

БЪЛГАРСКА АСОЦИАЦИЯ ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ
BULGARIAN ASSOCIATION FOR CLINICAL IMMUNOLOGY



Годишник на БАКИ 2007



**Издателство „Лице“
София, 2008**

СЪДЪРЖАНИЕ

О Т Ч Е Т на Управителния съвет за дейността на сдружение „Асоциация по клинична имунология“ през 2006 година	5
О Т Ч Е Т на Управителния съвет за дейността на сдружение „Асоциация по клинична имунология“ през 2007 година	7
ЦЕНТРАЛНА ЛАБОРАТОРИЯ ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ	10
МБАЛСМ „Н. И. Пирогов“. ОТДЕЛЕНИЕ ПО ТРАНСФУЗИОННА ХЕМАТОЛОГИЯ И ИМУНОЛОГИЯ	12
ЛАБОРАТОРИЯ ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, София	15
ЛАБОРАТОРЕН СЕКТОР КЛИНИКА ПО АЛЕРГОЛОГИЯ И АСТМА, УМБАЛ „Александровска“	18
Национален център по хематология и трансфузиология ЛАБОРАТОРИЯ ПО ЦИТОПАТОЛОГИЯ, ХИСТОПАТОЛОГИЯ, ИМУНОЛОГИЯ И ИМУНОХИМИЯ	19
МЕДИКО-ДИАГНОСТИЧНА ЛАБОРАТОРИЯ ПО ИМУНОЛОГИЯ УМБАЛ „Д-р Г. Странски“ – Плевен, ЕАД	21
ЛАБОРАТОРИЯ ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ, УМБАЛ „Св. Марина“, Варна	23
„ПАРАДОКСИ НА ИМУННИЯ ОТГОВОР“ (АКО ИМА ТАКИВА?) <i>Б. Божков</i>	24
ПАТОГЕНЕЗА И ДИАГНОСТИКА НА АВТОИМУННИТЕ ТИРЕОИДНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ <i>И. Атанасова</i>	33
ТЮТЮНОПУШЕНЕТО – РИСКОВ ФАКТОР ЗА АВТОИМУННИ БОЛЕСТИ НА ЩИТОВИДНАТА ЖЛЕЗА <i>Д. Попова</i>	49
АВТОИМУННИТЕ ЗАБОЛЯВАНИЯ НА ЩИТОВИДНАТА ЖЛЕЗА И СИСТЕМЕН ЛУПУС <i>М. Балева, Кр. Николов</i>	61

ОПРЕДЕЛЯНЕ НИВА НА ТРОМБОЦИТНО-ЛЕВКОЦИТНИ АГРЕГАТИ ПРИ ЖЕНИ С ИНФЕРТИЛИТЕТ, ПРИДОБИТИ ТРОМБОФИЛИЧНИ ФАКТОРИ И АНТИТИРЕОИДНИ АНТИТЕЛА <i>Г. Велева, Цв. Луканов, П. Петрова, Е. Конова</i>	69
IL-2/IL-4 ДИСБАЛАНС ПРИ ПАЦИЕНТИ С БОЛЕСТТА НА БАЗЕДОВ И ВРЪЗКАТА МУ С ПРОГРЕСИЯ НА ЗАБОЛЯВАНЕТО <i>Кр. Халачева, Ж. Геренова</i>	75
ВЪНШНА ОЦЕНКА НА КАЧЕСТВОТО – СХЕМИ 1, 2 И 3: ИМУНОГЛОБУЛИНИ, КОМПЛЕМЕНТ, С-РЕАКТИВЕН ПРОТЕИН, АВТОАНТИТЕЛА, HLA-B27. СРАВНИТЕЛЕН АНАЛИЗ НА ДАННИТЕ ЗА 2006/2007 г. <i>А. Михайлова, П. Бонева, Е. Наумова</i>	81
ВЪНШНА ОЦЕНКА НА КАЧЕСТВОТО ПО ИМУНОЛОГИЯ 2007: ФЛОУЦИТОМЕТРИЧНА ИМУНОФЕНОТИПИЗАЦИЯ <i>М. Николова</i>	94
НАЦИОНАЛНА ПРОГРАМА ЗА РАЗВИТИЕ НА ТРАНСПЛАНТАЦИЯТА НА СТВОЛОВИ КЛЕТКИ В РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ 2007-2013 г. <i>Е. Наумова, Д. Бобев, А. Михайлова, Д. Балтаджиева М. Иванова, Д. Маринова, М. Енчев, Р. Замфирова</i>	105
УКАЗАНИЯ ЗА АВТОРИТЕ	107

О Т Ч Е Т

*на Управителния съвет за дейността
на сдружение „Асоциация по клинична имунология“
през 2006 година*

Експертният съвет по имунология на 8.VII.2005 година взе решение за учредяване на Асоциация по клинична имунология. Учредителното събрание беше председателствано от проф. д-р Богдан Петрунов със секретар проф. д-р Марта Балева. Прие се уставът на Асоциацията и се избра Управителен съвет и председател.

ЦЕЛИ:

- 1. да обединява и подпомага членуващите в нея имунолози за постигане на общите им задачи;**
- 2. да създава условия за професионално развитие и изява на своите членове;**
- 3. да популяризира новостите в областта на клиничната имунология;**
- 4. да съдейства за развитието на клиничната имунология в България;**
- 5. да съдейства за издигане ролята и значението на клиничната имунология в медицината;**
- 6. да подпомага работещите в областта на клиничната имунология в диалога и взаимоотношенията им с местната и централната власт, както и с БЛС и НЗОК.**

Необходимостта от създаването на професионалното сдружение, обединяващо специалистите, работещи в областта на клиничната имунология, беше продиктувана от два главни фактора:

1. *Промените в системата на здравеопазването с прилагане на здравната реформа. Оказа се, че специалистите, които имаха вече работещи професионални сдружения, намериха своевременно своето място в здравната реформа и могат да водят диалог с местната и централната власт, БЛС и НЗОК.*

2. *Проведените имунологични срещи, организирани от ЕС по имунология, през последните пет години показаха недвусмислено желанието и необходимостта от тясна връзка между имунолозите за издигане на клиничната имунология на подобаващото ѝ се равнище. Плод на тази колаборативна дейност са:*

1. Разработените и публикуваните в Държавен вестник:

- Медицински стандарти: „Клинична и лабораторна имунология“ и „Имунологична подготовка на реципиентите за трансплантация на тъкани, органи и клетки“.
- Оценъчни показатели по имунология за акредитация на медико-диагностичните лаборатории по програмата за акредитиране на лечебни заведения.

2. Включен пакет имунология с най-често използваните имунологични показатели, както и основни високоспециализирани имунологични изследвания в Наредба № 40, приложение II и респективно в НРД.

3. Разработените консенсусни цени на имунологичните изследвания.

4. Изработените две нови програми за обучение на специализиращите по съответно променената номенклатура, клинична имунология за лекари и лабораторна имунология за специалисти с немедицинско образование. Програмите са съобразени с Европейските директиви с включени кредитни точки.

5. Постави се началото на Национална система за външна оценка на качеството по имунология с междулабораторния контрол по флоуцитометрия, организиран от Националната референтна лаборатория по флоуцитометрия (НИЕМ) с ръководител проф. Хр. Тасков и впоследствие разширена с нови схеми.

Всичко това позволи на имунологичните лаборатории да сключват договор със Здравната каса, а също така да бъдат подготвени за процесите на акредитация.

3. Проведени срещи и конференции.

3.1. 5-ата имунологична среща, проведена на 11.XI.2005 г. в Пловдив по инициатива на ЕС по имунология, на която накратко се представиха целите и задачите на Сдружението и средствата за постигането им. Изтъкнато беше предимството на членството в Асоциацията по клинична имунология. Обсъдиха се горещи въпроси, свързани с: имунологичната помощ и мястото ѝ в здравната реформа; статуса на специализиращите имунология, неработещи в база за специализация; дадоха се предложения за включване на разширен набор от имунологични изследвания, както и високоспециализирани имунологични дейности и разработване на клинични пътеки, съответно в Наредба №40, приложение II и НРД.

3.2. Честване на Световния Ден на имунологията на 29 април 2006 година в Плевен съвместно с научното дружество по имунология при СУБ и любезното домакинство на имунолозите от Плевен.

