха статистически значими OR (95%CI) при използването на рецесивен и кодоминантен (GG/AA) модели на унаследяване – съответно OR=6,33 (95%CI: 1,41 - 28,39), $p=0,016$ за първия и OR=6,67 (95%CI: 1,14 - 38,83), $p=0,035$ за втория. 50% от носителите на anti-dsDNA са носители на GG-генотип, за разлика от 13,6% от пациентите, при които не се откриват тези антитела.



Разпределение по генотипове на rs172378 при пациенти със СЛЕ според носителството на anti-dsDNA.

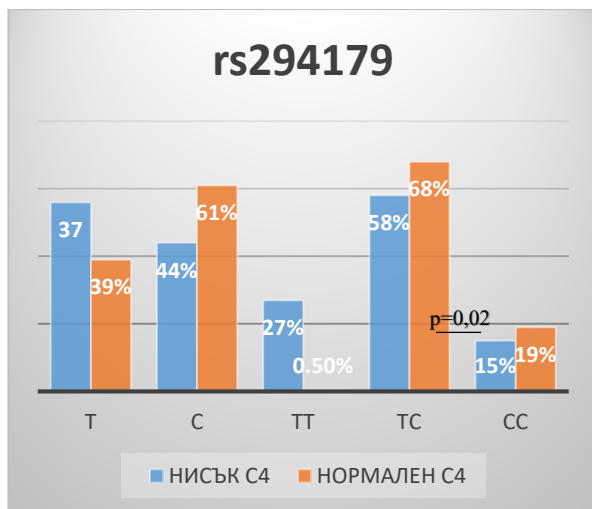
Асоциационният анализ демонстрира и друга евентуална асоциация между носителството на anti-dsDNA антитела и хетерозиготното носителство на rs682658 и rs294179. Изглежда пациенти с генотип GT за rs682658 и TC за rs294179 в изследваната кохорта по-рядко синтезират anti-dsDNA от носителите на другите два генотипа със съотношение на шансовете $OR=0.21$ (95%CI: 0,06 - 0,80), $p=0,018$ и $OR=0,18$ (95%CI: 0,04 - 0,73), $p=0,012$.

6.4.2. Фактори на комплемента

Асоциация с ниски стойности на комплементните компоненти C3 и C4 при болните със СЛЕ не демонстрира нито едно от изследваните SNPs. Единствено следва да се отбележи, че от всички пациенти с нормални нива на C4 (19 на брой), само един е носител на ТТ-генотипа на rs294179.

Малко по-различно стоят нещата, когато се анализира само подгрупата пациенти с бъбречно ангажиране, в която попадат повечето от пациентите с понижени стойности на някой от факторите на комплемента (33 от общо 36 болни с нисък комплемент са с ЛН).

Когато пациентите с ЛН се разделят на две групи според стойността на C4 (понижена/нормална) се установява асоциация на ТТ-генотипа на rs294179 с понижени стойности на C4, $p=0,02$.



Алелно и генотипно разпределение на rs294179 при пациентите с ЛН според нивата на C4

6.5. Хистоморфологични характеристики на подгрупата пациенти с ЛН

Не се установиха асоциации между алелните и генотипните разпределения на петте изследвани SNP и хистологичния клас на ЛН, нито с хистопатологичните индекси за активност и хроничност на нефрита.

Асоциациите на петте SNPs с изследваните параметри у пациентите със СЛЕ, демонстрирани в проведеното проучване, могат да се обединят в три групи: 1/ полови различия в генотипните разпределения; 2/ асоциации на rs172378 с някои клинично-имунологични детерминанти на по-тежко протичане и 3/ асоциации на rs294179.

Не се позитивира връзка между генотипните честоти на полиморфизмите и изчислените индекси на болестна активност и причинена от болестта увреда (съотв. BILAG score SLICC/ACR DI). Такава не се установи и с хистологичния клас

на ЛН, протеинурията, уринния седимент, нито с хистопатологичните индекси за активност и хроничност.

Полови различия се установяват в генотипните разпределения на rs665691, rs682658 и rs292001, но те следва да се тълкуват в контекста на относително малкия брой пациенти, включени в проучването и доминирането на женския пол в кохортата.

Установява се, че rs172378 се асоциира не само със СЛЕ в сравнение със здрави индивиди, но и с някои детерминанти на по-тежко протичане – по-ранно начало, бъбречно ангажиране и носителство на anti-dsDNA. Тези резултати не са изцяло нови в научната литература.

