



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“-ВАРНА
ФАКУЛТЕТ „ФАРМАЦИЯ“**

**КАТЕДРА ПО БИОХИМИЯ, МОЛЕКУЛНА
МЕДИЦИНА И НУТРИГЕНОМИКА**

Галя Михайлова Михайлова

**СКРИНИНГ И ФУНКЦИОНАЛЕН АНАЛИЗ НА НОВИ
АНТИ-КОМПЛЕМЕНТНИ АВТОАНТИТЕЛА
В ХОДА НА
СИСТЕМЕН ЛУПУС ЕРИТЕМАТОДЕС**

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

**ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА
СТЕПЕН „ДОКТОР“ ПО НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ
„БИОХИМИЯ“**

Научен ръководител:

Доц. Мария Атанасова Раданова, д.б.

Научен консултант:

Д-р Васил Венциславов Василев, д.м.

Официални рецензенти:

Проф. д-р Виктория Степан Сарафян-Озаян, дм, дмн

Проф. Илия Николов Илиев, д.б.

гр. Варна, 2020

Дисертационният труд е обсъден на заседания на разширен катедрен съвет на катедрата по Биохимия, молекулна медицина и нутригеномика при Медицински университет-Варна и насочен за защита пред научно жури.

Дисертационният труд обхваща 136 страници, 54 фигури и 7 таблици. Цитирани са 217 заглавия.

Дисертантът е асистент в Катедрата по биохимия, молекулна медицина и нутригеномика при Медицински университет-Варна.

Експерименталната работа по дисертационния труд е извършена в Катедрата по биохимия, молекулна медицина и нутригеномика при Медицински университет-Варна и Cordeliers Research Center. Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на.....отчаса в на открито заседание на Научното жури.

СЪДЪРЖАНИЕ

Използвани съкращения	4
Увод	6
Цели и задачи	7
Материали и методи	8
I. Подбор на пациенти с ЛН и здрави доброволци за включване в изследването	8
1. Описание на пациентите с ЛН, включени в изследването	9
II. Препаративни методи	10
1. Пречистване на IgG от човешка плазма	10
2. Подготовка на сефарозна основа за експеримент за разграничаване на анти-C3 и анти-C4 автоантителата	10
III. Аналитични методи	11
Резултати	17
I. Скрининг на плазми от пациенти с ЛН и здрави доброволци за наличие на автоантитела срещу комплементни протеини. Оценка на взаимодействията на намерените анти-комплементни антитела с прицелните им антигени в реално време	17
II. Анализ на отношенията между нивата на известни биомаркери за оценка на активността на лупусната нефропатия и нивата на новооткрити анти-комплементни автоантитела	25
III. Проследяване на промени в нивата на новооткритите анти-комплементни автоантитела в хода на заболяването	43
IV. Изследване на ефекти на анти-комплементните антитела върху физиологичните взаимодействия на прицелните им молекули с техни естествени лиганди (белтъци и клетки)	44
V. Теоретично предсказване на епитопи на някои от установените анти-комплементни автоантитела	53
Обсъждане	57
Заклучение	68
Изводи	70
Приноси	72
Списък на публикации и участия в научни форуми	74
Финансиране	75

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

- ЛН** – лупусна нефропатия (лупусен нефрит)
СЗО – Световна здравна организация
СЛЕ – системен еритематозен лупус
ACR – American College of Rheumatology
Ag-Ab – антиген-антитяло
АНА – антинуклеарни антитела
Анти -C5 – антитела срещу C5 компонента на комплемента
Анти- фактор H – антитела срещу фактор H
Анти-C1 Inh – антитела срещу C1-
Анти-C1q – антитела срещу C1q
Анти-C1r – антитела срещу C1r
Анти-C1s – антитела срещу C1s
Анти-C2 – антитела срещу C2 компонента на комплемента
Анти-C3 – антитела срещу C3 компонента на комплемента
Анти-C4 – антитела срещу C4 компонента на комплемента
Анти-dsDNA – антитела срещу двойноверижна ДНК инхибитор
Анти-фактор В – антитела срещу фактор В
Анти-фактор I – антитела срещу фактор I
Анти-ghB-антитела срещу полипептидната верига ghB, част от глобуларния домен на C1q молекулата
Анти-MBL – антитела срещу манозо-свързващ лектин
BIAG – British Isles Lupus Assessment Group
CR1 – комплементен рецептор 1
CRP – С-реактивен протеин
DAF-Decay-accelerating factor
DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole
EGTA – ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid
ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay
FACS - fluorescence-activated cell sorting
HRP – Horse Reddish Peroxidase
HUVEC – Human Umbilical Vein Endothelial Cells
Ig – имуноглобулин
ISN – International Society of Nephrology
МАС – мембранно-атакуващ комплекс
МАp19 и **МАp44** - MBL-асоциирани протеини
MASP – MBL-асоциирана серин-протеаза

MBL – манозо-свързващ лектин

NeF – нефритен фактор

NPV – негативна предиктивна стойност

OPD – o-Phenylenediamine – орто-фенилендиамин

PBS – фосфатно буфериран физиологичен разтвор

PPV – позитивна предиктивна стойност

RPS – Renal Pathology Society

SLAM – Systemic Lupus Activity Measure

SLEDAI – Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index

SPR - surface plasmon resonance

TPBS - фосфатно буфериран физиологичен разтвор с Tween 20

УВОД

Ролята на автоимунитета и загубата на имунен толеранс към собствени протеини, имат съществено място в настоящите представи за етиологията и патогенезата на системния лупус еритематодес (СЛЕ). Заболяването се характеризира с широкоспектърни органични прояви, множество автоантитела и многофакторна имунологична патогенеза. Лупусната нефропатия е една от най-сериозните, значими и чести прояви на СЛЕ. За пациентите с лупусен нефрит (ЛН) са характерни по-висока заболяемост и смъртност в сравнение със СЛЕ пациентите без бъбречно засягане. ЛН дава отражение върху качеството на живот на пациентите и прогнозата на СЛЕ. Лечението почти винаги е продължително, сравнително често е свързано с множество нежелани последици за пациента и неговите близки и има значими финансови измерения. Предвид тежестта на ЛН, който често води до развитие на бъбречна недостатъчност, и определя дългосрочната прогноза при пациентите, през последните години усилено се търсят биомаркери за ранна диагностика, за по-точна оценка на активността на заболяването, степента на неговата тежест и отговора на терапията.

Основна роля в имунопатогенезата на СЛЕ и ЛН има системата на комплемента, част от вродената имунна защита. Тази роля се разглежда като двустранна: от една страна, активирането на комплементната каскада с включване на механизмите на вродения и придобития имунитет водят до развитие на възпаление, имунен отговор към автоантигени и в крайна сметка персистиращо тъканно увреждане, а от друга – недостатъчното активиране на комплементната каскада води до нарушен клирънс на имунни комплекси и апоптотични клетки с тяхното натрупване и развитие на автоимунитет. Основна роля в придобитите функционални дефицити на комплементната каскада при СЛЕ и ЛН имат автоантителата към компоненти и регулатори на комплемента. Най-важните анти-комплементни автоантитела, които имат патогенетична роля за развитието на СЛЕ и главно на ЛН са анти-C1q антителата. Други автоантитела срещу компоненти на комплементната система, описвани при СЛЕ и ЛН не са достатъчно проучени и тяхното патогенетично и клинично значение на този етап не е напълно изяснено.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на планираното научно изследване е да се установи наличие и да се характеризира функционалната активност на нови автоантитела срещу компоненти и регулатори на системата на комплемента при пациенти с ЛН.

За постигането на тази цел бяха планирани следните научни задачи:

1. Скрининг на плазми от 104 пациенти с ЛН за наличие на автоантитела срещу комплементни протеини. Оценка на взаимодействията на намерените анти-комплементни антитела с прицелните им антигени в реално време.
2. Анализ на отношенията между нивата на известни биомаркери за оценка на активността на лупусната нефропатия и нивата на новооткритите анти-комплементни автоантитела.
3. Проследяване на промени в нивата на новооткритите анти-комплементни автоантитела в хода на заболяването.
4. Изследване на ефекти на анти-комплементните антитела върху физиологичните взаимодействия на прицелните им молекули с техни естествени лиганди (белтъци и клетки).
5. Теоретично предсказване на епитопи на някои от установените анти-комплементни автоантитела.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

I. Подбор на пациенти с ЛН и здрави доброволци за включване в изследването

След получаване на положителна оценка от местната комисия по етика – Комисия по етика на научните изследвания (КЕНИ) при Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“, Варна, включените в настоящото изследване пациенти и здрави доброволци бяха предварително информирани относно целите, задачите и методите на работата и подписаха декларации за информирано съгласие.

Всички пациенти в изследването бяха подбрани по определени критерии от д-р Васил Василев, д.м. от Клиника по Нефрология, УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“ и Клиничен център по Нефрология, Медицински университет – София.

Критериите за включване на пациентите в изследването бяха:

1. Диагностициран системен лупус еритематодес на базата на анамнеза, клиничен преглед, клиничко-лабораторни и имунологични изследвания, съгласно критериите на American College of Rheumatology (ACR) (изпълнени минимум 4 от 11 критерия), при който е налице лупусен нефрит (установявана понякога персистираща протеинурия от 0,5 g/24 h или по-висока и/или наличие на еритроцитурия, левкоцитурия или клетъчни цилиндри при микроскопско изследване на уринен седимент, при изключване на друго заболяване, което може да бъде причина за уринните промени). Лупусният нефрит трябва да бъде доказан хистологично по време на пролежаване в Нефрологична клиника;
2. Възраст над 18 год.;
3. Изявено желание за участие в изследването и подписано информирано съгласие.

За контролна група в изследването бяха включени 81 здрави доброволци. Критериите за включване на здравите доброволци в изследването бяха:

1. Да са клинично здрави; без наличие на възпалителни инфекциозни или автоимунни заболявания, както и без активно бъбречно заболяване по анамнестични, клинични, лабораторни и документални данни;
2. Възраст над 18 год.;

3. Изявено желание за участие в изследването и подписано информирано съгласие.

Разпределението по пол сред доброволците беше 56 (77,8%) жени и 16 (22,2%) мъже на средна възраст $44,85 \pm 15,73$ год. Средната възраст при мъжете доброволци беше $42,30 \pm 14,63$ год., а средната възраст при жените доброволци беше $41,40 \pm 15,96$ год., като липсваше сигнификантна разлика във възрастта между мъже и жени ($p=0,625$).

От всеки пациент и здрав доброволец беше вземано еднократно по 6 ml кръв и отделената кръвна плазма беше замразявана при -20°C за последващите анализи.

При 39/104 (37,5%) от пациентите с ЛН бяха налице между 3 и 11 проби, събирани по повод на дисертационния труд на д-р Василев (член на научния екип на проекта) на тема: „Автоантитела срещу компоненти на комплемента при пациенти с лупусна нефропатия“. Пробите обхващат проследяване на заболяването за предходен период от средно 13,0 (от 6,0 до 25,0) месеца за периода от 12.2005 г. 09.2016 г.

Настоящото изследване беше планирано като проспективно едноцентрово кроссекционно, включващо пациенти с диагностициран СЛЕ и ЛН. Наличието на проби от същите пациенти, събрани в предходен период по повод разработване на дисертацията на д-р Василев и съгласно изискванията на чл. 203. (1) от Закона за здравето, позволи изследването да включи и аспект на лонгитудинално кохортно проучване на пациентите със СЛЕ и ЛН.

1. Описание на пациентите с ЛН, включени в изследването

Пациентите, включени в настоящия дисертационен труд бяха 104. Един пациент имаше морфологични промени Клас VI; 18 пациенти бяха диагностицирани с Клас V; 32 пациенти бяха с Клас IV; 11 пациенти имаха Клас III; 33 пациенти имаха Клас II и 5 пациенти - Клас I ЛН.

Активността на ЛН беше определена според LN British Islet Lupus Assessment Group (BILAG) Renal score (Hay et al., 1993; Isenberg et al., 2005), включващ пет категории: категория А, отговаряща на тежко заболяване, категория В - умерено бъбречно заболяване, категория С - стабилно, леко заболяване, категория D - неактивно предходно бъбречно заболяване, категория Е -отсъствие на бъбречно заболяване. Всички пациенти бяха разделени в описаните категории на BILAG Renal score както следва: 26 пациенти (25,0%) с категория А ЛН, 32 (30,77%)

с категория В ЛН, 19 (18,27%) с категория С ЛН и 27 (25,96%) с категория D ЛН. В изследваната от нас кохорта нямаше пациенти, които да попадат в категория Е ЛН.

СЛЕ засяга и двата пола, но по литературни данни е известно, че преобладава при жени в детородна възраст. В съгласие с научната литература, жените преобладаваха в изследваната от нас кохорта, като разпределението по пол беше както следва: 24 мъже (23,08%) и 80 жени (76,92%).

СЛЕ може да се развие на всяка възраст, въпреки че началото на заболяването при повечето пациенти присъства между 20 и 55 годишна възраст. В нашата кохорта нямаше СЛЕ пациенти под 18 годишна възраст. Средната възраст на мъжете в кохортата беше 41,5 години (медиана), а на жените 43,5 години (медиана).

Измерването на антинуклеарни антитела (АНА), анти-dsDNA, комплементните С3 и С4 нива бяха извършени в Университетска болница „Царица Йоана“-ИСУЛ-София. Данните ни бяха предоставени заедно с клиничните данни на пациентите от д-р Василев.

Определяне на АНА титрите е чрез индиректна имуофлуоресценция. Стойности над 1:80 се приеха за патологични титри на АНА.

Нивата на анти-dsDNA са определени чрез ELISA (U/mL), като за патологични анти-dsDNA се приеха нивата над 20 U/mL.

Нивата на комплементните С3 и С4 в пациентската плазма са измервани чрез имуодифузия. Референтните граници за С3 бяха от 0,75 до 1,65 g/L, а за С4 – 0,20 до 0,65 g/L.

II. Препаративни методи

1. Пречистване на IgG от човешка плазма

За пречистване на IgG от човешка плазма бяха използвани Sepharose-protein G beads, следвайки протокола на производителя. Концентрацията на IgG беше определена чрез NanoDrop™.

2. Подготовка на сефарозна основа за експеримент за разграничаване на анти-С3 и анти-С4 автоантитела

2.1. Подготовка на сефарозна основа с C3/C4 комплементен протеин

Sepharose-protein G beads бяха промити и натоварени с C3 белтък с концентрация 5 mg/ml/ C4 белтък с концентрация 4 mg/ml. Подготвената основа се съхранява в хладилни условия до следващия анализ.

2.2. Анализ за разграничаване на анти-C3 от анти-C4 антитела

C3/C4 бийдовете се разпределят по 10 колони и се инкубират за overnight при 4°C с пречистените IgG-та с най-висока концентрация. На следващия ден колонките се отварят и изтеклото съдържание, обеднено на C3/C4 се събира за последващи анализи. Колонките се елюират с глицин, като предварително в епуветките се накапват по 10 μ l 1,5 M Tris, pH 8.00. Измерва се OD на елюираните фракции при $\lambda = 280$ nm;

III. Аналитични методи

1. Ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA)

ELISA беше основният метод за регистриране на взаимодействията между изследваните молекули. В хода на работата бяха прилагани различни схеми и реакционни количества, както са описани по-долу.

1.1. ELISA за определяне нивото на анти-C1q, анти-C1s, C1r, C2, C3, C4, C1 Инхбитор, фактор P, фактор B, фактор H, фактор I автоантитела антителата

Микротитрационна плака се имобилизира с антиген (20 μ g/ml) (Complement technology, Inc) и се инкубира за една нощ при 4°C. Несвързаните участъци се блокират с 1%BSA в PBS с Tween 20 за 1 час при 37°C. Плаката се промива 3 пъти с TPBS (PBS с 0,05% Tween 20) и се натоварва с плазмите, разредени 1:100 в PBS/0,75 M NaCl за анти-C1q антителата и в TPBS/0.15 M NaCl за останалите антитела за 1ч при 37°C. След трикратно промиване следва инкубация със заешко античовешко IgG антияло, конюгирано с пероксидаза (anti-human IgG-HPR) и разредено 1:1000 в TPBS. След промиване реакцията се развива със субстратен разтвор OPD (ортофенилендиамин). Реакцията се спира 4 N H₂SO₄. Абсорбцията се детектира при дължина на вълната-490 nm.

1.2. ELISA за регистриране на специфично взаимодействие на анти-C1s, анти-C1r и анти-фактор Р антитела с техни прицелни молекули

Антигенът се имобилизира (C1s, C1r и анти-фактор Р съответно) (Complement technology, Inc) върху микротитрационна плака и се инкубира за 1ч при 37°C или за една нощ на 4°C. Несвързаните участъци в плаката се блокират с 2% BSA в 1xPBS за 30 мин при 37°C. След промиване с TPBS (PBS с 0,05% Tween 20) плаката се инкубира с пречистени IgG в падащи концентрации за 1ч при 37°C. Следва трикратно промиване плаката и инкубиране античовешко IgG антитяло, конюгирано с пероксидаза (anti-human IgG-HPR) и разредено 1:2000 в TPBS за 1ч при 37°C. След трикратно промиване реакцията се развива със субстрат TMB (SureBlue™ TMB Microwell Peroxidase Substrate (1-component)). Реакцията се спира с 4 N H₂SO₄. Абсорбцията се детектира при дължина на вълната-450 nm;

1.3. ELISA за определяне влиянието на анти-C1s, анти-C1r и анти-C1q антителата върху формирането на C1 комплекса

Микротитрационна плака се имобилизира с поликлонално заешко античовешко C1q, разредено 1:1000 в 1xPBS (Complement, Dako, Lot 00064970) и се инкубира за 1h/37°C; Несвързаните участъци в плаката се блокират с 2%BSA в 1xPBS за 30 мин при 37°C. По време на блокирането IgG (разредени в концентрации 200µg/ml, 100µg /ml, 50 µg/ml, 25µg/ml за анти-C1r/s позитивните пациенти и 200µg/ml, 100µg/ml, 50 µg/ml, 0 (само буфер) µg/ml за контролите; 50µg/ml, 25µg/ml, 12.5 µg/ml, 6.125µg/ml за анти-C1q позитивните пациенти и 50µg/ml, 25µg/ml, 12.5 µg/ml, 0 (буфер) µg/ml за контролите), изолирани от пациенти, позитивни за анти-C1r, от пациенти, позитивни за анти-C1s, от пациенти, позитивни за анти-C1q и от здрави контроли, бяха инкубирани с C1r, C1s и C1q в TTBS, 1M CaCl₂. Плаката се инкубира с антитяло *Goat antisera to human C1s (Quidel, LOT 905645-1)*, разредено 1:500, последвано от антитяло Rabbit anti-goat IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, LOT J0713), разредено 1:2000. Взаимодействията бяха детектирани със субстрат TMB (SureBlue™ TMB Microwell Peroxidase Substrate (1-component)).

1.4. Имунологични тестове за количествено определяне на Ва фрагмент на фактор В, индикатор за активирането на алтернативния път на комплемента и за определяне на С4а фрагмент (Quidel, microVue™ Complement)

Определяне на количеството на Ва фрагмента, маркер за активирането на алтернативния път, се извърши съгласно инструкциите на производителя. Определяне на количеството на С4а фрагмента, маркер за активирането на класически/лектинов път, се извърши съгласно инструкциите на производителя.