Наред с интересната социална програма всички имунологични звена направиха кратко представяне, което позволи имунологичната общност да познава съвременния статус на имунологията у нас. По време на плевенската среща се проведе съвместно съвещание на ЕС по имунология, УС на Сдружението, председателя и секретаря на дружеството по имунология при СУБ и други изтъкнати имунолози. Разгледаха се разработените от съответните работни групи три клинични пътеки и се реши тези пътеки с направените допълнения и промени да се изпратят в НЗОК за включване в Наредба № 40 и НРД 2007 година.

3.3. Национална конференция на тема: „Поточна цитометрия и управление на качеството в лабораториите по клинична имунология“.

Чества се 20 години флоуцитометрия в България съвместно с фирма „Диамед“. 20-годишнината на флоуцитометрията в България беше ознаменувана с научен симпозиум, където се изнесоха исторически бележки от събития и годишници с поглед от две страни, прилагащите флоуцитиметрия – проф. Хр. Тасков и фирма „Диамед“ – д-р М.Танев. Изнесоха се интересни научни доклади, посветени на най-новите достижения във флоуцитометрията и приложението ѝ в клиничната практика, от водещите учени имунолози у нас.

На първата национална конференция по управление на качеството на лабораториите по клинична имунология се обсъдиха резултати от провеждането на ВОК по имунология през 2005 година, съответно по флоуцитометрия с организатори проф. Хр. Тасков и доц. М. Николова и схеми 1, 2 – доц. А. Михайлова. Освен това изтъкнати имунолози представиха обобщени резултати от използваните референтни стойности по съответните имунологични показатели. Обсъдиха се различията в референтните стойности, използвани за оценка на имунологичните показатели от различни звена.

ОТЧЕТ

на Управителния съвет за дейността на сдружение „Асоциация по клинична имунология“ през 2007 година

1. Проведени курсове и конференции.

1.1. Национална конференция по клинична имунология „Автоимунитет и щитовидна жлеза“, проведена в рамките на Плевенските имунологични дни, хотел „Ростов“, Плевен, от 27 до 29 април 2007 година. Конференцията беше организирана съвместно със секция „Имунология“ при СУБ. В рамките на конференцията беше честван и Международният ден на имунологията – 29 април. Присъстваха 50 души, работещи в областта на имунологията и ендокринологията. Научната програма беше посветена на автоимунните заболявания на щитовидната жлеза и асоциирането им с други автоимунни болести. Проведеха се интересни дискусии, свързани с мястото на имунологията в диагнозата и проследяването на горепосочените заболявания, оценена както от погледа на имунолозите, така и от погледа на ендокринолозите. Социалната програма беше елегантно подбрана и перфектно осъществена от любезните домакини на конференцията. Всичко това позволи укрепване и разширяване на сътрудничеството ни с ендокринологията и очерта ясно, че това е правилният път за колаборация с други клинични специалности.

1.2. Международният симпозиум по флоуцитометрия се проведе през юни в НЦЗПБ, организиран от фирма ДИАМЕД и секция „Поточна цитометрия“ към АКИ. Присъстваха около 20 специалисти в областта на флоуцитометрията. Изнесоха се полезни доклади за технически новости във флоуцитометрията и разширените възможности, които дава за по-прецизна оценка на клетъчните популации и техните субпопулации при инфекциозни болести, автоимунни заболявания и инфертилитет при жената. Курсът завърши с разгорещени дискусии, които продължиха с приятелско веселие на чаша вино.

1.3. Национална конференция по качеството в имунологията, имуногенетиката и трансплантацията на стволови клетки, проведена на 1-3 декември 2007 година в хотел „Самоков“, Боровец. Присъстваха 120 души, между които имунолози, хематолози и други специалисти от България, Румъния, Сърбия, Гърция, Турция, Армения, Франция, Чехия, Испания, Ирландия, Австрия. През първия ден бяха отчетени резултатите от ВОК по имунология, схеми флоуцитометрия, имуноглобулини и комплемент, автоантитела. През втория ден се направи анализ и отчет на резултатите от Балканския ВОК, провеждан в рамките на EFI област 8 по схеми HLA типизиране, определяне на алоантитела и HLA-B27. Изнесоха се интересни лекции от видни учени в областта на имунологията като проф. Шарон – президент на EFI, Ciaran Dunne, Godfrid Fisher, Catherine Stavropolous и други посветени на развитието на имуногенетиката, мезенхимните клетки от пъпна връв, както и интересни аспекти на национална и европейски програми, свързани с трансплантацията на стволови клетки. Не на последно място, представители на БСА и МЗ разясниха важни аспекти, свързани с акредитацията на медицинските лаборатории и схеми за ВОК, както и правни въпроси, свързани с трансплантацията на тъкани, органи и клетки. Участниците имаха възможност за полезни дискусии и приятелски разго-

вори в неформална, релаксираща атмосфера, осигурена от разнообразната социална програма.

2. Секция „Поточна цитометрия“

Един от важните моменти през 2007 г. е, че Секцията по флоуцитометрия получи статут на асоцииран член на ISAC. Това разкрива възможности за участие в различни международни прояви, курсове и достъп до информация. Във връзка с членството започнаха да се получават двете списания на ISAC: Cytometry Part A и клиничната Cytometry Part B. Списанията са на разположение на интересувашите се в библиотеката на НЦЗПБ. На всички членове на Асоциацията ще бъдат изпратени потребителско име и парола за достъп онлайн.

Във връзка с членството вече започнахме да получаваме покани за участие в международни форуми. Единият от тях е Ежегодната конференция на ISAC –17-21 май 2008 в Будапеща.

1. В резултат на горепосочените съвещания, симпозиуми и конференции се направиха следните конкретни действия:

1. Изготвена форма за членство на английски език за чуждестранни граждани, желаещи да членуват в Асоциацията. Приет е 1 чужденец за член на АКИ.

2. Новоприети членове на Асоциацията през отчетния период:

- 2-ма лекари със специалност клинична имунология
- 1 чужденец

3. Разкрита е секция „Поточна цитометрия“ към АКИ с ръководител проф. д-р Христо Тасков съгласно решение на Общото събрание.

4. Сдружение „Асоциация по клинична имунология“ е прието за колективен член на ISAC и получава регулярно списание „Флоуцитометрия“, което е на разположение на всички членове на АКИ и се намира в библиотеката на НЦЗПБ.

5. Сдружение „Асоциация по клинична имунология“ е прието като колективен член на СБМД от месец юли 2007 година.

6. По предложение на проф. д-р Марта Балева УС реши да създаде печатен орган на АКИ, отразяващ цялостната ѝ дейност под формата на годишник, издаван 1 път годишно. За главен редактор на годишника единодушно бе избран проф. М. Балева. Първият брой за 2007 год. се предвижда да се издаде през януари 2008 година, в който ще бъдат отпечатани съобщенията от конференциите в Плевен (някои от тях вече са предадени), докладите от конференцията в Боровец (срок 22 декември), материали (доклади) от курса по флоуцитометрия и др.

7. Издаване на докладите от Националната конференция по качеството, проведена в Златни пясъци през октомври 2006 (проф. Тасков) в сп. „Инфектология“.

8. Интернет страница

Според документи на СЗО препоръчително е ВОК да се организира от интернационални или национални асоциации, които са неправителствени организации по микробиология, хематология, клинична химия и други. Експертите, оценяващи (анализиращи) резултатите, трябва да имат сключен граждански договор със сдружението. Техническият сътрудник, отговорен за изпращане на материали, писма, факсове и др., може да бъде на постоянен трудов договор със сдружението или на граждански договор. Сертификатът се подписва от председателя на Асоциацията и от съответния експерт с титла и име, но без звено (лаборатория), в която работи.

ЦЛКИ и лабораторията по флоуцитометрия при НЦЗПБ участват във ВОК безплатно за организираните от тях схеми.