В своето проучване Namjou et al. (Namjou B, 2009) макар да не откриват асоциация на rs172378 със СЛЕ, установяват, че А-алелът се асоциира с по-леко протичане на СЛЕ с фоточувствителност и без ЛН, както и може да се нарече протективен срещу ЛН и ниски нива на С3 фактор на комплемента, т.е G-алелът се асоциира с по-тежко протичащ СЛЕ, с ЛН и ниски нива на С3.

Обобщените асоциации, които rs294179 демонстрира в проведеното от нас изследване, се установяват само в подгрупата на болните с ЛН и са следните - хомозиготните носители на вариантният алел (СС-генотип) са с по-ранно начало на заболяването от останалите пациенти и в болшинството си са с патологично повишени стойности на креатинина, докато хомозиготните носители на дивия тип (ТТ-генотип) в по-голямата си част са с патологично понижени стойности на С4. Така докладваните резултати са твърде противоречиви, но в литературата липсват научни данни за сравнение.

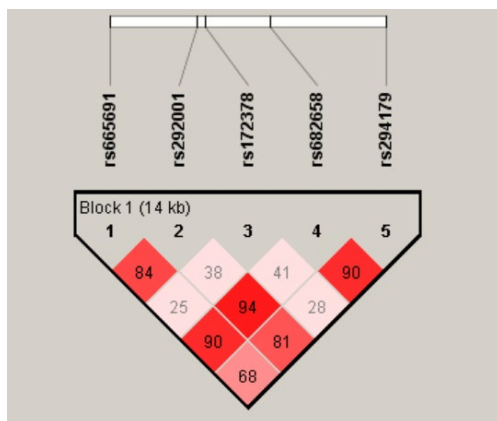
И двата полиморфизма, асоциирани с болестните прояви на СЛЕ (rs172378 и rs294179), демонстрират и връзка с липсата на серозит като клинична проява. Тази зависимост трябва да се

тълкува с повишено внимание, тъй като болните със серозит са много малко в нашето изследване (общо 6 пациенти).

7. НЕРАВНОВЕСНА ВРЪЗКА, ХАПЛОТИПЕН АНАЛИЗ

7.1. Неравновесна връзка между подобрите SNP в изследваната кохорта

Като последна стъпка в настоящата работа с помощта на програма Haploview 4.2 се оцени неравновесната връзка (LD) между петте подобрани SNPs при всички изследвани в нашето проучване индивиди (болни с РА, болни със СЛЕ и здрави доброволци), конструира се LD plot и се изчислиха показателите за неравновесна връзка LOD, D' и r^2 .



LD plot с цветно кодиране на петте подобрани SNPs в цялата група изследвани индивиди (болни с РА, болни със СЛЕ и здрави доброволци) (вж табл.4.2.9 от Материали и методи). В цветно кодираните квадрати е дадена стойността на $D' \times 100$

Табл. 5.7.1. Показатели на неравновесната връзка D' , LOD , r^2 и разстояния между петте SNPs

	rs292001	rs172378	rs682658	rs294179
rs665691	4,6kb 0,84 31,21 0,552	5,0kb 0,25 2,61 0,055	8,4kb 0,903 30,74 0,538	14,5kb 0,681 18,32 0,37
rs292001		0,4kb 0,383 6,62 0,13	3,8kb 0,94 26,29 0,449	9,9kb 0,811 21,92 0,41
rs172378			3,3kb 0,417 4,44 0,097	9,4kb 0,283 2,42 0,056
rs682658	разстояние D' LOD r^2			6,1kb 0,9 36,78 0,629

От тях личи, че висока степен на неравновесно унаследяване се установява между rs665691 и rs682658 ($D'=0,903$, $r^2=0,538$), rs665691 и rs292001 ($D'=0,840$, $r^2=0,552$), rs292001 и rs682658 ($D'=0,940$, $r^2=0,449$), rs292001 и rs294179 ($D'=0,811$, $r^2=0,410$) и rs682658 и rs294179 ($D'=0,900$, $r^2=0,629$). В по-малка степен такава съществува и между rs665691 и rs294179 ($D'=0,681$, $r^2=0,370$) като се има предвид, че те са разположени най-далеч един от друг (на разстояние 14,5kb). Тези резултати в голяма степен се потвърждават от много други проучвания:

1/ сред азиатци са докладвани следните стойности на D' и r^2 : $D'>0,998$ и $r^2>0,998$ (между rs665691 and rs292001),