2. Western blot анализи

2.1. Детекция на *CFHL1*, *CFHR1*, *CFHR2* делеция

Плазма от ЛН пациенти се разрежда 1/100 в дистилирана вода и се смесва с нередуциращ буфер в съотношение 4:1. Пробите се инкубират за 10мин на кипяща водна баня. Накапват се върху 10% NuPAGE Bis-Tris готов гел (Invitrogen). След края на електрофорезата гелът се трансферира върху нитроцелуозна мембрана, която се инкубира с кози анти-човешки фактор Н антисетум (Quidel), разреден 1/1000. Следва инкубация с второ анти-козе HPR антитяло и детекция на сигнала чрез хемилуминисценция след използване на ECL детектиращ кит и iBright система (Invitrogen).

2.2. Кофакторен анализ за активност на фактор I

Микротитрационна плака се имобилизира с 1µg/ml хондроитин сулфат на ямка (по 50µl) и се инкубира за една нощ на 4°C. Несвързаните участъци се блокират с 1% млечен хидролизат и се След един час инкубация на стайна температура се промива трикратно с буфер, съдържащ 10 mM HEPES, 50 mM NaCl, Tween 0.05%, с pH 7.2. Плаката се инкубира с пречистен FH (Complement technology,Inc) в разреждане 1:1500 на 37°C за 30 мин. Добавят се пречистени IgG на пациенти и здрави доброволци, преинкубирани с C3b (Complement technology,Inc), предварително рареден 1:80, , на 37°C за 30 мин. Приготвя се FI (Complement technology,Inc) в разреждане 1:10 и се инкубира на плаката отново на 37°C за 30 мин. От всяка ямка се вземат по 40µl и се

съхраняват на 4°C до електрофореза. След края на електрофорезата гелът се трансферира върху нитроцелулозна мембрана мембраната. Мембраната се инкубира с козе anti-C3 антителя и последващо второ анти-козе HRP антителя. За детекция на ECL детектиращ кит и iBright система (Invitrogen).

3. Активиране на системата на комплемента върху късни апоптотични клетки

HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) бяха използвани, за да се провери възможността анти-фактор Р автоантителата да модулират опсонизацията на късни апоптотични клетки чрез комплемента. Късни апоптотични клетки бяха получени в следствие на спонтанното им отделяне от конфлуентен монослой в присъствие на PBS. Клетките бяха характеризирани като късни апоптотични при детектиране на фосфатидилсерин върху клетъчната мембрана (свързване на анексин V), по нарушена бариерна функция на мембраната им (пропускливост за пропидиев йодид) и ДНК фрагментация (dapi).

3.1. Определяне на C3 и фактор Р депозиция в присъствие на IgG, изолирани от пациенти, позитивни за автоантитела срещу C3 и фактор Р и от здрави доброволци

Апоптотичните клетки се инкубират с 1:10 разреден нормален човешки серум самостоятелно или с IgG, пречистени от здрави донори или от пациенти с ЛН, позитивни за анти-C3 и позитивни за анти-фактор Р. Разреждащият буфер съдържа 10 mM EGTA и 10 mM MgCl₂. EGTA-Mg служи за инхибиране на класическия и лектиновия път и позволява активиране само на алтернативния път на комплемента. След 30 минути инкубация със серума при 37 ° C, клетките се промиват с PBS, съдържащ 1% BSA, 0,1% натриев азид и 10 mM EDTA. Следва инкубиране с анти-C3с моноклонално мише антителя или анти-фактор Р антителя, разрежено 1:50, последвано от анти-мише антителя в разреждане 1:100. Клетките се анализират чрез FACS.

4. SPR базирана технология за отчитане на взаимодействия в реално време

4.1. SPR за регистриране на дозова специфичност на пречистени IgG от пациенти и здрави доброволци

Взаимодействието на автоантителата с техните антигени беше анализирано в реално време, използвайки биосензорен апарат и кореспондиращите биосензорни чипове. Всички разтвори се приготвят с дейонизирана вода, филтрирана и дегазирана. Антигенът (Complement Technology) се имобилизира ковалентно към биосензорния чип, следвайки инструкциите на производителя. IgG, пречистени от ЛН пациенти, позитивни за автоантителата, свързващи съответния антиген, и здрави контроли се инжектират за 300 сек, разтворени в TPBS буфер. Следва дисоциация за 300 сек. С подходящ софтуеър се изважда фоновия сигнал от активираната/ деактивираната поточна линия.

4.2. SPR за регистриране на ефекта на анти-фактор P антителата върху образуването на конвертазата на алтернативния път на комплемента

Ефектът на анти-фактор P IgG върху свързването на фактор P към конвертазата и нейните отделни компоненти се изследва като пречистени IgG от ЛН пациенти, позитивни за анти-фактор P, в 10 mM HEPES, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl, 0.005% Tween 20, pH 7.4 буфер се инжектираха за 300 сек върху биосензорен чип с пропердин. Същият буфер отделно се инжектира като контрола. C3b (13 µg/ml), C3b (13 µg/ml) + factor B (10 µg/ml) and C3b (13 µg/ml)+ factor B (10 µg/ml) + factor D (0.5 µg/ml) (Complement Technology) бяха инжектирани за 300 сек асоциация, последвана от 300 сек дисоциация.

4.3. Теоретично предсказване на антигенни детерминанти за анти-С3, анти-С4 и анти-фактор Р

В клетъчните епитопи върху човешки С3, С4 и фактор Р бяха предиктирани чрез използването на IEBD server В Cell Epitope Prediction Tools (Предикция на линейни епитопи от протеиновата секвенция) (<http://tools.ieedb.org/main/bcell/>). Кристалната структура на фактор Р мономера (Pedersen et al., 2019) беше използвана за input file. Предсказаните антигенни детерминанти бяха визуализирани чрез PyMOL.

5. Статистически методи

Статистическите анализи бяха извършени на софтуер GraphPad Prism 6.01. Количествените анализи бяха експресирани като медиана стандартно отклонение, тъй като според статистиката тя е най-подходяща за клинични изследвания, когато променливата има крайни стойности доста отдалечени една от друга, както е в случая с антителата. За сравнителните анализи между групите беше използван Mann-Whitney непараметричен тест, а за корелационните анализи по отношение на относителната връзка между параметрите Spearman. Fisher's exact test също беше извършен в статистическото анализиране. Отношение на шансовете (OR-odds ratio) и 95% доверителен интервал (CI-confidence interval) бяха изчислявани. За статистическа значими се приемаха резултатите с $p < 0.05$.

РЕЗУЛТАТИ

I. Скрининг на плазми от пациенти с ЛН и здрави доброволци за наличие на автоантитела срещу комплементни протеини. Оценка на взаимодействията на намерените анти-комплементни антитела с прицелните им антигени в реално време.

Чрез ELISA по протоколи, оптимизирани в лабораториите на Катедрата по биохимия, молекулна медицина и нутригеномика и Cordeliers Research Center и описани в глава „Материали и методи“ бяха скринирани плазми от пациенти с клинично доказан ЛН и здрави доброволци. Всички проби бяха изследвани за наличие на автоантитела срещу компонентите на комплемента C1q, C1s, C1r, C2, C3, C4, Фактор В, C5, C6, C7, C8 и C9, срещу активационните фрагменти C4b и C3b, както и срещу регулатори на комплементната каскада C1 инхибитор, фактор Р (пропердин), фактор Н и фактор I.

Изследването на нивата на анти-комплементните автоантитела в 81 здрави доброволци послужи за определяне на граничните стойности (cut-off), разграничаващи позитивни от негативни пациенти за отделните антитела. За cut-off при отделните анти-комплементни автоантитела беше приета съответната средна стойност на оптичната плътност при дължина на вълната от 490 nm (OD 490 nm), измерена в групата на здравите доброволци плюс 3 стандартни отклонения (+3SD).

За валидиране на резултатите, получени от класическите ELISA-и при идентифициране на нови анти-комплементни автоантитела в пациентите беше използван метод, основаващ се на повърхностния плазмонен резонанс (Surface Plasmon Resonance, SPR). Анализите бяха извършени по протокол (Noe et al., 2019) в изследователския център Cordeliers Research Center, INSERM UMRS 1138 в рамките на проект за мобилност.

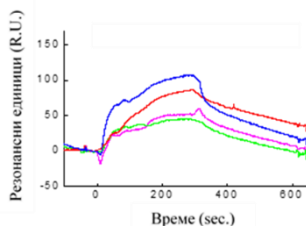
1. Скрининг за автоантитела срещу ранните компоненти на комплемента C1q, C1s, C1r, C2, C3 и C4, както и срещу активационните фрагменти C4b и C3b.

При първоначалния скрининг на 25 пациенти, анти-C2 антитела бяха регистрирани само при един пациент (4,0%, 1/25). Затова

останалите подобрани пациенти не бяха скринирани за наличие на анти-С2.

Анти-С3 и анти-С4 антитела при пациенти с ЛН са докладвани при изследването на д-р Василев (Василев, 2018; Vasilev et al., 2015), което обхваща 72 пациенти. В настоящото проучване анти-С3 антителата бяха изследвани при нови 31 пациенти, а анти-С4 в 28 от тях. Позитивни за анти-С3 бяха доказани при 5 от новите пациенти (5/33, 15,15 %), а позитивен за анти-С4 беше само 1 пациент (1/28, 3,57 %).

В предходни изследвания на екипа ни (Василев, 2018) бяха установени анти-С4 антитела при 13 пациенти (13/72, 18,06%). При добавянето на новите пациенти, изследвани в настоящия труд за анти-С4 антитела, общият брой серопозитивни пациенти в кохорта от 100 души – 14 (14/100, 14,00%). Наличието на тези антитела беше валидирано чрез SPR технологията. Бяха подобрани 4 силно позитивни за анти-С4 антитела пациенти, от които бяха изолирани IgG. От SPR сензограмите е видно, че тези IgG разпознават С4 антиген (Фиг. 1).



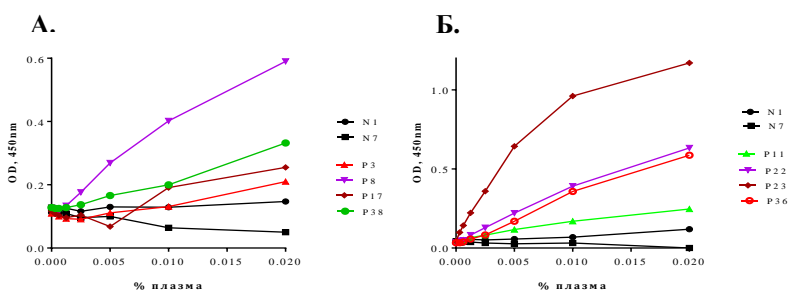
Фиг. 1. SPR сензограма за свързване на изолирани IgG от пациенти с ЛН към С4. Човешки С4 е ковалентно имобилизиран към GLC sensor chip (Bio-Rad). Протеин G-пречистени IgG от четирима пациенти с ЛН, оценени като серопозитивни за анти-С4 чрез ELISA, разтворени в PBS с 0,005% Tween, са инжектирани за 300 s. Сигналът, отразяващ фоново свързване е неутрализиран.

В хода на настоящото изследване беше установено, че пациентите с патологично високи нива анти-С3 бяха позитивни и за анти-С3b.

Скрининг за антитела срещу С1 комплекса (С1q, С1s и С1r) в настоящото изследване са правени само за анти-С1q при 28 нови пациенти. От тях позитивни за анти-С1q бяха 8 (8/28, 28,57%). Сред

здравите доброволци, позитивни за анти-C1q автоантитела бяха 11 индивида (11/81, 13,58%).

По отношение на анти-C1г и анти-C1s, установени в пациенти с ЛН в предходни изследвания на екипа ни (Василев, 2018) бяха проведени анализи за оценка на специфичността на антителата. Бяха регистрирани дозово зависими взаимодействия на пречистени IgG от трима, позитивни за анти-C1г (P8, P17 и P38) и от трима, позитивни за анти-C1s (P22, P23 и P36) пациенти, с техните антигени (фиг. 2 А. и Б.). Свързването на анти-C1г и анти-C1s при по един от изследваните позитивни пациенти (P3 и P11, съответно) беше слабо и сравнимо с това на контролните плазми (фиг. 2 А. и Б.).

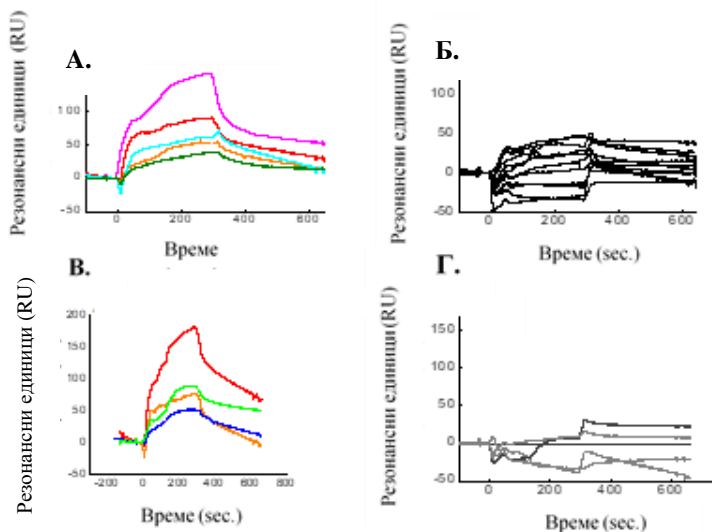


Фиг. 2. Оценка на специфичността на взаимодействие на анти-C1г (А.) и анти-C1s (Б.) автоантитела. ELISA плаките са имобилизирани с 10 $\mu\text{g/ml}$ човешки C1г и C1s в карбонатен буфер. След блокиране с 1% BSA плаките са инкубирани с пречистени IgG от пациенти позитивни за анти-C1г (А.) и позитивни за анти-C1s (Б.) в концентрации: 100 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 12,5 $\mu\text{g/ml}$, 6,25 $\mu\text{g/ml}$, 3,13 $\mu\text{g/ml}$, 1,56 $\mu\text{g/ml}$, 0,78 $\mu\text{g/ml}$ и 0 $\mu\text{g/ml}$. Взаимодействията са детектирани чрез кози античовешки IgG - HRP-конюгат (1:2000) и субстрат TMB.

Проведените SPR анализи на взаимодействията на анти-C1г с C1г и на анти-C1s с C1s не показаха Ag-Ab свързване, въпреки регистрираните специфични взаимодействия при дозово зависимите ELISA (Фиг. 2, А. и Б.).

Измежду всички серопозитивни за антитела срещу C1 комплекса, нямаше пациенти едновременно позитивни за анти-C1q, анти-C1г и анти-C1s автоантитела, но трима от пациентите имаха анти-C1q и анти-C1s автоантитела и един – анти-C1q и анти-C1г автоантитела.

Единични проби, изследвани чрез ELISA за анти-C1q, анти-C1г, анти-C1s бяха анализирани и чрез SPR базирана технология. Позитивни за анти-C1q чрез ELISA бяха позитивни и чрез SPR (Фиг. 3, А.). Пациенти, негативни за анти-C1q чрез ELISA тест, останаха негативни и чрез SPR (Фиг. 3, Б.). Но някои пациенти с референтни нива на анти-C1q при ELISA се позитивираха с SPR анализа (Фиг.3, В.). Възможно обяснение на отчетените антиген-антитяло взаимодействия е, че SPR е по-чувствителен метод, който регистрира антитела с по-нисък афинитет, имащи по-бърза степен на дисоциация от антигена. Чрез SPR метода се наблюдават свързващи събития в реално време без дългите стъпки на инкубация, характерни за ELISA. Известно е, чрез ELISA не може да се детектират антитела с нисък афинитет (Wadhwa et al., 2015). При SPR анализа бяха тествани и 4 IgG, изолирани от здрави доброволци, които не показаха свързване (Фиг.3, Г.).



Фиг. 3. SPR сензограми за свързване на изолирани от пациенти и здрави доброволци IgG към C1q. IgG изолирани от пациенти с ЛН, оценени като серопозитивни за анти-C1q чрез ELISA (А.). IgG изолирани от пациенти с ЛН, отрицателни за анти-C1q чрез ELISA (Б.). IgG изолирани от пациенти с ЛН, оценени като негативни за анти-C1q чрез ELISA, но позитивни – чрез SPR (В.). IgG изолирани от на здрави доброволци (Г.).

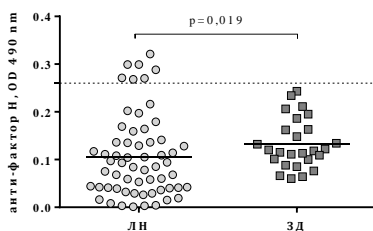
2. Скрининг за автоантитела срещу късните компоненти на комплемента C5, C6, C7, C8 и C9.

При първичен скрининг на 25 пациенти с ЛН, всички бяха оценени като негативни за антитела срещу късните комплементни компоненти C5, C6, C7, C8 и C9. Други проби на са изследвани за наличие на антитела срещу тези антигени.

3. Скрининг за автоантитела срещу регулатори на комплементната каскада C1 инхибитор, фактор В, фактор Н, фактор I и фактор Р.

Пациенти, позитивни за анти-C1 инхибитор, фактор В и анти-фактор I антитела не бяха установени.

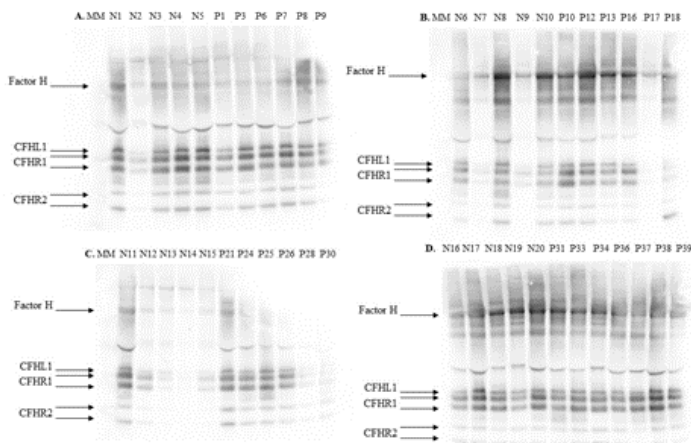
При малко на брой пациенти – 7 (7/60, 11,67%) бяха регистрирани анти-фактор Н антитела (Фиг. 4). Беше установено статистическо значимо различие между нивата на анти-фактор Н антителата при изследваните пациенти и здрави доброволци (Mann-Whitney U test, $p < 0,019$) (Фиг. 4).



Фиг. 4: Определяне нивата на анти-фактор Н автоантитела в пациенти с лупусна нефропатия (ЛН) и здрави доброволци (ЗД) чрез ELISA. Човешки фактор Н е имобилизиран в концентрация 20µg/ml и инкубирани със плазма на пациенти и здрави доброволци (1:100 в TPBS). Образованите комплекси са установени със заешки анти-човешки IgG, конюгиран с пероксидаза. На графиката с пунктир е посочен cut-off, разграничаващ позитивни от негативни пациенти.