През 2007 г. във ВОК по имунология са участвали 26 лаборатории. За схема 1 (имуноглобулини, комплемент, СРП) са проведени 3 цикъла, а за схеми 2А (АНА, анти-ДНК антитела), 2Б (ЕНА профил) и 2В (АНЦА) – по един цикъл. ВОК за автоантитела бе разширен с включване на нова схема – 2Г, за антикардиолипнови антитела. На всеки цикъл бяха изпращани по 2 проби за съответния показател. Стартираният през ноември 2006 г. ВОК за определяне на HLA-B27 бе особен в схема 3. В проведения през юли цикъл бяха изпратени 5 проби. В него както през 2006 г. участваха 6 лаборатории от България и 8 – от Балканския регион (Гърция, Румъния, Турция). Към схемата за имунофенотипизиране се добави нов показател – определяне на абсолютен брой на стволови клетки. Съгласно решението на общото събрание от 2006 г. всички схеми за оценка на качеството се обединиха в Национална система за ВОК по имунология, а сертификатите се издават от името на Асоциацията.

ЦЕНТРАЛНА ЛАБОРАТОРИЯ ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ

Лабораторията е създадена през 1971 г. като Имунологична лаборатория към Катедра по нефрология, ИСУЛ. За времето на нейното съществуване последователно е в структурата на НИНУХТ (1976-1986), НЦССЗ (1986-1988), Президиума на МА (1988-1989), НИП (1989-1991) и Катедра по клинична лаборатория и клинична имунология, МФ. София. От 2000 г. е обособена като Централна лаборатория по клинична имунология (ЦЛКИ) при МБАЛ „Александровска“. Лабораторията е акредитирана през 1998 г. от Европейската федерация по имуногенетика, което гарантира качество, покриващо националните и европейските стандарти. От 2000 г. ЦЛКИ е определена със заповед на Министъра на здравеопазването за **Национална референтна лаборатория по тъканно типизиране и имунологичен мониторинг**, която да осъществява референтна, контролна и методична дейност по съответните направления в имунологията.

Основни дейности:

– диагностично-лечебна, научна и преподавателска.

Диагностично-лечебната дейност е свързана с имунодиагностика на вродени и придобити имунодефицитни състояния, автоимунни болести, солидни тумори и неопластични процеси на хемопоегичната тъкан, инфекциозни болести, репродуктивни болести; молекулярно-генетична диагностика; индициране, провеждане и контрол на имуномодулираща терапия; имуногенетична консултация; имунологична подготовка при трансплантация на органи, тъкани и клетки. През 1986 г. в лабораторията е създаден функциониращ и досега Национален списък на чакащите бъбречна трансплантация. От 2005 г. ЦЛКИ е пълноправен член на Световния регистър на донори на костен мозък (BMDW), което ѝ дава възможност за търсене на неродствени донори за българските пациенти сред над 10 млн. дарители.

От 2005 г. лабораторията участва активно в изграждането, организирането и провеждането на Национална система за външна оценка на качеството на имунологичните показатели.

Научно-преподавателска дейност: Имунологията е въведена като задължителна учебна дисциплина за студенти медици и е утвърдена като основна медицинска специалност за следдипломна квалификация през 1994 г. От 2005 г. са обособени две специалности – „Клинична имунология“ за лекари и „Лабораторна имунология“ за специалисти с немедицинско образование. ЦЛКИ е база за обучение на студенти медици, както и за специализиращи клинична и лабораторна имунология кадри от страната и чужбина. Провежда се и обучение в по-тясно специализирани области, като тъканно типизиране, молекулярно-биологични техники, ДНК анализ, флоуцитометрия и др. Натрупаният в продължение на над 30 години опит в областта на имунологията и утвърдената приемственост за предаването му са предпоставка за създаване на научно-преподавателски кадри, които могат и прилагат достиженията на фундаменталната имунологична наука в клиничната практика и на тази база осъществяват високо качество на преподаване в областта на имунологията.

Научно-преподавателските кадри участват в написване на учебници, ръководства, монографии, научни статии, доклади на конгреси и конференции. В звеното се работи по български и международни научни проекти.

Квалификация на персонала и медицинската апаратура: Персоналът на лабораторията се състои от 15 щатни служители – лекари, биолози, инженер, медицински сестри, лаборанти. Всички кадри имат необходимата професионална квалификация за заеманата от тях длъжност, отговаряща на изискванията на националните и международните стандарти.

Лабораторията разполага както със съвременна лабораторно-медицинска специализирана апаратура (флоуцитометър, секвенатор, РСК амплификатори, електрофоретична система, трансилюминатор, спектрофотометри, тъканен дезинтегратор), така и с всички общоприети апарати и инструментариум за лабораторна дейност.

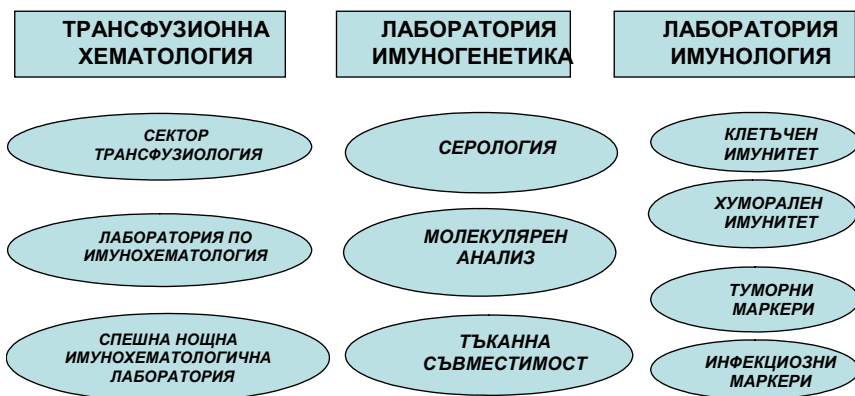
МБАЛСМ „Н. И. Пирогов“ ОТДЕЛЕНИЕ ПО ТРАНСФУЗИОННА ХЕМАТОЛОГИЯ И ИМУНОЛОГИЯ

1971 г. – създаване на Отделение по кръвопреливане и тъканна съвместимост с ръководител ст.н.с.І ст. д-р Миньо Минев, д.м.н.

1991 г. – отделението е преименувано в Отделение по кръвопреливане и имуногенетика с ръководител ст.н.с.ІІ ст. д-р Фани Мартинова, д.м.

2006 г. – отделението е преименувано в Отделение по трансфузионна хематология и имунология с ръководител ст.н.с.І ст. д-р Фани Мартинова, д.м.н.

Структура на Отделение по трансфузионна хематология и имунология:



Лаборатория по трансфузионна хематология

Диагностични изследвания на:

- Антигените на ABO системата.
- Антигените на Rhesus системата.
- Антигените на 8 други главни еритроцитни системи.
- Антиеритроцитни антители.
- Антитромбоцитни антители.

Лечебнодиагностична дейност:

- Подбор на съвместима кръв и кръвни концентрати.

Лаборатория по имуногенетика

- Създадена през 1971 г. като лаборатория за тъканна съвместимост.
- През 1972 г. започва съвместната дейност на отделението с Центъра по бъбречна трансплантация (проф. Кръстинов) и е създадена първата картотека на чакащите бъбречна трансплантация с определени HLA антигенни формули.

➤ През 1972 г. започва HLA типизиране на трупни донори на кост (спонгиоза) и на кожа.

➤ 1973 г. – започва провеждането на популационно-генетични изследвания за разпределението на HLA антигените сред българското население.

➤ 1980 г. – лабораторията по тъканна съвместимост официално е обявена за типизираща лаборатория към създадения Център за бъбречна трансплантация на база институт „Пирогов“ с международни контакти с „Интертрансплант“ с център Прага.

➤ 2001 г. – създаване на Национален регистър на донори за костномозъчна трансплантация.

Лечебнодиагностична дейност:

➤ системно изследване на болните с масивни и многократни кръвопреливания за наличие на HLA антители и подбор на кръв и тромбоцитни концентрати чрез HLA съвместимост;

➤ типизиране на деца и техни родственици за костномозъчна трансплантация;

➤ диагностични изследвания (за носителство на B27 и B5) на болни от цялата страна (хоспитализирани и амбулаторни);

➤ левкоцитни съдебно-медицински експертизи по дела за спорен родителски произход;

➤ криминалистични експертизи с HLA типизиране на сухи петна от кръв;

➤ пренатална диагностика – HLA типизиране на фетус при данни за вероятна генетична предиспозиция към HLA–свързано заболяване.

Лаборатория по клинична имунология

➤ Създадена през 1982 г.