$D' > 0,973$ и $r^2 > 0,983$ (между rs292001 и rs682658), $D' > 0,975$ и $r^2 > 0,983$ (между rs665691 и rs682658) (Yao Q, 2017);

2/ в различните европейски кохорти, включени в базата данни Ensembl (табл. 5.7.2), в която са генотипизирани 5 различни кохорти с европейски произход (Utah residents with Northern and Western European Ancestry; Finnish in Finland; British in England and Scotland; Iberian population in Spain; Toscani in Italy);

3/ у български здрави индивиди се потвърждава установената от нас неравновесна връзка между rs292001 и rs294179 ($D' = 0,842$ и $r = 0,653$), но нивата на скаченост между rs172378 и rs292001 са по-високи ($D' = 0,926$, $r = -0,368$) от отчетените в нашето изследване (Radanova M., 2015).

Rs172378 демонстрира много по-ниски стойности на показателите за неравновесна връзка, т.е. той се унаследява в голяма степен независимо от останалите. Предвид това хаплотипния анализ се осъществи без него.

По отношение на неравновесното унаследяване на rs172378 резултатите ни са по-различни от повечето публикувани в литературата. Например, описана е неравновесна скаченост между rs665691 и rs172378 у афро-американци ($D' = 0,97$, $r^2 = 0,70$), латино-американци ($D' = 0,99$, $r^2 = 0,88$) (Namjou B, 2009) и азиатци ($D' = 0,998$, $r^2 = 0,88$) (Сао CW, 2012). Това вероятно не може да бъде отнесено към нашите резултати, предвид сериозните междурасови разлики в алелните честоти на тези два полиморфизма – вариантният алел за европейците е основен в другите популации.

Други автори обаче установяват и у европейска раса такива неравновесни връзки на rs172378 с околните му SNPs. Rafiq et al съобщават за висок LD между rs172378 и rs292001 ($r^2 > 0,8$) в Seattle SNP Project. Техните данни се потвърждават и

от уеб-базираните данни на Ensembl Project на Cambridge, UK , където за всяка от гореизброените кохорти неравновесната връзка между rs172378 и всеки друг от подбраните SNP е почти пълна ($D' > 0,944$ и $r^2 = 1$).

Тези различия може и най-вероятно се дължат на разлики между българската популация и изброените европеидни кохорти. В единственото българско проучване за честотата на C1q полиморфизми у здрави индивиди, Radanova et al (Radanova M., 2015) установяват, че честотата на разпределение по алели и генотипи на rs172378 не е чак толкова близка до тази на цитираните по-горе европейски кохорти, колкото е до докладваната за една гръцко-кипърска кохорта (Dardiotis E, 2009). За съжаление, за нея авторите не предоставят LD данни. Друга причина за разликата в унаследяването на rs172378 е неговата тясна асоциация с автоимунните заболявания, които изследваме. Възможно е да се предположи, че при тези пациенти е намесена допълнителна транскрипционна регулация. Например, Petry et al. съобщават, че при всички случаи на редки кодиращи мутации, водещи до дефицит на C1q, присъства и rs172378 (Petry F, 2005).

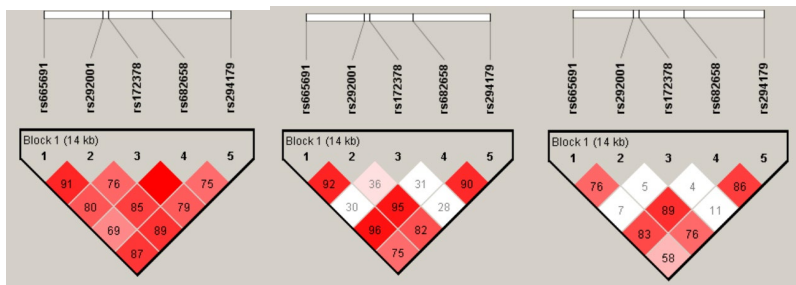
Показатели на неравновесната връзка D' и r^2 сред нашата кохорта и пет европейски кохорти, изследвани в 1000 Genome Project