Тъй като анти-фактор Н при пациенти с автоимунната форма на HUS обикновено силно корелират с хомозиготна делеция на CFHR1 и

CFHR3 гените (Blanc et al., 2012; Blanc et al., 2015; Valoti et al., 2019), ние изследвахме за наличието на тази генна делеция на фактор Н-свързаните протеини (CFHL1, CFHR1 и CFHR2) в нашата кохорта за да проверим за възможна причината за формирането на тези автоантитела в нашата кохорта (Фиг. 5).

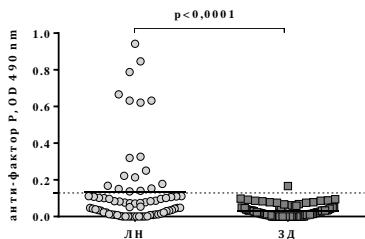


Фиг. 5. Имуноблот за детекция на генна делеция в фактор Н-свързаните протеини (CFHL1, CFHR1 и CFHR2) при ЛН пациенти и здрави контроли.

Анти-фактор Н антисерум разпознава фактор Н, CFHR1, CFHR2 и CFHL1 и позволява да се определи дали пациентът е дефицитен или не. Чувствителността на метода, обаче, не е достатъчна, за да се съди за хетерозиготен дефицит на фактор Н-свързаните протеини. Всички тествани 25 ЛН пациенти без един (P17) показаха сигнал, кореспондиращ на двете гликоформи на CFHR1 (Фиг. 5). CFHR1 делеция не беше открита сред 20 тествани здрави контроли. Затова, честотата на делеция на CFHR1 в българската кохорта се определи като много ниска, под 2%.

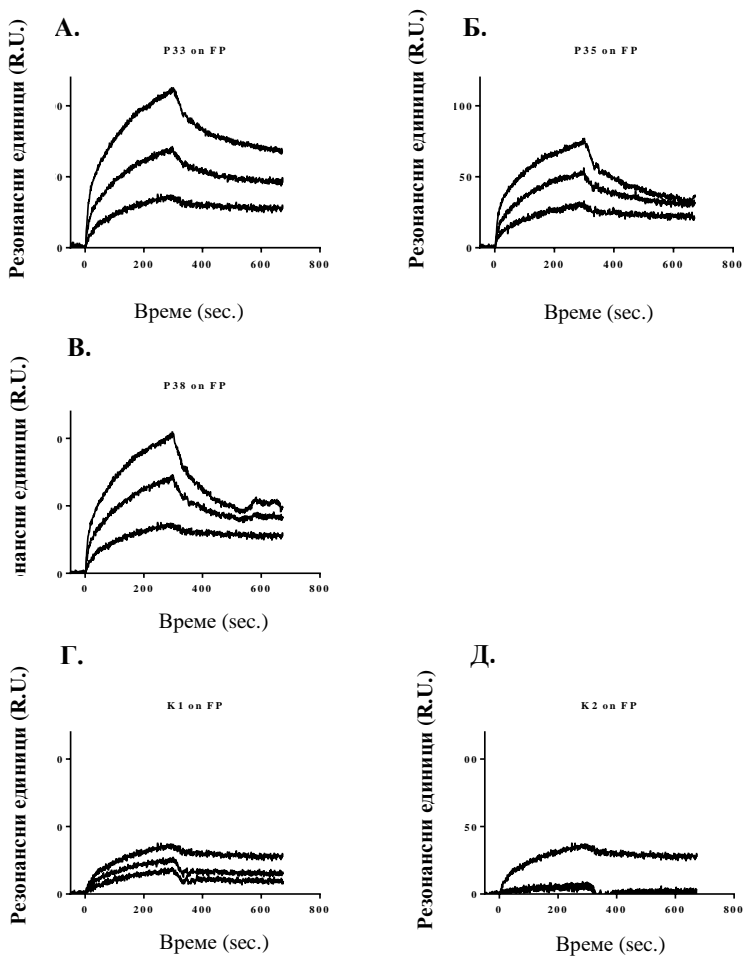
Основен принос на настоящото изследване е детектирането на автоантитела срещу фактор Р (пропердин). Статистически значими патологично повишени титри на анти-фактор Р антителата бяха установени при 18 (18/73, 24,66%) от изследваните пациенти (Фиг. 6).

Между нивата на анти-фактор Р в пациенти и здрави доброволци беше установена статистически значима разлика (Mann-Whitney U test, $p < 0,0001$) (Фиг. 6).



Фиг. 6. Определяне нивата на анти-фактор Р автоантитела в пациенти с лупусна нефропатия (ЛН) и здрави доброволци (ЗД) чрез ELISA. Човешки фактор Р е имобилизиран в концентрация 20 μ g/ml и инкубирани със плазма на пациенти и здрави доброволци (1:100 в TPBS). Образованите комплекси са установени със заешки анти-човешки IgG, конюгиран с пероксидаза. На графиката с пуктир е посочен cut-off, разграничаващ позитивни от негативни пациенти.

Данните за взаимодействията на IgG, изолирани от трима позитивни за анти-фактор Р пациенти (P33, P35 и P38) с фактор Р в реално време (Фиг. 7, А., Б. и В.) корелираха с получените чрез ELISA резултати (Фиг. 6). Представените взаимодействия в реално време се повториха при различни концентрации на IgG, което доказва специфичност на взаимодействието (Фиг. 7, А., Б. и В.). При SPR анализа бяха тествани и IgG, изолирани от здрави доброволци, които не показаха свързване към фактор Р (Фиг. 7, Г. и Д.).



Фиг. 7. SPR сензограми за свързване на изолирани IgG към фактор P. IgG изолирани от пациенти с ЛН, оценени като серопозитивни за анти-фактор P чрез ELISA (А., Б. и В.). IgG изолирани от здрави доброволци (Г. и Д.). Човешки фактор P е ковалентно имобилизиран към GLC sensor chip (Bio-Rad). Протеин G-печистени IgG от ЛН пациенти и здрави контроли, разтворени в PBS с 0,005% Tween в 1:50, 1:100, 1:200, бяха инжектирани за 300 s. Сигналят, отразяващ фоново свързване, е неутрализиран.

В настоящата дисертация за първи път бяха доказани анти-фактор Р автоантитела в пациентска кохорта с ЛН, като детектирането им даде възможност да се проведат анализи за доказване на тяхната специфичност и функционална значимост.

II. Анализ на отношенията между нивата на известни биомаркери за оценка на активността на лупусната нефропатия и нивата на новооткрити анти-комплементни автоантитела.

Лабораторни стойности на комплементните компоненти С3 и С4, АНА, анти-dsDNA и анти-C1q антителата, протеинурия, уринен седимент и гломерулна филтрация (eGFR) са класически клинични биомаркери при ЛН.

Оценката на eGFR, протеинурията и уринния седимент са нужни за ранното детектиране на ЛН екзербации. А измерването на плазмените нива на АНА, анти-dsDNA, анти-C1q антителата и С3 и С4, освен при диагнозата се използват и за оценка на имунологичната активност на лупусната нефропатия.

В настоящия дисертационен труд са направени анализи за връзка между посочените по-горе маркери за оценка на активността на заболяването и новооткритите в хода на изследването анти-комплементни автоантитела – анти-фактор Н и анти-фактор Р. Направени са и анализи за разпределение на тези антитела по пол, възраст и за връзка с продължителността на заболяването.

Проследени са промените в нивата само на анти-фактор Р антителата в хода на заболяването. Тези промени са представени и във връзка с измененията в активността на ЛН, оценени чрез категориите на BILAG Renal score.

1. Анализ на отношенията между нивата на биомаркери за оценка на активността на ЛН и нивата на анти-фактор Н автоантитела.

1.1. Анализ на разпределението на анти-фактор Н автоантителата по пол, възраст и продължителност на заболяването

Наличието на повишени анти-фактор Н автоантитела не беше свързано с пола на пациентите (Mann-Whitney U, $p=0,593$), възрастта на

пациентите (Spearman, $r=-0,071$, $p=0,592$) и с продължителността на заболяването (Spearman, $r=-0,031$, $p=0,816$).

1.2. Анализ на асоциации между нивата на анти-фактор Н автоантителата и основни клиничко-лабораторни показатели на ЛН

Бяха проследени връзките на нивата на анти-фактор Н с някои основни клиничко-лабораторни показатели на ЛН като протеинурия, уринен седимент и eGFR.

За патологични нива на протеинурия приехме стойности $\geq 0,15$ g/24h, а за референтни нива всички стойности $< 0,15$ g/24h. Патологично ниво на протеинурия ($\geq 0,15$ g/24h) беше установено при 44 (44/60, 73,33%), а референтни нива на протеинурия ($< 0,15$ g/24h) - при 16 (16/60, 26,67%) от изследваните за анти- фактор Н пациенти. Не открихме статистически значим ефект на патологичните анти-фактор Н нива върху протеинурията (Fisher's exact test, $p=0,092$), статуса на уринния седимент (Fisher's exact test, $p=0,454$) и реналната функция, оценена по eGFR (Fisher's exact test, $p=0,330$).

Статистически значима разлика в нивата на анти-фактор Н се установи единствено спрямо статуса на уринния седимент (Mann-Whitney U, $p = 0,021$). Корелационният анализ потвърди тази връзка (Spearman, $r=0,303$, $p=0,021$).

1.3. Анализ на асоциации между нивата на анти-фактор Р автоантителата и основни имунологични маркери на ЛН

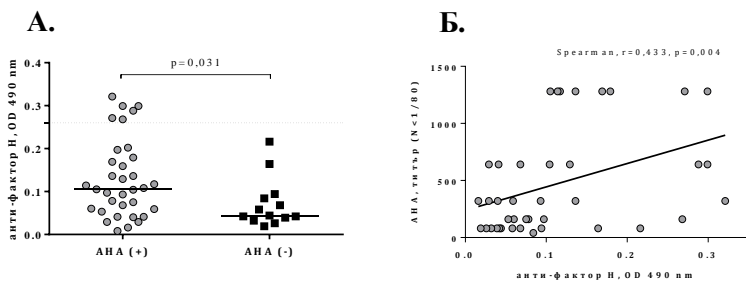
Бяха проследени връзките на нивата на анти-Фактор Н антителата с някои основни имунологични показатели за активност на ЛН като нива на АНА, на анти-dsDNA, на комплеметните C3 и C4, както и нива на анти-C1q антителата.

1.3.1. Изследване на влиянието на анти-фактор Н автоантелата върху нивата на АНА

От всички 60 пациента, скринирани за анти-фактор Н, АНА титрите бяха определени при 47 (47/60, 78,33%) от тях. Патологични нива на АНА ($>1:80$) бяха установени при 34 (34/47, 72.34%) от пациентите.

Не установихме влияние на анти-фактор Н антителата върху серологичния АНА статус (Fisher's exact test, $p=0,169$).

Нивата на анти-фактор Н нивата при пациенти с повишени АНА титри (медиана 0,107) бяха статистически значимо по-високи в сравнение с нивата на анти-фактор Н при пациенти с референтни АНА титри (медиана 0,044) (Mann-Whitney U, $p=0,031$, Фиг. 8, А.). Корелационният анализ показва значима и умерена връзка на анти-фактор Н антителата с АНА (Spearman, $r=0,433$, $p=0,004$, Фиг. 8, Б.).



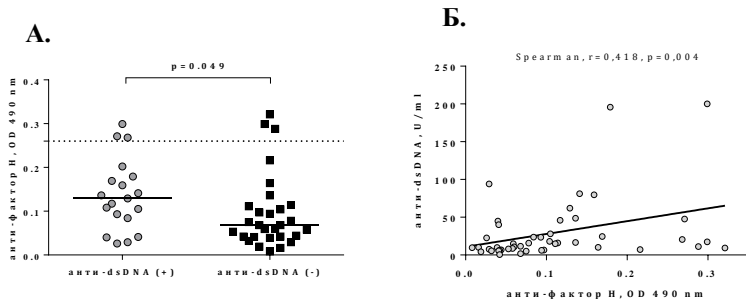
Фиг. 8. Анти-фактор Н нива в зависимост от серологичния статус на АНА (А.). Корелационна зависимост между анти-фактор Н автоантителата и АНА (Б.).

1.3.2. Изследване на влиянието на анти-фактор Н автоантителата върху нивата на анти-dsDNA антителата

За 48 пациенти (48/60, 80,0%) от изследваните за анти-фактор Н имаше данни за нива на анти-dsDNA антитела.

Не установихме анти-фактор Н антителата да имат влияние върху титрите на анти-dsDNA (Fisher's exact test, $p=1.000$).

Установи се значима разлика в медианите на нивата на анти-фактор Н при наличие и отсъствие на високи анти-dsDNA нива (Mann-Whitney U, $p=0,049$, Фиг. 9, А.), като корелационният анализ показва връзка между анти-фактор Н антителата и анти-dsDNA (Spearman, $r=0,418$, $p=0,004$, Фиг. 9, Б.).

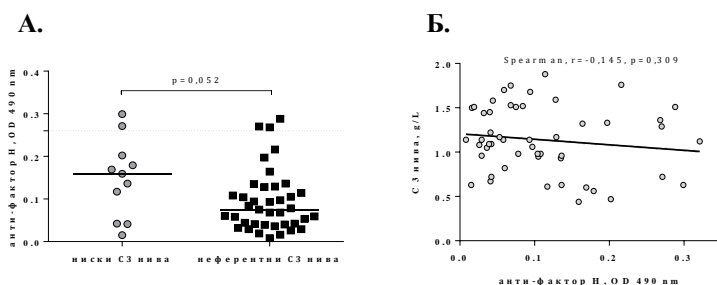


Фиг. 9. Анти-фактор Н нива в зависимост от серологичния статус на анти-dsDNA (А.). Корелационна зависимост между анти-фактор Н автоантителата и анти-dsDNA (Б.).

1.3.3. Изследване на влиянието на анти-фактор Н автоантелата върху нивата на комплементните С4 и С3

Анти-фактор Н нивата не определяха С3 хипокомплементемия (Fisher's exact test, $p=0,301$).

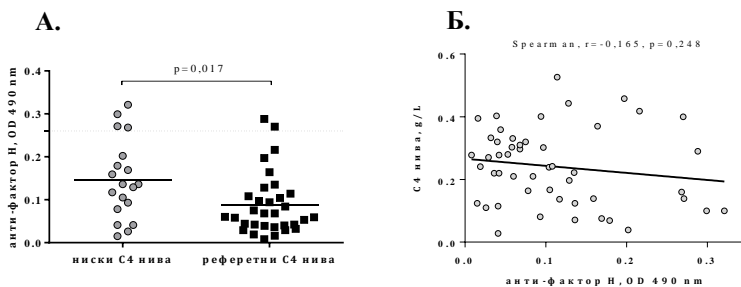
Нивата на анти-фактор Н автоантителата при пациенти с (медиана, 0,159) и без С3 хипокомплементемия (медиана, 0,077) не бяха статистически значимо различни (Mann-Whitney U, $p=0,052$, Фиг. 10, А.). Статистически значима корелация между нивата на анти-фактор Н и С3 не беше установена (Spearman, $r=-0,145$, $p=0,309$, Фиг. 10, Б.)



Фиг. 10. Анти-фактор Н нива в зависимост от от присъствието и отсъствието на хипокомплементемия С3 (А.). Корелационна зависимост между анти-фактор Н и нивата на С3 (Б.).

По отношение на С4 нивата не беше открит значим ефект на анти-фактор Н автоантителата (Fisher's exact test, $p=0,179$). Въпреки това,

нивата на анти-фактор Н антителата при пациенти с С4 хипокомplementемия (медиана, 0,136) статистически значимо се различаваха от нивата на анти-фактор Н при пациенти с референтни нива на С4 (медиана 0,064) (Mann-Whitney U, $p=0,017$, Фиг. 11, А.). Тази разлика в нивата на анти-фактор Н антителата спрямо серологичния статус на С4 не се потвърди от корелационния анализ (Spearman, $r=-0,165$, $p=0,248$, Фиг. 11, Б.)

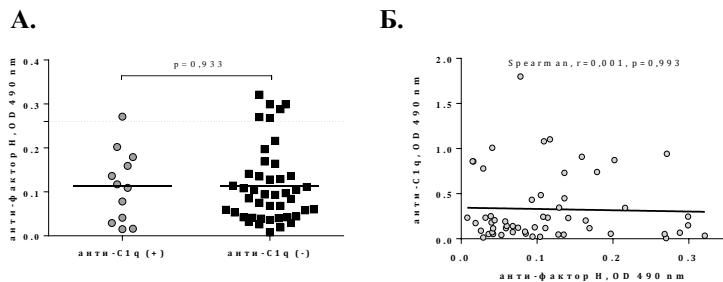


Фиг. 11. Анти-фактор Н нива в зависимост от присъствието и отсъствието на хипокомplementемия С4 (А.). Корелационна зависимост между анти-фактор Н и нивата на С4 (Б.).

1.3.4. Изследване на влиянието на анти-фактор Н автоантителата върху нивата на анти-С1q

56 пациенти от всички 60 изследвани за анти-фактор Н бяха скринирани за анти-С1q автоантитела. Не се установи влияние на анти-фактор Н нивата върху серологичния статус на анти-С1q нивата (Fisher's exact test, $p=1.000$).

Медианата на нивата на анти-фактор Н автоантителата при пациенти с патологични нива на анти-С1q беше 0,113. Медианата на нивата на анти-фактор Н при пациенти с референтни анти-С1q беше 0,094. В тази връзка не беше установена значима разлика в нивата на анти-фактор Н антителата при двете сравнени групи (Mann-Whitney U, $p=0,933$, Фиг. 12, А.). Корелационният анализ потвърди този резултат (Spearman, $r=0,001$, $p=0,993$, Фиг. 12, Б.).



Фиг. 12. Анти-фактор Н нива в зависимост от наличие (+) и отсъствие (-) на анти-C1q антитела при пациентите с ЛН (А.). Корелационна зависимост между анти-фактор Н и анти-C1q антителата (Б.).

1.4. Анализ на асоциации между нивата на анти-фактор Н автоантителата и основни хистологични признаци на ЛН

Хистологична диагноза беше налице за 58 от включените в скрининга за анти-фактор Н антитела (58/60, 96,67%) пациенти. Хистологичните класове на пациентите бяха определяни съгласно критериите на International Society of Nephrology (ISN) и Renal Pathology Society (RPS). Хистологичните индекси на активност и хроничност бяха отчетени според критериите на National Institutes of Health (NIH). Данните за хистологичните признаци при изследваните пациенти в настоящата дисертация бяха предоставени от Клиниката по нефрология към УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“ При отчитането на зависимости на анти-фактор Н антителата и хистологичните белези на хроничност бяха включени само случаите, при които времето между вземането на кръвната проба за изследване на анти-фактор Р антителата и провеждането на бъбречната биопсия е било поне 12 месеца.