Основни диагностични дейности:

➤ мониторинг на имунните промени при болни с кръвопреливания, при болни с гнойни, септични, възпалителни усложнения при хирургични и вътрешни заболявания;

➤ посттрансплантационен мониторинг на имунните промени при болни с бъбречни трансплантации, извършвани в Центъра за бъбречни трансплантации на база на МБАЛСМ „Н. И. Пирогов“;

➤ изследване за носителство на антиген HLA-B27;

➤ изследване на:

– основен клетъчен панел лимфоцитни маркери (флоуцитометричен метод);

– маркери на възпалението (флоуцитометричен и нефелометричен метод);

– маркери на хуморалния имунитет;

– цитокини (флоуцитометричен и имуноензимен метод);

– вирусни маркери;

– туморни маркери;

– автоантитела (имуноензимен метод).

Имуномодулираща терапия:

➤ Приложение на плазмени препарати (човешки серумен албумин – 1984 г., хиперимунна антистафилококова и грам-отрицателна плазма – 1985 г., антистафи-

лококов гама-глобулин – 1985 год., имуновенин и стафовенин – 1995 г., ендобулин, гамагард – 1997 г., интраглобин, пентаглобин – 2001 г.);

- декарис (левамитозол), антистенокардин (1985);
- антилимфолин R (1985);
- изопринозин, тимоглобулин (1995);
- неупоген и други препарати;
- антиромбин III концентрат (1998).

Международни контакти:

- 1976 – 1982 г. – участие в „Интертрансплант“ по проблем „Трансплантации на органи и тъкани и въпроси на трансплантационната имунология“ с теми: „Разработка и усъвършенстване на методите на типизиране, имащи значение за имунологичната характеристика на реципиента и донора“ и „Трансплантация на кожа“;
- 1976 и 1982 г. – домакин на международни работни срещи на „Интертрансплант“ по тъканна съвместимост;
- 1981 г. – домакин на II Медицински симпозиум Англия-България по проблем „Трансплантация на бъбреци. Имунологични и хирургични проблеми“;
- 2002 г. – получени документи (пакет А) по акредитация към EFI;
- 2003 г. – член на WBMA (World Bone Marrow Association).

ЛАБОРАТОРИЯ ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, София

Лабораторията е структурно звено на Университетската болница „Св. Иван Рилски“. Създадена е преди повече от 30 години и е от първите имунологични лаборатории в България. От 1996 г. в лабораторията е въведена флоуцитометрията, а от 1998 г. колектив от лабораторията става член на Beckton Dickinson FACS User's Club. Лабораторията осигурява съвременна имунологична диагностика, обучение на студенти и специализиращи лекари, разработване на научни проблеми, свързани с патогенезата, диагностиката и лечението на болни с имунообусловени болести. В лабораторията са работили и продължават да работят висококвалифицирани и водещи за страната клинични имунолози. Защитени са 2 дисертации за „ДМН“ и 6 за „доктор“, хабилизирани са 2-ма професори и 3-ма доценти. Понастоящем в лабораторията работят: 1 професор по имунология, 1 лекар „доктор“ – и двамата специалисти по клинична имунология, 1 биолог – специалист „Лабораторна имунология“, и 3-ма лаборанти.

ЛАБОРАТОРНОДИАГНОСТИЧНА ДЕЙНОСТ

Клиничните имунолози работят в пряка и ежедневна връзка с клиницисти, консултират болни и това е много важно и в интерес на болните. Лабораторията поддържа съвременен диагностично-лабораторен ниво и изчерпателен регистър лабораторни показатели в няколко области:

- автоимунни заболявания на съединителната тъкан;
- хронични чернодробни болести;
- глутенова ентеропатия (целиакия);
- диагностика и терапия на придобити имунодефицитни състояния;
- изследване на „имунната компетентност“;
- проследяване на имунотерапия и др.

Лабораторията обслужва:

- лежачо болни на клиниките МБАЛ „Св. Иван Рилски“;
- болни от други софийски болници – като МВР, ИСУЛ, педиатрия и др.;
- граждани от цялата страна.

Лабораторията работи със Здравноосигурителната каса за обслужване и в доболничната помощ с имунологични изследвания още от 2002 г.

Всички показатели се контролират с ежедневен вътрешнолабораторен контрол и редовно участие в национална и международна система за наблюдение на качеството.

Постижения в научноизследователската дейност

1. Проучвания върху патогенетичните механизми на хроничните гломеруло-нефрити и възпалителни заболявания на бъбреците:

- едни от първите в страната оригинални имунологични изследвания и публикации за бъбречна имунология;

- разработени и внедрени за първи път в страната нови диагностични имунологични методи;
 - дисертация за „кандидат на науките“ върху патогенеза на автоимунния анти-ГБМ нефрит – 1984 г.
2. Патогенетични проучвания при автоимунни болести:
- съвременна автоантителна диагностика на лупусна нефропатия;
 - клетъчни имунни механизми и цитокини при СЛЕ;
 - клетъчни имунни механизми при вторичен анти-фосфолипиден синдром при СЛЕ – защитена дисертация на докторант;
 - цитокини при ревматоиден артрит – сътрудничество за дисертация;
 - имуномодулираща терапия при лупусна нефропатия – сътрудничество за дисертации.
3. Роля на фибронектина в имунопатогенезата на хроничните гломерулонефрити:
- проучване на нова област в патогенезата на хронични гломерулонефрити – роля на съединителнотъканни белтъци и разтворим фибронектин в имунологично медирано тъканно ремоделиране и фиброза при хронични гломерулонефрити;
 - дисертация за „доктор на науките“ – 1997 г.
4. Прилагане и имунологично мониториране на различни нови схеми на имуномодулираща терапия при автоимунни и други хронични гломерулонефрити:
- комбинирана имуносупресорна и антикоагулантна терапия при гломерулонефрити – сътрудничество за докторска дисертация;
 - приложение на интравенозен имуноглобулин като имуномодулираща терапия при лупусни и други хронични гломерулонефрити – сътрудничество за кандидатска дисертация, фрагмент от докторска дисертация.
5. Мониториране на имунната активност в хода на имуномодулиращи терапевтични лекарства, биопродукти и схеми на приложение при раково болни:
- изследване характера на имунния дефицит при раково болни чрез нови чувствителни, имунологични методи;
 - проучвания на имунологичните ефекти при клинично приложение на ДНК ваксини при болни с простатен карцином и болни с колоректален карцином – съвместни разработки с колеги от Вашингтонския университет, Национален център по хематология, международни публикации и доклади;
 - имунологични ефекти при клинично приложение на различни лечебни препарати и хранителни добавки при раково болни;
 - проучване на имунологични механизми при локално терапевтично приложение на IL-2 при болни с метастатичен рак в коремна кухина.
6. Проучвания на имунния отговор при хора, подложени на професионални вредности на околната среда:
- кандидатска дисертация в областта;
 - национални и международни публикации;
 - преподаване в Европейска програма Master Sci – курс Environmental Health effects и имунотоксикология.
7. Получаване, характеризиране на стволови клетки с оглед терапевтично приложение.

Финансирани научни проекти след 2000 г.

1. Studies for the cellular immune mechanisms of the autoimmune response against b2GPI. ZBUPJO62124, FCOPEF 2000-2003, Swiss National Science Foundation

2. „An open labeled clinical phase II study with Cis-4 Hydroxyl-Proline (CHP) as an anti-tumor agent in 60 patients with resected colorectal adenocarcinoma and liver metastases“, IPSS GmbH, 2003 г.

3. „Изследване на клетъчния имунен отговор срещу b2GPI при болни с SLE и APS“, СМН на МУ – София, Договор № 11/2000 г.

4. „Биохемиска, имунолошка и хистолошка евалуација на ефектите на Methotrexat-от при артифицијален прекин на бременоста“, Македоно-български проект, Министерство на образование и наука на Македонска Република, 2000–2003 г.

5. „Промени в Th1/Th2 цитокиновия профил и неоптериновите нива в хода на локална терапија с IL-2 при тумори на гастроинтестиналниот тракт“, Проект 41, СМН на МУ-София, 2002 г.

6. „Промени в лимфоцитните субпопулации и острофазовите протеини при локална терапија с IL-2 при тумори на гастроинтестиналниот тракт“, Национален фонд „Медицински изследвания“, НИП 713/2002 г.

7. „Изследване нивата на тиоредоксин, растворими IL-2R и определене на CD4+CD25+ Т лимфоцити при пациенти с карцинома на перитонеума, третирани с рекомбинантен IL-2“, СМН на МУ – София, Проект 15/2003 г.