SNPs/ D' , r^2	Изследвана кохорта	Финландци*	Тосканици*	Жители на Юта*	Британци*	Иберийци*
rs665691 – rs292001	0,840, 0,552	0,999, 0,797	0,999, 0,841	0,999, 0,781	0,999, 0,743	0,937, 0,783
rs665691 – rs682658	0,903, 0,538	1, 0,817	0,999, 0,755	0,999, 0,784	1, 0,915	0,978, 0,763
rs665691 – rs294179	0,681, 0,370	0,596, 0,320	0,845, 0,602	0,803, 0,618	0,903, 0,746	0,842, 0,588

rs292001 – rs682658	0,940, 0,449	0,999, 0,651	0,999, 0,635	0,999, 0,612	0,999, 0,680	0,975, 0,678
rs292001 – rs294179	0,811, 0,410	0,559, 0,276	0,847, 0,510	0,783, 0,460	0,876, 0,521	0,851, 0,536
rs682658 – rs294179	0,900, 0,629	0,817, 0,492	0,980, 0,858	0,976, 0,779	0,910, 0,828	0,901, 0,782
rs665691 – rs172378	0,250, 0,055	0,999, 0,797	0,999, 0,841	0,999, 0,781	0,999, 0,761	0,978, 0,806
rs292001 – rs172378	0,383, 0,130	1, 1	1, 1	1, 1	1, 0,977	1, 0,944
rs682658 – rs172378	0,417, 0,097	0,999, 0,651	0,999, 0,635	0,999, 0,612	0,999, 0,696	0,999, 0,672
rs294179 – rs172378	0,283, 0,056	0,559, 0,276	0,847, 0,510	0,783, 0,459	0,878, 0,536	0,871, 0,529

Легенда: Finnish in Finland (финландци), Toscani in Italy (тосканци), Utah residents with Northern and Western European ancestry (жители на Юта), British in England and Scotland (британци) и Iberian in Spain (иберийци).

За да интерпретираме тези резултати, констриуирахме подобни на горния LD плотове поотделно за всяка група – само здрави индивиди, само пациенти с РА и само пациенти със СЛЕ. От тях става ясно, че в групата на здравите индивиди и петте полиморфизма са в неравновесна връзка и се унаследяват до голяма степен скачено. Rs172378 се унаследява отделно от останалите SNP само в групите на болните, и то при пациентите със СЛЕ – в по-голяма степен, отколкото при тези с РА. Може да се заключи, че липсата на скаченост е в пряка връзка със силната асоциация, която rs172378 демонстрира с РА, и още повече със СЛЕ.



LD plot с цветно кодиране на петте подобрани SNPs последователно отляво надясно – само при здравите индивиди, в групата на пациентите с РА и в групата пациенти със СЛЕ. В цветно кодираните квадрати е дадена стойността на $D' \times 100$

7.2. Хаплотипен анализ на всички изследвани индивиди

Установяват се 10 хаплотипа (rs665691-rs292001-rs682658-rs294179), които са общи за цялата кохорта. Два от тях (C-G-G-T и G-A-T-C) са особено чести, с кумулативна честота 71,4%, т.е. срещат се при почти $\frac{3}{4}$ от изследваните индивиди. Никой от тях не се асоциира с наличие на едно от двете аутоимунни заболявания (СЛЕ и РА). Няма връзка и с плазмените нива на С1q, нито с демографските показатели (пол и възраст) на всички изследвани индивиди. Останалите осем са с ниска честота и не подлежат на анализ.

Освен това за асоциация с нивата на С1q бе тестван и третия по честота генотип, заради данните, демонстрирани по-долу (за връзката му с нивата на С1q в групата болни от СЛЕ). Асоциация не се потвърди.

7.3. Анализ на хаплотипните асоциации с РА

Haplotype	Freq.	Case, Control Ratios	Chi Square	p value
Haplotype Associations				
[-] Block 1				
CGGT	0.433	0.437, 0.430	0.011	0.9146
GATC	0.351	0.421, 0.291	4.593	0.0321
CGTC	0.064	0.035, 0.089	3.063	0.0801
GGTC	0.045	0.043, 0.047	0.03	0.8618
GATT	0.027	0.026, 0.028	0.009	0.9253
GGTT	0.023	0.018, 0.028	0.291	0.5898
CGGC	0.019	0.010, 0.027	0.986	0.3208
CGTT	0.011	0.000, 0.020	2.22	0.1363

Сравнителен анализ на хаплотипното разпределение на rs665691, rs292001, rs682658 и rs294179 между пациентите с РА и контролната група здрави индивиди (Haploview 4.2)