1.4.1. Изследване на нивата на анти-фактор Н автоантителата при различните хистологични класове ЛН и при пациенти с хистологични лезии на активност и хроничност

Сред хистологично определените пациенти 10 (10/58, 17,24%) бяха диагностицирани с Клас V ЛН; 21 (21/58, 36,21%) с Клас IV ЛН; 3 (3/58, 5,17%) с Клас III ЛН; 20 (20/58, 34,48%) с Клас II ЛН и 4 (4/58, 6,90%) с Клас I ЛН. Сред пациентите нямаше такива с Клас VI ЛН. Анти-фактор

Н позитивните пациенти бяха разпределени в съответните хистологични класове, както следва: един пациент (1/6, 16,67%) с хистологичен Клас V ЛН, един (1/6, 16,67%) с Клас IV и четирима (4/6, 66,67%) с Клас II ЛН. В класовете III и I нямаше пациенти, позитивни за анти-фактор Н автоантитела.

Поради важноста на хистологичните промени като индикатори за тежестта и прогнозата на заболяването беше проучена и зависимостта между нивата на анти-фактор Н автоантителата и хистологични маркери за активност и хроничност (Таблица 1).

Таблица 1: Сравнителен анализ между нивата на анти-фактор Н в групите пациенти с и без хистологични признаци на активност и хроничност на ЛН.

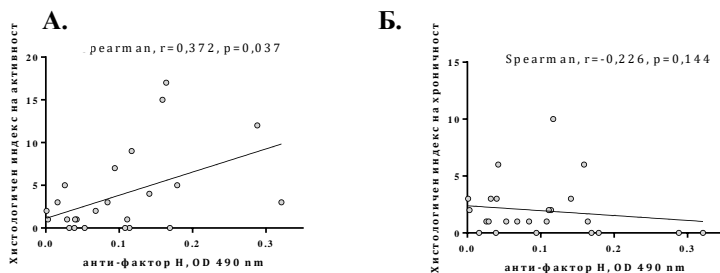
Хистологични признаци	Анти-фактор Н Медиана (от-до)		p стойност
	Присъствие	Отсъствие	
Ендокапилярна пролиферация	0,114 (0,003-0,321)	0,039 (0,001-0,053)	0,004
Гломерулна левкоцитна инфилтрация	0,174 (0,169-0,179)	0,076 (0,001-0,321)	0,068
Депозити "телени бримки"	0,111 (0,003-0,179)	0,068 (0,001-0,321)	0,522
Фибриноидна некроза/кариорексис	0,114 (0,032-0,179)	0,053 (0,001-0,321)	0,152
Клетъчни полулуния	0,117 (0,003-0,179)	0,084 (0,001-0,321)	0,670
Интерстициално инфилтрация	0,117 (0,001-0,169)	0,053 (0,003-0,321)	0,170
Гломерулна склероза	0,042 (0,001-0,164)	0,111 (0,016-0,321)	0,064
Фиброзни полулуния	0,042 (0,001-0,159)	0,094 (0,016-0,321)	0,320
Тубулна атрофия	0,063 (0,001-0,159)	0,101 (0,003-0,321)	0,561
Интерстициална фиброза	0,114 (0,040-0,159)	0,053 (0,001-0,321)	0,228

Измежду маркерите за активност, каквито са ендокапилярна пролиферация, гломерулна левкоцитна инфилтрация, депозити „телени бримки“, кариорексис, клетъчни полулуния и интерстициална инфилтрация, се откри статистически значима разлика в нивата на анти-

фактор Н при наличие и отсъствие на ендокапилярна пролиферация (Mann-Whitney U, $p=0,004$, Таблица 1). Установихме тенденция към значима разлика в анти-фактор Н нивата спрямо гломерулната левкоцитна инфилтрация (Mann-Whitney U, $p=0,068$, Таблица 2).

Измежду хистологичните признаци на хроничност, каквито са гломерулна склероза, фиброзни полулуния, тубулна атрофия и интерстициална фиброза, единствено беше открита тенденция към статистически значимо по-високи анти-фактор Н нива при отсъствие на гломерулна склероза в сравнение с нивата при наличие на този хистологична лезия (Mann-Whitney U, $p=0,064$, Таблица 1).

Установихме статистически значима връзка на анти-фактор Н нивата с индекса на активност (Spearman, $r=0,372$, $p=0,037$, Фиг. 13, А.) и отсъствие на такава с индекса на хроничност (Spearman, $r=-0,226$, $p=0,144$, Фиг. 13, Б.).



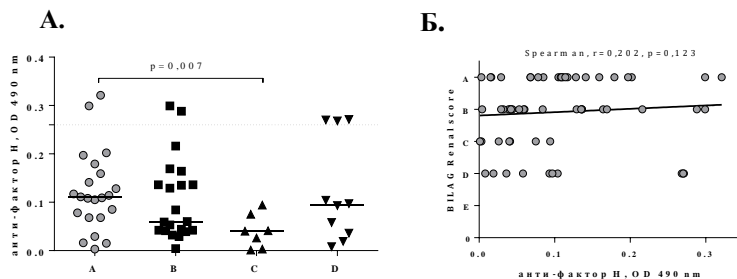
Фиг. 13. Корелационен анализ между нивата на анти-фактор Н и хистологичния индекс на активност (А.), хистологичния индекс на хроничност (Б.)

1.5. Изследване на влиянието на анти-фактор Н автоантелата върху комплексната оценка на ЛН по BILAG Renal score

British Isles Lupus Assessment Group (BILAG) е клинична мярка за активността на лупусното заболяване. Използването му се счита за валидно, надеждно и чувствително на промени. За разлика от другите индекси за лупусна активност като SLEDAI и SLAM, в които общата оценка за активността на заболяването обикновено се калкулира, при BILAG индекса се докладва активността в различните органи/системи поотделно.

Пациентите, които бяха позитивни за анти-фактор Н антитела и с категория А според BILAG Renal score бяха 2 (2/7, 28,57%). 2 (2/7, 28,57%) от пациентите с категория В имаха повишени анти-фактор Н нива. В категория С нямаше позитивни за анти-фактор Н пациенти. В категория D попадаха 3 (3/7, 42,86%) от анти-фактор Н позитивните пациенти. Въз основа на това разпределение анти-фактор Н антителата нямаша ефект върху определянето на по-тежката категория А при пациентите (Fisher's exact test, $p=1.000$).

Медианата на анти-фактор Н нивата при пациентите с категория А беше 0,110, а медианата на нивата на анти-фактор Н в пациентите от останалите категории (В, С и D) – 0,060. Тази разлика не беше статистически значима (Mann-Whitney, $p=0,149$), но при сравнение нивата на анти-фактор Н при категории А и С, те се различаваха съществено (Mann-Whitney U, $p=0,007$, Фиг. 14, А.).



Фиг. 14. Нива на анти-фактор Н автоантителата при пациентите, разделени по категорията на ЛН според BILAG Renal score
Корелационен анализ между нивата на анти-фактор Н и възрастта (А.).
Корелационна зависимост между анти-фактор Н нивата и BILAG Renal score (Б.)

При изследване на зависимостта между нивата на анти-фактор Н и категорията по BILAG Renal score също не беше установена статистически значима корелационна зависимост (Spearman, $r=0,202$, $p=0,123$, Фиг. 14, Б.).

2. Анализ на отношенията между нивата на биомаркери за оценка на активността на ЛН и нивата на анти-фактор Р автоантитела.

2.1. Анализ на разпределението на анти-фактор Р автоантителата по пол, възраст и продължителност на заболяването

Бяха проследени честота на анти-фактор Р при мъже и жени, нивата им при пациенти на различна възраст и с различна продължителност на заболяването. Статистически значимо влияние на пола върху нивата на анти-фактор Р не бяха установени (Mann-Whitney U, $p=0,092$). Не беше намерена статистически значима корелационна зависимост между възрастта на пациентите и нивата на анти-фактор Р антителата ($r=-0,024$, $p=0,839$), както и между давността на заболяването и нивата на автоантителата (Spearman, $r=-0,091$, $p=0,444$).

2.2. Анализ на асоциации между нивата на анти-фактор Р автоантителата и основни клиничко-лабораторни показатели на ЛН

Бяха проследени връзките на нивата на анти-Фактор Р с някои основни клиничко-лабораторни показатели на ЛН като протеинурия, уринен седимент и eGFR.

Не се установи статистически значимо влияние на анти-фактор Р нивата върху нивата на протеинурията (Fisher's exact test, $p=0,561$), статуса на уринния седимент (Fisher's exact test, $p=0,595$) и бъбречната функция, оценена чрез eGFR (Fisher's exact test, $p=0,736$). Разликите в анти-фактор Р антителата между пациенти с и без патологични нива на протеинурия; с и без активен уринен седимент; с и без компенсирана бъбречна функция не бяха статистически значима (Mann-Whitney U, $p=0,369$; Mann-Whitney U, $p=0,897$; Mann-Whitney U, $p=0,091$ съответно). Корелационните анализи потвърдиха тези резултати (Spearman, $r=0,192$; $p=0,104$ за протеинурия и Spearman, $r=0,016$, $p=0,896$ за уринен седимент). Корелационна зависимост между анти-фактор Р и eGFR също не беше установена, а по-скоро тенденция към негативна такава (Spearman, $r=-0,212$; $p=0,072$).

2.3. Анализ на асоциации между нивата на анти-фактор Р автоантителата и основни имунологични маркери на ЛН

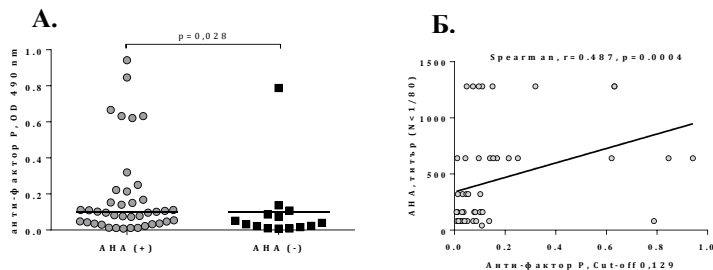
Бяха проследени връзките на нивата на анти-фактор Р антителата с някои основни имунологични показатели за активност на ЛН като нива на АНА, на анти-dsDNA, на комплеметните С3 и С4, както и нива на анти-С1q антителата.

2.3.1. Изследване на влиянието на анти-фактор Р автоантелата върху нивата на АНА

Данни за нивата на АНА имаше за 54 (54/73, 73,97%) от изследваните за анти-фактор Р пациенти. Патологично повишени титри на АНА (>1:80) бяха установени при 40 (40/54, 74,07%) от тях. В тази група броят на серопозитивните за анти-фактор Р антитела беше 16 (16/40, 40,00%).

Не беше установено статистически значимо влияние на наличието на анти-фактор Р антитела върху патологично повишените титри на АНА (Fisher's exact test, $p=0,508$).

Медианата на нивата на анти-фактор Р антителата при пациентите с патологични титри на АНА – 0,100 беше по-висока от медианата на нивата на антителата при пациенти с референтни стойности на АНА – 0,036. Беше установена статистически значима разлика в нивата на анти-фактор Р по отношение на серологичния статус на АНА (Mann-Whitney U, $p=0,028$, Фиг. 15, А.), като имаше и средна по-сила статистически значима корелация между нивата на анти-фактор Р и АНА титрите (Spearman, $r=0,487$, $p=0,0004$, Фиг. 15, Б.).



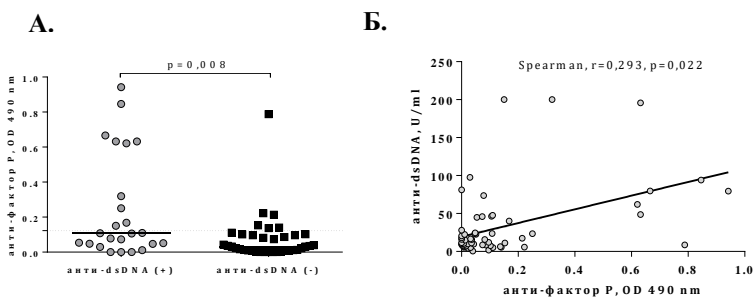
Фиг. 15. Анти-Фактор Р нива в зависимост от серологичния статус на АНА (А). Корелационна зависимост между анти-фактор Р и АНА (Б)

2.3.2. Изследване на влиянието на анти-фактор Р автоантелата върху нивата на анти-dsDNA антителата

Данни за нивата на анти-dsDNA при изследваните за анти-фактор Р пациенти имаше за 62 (62/73, 84,93%) от тях. Патологично повишени нива на анти-dsDNA (≥ 20 U/mL) установихме при 26 (26/62, 41,94%) пациенти. В тази група броят на серопозитивните за анти-фактор Р антитела беше 15 (15/18, 83,33%).

Беше установено, че наличието на патологично повишени нива на анти-фактор Р определя наличието на патологично повишени концентрации на анти-dsDNA с относителен риск 1,96; 95% CI: 1,14 – 3,35, Fisher's exact test, $p=0,036$.

Медианата на нивата на анти-фактор Р при изходно изследваните пациенти с ЛН с патологично повишени концентрации на анти-dsDNA беше 0,092, статистически значимо по-висока от медианата на нивата на анти-фактор Р пациенти с референтни нива на анти-dsDNA 0,032 (Mann-Whitney U, $p=0,008$, Фиг. 16, А.). Корелационен анализ също потвърди значимата връзка на анти-фактор Р автоантителата с анти-dsDNA (Spearman, $r=0,293$; $p=0,022$, Фиг. 16, Б.).



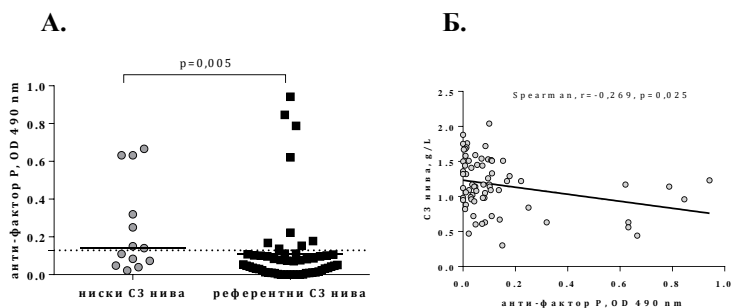
Фиг. 16. Нива на анти-Фактор Р антителата при изследваните пациенти, разделени спрямо серологичния статус на анти-dsDNA (А.). Корелационна зависимост между анти-Фактор Р и анти-dsDNA (Б.).

2.3.3. Изследване на влиянието на анти-фактор Р автоантелата върху нивата на комплементните С4 и С3

Пациентите, изследвани за анти-фактор Р с хипокомплементемия С3 бяха 69 (69/73, 94,52%), а тези с хипокомплементемия С4 бяха 64 (64/73, 87,67%). Едновременно С3 и С4 сред изследваните за анти-фактор Р бяха проследени при 64 (64/73, 87,67%). В тази група броят на серопозитивните за анти-фактор Р антитела беше 15 (15/18, 83,33%).

Установихме, че присъствието на патологично повишени анти-фактор Р антитела статистически значимо определя присъствието на С3 хипокомплементемия с относителен риск 3,98; 95% CI: 1,40 – 11,33, Fisher's exact test, $p=0,015$.

Пациентите с ниски С3 нива имаха по-висока медиана на нивата на анти-фактор Р 0,140 в сравнение с медианата на анти-фактор Р при пациенти с референтни нива на С3 0,047 (Mann-Whitney U, $p=0,005$, Фиг. 17, А.). Зависимостта на ниските С3 нива от високите плазмените нива на анти-фактор Р се потвърди и от корелационен анализ- установи се статистически значима отрицателна и слаба по сила зависимост между анти-фактор Р нивата и плазмените нива на С3 (Spearman, $r=-0,269$, $p=0,025$, Фиг. 17, Б.).

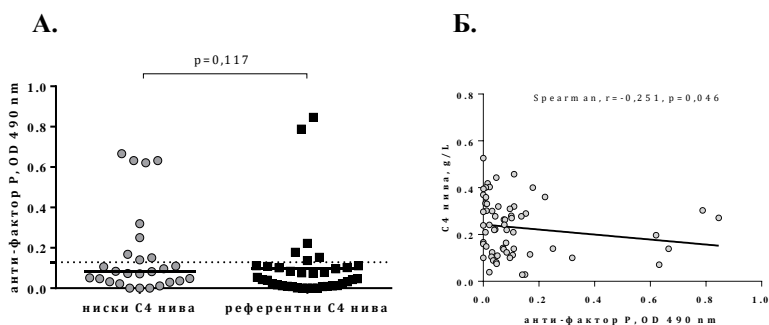


Фиг. 17. Нива на анти-фактор Р по отношение серологичния С3 статус (А.). Корелационна зависимост между нивата на анти-фактор Р антителата и нивата на С3 (Б.).

Не установихме статистически значимо влияние на наличието на високи нива на анти-фактор Р върху наличието на С4

хипокомplementемия при изследваните пациенти (Fisher's exact test, $p=0,141$).

Медианата на анти-фактор Р при пациенти с С4 хипокомplementемия – 0,082 беше относително по-висока от медианата на антителата при пациенти с референтни стойности на С4 – 0.043. Въпреки това, не беше установено статистически значима разлика в нивата на анти-фактор Р при ниски и референтни концентрации на този комplementен протеин (Mann-Whitney, $p=0,117$, Фиг. 18, А.). Независимо от това, корелационният анализ показва статистически значима отрицателна и слаба зависимост между анти-фактор Р нивата и С4 (Spearman, $r=-0,251$, $p=0,046$, Фиг. 18, Б.)

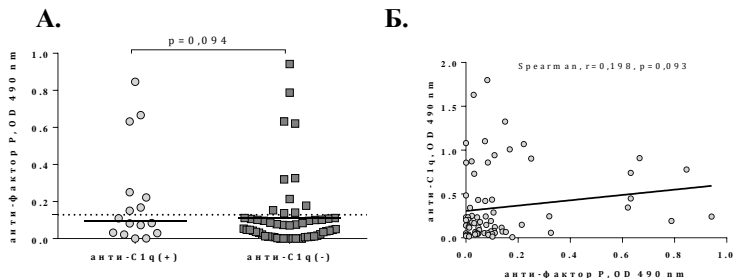


Фиг. 18. Нива на анти-Фактор Р в зависимост от присъствието или отсъствието на хипокомplementемия С4 (А.). Корелационна зависимост между анти-Фактор Р нивата и С4 (Б.).

2.3.4. Изследване на влиянието на анти-фактор Р автоантителата върху нивата на анти-С1q автоантителата

Всички 73 пациенти, изследвани за анти-фактор Р бяха изследвани и за анти-С1q автоантитела. Патологично повишени нива на анти-С1q се наблюдаваха при 16 (16/73, 21,92%) пациенти. Установихме тенденция към статистически значимо влияние на наличието на анти-фактор Р антителата върху високите нива на анти-С1q с относителен риск 2,67, 95%CI: 1,182-6,047, Fisher's exact test, $p=0,056$.

Медианата на нивата на анти-фактор Р антителата при пациенти, позитивни за анти-C1q беше 0,097, а медианата на анти-фактор Р антителата при пациенти, негативни за анти-C1q – 0,048. Статистически значима разлика в нивата на анти-фактор Р спрямо серологичния статус на анти-C1q не беше отчетен (Mann-Whitney, $p=0,094$, Фиг. 19, А). Отсъствието на корелационна зависимост ($r=0,195$, $p=0,093$, Фиг. 19, Б) потвърди тези резултати.