8. „Оценка на имуномодулиращата активност на мезенхимни стволови клетки, изолирани од различни тъканни източници“, НФ „Научни изследвания“, Договор Д01-809/2006.

ЛАБОРАТОРЕН СЕКТОР КЛИНИКА ПО АЛЕРГОЛОГИЯ И АСТМА, УМБАЛ „Александровска“

Лабораторният сектор е създаден първоначално към Центъра по алергология на тогавашната Медицинска академия през 1971 г. По-късно се преименува в Лаборатория по имунология, а от 2000 г. отново е Лабораторен сектор към Клиниката по алергология и астма. Първ ръководител на лабораторията е проф. д-р Г. Костурков. От 1991 г. завеждащ е проф. д-р Б. Божков, а от 2000 г. – проф. М. Балева.

Първоначално в лабораторията се изследват главно стандартните лабораторни показатели като пълна кръвна картина, СУЕ, ензими, урина. От имунологичните изследвания са застъпени серумните имуноглобулини, изследване на функционалната активност на комплемента, AST, ревматоиден фактор, бластната трансформация и инхибицията на миграцията. След идването на д-р М. Балева, д-р К. Николов и д-р Д. Попова през 1980 г. в лабораторията започва интензивно развитие в няколко направления: изследване на хуморален имунен отговор (антинуклеарни антитела, антимитохондриални и антигладкомускулни антитела, антифосфолипидни антитела, комплементарни фракции, общи и специфични ИгЕ, вирусни маркери и пр.) и имунофенотипизация главно при пациенти с онкохематологични заболявания.

През изминалия период двама от сътрудниците на лабораторията защитават дисертации за научната степен „доктор на науките“: проф. д-р Б. Божков (в момента пенсионер) и проф. д-р М. Балева, а четирима – за научната степен „доктор“ – доц. д-р К. Николов (в момента завеждащ Катедра и Клиника по дерматовенерология към Медицински университет – Варна), доц. д-р Д. Попова (в момента на работа в МБАЛ „Пирогов“), д-р Б. Бояновски (в момента на работа в САЩ) и д-р М. Правчанска. Освен това в лабораторията под научното ръководство на проф. М. Балева са защитили научната степен „доктор“ и следните извънщатни сътрудници на лабораторията: д-р С. Владева (на работа в Медицински университет, Ст. Загора), доц. д-р Б. Върбанова (Медицински университет, Варна), д-р И. Цочева (Катедра педиатрия, Медицински университет – София), д-р Башар (Шри Ланка).

Лабораторията участва в преподаването по вътрешни болести, алергология, клинична и лабораторна имунология. В момента към нея работят проф. М. Балева, д-р М. Правчанска, д-р Е. Викентиева, 3-ма лаборанти и 2-ма санитарни. През последните 10-15 години сътрудници на лабораторията участват успешно в разработката на редица проекти, финансирани от Министерството на науката и образованието и Медицински университет – София, както и в Европейския проект за антифосфолипидния синдром. Материалите от тези проучвания са публикувани в наши и чужди списания.

Национален център по хематология и трансфузиология ЛАБОРАТОРИЯ ПО ЦИТОПАТОЛОГИЯ, ХИСТОПАТОЛОГИЯ, ИМУНОЛОГИЯ И ИМУНОХИМИЯ

София 1756, ул. „Пловдивско поле“ № 6
Тел: (02) 9701222, 9701225, 9701219, 9701216
Fax: (02) 9701107
E-mail: lymphoma2006@mail.bg; margenova@mail.bg

Ст.н.с. II ст. д-р Маргарита Генова, д.м – зав. лаборатория
Гл. ас. д-р Весела Николова
Н.с. III ст. д-р Велизар Шиваров
Д-р Лидия Гърчева
Д-р Йохан Димитров
Н.с. II ст. Владимир Толев, биолог

Нашата задача е да бъдем отбор

– в нападение (нови методи, нови подходи, нови предизвикателства)
– и в защита (допълване на компетентности и отговорности, за да осигурим най-надеждната диагноза за болния и солидна база, на която да стъпи клиницистът).

Дейности:

Лабораторията е част от Националния център по хематология и трансфузиология и предоставя **пълен спектър** на класическа цитологична, цитохимична, хистологична, имунохистохимична, имунохимична и флоуцитометрична диагностика на заболяванията на кръвта съгласно изискванията на понастоящем действащите класификационни схеми (СЗО и т.н.).

Уникалната ѝ възможност да предостави комплексна диагностика на хематологично болните и широкият спектър от хематологични заболявания, които са обект на дейността на нашия център, я определят като лаборатория без аналог в страната.

➤ Пълен обхват на диагностика и класификация на *остри левкемии, миелодиспластични синдроми и хронични миелопрролиферативни заболявания*:

- ✓ Определяне на линия на диференциация и степен на матурация, идентифициране на левкемично-асоциирани фенотипи.
- ✓ Мониторирание на терапевтичния отговор и минималната резидуална болест в костния мозък.
- ✓ Идентифициране на левкемична популация в ликвор, телесни течности и изливи.

- Широк обхват в диагностиката, стадиране и прогноза на *ходжкинови и неходжкинови лимфоми*:
 - ✓ Диагностика и субкласифициране по критериите на WHO (2001) на базата на комплексна оценка на морфология и имунофенотип.
 - ✓ Оценка на левкоцитни повърхностни и цитоплазмени антигени за фенотипизиране на лимфоми с данни за левкемизация и/или ангажиране на костен мозък – определяне линия на лимфоидна диференциация, матурационен стадий, клоналност и статус на резидуалната лимфоцитна популация с оглед избор на оптимална схема на лечение и прилагане на таргетна терапия с моноклонални антители.
 - ✓ Прогностични параметри – ZAP-70, CD38.

- Диагностика и контрол на лечението *костномозъчна хипоплазия-аплазия*:
 - ✓ Вкл. контрол на лимфоцитни субпопулации за определяне на индикации за лечение и мониториране на терапевтичен отговор.

- Имунофенотипни изследвания на *хемопоетични стволови клетки*:
 - ✓ Количествено определяне на CD34+ хематопоетични стволови клетки за целите на трансплантацията – контрол на мобилизацията на CD34(+) ХСК и контрол на дозата за гарантиране на успешна трансплантация.
 - ✓ Оценка на допълнителни стволово-клетъчни маркери в костен мозък, кордална кръв, в периферна кръв при режими на мобилизация.

- Флоуцитометричен анализ на *множествена лекарствена резистентност*:
 - ✓ Комплексен алгоритъм на изследване на клинично значима констелация от флоуцитометрични и молекулярно генетични параметри (*MDR1, MRP1, LRP, BCRP1* гени) за оценка на лекарствената резистентност при болни с левкемии.

- Флоуцитометричен контрол на броя *резидуални левкоцити в обезлевкоцитени еритроцитни и тромбоцитни концентрати* съгласно Препоръка №R (95) 15 на Комитета на министрите към Съвета на Европа.

- Изследване на *нормални и патологични протеини* (парапротеини, криоглобулини, еуглобулини) в серум, урина и ликвор чрез електрофореза и имуноелектрофореза/имунофиксация. Количествено изследване на имуноглобулини.

МЕДИКО-ДИАГНОСТИЧНА ЛАБОРАТОРИЯ ПО ИМУНОЛОГИЯ УМБАЛ „Д-р Г. Странски“ – Плевен, ЕАД

МДЛ по имунология е създадена през 1981 г. като самостоятелно звено към Централна клинична лаборатория. През 1991 г. във Втора клинична база на УМБАЛ – Плевен, се обособява Център по клинична имунология. През 2003 г. влиза в състава на разкритата клиника по алергология и клинична имунология като самостоятелно обособена структурна и административна единица – МДЛ по имунология. През 2003 г. се включва като секция „Имунология и алергология“ в обединената катедра „Дерматология, венерология, алергология и имунология“. Ръководител на лабораторията и катедрата е доц. д-р Петрунка Каменова Петрова, д.

Към настоящия момент в лабораторията работят: доц. д-р П. Петрова, д., доц. д-р Е. Конова, д., ст. асистент д-р Хр. Андреева д., ординатори – д-р Ц. Луков и д-р Св. Гечева, четирима лаборанти и един санитар. Всички кадри са с необходимата професионална квалификация за заеманата от тях длъжност, отговаряща на изискванията на националните стандарти.