След това се сравни хаплотипното разпределение между болните само от РА и здравите. При направения хаплотипен анализ са установени общо осем хаплотипа, общи за болни с РА и здрави. Най-често срещаните хаплотипове (rs665691-rs292001-rs682658-rs294179) при изследваните от нас индивиди са два (C-G-G-T и G-A-T-C, същите като за цялата кохорта), с кумулативна честота 0,784. Те се срещат при повече от $\frac{3}{4}$ от изследваните общо 125 индивида (58 болни с РА и 67 здрави контроли). Вторият от тях (G-A-T-C) се асоциира с РА с $\chi^2=4,59$ или изчислено OR (95%CI) = 1,78 (1,06 – 3,01), p=0,03. Никой от тях не корелира със стойностите на С1q, нито с някоя от другите клинични, лабораторни и имунологични характеристики на изследваните индивиди, нито с отговора към лечение. Другите шест хаплотипа са с много ниска честота и не се асоциират с РА.

7.4. Анализ на хаплотипните асоциации със СЛЕ

Haplotype	Freq.	Case, Control Ratios	Chi Square	p value
Haplotype Associations				
[-] Block 1				
CGGT	0.387	0.338, 0.425	1.858	0.1728
GATC	0.253	0.209, 0.287	1.925	0.1653
CGTC	0.111	0.144, 0.086	2.017	0.1556
GGTC	0.052	0.057, 0.048	0.104	0.7469
CGTT	0.034	0.051, 0.021	1.541	0.2145
GGTT	0.032	0.037, 0.028	0.148	0.7007
GATT	0.029	0.032, 0.028	0.035	0.8517
CATC	0.028	0.051, 0.009	3.79	0.0515
CGGC	0.026	0.019, 0.031	0.291	0.5897
GGGT	0.025	0.034, 0.019	0.498	0.4806

Сравнителен анализ на хаплотипното разпределение на rs665691, rs292001, rs682658 и rs294179 между пациентите със СЛЕ и контролната група здрави индивиди (Haploview 4.2)

Сравни се и хаплотипното разпределение между болните със СЛЕ и здравите. Общите хаплотипи са 10 на брой, от които най-разпространени са три (двата коментирани по-горе - C-G-G-T, G-A-T-C; и C-G-T-C).

7.4.1. C-G-G-T

C-G-G-T е хаплотипът с най-голяма честота сред пациентите със СЛЕ (33,8%). Той не корелира с плазмените нива на C1q, нито с наличието на заболяване, но се установяват някои зависимости по отношение на клинично-имунологичния статус на пациентите.

В групата пациенти със СЛЕ anti-Sm антитела са изследвани изобщо при 19 пациента, от които само 2 (10,5%) са носители на anti-Sm в патологично повишени титри. И двамата anti-Sm положителни болни не са носители на C-G-G-T хаплотипа.

Освен това в групата болни с клинична проява серозит, от общо 6 болни със серозит петима (83%) са носители на C-G-G-T хаплотипа като четирима (две трети от всички) го носят в хомозиготно състояние.

Тези зависимости са изведени при малък брой на изследваните болни и следва да се интерпретират с повишено внимание.

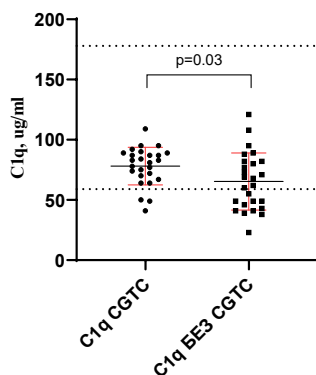
7.4.2. G-A-T-C

Вторият по честота при пациентите със СЛЕ хаплотип (21%) не корелира с плазмените нива на C1q, наличието на заболяване или някоя от останалите характеристики на болните.

7.4.3. C-G-T-C

Третият хаплотип е с честота сред болните от СЛЕ 14.4%. Това е единственият хаплотип, при който се установява асоциация с нивата на C1q като носителите му имат по-високи плазмени нива на C1q от носителите на други хаплотипи – средно (SD) 78,15(15,6) $\mu\text{g/ml}$ срещу 65,3(23,8), $p=0,03$.

НИВА НА C1q СПОРЕД ХАПЛОТИП CGTC



Нива на С1q при пациенти със СЛЕ според носителство на хаплотип CGTC

Освен това всичките четирима болни, у които се установяват SSA/Ro автоантитела в патологични титри, са носители на този хаплотип.

V. ОГРАНИЧЕНИЯ НА ПРОУЧВАНЕТО

Настоящото проучване има и определени слаби страни, най-важната от които е малкият брой изследвани индивиди – 111 болни и 67 здрави. Това намалява силата му за откриване на статистически различия и особено по отношение на генетичните анализи води до неуместно подценяване на някои асоциации и невярно подчертаване на други. Необходима е репликация на получените резултати в нова, независима и по-голяма по численост кохорта, както и набиране на по-голяма контролна група здрави индивиди.