Фиг. 19. Анти-фактор Р нива в зависимост от наличие (+) и отсъствие (-) на анти-C1q антитела при пациентите с ЛН (А.). Корелационна зависимост между анти-фактор Р и анти-C1q антителата (Б.).

2.4. Анализ на асоциации между нивата на анти-фактор Р автоантителата и основни хистологични признаци на ЛН

Хистологична диагноза беше налице за 71 от включените в скрининга за анти-фактор Р антитела (71/73, 97,30%) пациенти. Хистологичните класове на пациентите бяха определяни съгласно критериите на International Society of Nephrology (ISN) и Renal Pathology Society (RPS). Хистологичните индекси на активност и хроничност бяха отчетени според критериите на National Institutes of Health (NIH). Данните за хистологичните признаци при изследваните пациенти в настоящата дисертация бяха предоставени от Клиниката по нефрология към УМБАЛ „Царица Йоана – ИСУЛ“. При отчитането на зависимости на анти-фактор Р антителата и хистологичните белези на хроничност бяха включени само случаите, при които времето между вземането на кръвната проба за изследване на анти-фактор Р антителата и провеждането на бъбречната биопсия е било поне 12 месеца.

2.4.1. Изследване на нивата на анти-фактор Р автоантелата при различните хистологични класове ЛН

Изследваните пациенти бяха разпределени в хистологичните класове ЛН, както следва: един (1/71, 4,00%) от пациентите беше диагностициран с Клас VI ЛН; 11 (11/71, 15,49%) имаха Клас V ЛН; 23 (23/71, 32,39%) попадаха в групата на Клас IV ЛН; седем (7/71, 9,86%) – Клас III ЛН; 25 (25/71, 35,21%) – Клас II и четирима (4/71, 5,63%) – Клас I ЛН. Нямаше позитивни за анти-фактор Р автоантитела пациенти с Клас VI и Клас I в изследваната кохорта. Разпределението на анти-фактор Р позитивните пациенти сред останалите хистологични класове беше както следва: трима (3/17, 17,65%) попадаха в групата на пациентите с Клас V ЛН; девет (9/17, 52,94%) бяха с Клас IV; един (1/17, 5,88%) имаше Клас III и четирима (4/17, 23,53%) – Клас II ЛН.

2.4.2. Изследване на нивата на анти-фактор Р антителата при пациенти с хистологични лезии на активност и хроничност

Нивата на анти-фактор Р в пациентите бяха проследени в зависимост от наличието на хистологичните белези на активност. Наличието на анти-фактор Р антителата беше разглеждано и във връзка с наличие на хистологичните белези за хроничност. Резултатите от сравнителния анализ между нивата на анти-фактор Р в групите с и без изследваните хистологични признаци на лупусна нефритна активност и хроничност са показани в Таблица 2.

Таблица 2: Сравнителен анализ между нивата на анти-фактор Р в групите пациенти с и без хистологични признаци на активност и хроничност на ЛН.

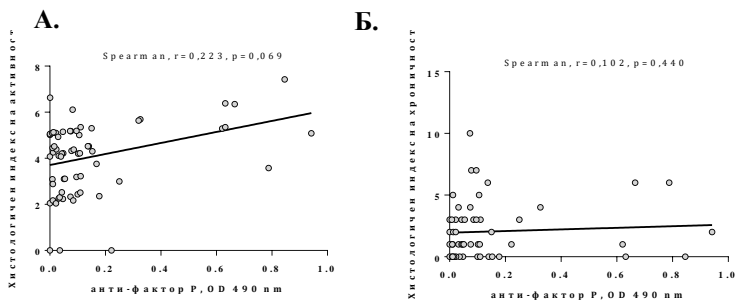
Хистологични признаци	Анти-Фактор Р Медиана (граница от - до)		Р стойност
	Присъствие	Отсъствие	
Ендокапиллярна пролиферация	0,048 (0,000-0,942)	0,054 (0,000-0,326)	0,797
Депозити "телени бримки"	0,238 (0,000-0,942)	0,047 (0,000-0,788)	0,009
Фибриноидна некроза/кариорексис	0,076 (0,000-0,666)	0,048 (0,000-0,942)	0,655

Клетъчни полулуния	0,124 (0,073-0,666)	0,043 (0,000-0,942)	0,009
Интерстициално инфилтрация	0,061 (0,000-0,942)	0,051 (0,000-0,846)	0,740
Гломерулна склероза	0,053 (0,000-0,788)	0,061 (0,000-0,942)	0,697
Фиброзни полулуния	0,124 (0,073-0,788)	0,043 (0,000-0,942)	0,008
Тубулна атрофия	0,078 (0,000-0,942)	0,045 (0,000-0,846)	0,349
Интерстициална фиброза	0,064 (0,000-0,942)	0,048 (0,000-0,846)	0,829

При пациенти с доказано наличие на субендотелни депозити "телени бримки" и клетъчни полулуния, нивата на анти-фактор Р нивата са статистически значимо по-високи от нивата им при пациенти с отсъствие на тези признаци на хистологична активност (Mann-Whitney U, и за двата белега $p=0,009$, Таблица 2).

От хистологичните белези на хроничност статистическа значима разлика в нивата на анти-фактор Р беше установена само между пациентите при които се доказват фиброзни полулуния и пациенти без такъв признак на хроничност на ЛН (Mann-Whitney U, $p=0,008$, Таблица 2).

Статистически значима корелация не беше намерена между нивата на анти-фактор Р и хистологичните индекси на активност и хроничност (Spearman, $r=0,244$, $p=0,049$, Spearman, $r=0,102$, $p=0,440$, фиг. 20).

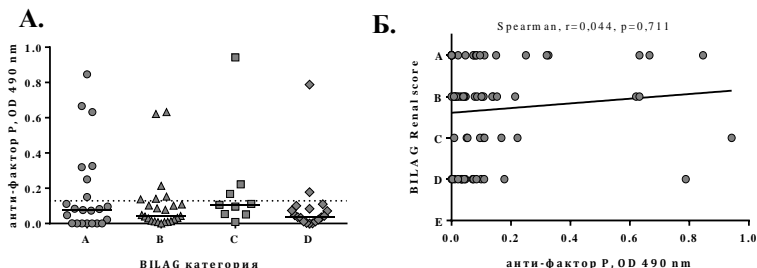


Фиг. 20. Корелационна зависимост между нивата на анти-фактор Р и хистологичния индекс на активност (А.) и хистологичния индекс на хроничност (Б.).

2.5. Изследване на влиянието на анти-фактор Р автоантелата върху комплексната оценка на ЛН по BILAG Renal score

Сред позитивните за анти-фактор Р антитела 7 (7/22, 31,81%) пациенти бяха оценени в категория А, BILAG Renal score, 6 (6/24, 25,00%) пациенти бяха оценени в категория В, 3 (3/9, 33,33%) пациенти – в категория С и 2 (2/18, 11,11%) – в категория D. В изследваната кохортата пациенти с ЛН нямаше такива в категория Е.

Не беше установена статистически значима разлика в нивата на анти-фактор Р в различните категории пациенти по BILAG Renal score (фиг. 21, А.). При изследване на зависимостта между нивата на анти-фактор Р и категорията по BILAG Renal score също не беше установена статистически значима корелационна зависимост (Spearman, $r=0,044$, $p=0,711$, Фиг. 21, Б.).



Фиг. 21. Нива на анти-фактор Р антителата при пациентите, разпределени в зависимост от комплексната клинично-лабораторна оценка на активността на ЛН по BILAG Renal score (А.). Корелационна зависимост между анти-Фактор Р нивата и BILAG Renal score (Б.).

Беше оценено значението на анти-фактор Р антителата да определят най-тежката категория А BILAG Renal score самостоятелно и в комбинация с други показатели на активност на лупусната нефропатия. Резултатите са представени в Таблица 3.

Сами анти-фактор Р антителата не се свързаха с по-високата категория на активност. Само в комбинация с други имунологични маркери на активност, анти-фактор Р автоантителата определят значимо категория А по BILAG Renal score. Високата негативна предиктивна стойност (NPV) на комбинацията на анти-фактор Р с анти-dsDNA

предполага, че пациентите, които са негативни и за двата показателя няма да развият тежка форма на заболяването.

Таблица 3. Значение на анти-фактор Р антителата самостоятелно и в комбинации с конвенционални маркери за активност на ЛН за определяне на категория А по BILAG Renal score

BILAG A vs BILAG B, C, D	Специфичност, %	NPV, %	Чувствителност, %	PPV, %	P
Анти-С1q	87,9% (188/214)	85,5% (188/219)	40,4% (21/52)	44,7% (21/47)	0,000
<i>Анти-фактор Р</i>	18,7% (40/214)	75,5% (40/53)	74,5% (38/51)	17,9% (38/212)	0,275
Анти-С1q и <i>Анти-фактор Р</i>	88,3% (189/214)	85,1% (189/222)	35,3% (18/51)	41,9% (18/43)	0,000
Анти-С1q и Анти-dsDNA	91,4% (169/185)	86,7% (169/195)	38,1% (16/42)	50,0% (16/32)	0,000
<i>Анти-фактор Р</i> и Анти-dsDNA	57,3% (106/185)	89,8% (106/118)	70,7% (29/41)	26,9% (29/108)	0,001
Анти-С1q, Анти-dsDNA и нива на С3 и С4	97,8% (176/180)	84,2% (176/209)	19,5% (8/41)	66,7% (8/12)	0,000
<i>Анти-фактор Р</i> , Анти-dsDNA и нива на С3 и С4	94,4% (170/180)	85,9% (170/198)	30,0% (12/40)	54,5% (12/22)	0,000

III. Проследяване на промени в нивата на новооткритите анти-комплементни автоантитела в хода на заболяването.

Проследяването на динамиката на промените в нивата на новооткритите автоантитела беше възможно само за анти-фактор Р. Тъй като само за тези антитела имаше проследяване в нивата за период средно от 12 месеца на поне 3 проби от пациент. 39 от пациентите (39/73, 53,42%) бяха включени в това наблюдение. Повишаване на анти-фактор Р антителата до патологични нива поне в една от пробите беше установено при 27 (27/39, 69,23%) от пациентите. Проследяването на нивата на анти-фактор Р антителата в динамика беше проведено във връзка с отчитане на промяна в категорията на лупусния нефрит по

BILAG Renal score с цел да проучим възможно прогностично значение на тези антитела.

Само при един пациент с ЛН беше отчетена в динамика статистически значима корелационна зависимост между повишението на нивата на анти-фактор Р до патологични стойности с последващо повишение на категорията по BILAG бяха 1/29 (3,45% от всички, при които се установи повишаване на анти-фактор Р до патологични стойности в динамика). При 27 (27/29, 93,10%) имаше повишаване на анти-Фактор Р до патологично ниво, без да се отчита повишаване на BILAG категорията. При 17 пациенти (17/39, 43, 59%) нямаше повишение на категория по BILAG в периода на проследяването.

IV. Изследване на ефекти на анти-комплементните антитела върху физиологичните взаимодействия на прицелните им молекули с техни естествени лиганди (белтъци и клетки)

За анти-комплементните антитела, които показаха клинично значение, асоциирайки се с различни клинично-имунологични параметри за оценка на активността на заболяването бяха проведени функционални анализи с цел да се проследи ролята им при взаимодействията на комплементните протеини с техните естествени лиганди.

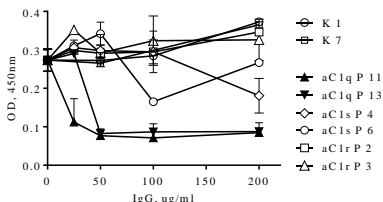
1. Функционални анализи на анти-C1g и анти-C1s автоантителата

В настоящото проучване не изследвахме асоциации на анти-C1g и анти-C1s автоантителата с клиничната активност. Такива данни са получени в предходни изследвания на екипа (Василев, 2018). Но намерените корелации на анти-C1g антителата с някои маркери на имулогична активност на заболяването в предходно наше проучване ни дадоха основание да проверим влияните на тези антитела върху формирането на C1 комплекса.

C1g и C1s се произвеждат в черния дроб, докато C1q се продуцира главно в тъканните макрофаги и незрели дендритни клетки, което означава, че поне част от C1 комплексите се образуват в циркулацията. При сложното сглобяване на C1 комплекса големи части от C1g и C1s са скрити в конуса на C1q - колагеновите стъбла. За да се оцени

възможността на анти-C1г и анти-C1s автоантителата да модулират способността на серин-протеазите C1г и C1s да взаимодействат с C1q, така, че да повлияят формирането на активен C1 комплекс беше конструиран функционален ELISA тест (фиг. 22).

От представената фигура е видно, че анти-C1г и анти-C1s антителата не променяха C1-образуващия капацитет (фиг. 22). Инхибиращ ефект върху формирането на C1 комплекса имаха само анти-C1q антителата.



Фиг. 22. Анализ на възможността на анти-C1г и/или анти-C1s антителата да повлияят образуването на C1 комплекса. ELISA плаките са имобилизирани с поликлонално заешко анти-C1q антитяло (1:1000). Плаките са блокирани с 1% BSA. По време на блокирането IgG в концентрации: 200µg/ml, 100µg/ml, 50µg/ml, 25µg/ml, 12,5µg/ml, 6,25µg/ml, 3,13µg/ml, 1,56µg/ml и 0µg/ml, изолирани от пациенти, позитивни за анти-C1г, от пациенти, позитивни за анти-C1s, от пациенти, позитивни за анти-C1q, както и от здрави контроли, са инкубирани с 10µg/ml C1r/C1s и 2µg/ml C1q, разредени в TTBS, 1M CaCl₂. След промиване следва инкубация с козе анти-човешко C1s антитяло (1:500). Взаимодействията са детектирани чрез заешки анти-кози IgG - HRP-конюгат (1:2000) и субстрат TMB.

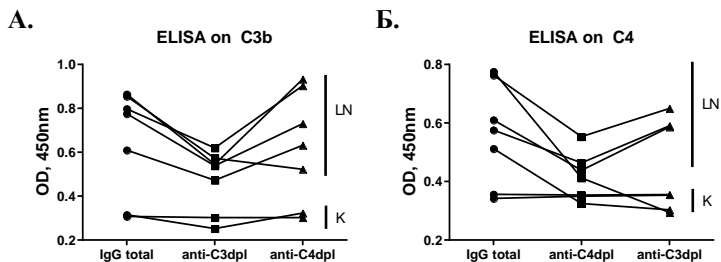
2. Функционални анализи на анти-C4 и анти-C3 автоантителата

Известно е, че комплементните протеини C3 и C4 са хомоложни. Също така е докладвано, че пациенти, позитивни за антитела срещу C3b проявяват реактивност срещу имобилизиран C4 (Vasilev, et al., 2019). До момента се знае, че анти-C3b антителата не са C3Nef (Daha et al., 1976; Vasilev, et al., 2019) тъй като C3Nef се свързват към конвертазата на алтернативния път, но не и към отделните ѝ компоненти. Но все още е трудно да се направи заключение, дали анти-C3 и анти-C4 са отделни

антитела или става въпрос само за крос-реактивност на анти-С3. Детектирането на анти-С4 антитела в предходни изследвания на екипа позволи да се проведе експеримент за разграничаване на тези автоантитела.

2.1. Анализи за разграничаване на анти-С4 от анти-С3 автоантителата

Проведен беше анализ, за да се изясни дали анти-С3 и анти-С4 антителата са независими и присъстват едновременно в двойно позитивните пациенти или става въпрос за кръстосано-реагиращи антитела, свързващи се към общ епитоп на повърхността на двата белтъка. Подготвени бяха сефарозни колонии за афинитетна хроматография, натоварени с С3 или С4 в концентрация 5 mg/ml. Пречистени IgG от пациенти, позитивни едновременно за анти-С3 и анти-С4, както и от здрави доброволци се прекарваха през колоните за да се изчерпят на IgG с реактивност към С3 или към С4. Елуатът от всяка колона се събираше и анализираше за реактивност към имобилизиран С3b (фиг. 23, А.) или С4 (фиг. 23, Б.) чрез ELISA.



Фиг. 23. Кръстосана реактивност на анти-С3 и анти-С4 автоантитела от пациенти с ЛН. Пречистени IgG от петима пациенти с ЛН двойно позитивни за анти-С3 и анти-С4 и от двама здрави доброволци се прекарват през колонии за афинитетна хроматография, натоварени или със С3 или с С4, за да се свържат IgG с реактивност към С3 или към С4. Елуатът се събира и анализира за реактивност към имобилизиран С3b (А.) или С4 (Б.) чрез ELISA

Всички тествани проби намалиха реактивността си към съответния антиген след преминаване през колона, съчетана със съответния антиген (т.е. анти-С3b реактивността намаляваше след преминаване през

натоварената със С3 колона и анти-С4 реактивността намаляваше след преминаване през - С4 колона) (фиг. 23, А. и Б.) При четири от изследваните пет проби реактивността спрямо С3b беше запазена след преминаване през С4 колона. Също при три от тях реактивността спрямо С4 беше частично или напълно запазена след преминаване през С3 колона. Това показва, че вероятно тези пациенти имат независими анти-С3b и анти-С4 антитела. IgG от пациента, които загубиха реактивността си по отношение на С3b след преминаване през С4 колона (фиг. 23, А.), не показва реакционна активност и към С4, след преминаване през С3 колона (фиг. 23, Б.), което говори за кръстосана реактивност на антителата и разпознаване на общ епитоп за двата протеина. Резултатите от този експеримент показват, че при пациенти с ЛН съществуват както независими анти-С3 и анти-С4 антитела, така и кръстосано реагиращи такива.

2.2. Функционална активност на анти-С3 антителата в двойнопозитивни за анти-С3 и анти-С4 пациенти

Беше проведен анализ за оценка на нивата на С3 и С4 в пациенти позитивни за анти-С3 и анти-С4 антителата. Установи се, че двойно позитивните за анти-С3 и анти-С4 проби имат статистически значими по-ниски нива на комплементните С4 и С3, сравнени с нивата при анти-С3 позитивните проби (Mann-Whitney, $p=0,002$ и $p=0,009$, съответно). Двойно позитивните за анти-С3 и анти-С4 проби имат статистически значими по-ниски нива от позитивните за само анти-С4 проби (Mann-Whitney, $p= 0,0022$ и $p=0.003$, съответно).

За да се провери функционалната активност на анти-С3 антителата в пациенти, които са двойно позитивни за анти-С3 и анти-С4 автоантитела беше проведен анализ на кофакторната активност на фактор I. Целта беше да се провери могат ли регистрираните анти-С3 антитела в тези пациенти да възпрепятстват активирането на фактор I от фактор H.