Лабораторията е снабдена със съвременна апаратура, позволяваща извършване на широк спектър диагностична и научна дейност: флоуцитометър (FACS^{Sort}, BD), автоматичен ELISA ридер, оборудване за клетъчни култури, флуоресцентен микроскоп и др.

В МДЛ по имунология се извършва рутинна имунодиагностика в следните основни аспекти:

- ✓ имунодефицитни състояния – определяне на някои параметри на хуморалния и клетъчен имунитет;
- ✓ автоимунни заболявания – определяне на широк набор от серумни автоантитела, автореактивни клетъчни популации, както и антигени от системата HLA;
- ✓ флоуцитометрична имунофенотипизация на клетки;
- ✓ имунодиагностика на репродуктивните неуспехи;
- ✓ определяне на серумни туморни маркери и ДНК анализ на тумори;
- ✓ диагностика на някои инфекциозни заболявания.

Научните направления, по които се работи, са свързани с проучвания в областта на патогенезата на някои имунодефицитни заболявания и автоимунни състояния чрез изследване на хуморален и клетъчен имунитет и фагоцитните функции. С приоритет се развива репродуктивната имунология съгласно съвременните тенденции и възможностите за приложението ѝ в клиничната практика. Изучават се принципите на приложение, механизмите на действие и ефектите на имуномодулиращата и имуностимулиращата терапия. Флоуцитометрично се определят тромбоцитни маркери и антитромбоцитни антитела.

Клиничната имунология е въведена като задължителна учебна дисциплина през 1994 г. и е утвърдена като основна медицинска специалност с Наредба за единните държавни изисквания за придобиване на висше образование по специалностите „Медицина“ и „Дентална медицина“ за образователно-квалификационна степен „магистър“ (ДВ, бр.95/2005 г.).

МДЛ по имунология е база за клиничното практическо обучение на български и чуждестранни студенти, специализанти и докторанти по правила и ред, определени от действащите в страната Закон за висшето образование, Закон за лечебните заведения и Наредба № 31 от 28.VI.2001 г. за следдипломно обучение в системата на здравеопазването и др.

Натрупаният в продължение на 20 години опит в областта на имунологията и утвърдената приемственост за предаването на опита са създали добри условия за образователния процес и научната дейност. Научно-преподавателските кадри, работещи в звеното, могат да прилагат достиженията на фундаменталната имунология в клиничната практика и на тази база да осъществяват добро качество на преподаване, диагностика и терапия в областта на клиничната имунология.

Резултатите от научните разработки са представени в монографии, научни статии, доклади и съобщения на конгреси и конференции у нас и в чужбина. В звеното се работи по наши и международни проекти.

Секцията по имунология към катедрата е утвърдена като един от водещите имунологични центрове в страната с приоритети – научна и клинична имунологична дейност, имунотерапия и репродуктивна имунология. Някои национални имунологични събития се организират и провеждат в Плевен. В последните няколко години МДЛ по имунология е организатор на превърналите се в традиция Плевенски имунологични дни, в рамките на които са проведени:

Първа международна конференция (2001) по антифосфолипиден синдром;

Втора международна конференция под наслов „Имунологични аспекти на инфертилитета“ и Пролетно училище за акушер-гинеколози на тема „Основи на репродуктивната имунология“, Плевен (2004);

Трета международна конференция под наслов „Всичко за интравенозната гама – глобулинова терапия“ и Лятно училище по автоимунитет на тема „Патогенеза и диагностика на автоимунните заболявания“, Плевен (2005).

В МДЛ по имунология към УМБАЛ – Плевен, се издава международно списание по имунология на английски език – *Clinical Application of Immunology* (ISSN – 1312-0832), което от 2004 г. с решение на Асамблеята на Балканската асоциация на имунологичните дружества (BAIS) е неин официален орган.

ЛАБОРАТОРИЯ ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ, УМБАЛ „Св. Марина“, Варна

В лабораторията по клинична имунология, УМБАЛ „Св.Марина“, Варна, от 10 години има флоуцитометър FACSort. Пробите се анализират чрез софтуерни продукти SimulSET, CellQuest 3.1, ModFit 2.0, HLA-B27 на компютър с операционна система MacOS 8.6.

Сортиращата система на апарата не е прилагана в лабораторната практика. Вече от една година се използват възможностите на флоуцитометъра за трицветен анализ.

В момента в лабораторията рутинно се извършва фенотипизация на лимфоми и левкемии, изследване на експресия на HLA-B27 ген, както и характеризирание на лимфоцитни популации при различни състояния.

Обработват се проби от периферна кръв, костен мозък, БАЛ, както и биопсични материали – четкови, тънкоиглени и оперативни.

Работният колектив на лабораторията се състои от доц. Светлозар Балев, д-р Феодора Иванова, д-р Иван Балабански и лаборантките Виктория Еврейнова и Ани Цветкова.

На флоуцитометъра са работили също и колеги от други клиници – д-р Цветанка Оджакова и д-р Хинко Върбанов.

През годините флоуцитометърът е използван и за научни изследвания, което помогна на някои колеги да защитят своите блестящи дисертации.

Лимфоцитни субпопулации и активационни маркери при болни с ХБН – д-р Светла Стайкова;

Лимфоцитни субпопулации от периферна кръв и интралиреозни пунктати – доц. Кирил Христов;

T-лимфоцитни субпопулации при мониториране на лечение на пациенти с БА – д-р Цветанка Оджакова;

Субпопулации на мононуклеарни клетки в периферна кръв и ставен пунктат при деца с ЮХА – доц. Боряна Върбанова;

ДНК анализ на четкови и оперативни биопсии от Са на маточна шийка – д-р Явор Корновски;

ДНК анализ на бенигнени стомашни и дебелочревни полипи – доц. Искрен Коцев;

Изследване на маркери за апоптоза (bcl-2 и Apelin V) при лечение на пациенти с НХЛ – д-р Хинко Върбанов;

Клинично значение на показателите от ДНК анализ при пациенти с остра левкемия – д-р Хинко Върбанов;

Характеристика на гранулоцитни функции чрез Burstest и Fagotest – д-р Даниела Герова;

Лимфоцитни субпопулации при някои инфекциозни заболявания – д-р Маргарита Господинова;

Диагностично значение на плътността на експресия на CD22 и CD23 при НХЛ и ХЛЛ – д-р Феодора Иванова.

„ПАРАДОКСИ НА ИМУННИЯ ОТГОВОР“ (АКО ИМА ТАКИВА?)

Б. Божков

Имунитетът е до голяма степен условно приет термин за нормалната защитна реакция на имунната система за запазване имунната хомеостаза на организма. Имунният отговор принципно защитава организма от външна агресия (основно от инфекции), но тази „агресия“ може да бъде и трансплантацията на алотипно различни тъкани или провежданата лекарствена терапия. Независимо от нашите традиционни представи за „задължителната полезна функция“ на имунната система за запазване на имунната хомеостаза при определени обстоятелства имунният отговор може да бъде ПАТОЛОГИЧНО ПРОМЕНЕН (прекъсване на имунната толерантност) и да се предизвика аберантен имунен отговор, насочен към безвредни за здравия организъм външни антигени (алергия) или към собствените антигени (автоимунни реакции).