Друг голям недостатък е едномоментният крос-секционен дизайн на проучването. Едно проспективно проучване на голяма група здрави/болни индивиди би демонстрирало асоциация между SNP и антияло-генеза, както и промяната на нивата на C1q във времето и при различни състояния.

Също така е уместно в последващо изследване да се стратифицират болните по активност и тежест на заболяването, което би позволило при един по-голям брой изследвани индивиди, детайлни подгрупови анализи за разкриване на евентуална хетерогенност на заболяванията.

Друг недостатък, който отчитаме е, че почти не са изследвани пациенти с ранно заболяване и скоро поставена диагноза. Една от причините за това е, че класификационните критерии, които бяха заложили (ACR, 1987г за РА и ACR, 1991г за СЛЕ), са твърде строги и обвързани с продължителността на болестния процес.

От имунологична гледна точка също би било редно да бъдат изследвани и други клинично релевантни антители като антителата срещу мутантния цитрулиниран виментин

(anti-MCV) и някои от карбамиланите протеини при РА, а anti-CCP2 антителата да се заменят с anti-CCP3. По отношение на пациентите със СЛЕ като недостатък на дизайна на проучването може да се изтъкне факта, че не бе заложено изследване на автоантителата срещу C1q (anti-C1q). Това би разкрило евентуална асоциация между полиморфизмите и автоантигеността на C1q, както и би отговорило колко от случаите с ниски нива на C1q можем да отдадем на свързване с автоантитела.

Предвид всичко гореизложено можем да заключим, че настоящата работа е добра отправна точка за по-детайлни и мащабни асоциативни, а защо не и големи популационни, проучвания на генетичните варианти на различните комплементни компоненти, тяхното влияние върху автоимунитета и евентуалните клинични приложения на тези знания.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В гореописаното крос-секционно проучване от типа случай/контрола бе поставена цел да се изследва кохорта български индивиди (болни от РА, болни от СЛЕ и здрави контроли) за наличието на пет подбрани единични нуклеотидни полиморфизма в генния клъстер на C1q компонента на класическия комплементен път, да се измерят нивата им на C1q и да се потърсят асоциации с болестните прояви.

В изследваната кохорта болни от СЛЕ и РА, типични за клиничната практика, се установи комплексна връзка с петте изследвани полиморфизми в C1q генния клъстер. rs172378 се асоциира и с двете заболявания (вероятно на база на връзка с аутоимунитета изобщо), и то до степен, променяща скаченото му унаследяване с другите четири SNPs, демонстрирано при здрави индивиди. rs292001 се асоциира с РА, а rs665691 е по-чест при болните от РА, отколкото при тези със СЛЕ.

Зависимости, макар и донякъде противоречиви, се откриват и с някои болестни аспекти. rs665691 и в по-малка степен rs294179 се асоциират с по-високи нива на C1q и със синтез на АСРА у пациентите с РА, очертавайки генетично и патогенетично различна подгрупа в рамките на самата болест. При пациентите със СЛЕ rs172378 освен със самото заболяване се свързва и с някои от детерминантите на тежкото му протичане – по-ранно начало, бъбречно ангажиране, синтез на anti-dsDNA антитела. Rs294179 изглежда играе роля в подгрупата на ЛН, където СС-генотипът му се асоциира с по-ранно начало и патологично

повишени стойности на креатинина, а ТТ-генотипът му – с болестно понижени нива на С4.

Въпреки ограниченията на проучването, можем да заключим, че то очертава многолика и обещаваща етиопатогенетична връзка на С1q генните полиморфизми с изследваните две автоимунни заболявания, която има място в комплексния им анализ и допринася за детайлното разбиране на процесите, определящи изявата им.