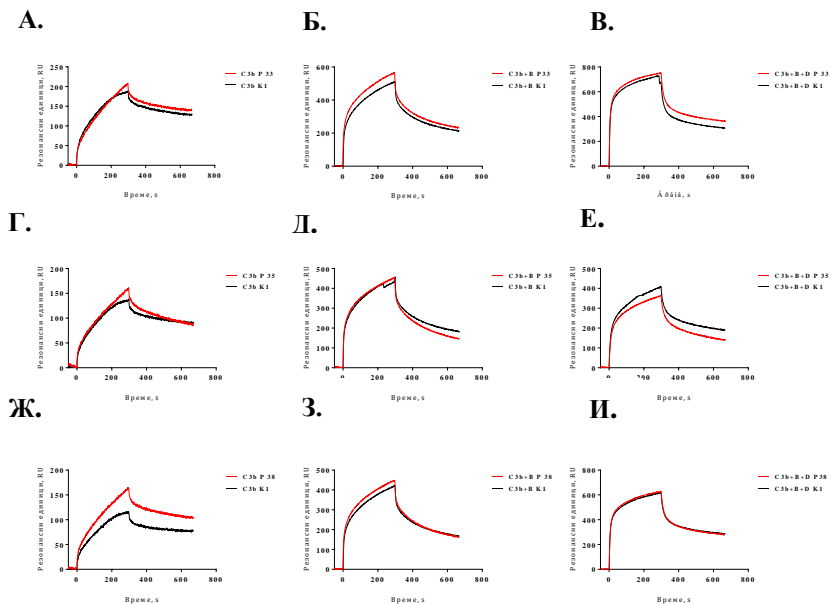
При хидролизата на С3b се генерират N-крайни 68-kDa и C-крайни 43-kDa фрагменти, визуализирането на тези фрагменти по време на анализа показва генерирането на iC3b (неактивен С3b). Поради вариабилността на контролните проби и липсата на разлика между пациенти и здрави доброволци заключихме, че анти-С3 антителата в пациентите не повлияват активирането на фактор I от фактор H.

3. Функционални анализи на анти-фактор Р автоантителата

3.1. Ефект на анти-фактор Р антителата върху формирането на С3 конвертазата на алтернативния път

Фактор Р (FP) е единственият позитивен регулатор на системата на комплемента. Той стабилизира С3 конвертазата (С3bBb) на алтернативния път. Механизмът на сглобяване на С3bBb включва - депозиция на С3b, свързване с фактор В, образуване на С3bВ (проконвертаза), след активиране от фактор D образуване на С3bBb (конвертаза). За да се оцени функционалната значимост на новооткритите анти-фактор Р автоантела в пациентите с ЛН, бяха проследени чрез SPR технологията в реално време ефектите на антителата върху възможността фактор Р да свързва С3b, С3bВ и С3bBb.

Анти-фактор Р позитивни проби от пациенти, които показаха силна реактивност бяха използвани при функционалните анализи. Присъствието на антителата слабо повишава свързването на Фактор Р с С3b при пациенти P33, P35 и P38 (фиг. 24, А., Г. и Ж.) и с проконвертазата при пациенти P33 и P38 (фиг. 24, Б. и З.), показано чрез SPR-базирана технология. Не се наблюдава разлика във влиянието на анти-фактор Р при свързването на фактор Р при изследваните пациенти и контролните IgG върху формирането на конвертазата.



Фиг. 24. SPR сензограми за влияние на анти-фактор P антителата върху взаимодействието на фактор P с C3b C3bB и C3bBb. Изследвано е влиянието на пречистени IgG от пациент (P33), позитивен за анти-FP антитела и от здрав доброволец (K1) върху свързването на фактор P със C3b (А.), със C3b+FB (проконвертаза) (Б.), и със C3b+FB+FD (конвертаза) (В.) в реално време. Изследвано е влиянието на пречистени IgG от пациент (P35), позитивен за анти-FP антитела и от здрав доброволец (K1) върху свързването на фактор P със C3b (Г.), със C3b+FB (проконвертаза) (Д.), и със C3b+FB+FD (конвертаза) (Е.) в реално време. Изследвано е влиянието на пречистени IgG от пациент (P38), позитивен за анти-FP антитела и от здрав доброволец (K1) върху свързването на фактор P със C3b (Ж.), със C3b+FB (проконвертаза) (З.), и със C3b+FB+FD (конвертаза) (И.) в реално време. Фактор P е имобилизиран върху SPR чип след това изложен на IgG от пациенти, позитивни за анти-фактор P (P33, P35, P38) и IgG от здрав доброволец (K1), последвано от въвеждане на C3b (А., Г. и Ж.), на C3b+FB (Б., Д. и З.) и на C3b+FB+FD (В., Е. и И.).

За да се измери доколко анти-фактор Р автоантителата повлияват активацията на класическия/лектинов и алтернативен път, се проведе количествен анализ за определяне нивата на C4a-des Arg и Ba, съответно. При нормални условия активирането на класическия или лектинов път води до разкъсване на комплементния протеин C4 в C4a и C4b фрагменти под действието на протеазата C1s. C4a бързо се разкъсва до по-стабилна и по-малко активна C4a-des Arg форма. При алтернативния път фактор В, който присъства в C3(H20),В или C3b,В комплекса, се разкъсва в Ba (33 Kd) и Bb (60 Kd) фрагменти под действието на фактор Factor D. Значима разлика в нивата на C4a и Ba фрагментите при IgG от ЛН пациенти и здрави контроли не се установи. Получените резултати показаха, че анти-фактор Р антителата не повлияват статуса на активация на комплементните пътища.

3.2. Изследване на опсонизацията на късни апоптотични клетки с C3b и фактор Р в присъствие на анти-фактор Р антитела

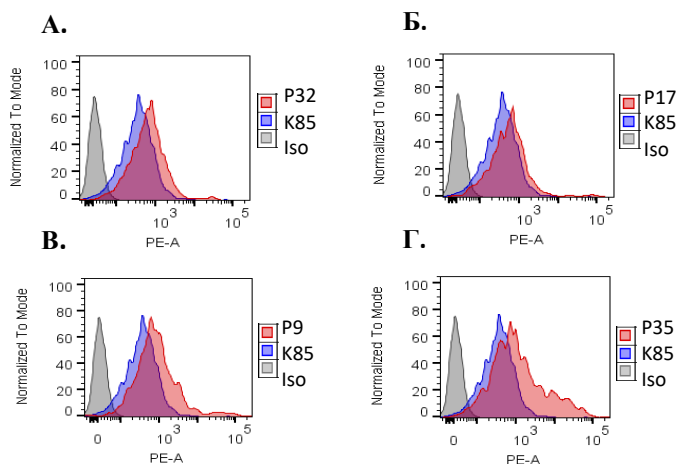
ЛН се характеризира с гломерулна депозиция на циркулиращи имунни комплекс. Докладвано е анти-C3 автоантителата да стимулират комплементната активация и привличането на възпалителни клетки, засилвайки гломерулната увреда (Jourde-Chiche, et al., 2019). Освен това, пациенти с гломерулна депозиция на фактор Р, показват увеличена екскреция на уринен протеин (Sato, et al., 2011). От тези данни, изглежда алтернативния път има роля в прогресията на гломерулно увреда и нещо повече автоантитела срещу неговите компоненти медирират този процес. Затова беше проведен функционален тест за оценка на възможността на анти-фактор Р автоантителата да модулират опсонизацията на комплемента върху късни апоптотични клетки.

Апоптотичните клетки бяха инкубирани с човешки серум и IgG от пациенти с патологично повишени анти-фактор Р (P33, P35, P38 и P9) и анти-C3 (P32, P17) антитела в условия на активиране на алтернативния комплементен път и блокиране на класическия и лектиновия път (EGTA, MgCl₂). След промиване депозицията на C3b и фактор Р бяха оценени чрез поточна цитометрия.

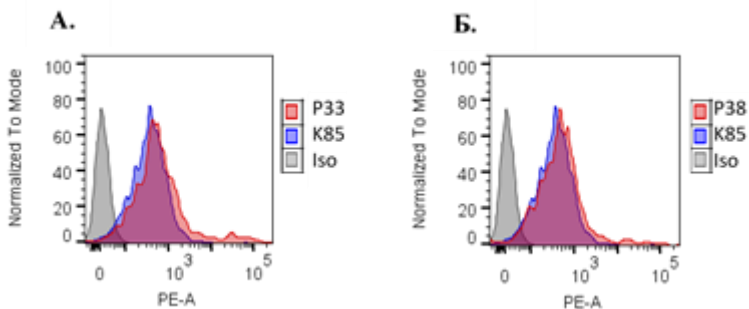
За четирима (P32, P17, P9 и P35) от изследваните шестима пациенти беше отчетена повишена депозиция на C3 фрагменти върху късни апоптотични клетки (фиг.25).

Депозиция на С3b беше регистрирана не само в присъствие на анти-С3 позитивни IgG (фиг. 25, А. и Б.), но и в присъствие на анти-фактор Р позитивни IgG (фиг. 25, В. и Г.).

Депозицията на С3 фрагменти върху късни апоптотични клетки в присъствие на анти-фактор Р антителата не се наблюдава при двама от позитивните за анти-фактор Р пациенти (P33, P38) (фиг. 26 А. и Б.). Това бяха същите пациенти, чийто анти-фактор Р антителата повишаваха слабо свързването на фактор Р с С3b (фиг. 24 А. и Ж.) и с проконвертазата (фиг. 24 Б. и З.).

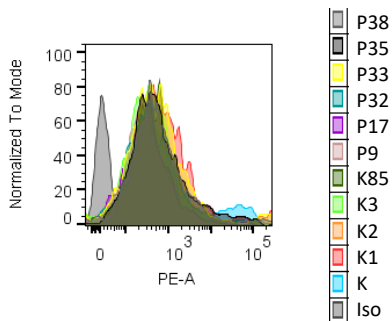


Фиг. 25. Хистограма от FACS анализ на С3 депозиция в присъствие на IgG, пречистени от пациенти, позитивни за анти-С3 (P32 (А.) и P17 (Б.)) и за анти-фактор Р (P9 (В.) и P35 (Г.)) аутоантитела, сравнени с контролна проба (K85).



Фиг. 26. Хистограма от FACS анализ на C3 депозиция в присъствие на IgG, пречистени от пациенти позитивни за анти-фактор Р (P33 (А.) и P38 (Б.)) аутоантитела, сравнени с контролна проба (K85).

За фактор Р свързване бяха изследвани – IgG пречистени от същите пациенти – P33, P35, P38, P9, P32 и P17 като и IgG – от здрави доброволци – K85, K3, K2 и сборна контрола К (фиг. 27).



Фиг. 27. Хистограма от FACS анализ на фактор Р свързване върху късни апоптотични клетки в присъствие на IgG, пречистени от пациенти позитивни за анти-C3 (P32, P17) и за анти-фактор Р (P33, P35, P38, P9) аутоантитела, сравнени с четири контролни проби (K85, K3, K2 и К).

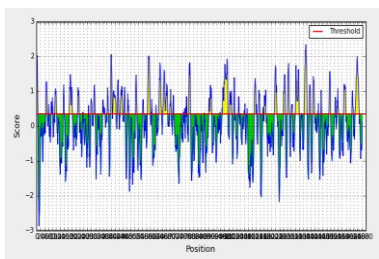
Резултатите от анализите представени с хистограмата на фиг. 27 показваха, че анти-C3 и анти-фактор Р антителата не са фактор при депозицията на фактор Р върху късни апоптотични клетки.

V. Теоретично предсказване на епитопи на някои от установените анти-комплементни автоантитела

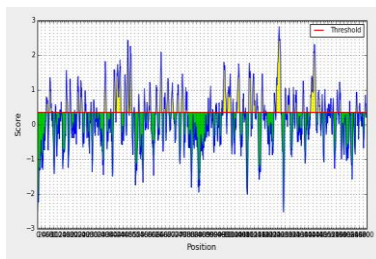
1. Визуализиране на епитопите на C3 и C4 за анти-C3 и анти-C4 автоантителата.

Функционалните последствия на анти-C3 автоантителата са познати, но не и тези на анти-C4. Също така почти нищо не се знае за епитопната специфичност на анти-C4, а силната структурна хомология между C3 и C4 предполага наличието на общи епитопи. В продължение на анализа за разграничаване на анти-C3 от анти-C4 автоантителата, проверихме кои са епитопите в C3 и C4, срещу които генерирането на тези антитела би се засилило и би се индуцирал автоимунен отговор, както и дали тяхното разположение подчертава ролята на антителата в ЛН патогенезата. Независимо от тяхната хомология, обаче идентичността на последователностите между C3 и C4 е само 25% с 466 идентични позиции и 541 подобни позиции (Uniprot, Clustalo). Епитопите на C3 и C4 бяха предсказани с помощта на IEBD сървър - <http://tools.iedb.org/bcell/> (фиг. 28, А. и Б.) От фиг. 28, Б. е видно, че C4 се очаква да е по имуногенен в сравнение с C3.

А.



Б.

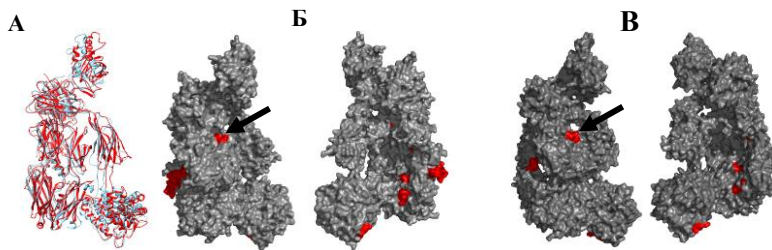


Фиг. 28. Прогнозирани чрез IEBD сървър епитопи на C3 (А.) и на C4 (Б.) в В-лимфоцити.

На графиките Y-осите изобразяват съответната оценката всеки остатък (осреднена в указания прозорец), резултат от използвания VeriPred Linear Epitope Prediction; докато X-осите изобразяват позициите на остатъците в последователността. Праговата стойност за C3 и за C4 беше 0,350, а максималната 2,342 и 2,829, съответно. За

аминокиселинните остатъци стойности над праговата се интерпретираха, като по-голяма вероятност за остатъка да бъде част от епитоп (тези остатъци са оцветени в жълто на графиките Фиг. 28). За С3 тези остатъци бяха 557 от 1663, а за С4 609 аминокиселинни остатъци са вероятно част от епитопо от общо 1744. Представеният метод обаче не предсказват епитопите сами по себе си, нито линейни, нито прекъснати, - те могат само да насочат изследователите да изследват по-нататък протеиновите региони за това, че са истински епитопи.

Визуализирането на прогнозираните епитопи в молекулата на С3 и С4 са представени на фиг. 29, А., Б. и В.



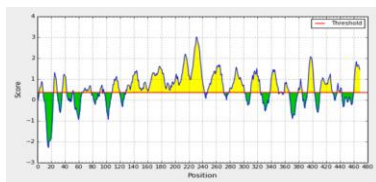
Фиг. 29. *In silico* представяне на епитопите на С3b и С4b в В-лимфоцити. Силна структурна хомология между С3b (червено) и С4b (синьо) Структурна суперпозиция, генерирана чрез софтуера USGS Chimera (А.). Пространствена локализация на предсказаните общи епитопи (червено) в С3b (Б.), в С4b (В.). Визуализацията е осъществена чрез PyMol.

Въпреки че някои от предсказаните епитопи се припокриват по структура, те са по-малко от 50% идентични по секвенция. Само 4 предсказани епитопа са с повече от 50% идентични секвенции. Един от епитопите при С3b – TIYTPG (маркиран с черна стрелка, фиг. 29, Б.) и един от епитопите при С4b – QPIYNPGQR (маркиран с черна стрелка, фиг. 29, В.) лежат в зона, където се свързват регулаторните молекули – фактор Н и CD46. Автоантитела, разпознаващи тези епитопи биха могли да доведат до смущение при свързването както на С3b, така и на С4b с регулаторите.

2. Визуализиране на епитопите на фактор Р за анти-фактор Р автоантителата

Свързването на анти-фактор Р IgG, пречистени от пациентска плазма и имобилизирането ѝ върху фактор Р беше специфично при използване на SPR базирана технология (фиг. 7). Това ни даде основание да предскажем чрез *in silico* анализ кои епитопи са имунодоминантни в молекулата на фактор Р и каква е тяхната локализация.

Епитопите на фактор Р бяха прогнозирани също с помощта на IEBD сървър - <http://tools.iedb.org/bcell/> (фиг. 30).



Фиг. 30. Прогнозирани чрез IEBD сървър епитопи на фактор Р в В-лимфоцити. На графиката Y-осите изобразяват съответната оценката всеки остатък (средена в указания прозорец), резултат от използвания VeriPred Linear Epitop Prediction; докато X-осите изобразяват позициите на остатъците в последователността.

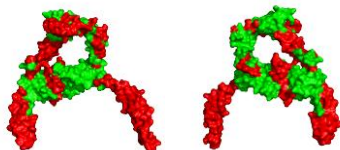
От данните на фигурата се вижда, че праговата стойност за фактор Р беше 0,350, а максималната 3,019. За аминокиселинните остатъци стойности над праговата се интерпретираха, като по-голяма вероятност за остатъка да бъде част от епитоп (тези остатъци са оцветени в жълто на графиките фиг. 30). За фактор Р тези остатъци бяха 304 от 469.

В Таблица 4 са представени предсказаните чрез IEBD пептидни антигенни детерминанти в фактор Р молекулата с големина повече от 3 аминокиселинни остатъка.

Таблица 4: Пептидни антигенни детерминанти в молекулата на фактор Р, предсказани чрез IEBD.

Start	End	Peptides longer than 3 AA properdin
3	8	TEGAQA
24	28	ATGSD
36	42	YEESGK
66	78	KRSGGLCQPCRSP
91	94	VTCS
109	119	GQCSGKVPAGT
129	243	DQQCCPEMGGWSGWPWEPCSVTCSKGRTRRRRACNHPAPKCGGHCPGQAQSEACD TQQVCPTHGAWATWGPWTPCSASCHGGPHEPKETRSRKCSAPEPSQKPPGKPCPLGLAY
248	271	CTGLPPCPVAGGWPWGPVSPCPV
278	301	TMEQRTCNHPVQHGHPFCAGDAT
310	324	VPCPVDGEWDSWGEW
339	350	EIPGQQRGRTC
359	366	RCAGQQQD
379	385	KGSWSEW
393	403	PPCGPNPTRAR
411	429	LPKYPPVTSMVEGQGEKNV
436	442	LPRCEEL

Визуализирането на прогнозираните епитопи в молекулата на фактор Р е представено на фиг. 31.



Фиг. 31. In silico представяне на епитопите на фактор Р в В-лимфоцити. Пространствена локализация на предсказани епитопи (червено) на повърхността на фактор Р, мономер (зелено). Визуализацията е осъществена чрез PyMol.

Голяма част от предсказаните епитопи са разположени извън зоната/"върха" образувана при свързването на два мономера и отговорна за свързването към С3 конвертазата. Те бяха локализирани върху свързващи области, различни от тази зона.