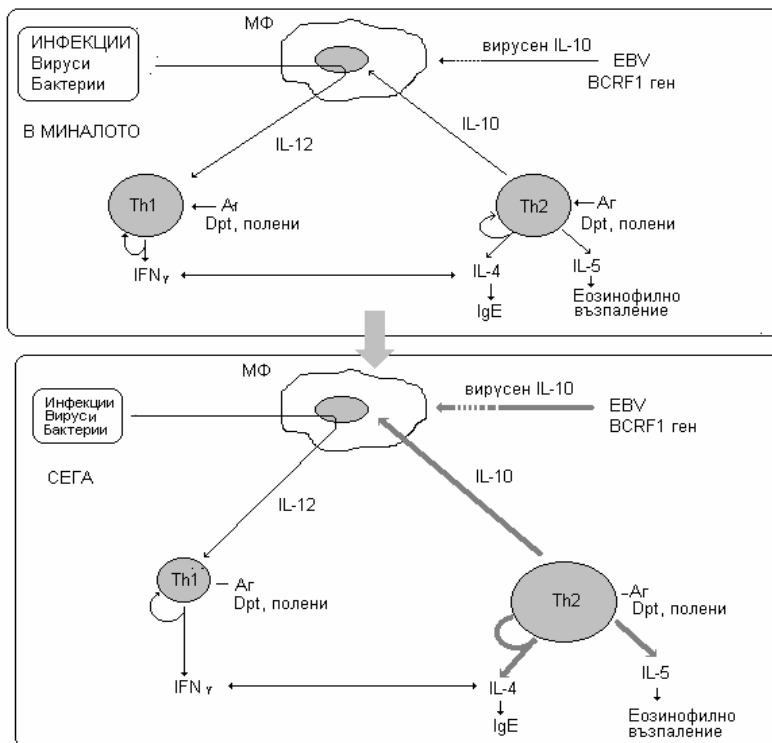
Думата „пара-докс“ е гръцка и буквално се превежда като друго, успоредно мнение. Но „парадокс“ означава и нещо, което е абсурдно, но може да се окаже факт. В този смисъл парадоксът е субективно, често пъти хипотетично мнение, докато се разкрие евентуално обективната истина за т. нар. парадокс. В същото време парадоксът може да бъде и провокация или спекулация за стимулиране на научното мислене. В крайна сметка парадоксът ни задължава да търсим обективната истина в случаите с привидно или действително парадоксален имунен отговор.

Като парадокси в имунния отговор можем, макар и условно, да определим:

- медираните от IgE алергични реакции и болести, разгледани в еволюционен (филогенетичен) аспект;
- автоимунитет и автоимунни болести;
- алергично-автоимунните припокриващи се (overlap) синдроми;
- групата на „преходните“ автоимунни болести и синдроми;
- парадоксални реакции, наблюдавани при лечението на някои автоимунни болести с моноклонални антитела (МКА).

Парадоксите на медираните от IgE алергични реакции и болести.

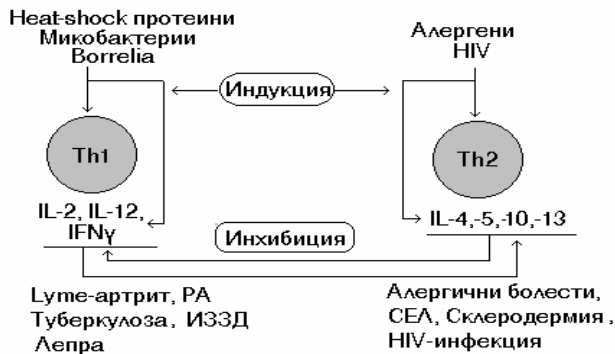
Алергичните реакции и болести се дефинират като проява на свръхчувствителност (СЧ) след прекъсване на толерантността към голямата група безвредни за здравия организъм външни антигени (поленови, храни, медикаменти и др.). Парадоксалното за тези реакции е „конверсията“ в еволюцията на IgE антителата – докато в миналото (дори и днес в някои райони на света) те са имали защитна роля при паразитните инфекции, днес те са причинители на алергични реакции и болести, част от които се наследяват (атопия). Имунният IgE отговор се определя като Th2-зависим и се е получил филогенетично от пренасочването на клетъчно-медиация (Th1-зависим) имунен отговор в Th2-зависим (фиг. 1).



Фигура 1. Пренасочване на имунния отговор от Th1 в Th2 (по Н. Okudaira, 1998). [1]

Обезпаразитяването, профилактиката и лечението на бактериалните инфекции, което води до Th2-зависим имуен отговор, заедно с генетичните фактори – доминантното наследяване на атопията, промените в съотношението на интерлеукините, и др. фактори повлияват изотипното превключване в IgE синтеза с последващите промени в имунния отговор.

Познаването на тези механизми позволява намесата в имунния отговор – т.нар. *имунологична интервенция* чрез модулация на лимфоцитната цитокинова секреция от Th2, към Th1-зависим имуен отговор (P. Miossec) [2]. Разработването на такива методи почива на установените факти за индуцирането на Th2-зависим имуен отговор от алергени (с производството на IL-4, -5, -10, -13), предизвикващи алергични болести и предразположение към системни аутоимунни болести като системен еритематозен лупус (СЕЛ), системна склеродермия и др. В същото време цитокините на Th2-зависимия имуен отговор потискат клетъчнозависимия Th1-имуен отговор. Известно е и индуцирането на Th1-имуен отговор от топлинно шокови протеини, микобактерии, борелии и др. (с IL-2, -12 и IFN γ), предизвикващи РА, лаймска болест, инсулинозависим захарен диабет (ИЗЗД), лепра и др. (фиг. 2).



Фигура 2. Възможности за модулация на цитокиновата секреция от Th1 и Th2 лимфоцитни субпопулации, използвани за имунологична интервенция (по P. Miossec) [2].

В процес на клинични изпитвания са и лечението на IgE-медираните алергични болести, в частност бронхиалната астма, с антитела към IL-5, което предполага потискане на Th2-зависимия имуен отговор (P.M.Cuss, 1998) [3] и по-съвременния метод с блокиране на IgE антителата с моноклоналното анти тяло (МКА) Xolair® (Omalizumab). Последният метод има вероятно значителни предимства и освен анафилактични реакции от приложението му при някои астматици засега не са описани други нежелани реакции. Но трябва да се има предвид, че намесата в имунния отговор с други МКА при лечение на автоимунните болести (вж. по-долу) крие рискове от влошаване състоянието на някои от лекуваните пациенти.

Парадоксални ли са автоимунитетът и автоимунните болести? До 1900 г. се е приемала догмата за толерантността на имунната система (self-tolerance), която поради „страх от самоотравяне“ (horror autotoxicus) не реагира с патологични реакции срещу собствените си тъкани, които могат да увредят организма. P. Ehrlich през 1900 г. отхвърля тази догма, като изгражда нова концепция за автоимунитета, с която приема, че имунната толерантност към собствените тъканни антигени може да бъде прекъсната и да се развият автоимунни реакции. По-късно P. Grabar доказва, че автоимунитетът присъства като нормална реакция в репертоара на имунната система (под формата на автоимунни лимфоцити), но при нормалната ѝ дейност тя не предизвиква автоимунни болести. Известно е, че появата на автоимунитета се свързва с прекъсване на толерантността към собствените антигени вследствие на твърде много причини:

- основните от тях са Т-клетъчните дефекти, получени при клоналната делеция и дефицит на супресорни лимфоцитни клонове;
- клонална анергия и от т.нар. суперантигени;
- от активирането на „забранени клонове автореактивни Т клетки;
- променен имуен отговор при бременност, трансплантации, освобождаване на т.нар. секвестрирани тъкани, лимфопролиферативни болести, неоплазми, имунни дефицити, вирусни инфекции, лекарства, менопауза и др.

● дефекти в антигенното разпознаване, свързани с тимусни дефекти, генни мутации при реаранжирането на Т-клетъчния рецептор и др.;

- дефекти в антигенното представяне от молекулите на ГКС;
- дефекти в преработването на антигените, поява на авто- и неоантигени;
- нарушени реакции на идиотипната-антиидиотипна мрежа.

Отделно трябва да се отбележи **парадоксалната роля на CD5+ В клетките и синтезираните от тях естествени (натурални) автоантитела (НАА) в патогенезата на автоимунните болести (АИБ)**. Известно е, че НАА към свои и чужди антигени присъстват в репертоара на нормалния имунен отговор, законсервирани през неговата еволюция във филогенезата. Те са полиспецифични, с нисък афинитет, най-често от клас IgM, секретирани от CD5+ В клетките, които са само 2-3% от лимфоцитната популация. Увеличаването на НАА се свързва с поликлоналната В-клетъчна активация, която намира място при системните, органо-неспецифични автоимунни болести. Увеличението им при тях говори за евентуалната им патогенетична роля при тези болести.

Парадоксалното е в ролята на синтезираните от CD5+ В клетките НАА, които освен като патогенни същевременно и предпазват организма от опасната за него автоимунизация, като синтезират НАА и към екзогенни алергени (алергия?), които реагират кръстосано с някои автоантигени, което е предпоставка за появата на алергично-автоимунни припокриващи се (overlap) синдроми с Th2 имунен отговор.