VII. ОБОБЩЕНИ ОСНОВНИ ИЗВОДИ

1. Пациентите, включени в проучването, са предимно жени, в средна/зряла (за РА) и млада (за СЛЕ) възраст, с дългогодишно заболяване и следните болестни параметри, често срещани в реалната клинична практика:

а. Болни от РА – значителна част са серопозитивни според RF (69%) и само около половината (52%) АСРА положителни; 55% са с ерозивно заболяване и голям дял – с повишени острофазови показатели (67% според СУЕ, 64% според CRP), но релативно малка част провеждат или са насочени за лечение с биологичен медикамент (53,4%);

б. Болни от СЛЕ – предимно са със ставно и бъбречно засягане, минимална част – с неврологична форма и серозит; средно са с по 1т от SLICC/ACR DI и сравнително равномерно разпределени по болестна активност според BILAG; при значителна част се установява ниско ниво на С4 (63,5%) и нормално – на С3 комплементен фактор (92%); в подгрупата болни с ЛН има тенденция към преобладаване на IV хистологичен клас (53%), а със значителна протеинурия (>0,5г/л) са 62% от болните.

2. Генотипно разпределение на изследваните С1q-SNPs.

а. Вариантният G-алел и GG-генотипът на rs172378 се асоциират с РА и още повече със СЛЕ, т.е. с наличието на аутоимунно заболяване;

б. AA-генотипът на rs292001 се асоциира с РА;

в. rs665691 и rs292001 показват значителни разлики в генотипното си разпределение между болните от РА и болните от СЛЕ като вариантният G-алел и съдържащите го

генотипове (GG и CG) на rs665691 и вариантният А-алел и АА-генотипът на rs292001 са по-чести при болните от РА;

в. rs682658 и rs294179 не демонстрират разлики в алелното и генотипното си разпределение между различните изследвани групи, което показва липса на асоциация със заболяванията в настоящото проучване.

3. Плазмени нива на С1q.

а. Нивата на С1q са значително по-ниски при пациентите с РА и СЛЕ, отколкото у здравите контроли;

б. Нивата на С1q са най-ниски у болните с ЛН като само при тях (в 35%) те са и патологично понижени;

в. Ниските нива на С1q корелират позитивно с бъбречно ангажиране и с нивата на С3 и С4 у пациентите със СЛЕ;

г. Нивата на С1q не корелират с нито един от останалите изследвани параметри в нито една от групите, в това число индексите за активност и увреда (вкл. хистологичните за ЛН) и не се променят под влияние на провежданото лечение.

4. Генотипни разпределения на изследваните С1q-SNPs и нива на С1q.

а. При болните от РА носителите на GG-генотип на rs665691 и на CC-генотип на rs294179 имат по-високи нива на С1q от носителите съответно на CC- и TT-генотиповете; носителите на GG-генотип на rs682658 имат по-ниски нива на С1q от носителите на TT-генотип;

б. При болните от СЛЕ и здравите индивиди зависимост не се установява.

5. Изследвани С1q-SNPs и болестни характеристики при пациенти с РА.

а. G-алелът и съдържащите го генотипове (GG и CG) на rs665691 се асоциират с носителство на АСРА;

б. Носителите на G-алел и GG-генотип на rs665691 са с по-високи нива на C1q и са предимно АСРА положителни. Оформя се генетично и имунологично различна подгрупа сред болните от РА;

в. Не се установява връзка между изследваните полиморфизми и ерозивно заболяване;

г. Не се установява зависимост между изследваните полиморфизми и необходимостта от включване на биологична терапия като резултат от неефективност на конвенционалните синтетични медикаменти.

б. Изследвани C1q-SNPs и болестни характеристики при пациенти със СЛЕ.

а. Вариантният (G) алел и GG-генотипът на rs665691 са по-чести у мъжкия пол, вариантният (G) алел и GG-генотипът на rs682658 са представени повече у женския пол, а AA-генотипът на rs292001 е по-чест у мъжете;

б. Вариантният G алел и GG генотипът на rs172378 се асоциират с по-ранна възраст на начало на заболяването, бъбречно ангажиране на болните от СЛЕ, както и с патологично повишени титри на anti-dsDNA аутоантитела;

в. CC-генотипът на rs294179 е по-чест в групата пациенти с повишен креатинин, а TC-генотипът – при пациентите с нормални стойности на креатинина;

г. В подгрупата пациенти с ЛН CC-генотипът на rs294179 се асоциира с по-ранно начало на заболяването и заедно с G-алела и GG-генотипа на rs665691 - с патологично повишен серумен креатинин, а TT-генотипът

на rs294179 се асоциира с понижени нива на С4 комплементния фактор;

д. Не се установява връзка между полиморфизмите и отговора към провежданото лечение в изследваната кохорта.

7. Хаплотипен анализ.