ОБСЪЖДАНЕ

Системата на комплемента играе ключова роля в патогенезата на ЛН. Автоантитела, насочени към някои компоненти и регулатори на комплементната каскада са доказани при пациенти с ЛН, но по-системен анализ на автоантителата към всички компоненти не беше правен. Не е добре изяснено и дали и до каква степен тези автоантитела имат патогенетичен ефект. Най-детайлни изследвания при пациенти със СЛЕ и/или ЛН на анти-комплементни автоантитела са провеждани главно за анти-C1q автоантителата. Малкото на брой изследвания върху други анти-комплементни автоантителата не позволяват да се заключи за потенциалната им патогенетична роля. Възможно е сред тях да има обещаващи нови биомаркери на ЛН. Ето защо настоящото изследване беше посветено на търсене на нови анти-комплементни антитела в ЛН пациенти, като изучаването на функционалната активност на тези антитела, би могло да допринесе за разкриването на нови патогенетични механизми с участие на алтернативния комплементен път, както и да доведе до установяване на нови биомаркери за ЛН.

Традиционно, класическият път е ключов за бъбречна увреда при ЛН. Пациентите с ЛН типично имат автоантитела срещу компонента C1q на инициаторния C1 комплекс на класическия път. В зависимост от кохортата и географския произход, позитивността за анти-C1q достига 97%. Поради тази висока честота дори се предполага, че ЛН не се развива в отсъствие на анти-C1q (Sinico et al., 2005; Gargiulo et al., 2015; Trendelenburg et al., 2006; Fremeaux-Vacchi et al., 2002). Въпреки това честотата на анти-C1q в нашата българска кохорта с биопсично доказан ЛН е само 14/74 (18,9%). Този резултат потвърди предходни изследвания с български пациенти, пробите на които не са включени в настоящата кохорта. За българската популация традиционно се установява по-ниска честота на анти-C1q автоантителата от 23% (9/38) (Radanova et al., 2012) или 33% (8/24) (Tsacheva et al., 2007) в сравнение с други изследвани кохорти (45,5%, Orbail et al., 2015; 42.5%, Metwally et al., 2019; 61,7%, Braun et al., 2007; 60%, Stojan&Petri, 2016; 85,7%, Chi et al., 2015).

Механизмът за развитие на автоимунен отговор срещу C1q при ЛН пациенти все още не е добре изяснен. C1q съществува главно като C1 комплекс в циркулацията. Все още не е ясно дали автоантигенът е C1q

сам или в контекста на C1 комплекса. Известно е, че C1 комплексът свързва имунни комплекси и апоптотични клетки и активира класическия път, за да осигури опсонизацията с C3b, която улеснява тяхното изчистване при физиологични условия (Sterner et al., 2014; Kościńska-Kasprzak et al., 2014; Cook&Botto, 2006). Затова е възможно е като автоантиген в условията на заболяването да действа целият C1 комплекс - C1q с C1r и C1s. Въпреки, че C1 комплексът е лабилен и след действието на C1Inh C1s се инактивира и C1r-C1s-C1Inh комплекса дисоциира от C1, оставяйки изолиран C1q (Merle et al., 2015a).

В предходно изследване на екипа ни беше установено, че освен C1q, C1r и C1s също са таргети за автоантитела при ЛН (Василев, 2018). C1s има функции извън комплементната каскада, действайки като извънклетъчен матрикс-деградиращ ензим и ензим, изчистващ ядрени антигени (Eriksson&Nissen, 1990; Nissen et al., 1990; Busby et al., 2000; Naito et al., 2012; Cai et al., 2015; Kerr et al., 2005; Lu&Kishore, 2017; Kapferer-Seebacher et al., 2016). C1r и C1s са локално експресирани в тъканите, включително и в бъбреците, от клетки, които не експресират C1q (Xavier et al., 2017; Roumenina et al., 2019). Затова не е необичайна ролята им като автоантигени в контекст, независим от присъствието на C1q.

Анти-C1r и анти-C1s автоантителата бяха установени чрез ELISA (Василев, 2018), а в настоящото изследване беше проверена специфичността им (фиг. 2) и бяха проведени експерименти за тяхното валидиране чрез втори метод, базиран на SPR-технологията. Въпреки доказаната специфичност на тези антитела не бяха потвърдени взаимодействията им с техните антигени в реално време чрез SPR технологията. Възможно обяснение на този факт е наличието на C1r-анти-C1r и C1s-анти-C1s имунни комплекси в изследваните IgG препарати. Тези комплекси по всяка вероятност възпрепятстват регистрирането на автоантителата за 5-те минути време на взаимодействие при условия на SPR метода. Инкубациите от по 1 час при статичните условия при ELISA благоприятстват регистрирането на тези антитела.

По отношение на клиничното значение на анти-C1r и анти-C1s антителата в наши изследвания, подготвени за публикуване бяха намерени слаби, но значими корелации за нивата на анти-C1s автоантителата с C3 ($r = -0,157$, $p = 0,012$) с анти-dsDNA ($r = 0,150$, $p =$

0,025) и с нивата на АНА ($r= 0,162$, $p = 0,016$). Беше установено, че пациенти, позитивни за анти-C1s антитела имат по-високи нива на АНА ($p = 0,001$) и анти-dsDNA антителата ($p = 0,018$). Анти-C1s антителата са докладвани в едно изследване на пациенти с ЛН (He&Lin, 1998), където те са свързани с повишена протеолитична активност на C1s.

В настоящия дисертационен труд бяха проведени функционални анализи с цел изследване на ролята на намерените анти-C1s и анти-C1g антитела за формирането на C1 комплекса, както и на значението на анти-C1q автоантителата в тези условия (фиг. 22). Беше установено, че анти-C1s и анти-C1g антителата не повлияват формирането на C1 комплекса (фиг. 22), докато анти-C1q антителата вероятно инхибират физиологичната роля на C1q и пречат на образуването му.

В заключение беше установено, че C1s и C1g вероятно действат като автоантигени при ЛН независимо от присъствието на C1q. Поради високата хомология на аминокиселинната си последователност те могат да споделят общи епитопи. Но установяването на пациенти, позитивни само за един от антигените предполага независимото съществуване на анти-C1s и анти-C1g автоантителата. Клиничното им значение е слабо и доказано, само за анти-C1s автоантителата. За анти-C1s и анти-C1g автоантителата не е присъщо функционално значение, присъщо на анти-C1q антителата.

В настоящата дисертация беше проучено също за наличие на анти-C1Inh антитела като компонент на комплемента, взаимодействащ с C1 комплекса. Присъствието на анти-C1Inh автоантитела са описани при СЛЕ пациенти, но кохортните изследвания са оскъдни (Mészáros et al., 2010; Tsai et al., 2019). В изследваната от нас кохорта не бяха детектирани анти-C1Inh автоантитела. Възможна причина е различната методика за детекция на антителата по отношение на антигена. В настоящия дисертационен труд е използван пречистен човешки C1Inh, подходящ само за изследователски дейности. В своето изследване Meszaros и съавтори (2010) използват C1Inh – лекарствен препарат, а Tsai и съавтори (2019) – синтезирани C1Inh пептиди. Разбира се, не бива да се пренебрегва и фактът, че продукцията на автоантитела се повлиява от етническия произход и генетичните различия (Mahmoudi et al., 2017).

При предварителния скрининг на малък брой ЛН пациенти за автоантитела към други ранни комплементни компоненти в настоящото изследване беше доказан само един пациент, позитивен за автоантитела

срещу С2. Затова и по-нататъшен скрининг за тези автоантитела не се извърши.

Беше потвърдено наличието на анти-С3 и анти-С4 автоантитела при пациенти с лупусна нефропатия. Анти-С3 антителата бяха докладвани при предходно изследване на екипа ни (12/39, 31%, Vasilev et al., 2015) с честота подобна на други изследвания (11/34, 32% (Durand&Burge, 1984), 6/20, 30%, (Kenyon et al., 2011) и 13/53, 25% (Nilsson et al., 1990), които откриват анти-С3 при пациенти със СЛЕ. Интересът към анти-С3 антителата в условията на лупусна нефропатия се разраства през последните години и нашите находки бяха потвърдени в чуждо по-голямо кохортно проучване на пациенти с ЛН (64/134, 48%, Tao et al., 2020).

От предварителните ни анализи беше установено, че някои пациенти, позитивни за анти-С3 антителата показват реактивност и срещу имобилизиран С4 протеин (Vasilev et al., 2015). В същото време друго изследване показва, че пациенти с ЛН, позитивни за анти-С3b антитела са негативни за анти-С4b антитела (Birmingham et al., 2016), което предполага, че анти-С4/С4b антителата са отделно формиращи се при някои пациенти. Ние установихме, че при ЛН пациенти анти-С3 и анти-С4 могат да съществуват като независими антитела и като кръстанореагиращи. Кръстосаната реактивност може да се обясни със сходството в секвенцията и структурата на двата антигена (Merle et al., 2015a). Получените данни показваха значимостта на тази крос-реактивност – двойно позитивните за анти-С3 и за анти-С4 антитела проби имат статистически значими по-ниски С3/С4 нива от позитивните за анти-С3 проби. В същото време, двойно позитивните проби имат статистически значими по-ниски С3/С4 нива от анти-С4 позитивните проби, което навежда на мисълта, че ниските С4 нива у двойно позитивните проби се дължат не толкова на анти-С4, колкото на анти-С3 антителата.

В настоящата дисертационна работа беше проведен функционален анализ във връзка с изследване на влиянието на анти-С3 антитела, изолирани от двойно позитивни за анти-С3 и анти-С4 проби върху свързването на Фактор Н с С3b, а оттам и върху кофакторната активност на Фактор I. По-ранни изследвания на научния ни екип с анти-С3 позитивни пациенти показваха, че тези антитела понижават свързването на Фактор Н и кофакторната активност при единични пациенти,

сравнени с IgG от здрави контроли (Vasilev et al., 2015). В настоящия анализ обаче не получихме данни, че в присъствието на анти-С3 антителата от двойно позитивни за анти-С3 и анти-С4 автоантитела пациенти, се редуцира свързването на Фактор Н и кофакторната активност на Фактор I. Вероятно влиянието върху кофакторната активност от анти-С3 антитела е рядко явление, срещащо се в изолирани случаи (Vasilev et al., 2019).

Структурната хомология между С3 и С4, ELISA резултатите, показващи, че анти-С3 могат да свързват С4, както и потвърдената крос-реактивност чрез функционален анализ, предполагат общи епитопи в С3 и С4 молекулите. Идентичността в аминокиселинните последователностите на тези комплементни протеини е само 25%. Според някои автори кръстосаната реактивност, предизвикана от протеини, споделящи епитопи, е рядка при по-малко от 50% прилика на последователността (Aalberse et al., 2000). Aalberse и съавтори (2000) предполагат, че се изискват поне 70% идентичност на аминокиселини по цялата дължина на протеиновата последователност. Високата степен на идентичност предполага и че протеините ще имат сходно нагъване. Направеният *in silico* модел обаче, потвърди силната структурна хомология на С3 и С4 при нисък процент на идентичност. Въпреки тези противоречиви данни подобно на IgE реактивността към определени антигени (Sankian et al., 2005), реактивността на анти-С3 и анти-С4 може да зависи повече от конформационната структура, вместо от високата степен на идентичност в аминокиселинната последователност или дори линейната епитопна идентичност. Бяха предиктирани пептидните антигенни детерминанти при С3 и С4, които биха предизвикали В клетъчен отговор. Само 4 от предсказаните епитоп са с повече от 50% идентични секвенции. Един от епитопите при С3b – TIYTPG и един от епитопите при С4b – QPIYNPGQR лежат в зона, където се свързват регулаторните молекули – фактор Н и CD46. Автоантитела, разпознаващи тези епитопи биха могли да доведат до смущение при свързването както на С3b, така и на С4b с регулаторите. Някои изследвания показват, че В-клетъчните епитопи с по-къса дължина (7-12 аминокиселинни остатъка) свързват антителата слабо (Rahman et al., 2016), тъй като антигени с по-малко от 16 аминокиселини няма да се свържат към целия CDR на антитялото (Rubinstein et al., 2008; Kringelum et al., 2015). Друго изследване докладва, че индуциращите IgG епитопи

имат предимно дължина между 4 и 10 аминокиселинни остатъка, следвани от такива с 11-15 и 16-20 (Gupta et al., 2013).

Функционалните анализи на анти-С3 и анти-С4 автоантителата, както генерираните в хода на дисертацията *in silico* модели на антигенните детерминанти са нови данни, които ще бъдат обобщени в предстояща публикация на екипа.

Само едно изследване върху частен случай на ЛН докладва автоантитела срещу фактор-В (Nozal et al., 2015). А скорошни изследвания обвързват анти-фактор В автоантителата с други бъбречни заболявания като С3 гломерулоситис (Strobel et al., 2010; Hauer et al., 2019; Marinozzi et al., 2017; Chauvet et al., 2020). Получените от нас данни са в съгласие с изследването на Chauvet и съавтори (2020), свързано с изследване на патофизиологичните механизми при остър пост-инфекциозен гломерулонефрит, където като контролна група са били използвани плазми от 26 ЛН пациента, при които анти-фактор В автоантитела не са били детектирани (Chauvet et al., 2020).

Фактор Н е главен негативен регулатор на комплементния алтернативен път (Merle et al., 2015a; Abbas et al., 2014), които във високи нива в плазмата инхибира С3 активацията във флуидна фаза и върху клетъчната повърхност (Sanchez-Corral et al., 2018). Фактор Н е един от кофакторите за фактор I-медираното протеолитично инактивиране на С3b. Свързвайки се с С3b върху нормалната клетка, фактор Н прави възможно свързването на фактор I. Фактор I пък е плазмена серин-протеаза, която хидролизира С3b до неактивен продукт iC3b. iC3b не може да свърже фактор В и по-късно да се оформи алтернативната С3-конвертаза. Затова фактор I е отрицателен регулатор на комплементната активация.

Наскоро беше докладвано, че фактор Н защитава срещу гломерулно ендотелно увреждане чрез взаимодействие с неутрофилите при пациенти с анти-неутрофил цитоплазмено антитяло (ANCA) - асоцииран васкулит (AAV) (Chen et al., 2018). Известно е, че серумните нива на фактор Н при активен ЛН са по-ниски в сравнение при СЛЕ без нефрит или при контролна група от здрави доброволци (Wang et al., 2012). Възможно обяснение на това наблюдение е наличието на автоантитела срещу фактор Н. Тези автоантитела са добре изучени при автоимунната форма на HUS (aHUS) (Dragon-Durey et al., 2005; Dragon-Durey et al., 2010; Jozsi et al., 2007; Strobel et al., 2010; Blanc et al., 2012)

и по-малко при С3G (Blanc et al., 2015). При aHUS анти-фактор Н автоантителата образуват комплекси с антигена, водейки до функционален фактор Н дефицит (Puraswani et al., 2019; Cedzyński et al., 2019; Blanc et al., 2012). При С3G анти-фактор Н автоантителата също инхибират регулаторната активност на фактор Н, но за разлика от aHUS, където тези антитела са повече специфични за С-терминалната част на фактор Н, тук те разпознават различни епитопи (Blanc et al., 2015; Goodship et al., 2012; Nozal et al., 2012).

Присъствието на анти-фактор Н автоантителата в пациенти с ЛН е детектирано в ново изследване с честота в пациентската кохорта 8,3% (10/120) (Li et al., 2020). Нашето изследване също потвърди наличието на анти-фактор Н антителата в пациенти с лупусна нефропатия – 11,7 % (7/60). Като при нашата кохорта, както и при С3G, анти-фактор Н антителата не бяха свързани с CFHR1/CFHR3 делеция (Blanc et al., 2015) (фиг. 13).

До този момент в литературата анти-фактор Н антителата са открити при 6,8% (4/60) СЛЕ пациенти с висока активност на заболяването, но без ренално увреждане (Foltyn et al., 2012). А в голямо кохортно изследване на 241 пациенти с ЛН анти-фактор Н автоантитела не са доказани (Wang et al., 2012). Наличието на противоречиви данни за съществуването на анти-фактор Н антителата поражда интерес към изучаване на тяхното отношение към патогенезата на заболяването. В изследването на Li и съавтори (2020) съобщават, че позитивните пациенти за анти-фактор Н антитела имат по-ниски серумни нива на креатинин и по-ниска честота на остро бъбречно увреждане в сравнение с негативните за тези антитела пациенти. Авторите съобщават за протективна роля на анти-фактор Н антителата. Те предполагат, че анти-фактор Н антителата при ЛН се държат като естествени, неспецифични автоантитела със слаба възможност да активират комплемента. Всъщност, не е необичайно автоантитела с протективна роля да бъдат открити измежду традиционния репертоар на автоантитела при автоимунни заболявания и в зависимост от условията да упражнят патогенетична роля (Shoenfeld&Toubi, 2005).

В нашето изследване, обаче ние установихме, че наличието на анти-фактор Н антителата в изследваните от нас пациенти корелираше умерено и значимо с титрите на АНА, с нивата на анти-dsDNA и С3 както и с активния уринен седимент (фиг. 8, Б; 9, Б; 10, Б). Наличието на

анти-фактор Н антитела беше значимо свързано с ендокapилярната пролиферация и с хистологичния индекс на активност. Нещо повече, четирима от серопозитивните за анти-фактор Н пациенти (4/7, 57,14%) имаха тежко или умерено заболяване според BILAG renal score (категория А и категория В). Взети заедно, нашите резултати предполагат, че е по-вероятно анти-фактор Н автоантителата да са по-скоро свързани с активната фаза на ЛН, вместо да имат протективна роля, както приемат Li и съавтори (2020).

Главният проблем, свързан с анти-фактор Н автоантителата при ЛН, е че те са с много ниски нива в сравнение с високите титри при aHUS и С3G. Затова, когато всички публикувани кохорти се разгледат заедно, не изглежда клинично обосновано тези автоантитела да се изследват като носители на информация относно хода на ЛН и на този етап не може да се твърди, че са патологично значими. Резултатите от нашите анализи са обобщени в подготвен за публикуване ръкопис.

В научната литература до публикуването на нашите резултати (Radanova et al., 2020) наличието на анти-фактор Р антителата са докладвани само в единичен случай пациент с хетерозиготна С3 мутация, асоциирана с ЛН, като в IgG фракцията на пациента са доказани антитела и срещу други комплементни протеини – С3, фактор I и фактор Н (Nozal et al, 2015). Нашето изследване има претенции за първото кохортно регистриране на анти-фактор Р антителата.

В настоящото изследване анти-фактор Р антитела бяха доказани при 24,66% (18/73). Изследвани бяха връзките на тези автоантитела с нивата на стандартни серологични и маркери за оценка на заболяването.

При анализа на взаимодействията на анти-фактор Р антителата с основни клинично-лабораторни показатели на лупусната нефропатия беше установена тенденция към негативна корелация с eGFR, предполагайки възможна асоциация с бъбречното увреждане. Нещо повече, получените резултати при анализите за връзката им с някои от имунологичните параметри за активността на заболяването показаха, че пациенти с патологично променени нива на АНА, анти-dsDNA, комплементните С3 и С4 и анти-С1q антитела имаха също и по-високи нива на анти-фактор Р антителата (фиг. 15, А; 16, А; 17,А; 18, А; 19, А). Като това отчетливо беше установено при сравнението между групите – пациенти, позитивни за анти-dsDNA и пациенти с референтни нива на анти-dsDNA ($p=0,013$, фиг. 16, А) и пациенти с хипокомплементемия

C3 към тези без хипокомplementемия ($p=0,008$, фиг. 17, А.). Бяха установени слаби и умерени корелационни връзки между анти-фактор Р антителата и рутинни маркери за имунологична активност на ЛН – титри на АНА, нива на анти-dsDNA, хипокомplementемията за C3, хипокомplementемията за C4 – и анти-фактор Р антителата. Корелацията с C3 комplementната консумация би могла да бъде свързана с цялостния автоимунен статус, където анти-фактор Р антителата са епифеномен или са антитела с функционална значимост. При сравнително изследване на нивата на анти-фактор Р антителата в хистологичен аспект, се установи, че при пациенти с субендотелни депозити "телени бримки", клетъчни полулуния и фиброзни полулуния нива на антителата са по-високи в сравнение с нивата при отсъствие на тези хистологични белези (Таблица 2). Установена беше липса на значима корелация между нивата на анти-фактор Р антителата и хистологичния индекс на активност. Въпреки значимите корелации със споменатите хистологичните признаци на активност и хроничност, липсата на значима корелация с индекса на активност показват, че анти-фактор Р антителата като неинвазивен маркер не могат да отразят адекватно активната хистологична активност. При изследване на връзката на анти-фактор Р антителата с BILAG Renal score, се установи, че анти-пропердиновите антитела не са свързани с определен категория и не могат да се използват за тяхното разпознаване. Нещо повече, получената зависимост между високите нива на анти-фактор Р и последващото повишаване на категорията по BILAG Renal score в рамките на лонгитудиналното проучване в динамика на изследваните пациенти не даде информация за ролята на тези антитела за определянето на най-високата категория А по BILAG Renal score. Затова ние изследвахме дали анти-фактор Р автоантитела могат да служат като биомаркер в комбинация с други характеристики на ЛН пациенти за прогнозиране на обострянията и тежестта на заболяването. Установихме, че анти-фактор Р антителата в комбинация с анти-C1q повишава специфичността им като конвенционален маркер за активност на лупусната нефропатия (Таблица 3). При включването на анти-фактор Р вместо анти-C1q в комбинация с другите класически маркери за имунологична активност на заболяването беше наблюдавано понижение на специфичността, но повишаване на чувствителността на комбинациите (Таблица 3). Установена беше висока негативна

предиктивна стойност (NPV) на комбинацията на анти-фактор Р с анти-dsDNA, което предполага, че пациентите, които са негативни и за двата показателя няма да развият тежка форма на заболяването.

Получените данни за анти-фактор Р антителата показаха, че не могат да се използват самостоятелно за категорична оценка на активността на заболяването. Но ако се проследят връзките на анти-фактор Р антителата с имунологичните маркери за активност на заболяването в по-голяма кохорта, би могло да се очаква задълбочаване и достигане на по-голяма статистическа сигнификантност.

Получените резултати за клиничното влияние на анти-фактор Р антителата дадоха основание да задълбочим изследванията, проучвайки функционалните свойства на анти-фактор Р антителата, за да се оцени патологичното им значение.

Фактор Р стабилизира С3 и С5 конвертазите и от тук би могло да се предположи, че анти-фактор Р антитела се свързват към него, водейки до повишаване на стабилизиращият капацитет и увеличавайки полуживота на тези иначе лабилни ензими. Такова повишаване на стабилизирането би могло да доведе до комплементна свръхактивация и патологични последици подобно на С3Nef, открити при гломерулонефрит (Marinozzi et al., 2017). За да се изясни дали анти-фактор Р автоантитела повлияват функциите на фактор Р като комплементен регулатор, техните функционални последствия бяха охарактеризирани. Анти-фактор Р IgG образуваха стабилен комплекс с техния прицелен антиген.

Освен да стабилизира С3bBb, за фактор Р е докладвано и да свързва С3b, подпомагайки неговата последваща асоциация с Фактор В (Hourcade, 2008). Ние открихме, че у някои пациенти анти-фактор Р IgG увеличават, макар и слабо, свързването на фактор Р към С3b и към С3bB (проконвертазата), но не повлияват С3 конвертазата на алтернативния комплементен път, за разлика от С3Nef, който реагира с С3 конвертазата и я стабилизира (Tanuma et al., 1990). В изследване с частен случай анти-фактор Р позитивни IgG активират комплемента в серум (Nozal et al., 2015). Ние не детектирахме комплементна активация във флуидна фаза чрез анти-фактор Р IgG, противно на автоантителата срещу други компоненти на алтернативния път като анти-Фактор В, анти-С3b или анти-Фактор Н (Marinozzi et al., 2017; Vasilev et al., 2015; Vasilev et al., 2019; Blanc et al., 2015). Възможна причина за този слаб или отсъстващ

ефект на анти-фактор Р IgG може да е използването на елюиращ буфер с ниско рН при IgG пречистването, което може да има драматичен ефект върху биологичната активност на IgG и тяхното антиген свързващо поведение (Djoumerska-Alexieva et al., 2010). Въпреки това, пречистените IgG показаха силно и дозово-зависимо взаимодействие с фактор Р, установено чрез SPR-базирана технология. Друга възможност е епитопите на анти-фактор Р IgG да са извън С3-конвертазното място за свързване на фактор Р. Въпреки че *in silico* определянето на антигенни детерминанти изисква експериментално валидиране както показва *in silico* предикцията- прогнозираните епитопи показаха по-висока плътност и трябва да се взема предвид с повишено внимание, предиктираните епитопи показаха по-голяма плътност на антигенни детерминанти извън С3bVb свързващата област. Цялостното впечатление от тези резултати, предполага че ефектът на тези автоантитела може би е индиректен и вероятно засяга други функции.

Докладвано е, че фактор Р свързва специфично късни апоптотични клетки, но не ранните такива и това се случва независимо от С3b (Xu et al., 2008). Ние извършихме анализ с късни апоптотични клетки, за да изясним дали анти-фактор Р антителата имат ефект върху С3b и фактор Р депозицията. Анти-фактор Р IgG не допринасят за депозицията на фактор Р при всички изследвани пациенти. Въпреки това, ние открихме, че анти-фактор Р антителата повишават С3b депозицията при 2/4 тествани пациенти до нива, подобни на тези на анти-С3b IgG от ЛН пациенти, които имат явни функционални последствия (Vasilev et al., 2015). Останалите двама, при които депозицията на С3 фрагменти върху късни апоптотични клетки в присъствие на анти-фактор Р антителата не се наблюдава бяха тези двама пациенти, при които анти-фактор Р антителата слабо повишаваха свързването на фактор Р към С3b и проконвертазата, но не и към самата конвертаза. С3 нивата и при двамата пациенти бяха в референтни граници. Това предполага, че при тези пациенти не е налице прекомерна консумация на С3, следвано от увеличена С3b депозиция.

Взети заедно, тези резултати предполагат, че анти-фактор Р антителата биха могли да допринасят за комплементната свръхактивация в субгрупа от пациенти, но това не е всеобщ феномен и функционалните последствия от тези автоантитела са по-скоро слаби.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Автоантителата, насочени към компонентите от системата на комплемента, могат да нарушат комплементната регулация и да предразположат към развитието на СЛЕ и ЛН. След скрининг за автоантитела срещу панел от комплементни протеини, такива не се откриха при ранните компоненти на комплемента С2 и фактор В, срещу всички късни компоненти, както и срещу регулаторите С1 Inh и фактор I. Това предполага, че антитела, насочени към тези компоненти не са част от автоимунния репертоар на ЛН.

Като част от автоимунната картина на лупусната нефропатия бяха потвърдени автоантителата срещу С1q, С3 и С4 в българска кохорта от пациенти. Нещо повече, беше потвърдена тенденцията анти-С1q автоантителата да се откриват с по-ниска честота сред пациентите от българската популация, а здравите, позитивни за анти-С1q да имат високи нива на тези автоантитела. Анти-С1г и анти-С1s автоантителата специфично взаимодействат с С1г и С1s, съответно. В условия на образуване на С1 комплекса, тези автоантитела не показват функционално значение. Единствено анти-С1q автоантителата имат инхибиращо действие върху формирането на този комплекс. Анти-С4 автоантителата съществуват като независими от анти-С3 антителата. В същото време при някои пациенти е възможна кросреактивност. Въз основа на тази доказана кросреактивност визуализирането на теоретично предсказаните антигенни детерминанти, показва вероятното им разположение в местата на свързване на негативните регулатори фактор Н и CD46.

Анти-фактор Н автоантитела се детектират при пациенти с ЛН сред българската популация. Тяхното формиране в хода на заболяването не се обвързва с делеция на някои от гените, кодиращи фактор Н-свързаните протеини, което говори за хетерогенността на тези автоантитела, срещани и при други автоимунни заболявания. Поради значими корелации с клинично-лабораторни параметри за оценка активността на заболяването и хистологичния индекс на активност, вероятно тези автоантитела са по-скоро обвързани с активната фаза на заболяването.

Анти-фактор Р автоантителата се детектират при 24, 66% от ЛН пациенти и са специфични за своя таргет-фактор Р. Присъствието на патологично повишени анти-фактор Р автоантителата определя и

наличието на патологично високи нива на имунологичните маркери за активност анти-dsDNA и патологично ниски нива на С3. Анти-фактор Р антителата не определят някоя от категориите за активност на заболяването по BILAG Renal score, нито могат да различават най-тежката категория А от останалите В, С и D по тази система за активност. В комбинация с анти-dsDNA анти-фактор Р антителата понижават специфичността на комбинацията, но повишават NPV. Проследяването на нивата на тези автоантитела в динамика спрямо промяна в категорията по BILAG renal score показва, че анти-фактор Р антителата не са прогностичен маркер.

Анти-фактор Р антителата повишават слабо свързването на фактор Р към отделните компоненти на алтернативната С3 конвертаза, но не и към вече образуваната конвертаза. Върху апоптотична повърхност, в условия на инхибирани класически и лектинов път, присъствието на анти-фактор Р повишава депозицията на С3b, но не и на фактор Р в субгрупа от пациенти. Във флуидна фаза анти-фактор Р антителата не повлияват активирането на алтернативния път. Подкрепящи тези функционални анализи, визуализираните теоретично предсказани епитопи от фактор Р молекулата се откриват извън мястото на свързване на фактор Р към алтернативната конвертатаза. На този етап анти-фактор Р антителата са по-скоро допринасящ фактор за патогенезата на ЛН.

Тези първи експериментални резултати при ЛН пациенти от българската популация показват, че анти-фактор Н и анти-фактор Р автоантителата се обвързват с активната фаза на заболяването, а анти-фактор Р автоантителата имат функционални последици, макар и със слаб ефект. Необходимо е тези резултати да се потвърдят в по-голяма кохорта и да се направят допълни изследвания с анти-фактор Н автоантителата. Към момента можем да твърдим, че само наличие на анти-фактор Р автоантителата не е достатъчно да индуцира активиране на комплемента и да ускори бъбречно увреждане. По-скоро те са допринасящ фактор за патогенезата на ЛН.

ИЗВОДИ

1. Изводи за новооткритите анти-фактор Р автоантитела

1. Анти-фактор Р автоантитела са установени в 24,66% от изследваните пациенти, а изолирани от здрави доброволци IgG не показваха свързване с фактор Р;
2. Анти-фактор Р автоантитела оказват влияние върху нивата на два от рутинно изследваните имунологични маркери за активност на заболяването - анти-dsDNA и С3, което прави антителата възможни маркери за проследяване на имунологичната активност на лупусен нефрит;
3. Установена е високата негативна предиктивна стойност (NPV) на комбинацията на анти-фактор Р и анти-dsDNA, което предполага, че пациенти негативни и за двата показателя няма да развият тежка форма на лупусен нефрит;
4. Лонгитудиналното проследяване на нивата на анти-фактор Р антителата показва, че те нямат прогностично значение по отношение промяна в категорията за активност на лупусен нефрит по BILAG Renal score;
5. Липсата на значима корелация на анти-фактор Р антителата с хистологичните индекси на активност и хроничност показва, че анти-фактор Р антителата не могат да служат за оценка на хистологичните промени, определящи активност и хроничност на лупусен нефрит;
6. Установеното повишаване на депозицията на С3 върху късни апоптотични клетки в субгрупа от пациенти с лупусен нефрит в присъствие на анти-фактор Р автоантитела, показва вероятно патогенетично значение на антителата при лупусен нефрит;
7. Чрез компютърно компютърно моделиране (*in silico* анализ) са определени епитопите, разпознавани от анти-фактор Р антителата, вероятно локализиращи извън зоната за свързване на пропердина към С3 конвертазата.

2. Изводи за анти-фактор Н автоантителата

1. Анти-фактор Н автоантитела са установени в 11,67% от изследваните пациенти, а не са регистрирани в здрави доброволци;
2. Доказаните анти-фактор Н антитела в пациентите с лупусен нефрит показват хетерогенност спрямо техния произход в сравнение със същите антитела при атипичния хемолитично-уремичен синдром;
3. По-висок хистологичен индекс на активност при пациентите с лупусен нефрит се свързва с по-високи нива на анти-фактор Н, което показва, че тези антитела могат да служат за оценка на хистологичните промени, определящи активност на лупусен нефрит.

3. Други обобщени изводи

1. Анти-комплементните автоантитела срещу C2, фактор В, късните компоненти на комплемента – C5, C6, C7, C8 и C9, както и срещу комплементните регулатори C1 инхибитор и фактор I не са част от автоимунният репертоар при лупусен нефрит.

ПРИНОСИ

Приноси с оригинален характер

1. За първи път са установени специфични анти-комплементни автоантитела срещу фактор Р и е определена тяхната честота сред пациенти с лупусен нефрит. Това е първото кохортно изследване, доказващо тези автоантитела при лупусен нефрит;
2. За първи път са анализирани взаимовръзки на анти-фактор Р антителата с рутинни клиничко-лабораторни, имунологични и хистологични маркери за оценка на активността и хроничността на лупусен нефрит;
3. Установено е, че патологично повишените нива на анти-фактор Р антителата определят повишени концентрации на анти-dsDNA и С3 хипокомплементемия;
4. За първи път при пациенти с лупусен нефрит в българската популация е доказано наличие на анти-комплементни автоантитела срещу фактор Н и е определена тяхната честота;
5. За първи път при пациенти с лупусен нефрит в българската популация са анализирани взаимовръзки на анти-фактор Н антителата с рутинни клиничко-лабораторни, имунологични и хистологични маркери за оценка на активността и хроничността на заболяването;
6. За първи път е проучена функционалната активност на анти-фактор Р автоантителата.

Приноси с потвърдителен характер

1. Проучено е наличието на анти-С3 и анти-С4 автоантитела в пациенти с лупусен нефрит;
2. Установен е относително по-нисък брой серопозитивни за анти-С1q антитела сред българските пациенти с лупусен нефрит в сравнение с други чужди кохорти;
3. Установен е относително висок брой серопозитивни за анти-С1q антитела сред българските здрави доброволци.

СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

Публикации във връзка с темата на дисертационния труд

1. Radanova M, **Mihaylova G**, Ivanova D, Daugan M, Lazarov V, Roumenina L, Vasilev V. 2020. Clinical and functional consequences of anti-properdin autoantibodies in patients with lupus nephritis. *Clin Exp Immunol.* 2020;10.1111/cei.13443. doi:10.1111/cei.13443 (**IF=3.532, Q2**)
2. **Mihaylova G**, Vasilev V, Kosturkova MB, Stoyanov GS, Radanova M. 2020. Long Non-Coding RNAs as New Biomarkers in Lupus Nephritis: A Connection Between Present and Future. *Cureus* 12(7): e9003. doi:10.7759/cureus.9003
3. Костуркова М, **Михайлова Г**, Кадинов В, Раданова М. 2018. Ролята на системата на комплемента при ревматологичните заболявания. *Варненски медицински форум*, т. 7(2) 18-32

Подготвени за публикуване ръкописи по темата на дисертационния труд

1. **Mihaylova G**, Vasilev V, Ivanova D, Lazarov V, Roumenina L, Radanova M. *Autoantibodies against components of the complement complex C1 in patients with lupus nephritis.* (подадена за публикуване в *Immunological Investigation*)
2. **Mihaylova G**, Vasilev V, Kosturkova M, Roumenina LT, Dragon-Durey M, Radanova M. *Anti-factor H autoantibodies in patients with lupus nephritis.*

Участия, представящи резултати от дисертационния труд на научни форуми

1. Mihaylova G, Vasilev V, Ivanova D, Daugan M, Noe R, Dragon-Durey M, Roumenina L, Radanova M. Lupus nephritis patients are positive for autoantibodies against components of the complement complex C1. *“International Congress of Medical Sciences”*, 10–13.05.2018 г., София, България – постер;
2. Mihaylova G, Vasilev V, Ivanova D, Daugan M, Noe R, Dragon-Durey M, Roumenina L, Radanova M. Autoimmune response against innate immune proteins in plasma. Постерна сесия в рамките на теоретичен и практически курс *“The molecular basis of diseases: Can we infer phenotypes from protein variant analysis?”*, организиран от FEBS (Federation of European Biochemical Societies) в периода от 23–25 May 2018, Bologna, Italy - постер;
3. Mihaylova G, Vasilev V, Ivanova D, Daugan M, Noe R, Dragon-Durey M, Roumenina L, Radanova M. Role of anti-C3 and anti-C4 autoantibodies for evaluation of the activity and severity of lupus nephritis. *“Fifth National Congress of Immunology”*, 25–28.10.2018 г., Пловдив, България – постер;
4. Mihaylova G, Vasilev V, Ivanova D, Daugan M, Noe R, Dragon-Durey M, Roumenina L, Radanova M. Autoimmune response against innate immune proteins in plasma. *“8th International workshop – Autoimmunity in 2019: The good and the bad news”*, 10 – 11.04.2019, Плевен, България – доклад;
5. Mihaylova G, Vasilev V, Ivanova D, Daugan M, Noe R, Dragon-Durey M, Roumenina L, Radanova M. Detection of circulating autoantibodies against complement regulator – Factor P and their relationship with anti-C1q antibodies in lupus nephritis patients. *“International Molecular Medicine Symposium by the Bosphorus”*, 14 – 16 May 2019, Istanbul, Turkey – постер;
6. Mihaylova G, Vasilev V, Ivanova D, Daugan M, Noe R, Dragon-Durey M, Roumenina L, Radanova M. Characterization of the prevalence, functional consequences and disease associations of autoantibodies against the positive complement regulator properdin in patients with lupus nephritis. *“44th Congress of FEBS”*, 6 – 11 July 2019 Krakow, Poland – постер.

Финансиране

Изследванията в настоящия дисертационен труд са финансирани по два научноизследователски проекта:

1. „Автоимунен отговор срещу плазмени протеини на вродената имунна система“, финансиран от Фонд „Научни изследвания“, МОН, Конкурс за двустранно сътрудничество 2016 г. – България – Франция с договор № ДНТС/Франция 01/11, 09.05.2017 г.

2. „Идентифициране на биомаркери от ново поколение за диагностична оценка на активността и проследяване на пациенти със системен лупус еритематодес“, финансиран от фонд „Наука“, Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“, Варна с договор № ФН-14/11.02.2019.