а. Всички от подбраните пет полиморфизма, с изключение на rs172378, демонстрират висока степен на нервановесно унаследяване и формират един хаплотипен блок;

б. G-A-T-C (rs665691-rs292001-rs682658-rs294179) хаплотипът показва асоциация с РА, но не се асоциира с други характеристики на заболяването, нито с нивата на С1q;

в. C-G-T-C (rs665691-rs292001-rs682658-rs294179) хаплотипът показва асоциация с ниски нива на С1q в пациентите със СЛЕ.

VIII. ПРИНОСИ

Приноси с теоретичен характер

1. Определени са наличието и честотата на пет SNPs в C1q генния клъстер – rs665691, rs292001, rs682658, rs172378 и rs294179 - при болни от РА, СЛЕ и здрави индивиди от българска популация и са анализирани различията между групите.

2. Анализирани са асоциациите им с клинични, лабораторни, имунологични и терапевтични аспекти на заболяванията.

3. Количествено е определено нивото на C1q при болни от РА и СЛЕ, както и у здрави контроли. Сравнени са плазмените му нива между трите групи и е анализирана връзката им с клинични, демографски, лабораторни, имунологични и терапевтични аспекти на заболяванията.

4. Изследвана е връзката между алелните и генотипните разпределения на петте изследвани SNPs и нивата на C1q у пациентите с РА и СЛЕ, както и у здравите индивиди.

5. Оценена е неравновесната връзка между петте изследвани SNPs и като е конструиран LD плот са анализирани асоциациите на най-честите хаплотипове с РА, СЛЕ и техните характеристики.

Приноси с практически характер

По отношение на Ревматоиден артрит е установено:

1. Ревматоидният артрит е генетично разнородно заболяване, свързано със SNPs в гена за C1q:

а. Намерени са полиморфизми в гена за А веригата на C1q, които се свързват с Ревматоиден артрит

- АА-генотип на rs292001

- G-алел и GG-генотип rs172378

б. Носителство на АСРА се свързва с rs665691 – SNP, който се намира в същия ген, но е различен от асоциираните с РА.

2. Няма връзка между изследваните полиморфизми и наличието на ерозии или отговора към провежданото лечение.

По отношение на Системен лупус еритематодес е установено:

1. СЛЕ е свързан с G-алела и GG-генотипа на rs172378 от гена за А веригата C1q.

2. Rs172378 се свързва и с по-ранно начало, бъбречно ангажиране, носителство на anti-dsDNA.

3. Rs294179 се свързва с нивата на креатинин, а в подгрупата пациенти с бъбречно ангажиране - и с възрастта на начало и нивата на C4 комплементния фактор.

4. Генотипните честоти на два от полиморфизмите – rs665691 и rs292001 - демонстрират значителни разлики между болните от РА и от СЛЕ.

Приноси с оригинален характер

1. За първи път в България е проведено асоциативно проучване на SNPs в генния клъстер на C1q сред пациенти с РА.

2. За първи път са установени асоциации на rs665691 и rs682658 SNPs в генния клъстер на C1q у български пациенти със СЛЕ.

3. За първи път са изследвани нива на C1q у български пациенти с РА, сравнени са с нивата им при болни от СЛЕ и при здрави индивиди и са проучени корелациите им с различните характеристики на заболяванията.

4. За първи път е проведено асоциативно проучване на хаплотипно ниво на изследваните SNPs с нивата на С1q, с РА, както и с клинично-имунологичните характеристики на заболяването.

Приноси с потвърдителен характер

1. Потвърдено е алелното и генотипното честотно разпределение на rs292001, rs172378 и rs294179 при здрави индивиди от българската популация.

2. Потвърдено е наличието на асоциация между rs292001 и РА.

3. Потвърдена е асоциацията на rs172378 с ЛН при български пациенти.

**IX. ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С
ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

1. Mariya B. Kosturkova, Mihaylova G, Kadinov VI, Radanova M. The Role Of The Complement System In Rheumatic Diseases. Varna Medical Forum; 2018; 7(2): 18-31. <http://dx.doi.org/10.14748/vmf.v7i2.5494>
2. Mariya B. Kosturkova, Radanova M, Mihaylova G, Kadinov V. Rheumatoid Arthritis and the Complement System. Revmatologija(Bulgaria) 2020; 28(4): 45-58 <https://doi.org/10.35465/28.4.2020.pp45-58>
3. Kosturkova M, Mihaylova G, Radanova M. AB0002 Association of C1q Genetic Polymorphisms with Susceptibility to Rheumatoid Arthritis in Bulgarian Cohort. Annals of the Rheumatic Diseases 2021; 80:1036. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2021-eular.989>