Примерите за това са няколко:

● НАА, срещани при поликлоналната В-клетъчна активация, са най-често със специфичност към нуклеарните антигени (ЕНА, ДНК, ревматоидно-артритни нуклеарни антигени), еритроцитни антигени, автоантитела, откривани при паразитни болести (малария, трипанозомиаза) и др.

● В клиничен аспект НАА се срещат преди всичко при СЕЛ като представител на системните органонеспецифични автоимунни болести. Подобен е и РА, при който ревма факторите (РФ) са със специфичност освен към ревматоидноартритните нуклеарни антигени и към антигенни детерминанти в константните региони на Ig молекулите на заразени с EBV В лимфоцити. Допуска се и ролята на НАА в обмяната на холестерола при атеросклерозата, приета днес също за болест с автоимунна патогенеза (вж. по-долу).

Разширяването кръга на АИБ доведе до нови примери за „парадокси“ на имунния отговор. Според съвременните проучвания това се получава поради три основни причини: увеличава се процентът на заболелите от известните АИБ; увеличават се болните с алергично-автоимунни припокриващи се (overlap) синдроми и трето – към АИБ се причисляват други болести, приемани досега за неавтоимунни (напр. атеросклерозата).

R. Ross (1999) [4] приема атеросклерозата за болест с автоимунна патогенеза, подобна на ревматоидния артрит. При атеросклерозата, приета за възпалително-съдова болест, се намират възпалителни лезии, водещи до обструкция на артериалните съдове. Фактори за тези лезии са високоспецифични клетъчно-молекулярни отговори, главно от макрофаги и лимфоцити. Основен рисков фактор за атеросклерозата си остават нископлътностните липопротеини (LDL), акумулирането на липиди в съдовата стена, при което се засягат големите и средните арте-

рии от еластичен и мускулен тип. Една от последиците от тези процеси е *нестабилната стенокардия* с исхемия на сърдечния мускул, мозъчните съдове и съдовете на крайниците.

Естествено намираните антитела срещу холестерола са приети за важен фактор в изказаната от С.К. Alving и N.M. Wassef (1999) [5] хипотеза за тяхната роля в имунологичните, предимно автоимунни механизми, участващи в метаболизма на холестерола (т.е. в т. нар. метаболитен синдром). За участието на естествено намираните антитела срещу холестерола са описани два известни засега пътя: рецепторно зависим и рецепторно независим път за деградация на LDL холестерола.

По първия път се елиминират 2/3 от LDL холестерола с тези антитела, намирани нормално в човешката плазма. Те съдействат за обмяна на LDL холестерола чрез неговото опсонизиране и отстраняване чрез рецепторите на комплемента (С3в), намирани на Купферовите клетки.

По втория – рецепторно независим, път се елиминира останалата 1/3 от LDL холестерола.

Парадоксалното (на пръв поглед) сходство между атеросклерозата и РА е предмет на проучване от V. Pasceri и сътр. (1999) [6]. Изградената от тях хипотеза за сходството между двете възпалителни болести почива на сходните имунопатогенетични механизми:

- Активиране на възпалителните клетки (макрофаги и мастоцити), отделящи колаген-разграждащи ензими в атеросклеротичните плаки в съдовете и предизвикващи колагенова деградация на синовията при РА.

- Друго сходство са активираните еднакви адхезионни молекули: VCAM-1, ICAM-1, E- и P- селектините, както и настъпващата и при двете болести неоангиогенеза.

- Като трето сходство цитираните автори изтъкват появата на активирани Т клетки с експресирани на тях IL-2 рецептори в атеросклеротичните плаки при нестабилната стенокардия и в синовията на РА.

- Характерни и за двете болести са специфичната популация Т клетки – CD4+ CD28– намирани в 65% от болните с нестабилна стенокардия и РА, докато у здрава хора тази специфична популация Т клетки е само 1%.

- Характерни още за тези Т клетки, както и Т клетките, отделящи IFN γ , е, че те активират МФ и подтикват синтезата на колаген.

Парадокси на имунния отговор при болни от системна склеродермия (СС), развили миелофиброза и левкемоидни реакции ante mortem.

СС е автоимунна болест с Th2-имунен отговор, което вероятно е причина за алергичните прояви при някои пациенти. Патогенетично се проявява със свръхпродукция на нормален колаген като израз на аберантна регулация на фибробластите в съединителната тъкан. През 1966 г. публикувахме в Zschr. Ges. Innere Med. [7] две болни със СС с клинични прояви на миелофиброза, доказана и хистологично, което постави въпроса за участието на миелоидните клетки в костния мозък, черния дроб и лимфните възли в патологичния процес.

Парадокс: Интерес представляваше терминално проявената левкемоидна реакция, достигнала при една от болните ексцесивни стойности на левкоцитите до 322 G/l.

„Парадоксалният“ алергично-автоимунен припокриващ се (overlap) синдром – проява на „химеричен“ имуен отговор. Идеята за „припокриването (overlap) на алергични и автоимунни болести при един и същи болен се зароди у нас през 1992 г. от наблюдението на болна от системен васкулит и болестта на Sharp, еволюирала в субакутен лупус еритематодес, която след години разви и atopични алергични реакции – полинозна астма и ринит. По същество алергично-автоимунният overlap синдром е проява на *химеричен имуен отговор*, съчетаващ прекъсването на толерантността към екзо-алергените (алергия, Th2-имуен отговор) и към собствените антигени (автоимунитет, Th1-имуен отговор), за което имаме много примери, събрани впоследствие от нашия авторски колектив (Б. Божков и съавт., 1999) [8].

Но „припокриване“ (overlap) може да се срещне и в изкуството, например портрета на Мона Лиза от Леонардо да Винчи с доказано по компютърен път съчетание на женски и мъжки черти в образа на Мона Лиза. Подобно на нея Леонардо е нарисувал и други възхитителни андрогини като напр. Йоан Кръстител.

Парадоксите в групата на „преходните“ автоимунни болести и синдроми. Една от характерните особености на overlap синдромите е техният преходен характер (transitional-синдроми). Класически пример за преходна автоимунна болест е смесената съединителнотъканна болест (ССТБ), съчетаваща симптоми на прогресивна системна склеродермия, СЕЛ, болестта на Churg-Strauss, CREST-синдром, антифосфолипиден синдром (АФЛС), дерматомиозит и полимиозит (ДМ/ПМ) и др. В основата на подобни transitional-синдроми стои серологичен overlap, съчетаващ характерни за горните автоимунни болести и синдроми набор от аутоантитела. „Парадоксалното“ при тях е често наблюдаваното (но напълно разбираемо) „разпадане“ на „преходната болест“ в една от „големите“ системни колагенози – СЕЛ или прогресивна системна склероза (ПСС) – и двете с Th2 зависим имуен отговор.

Парадокси на имунния отговор при лечението на субакутния кожен лупус еритематозус (SCLE) с инхибитори на TNF α (Infliximab) [9]. Тумор некротизиращият фактор алфа (TNF α) се експресира *in situ* в рефрактерни на лечение кожни лезии на SCLE. При такива болни е наблюдаван добър резултат при лечението с thalidomide, но с чести странични реакции от типа на тератогенната невротоксичност. SCLE се подобрява и от локалното лечение с имunosупресорите tacrolimus (Protopic) и pimecrolimus (Elidel). Добър резултат при някои от тези болни е получаван и от МКА срещу TNF α – Infliximab. TNF α е цитокин, отделян от моноцити и макрофаги, който индуцира продукцията на GM-CSF, IFN γ , IL-1 и повишава експресията на адхезионните молекули на епителните клетки.

Парадоксалното при лечението на SCLE с Infliximab е, че някои от пациентите вместо подобрение са получавали нови, подобни на лупус кожни прояви (Zampieri, S. и сътр., 2006) [10] и/или повишени титри на антинуклеарните антитела (АНА) към ds DNA (Klarman и сътр., 2003) [11] и антикардиолипинови антитела [12]. Парадоксалният отговор при лечението на някои от болните с SCLE от лечението с инхибитора на TNF α -моноклоналното анти тяло (МКА) Infliximab поставя въпроса за участието на цитокина TNF α в патогенезата на лупус-подобния аутоимунитет: ролята на медиатор или на протектор при болните от SCLE.

Въпросът с парадоксалните реакции след лечението на болни с лупус-подоб-

бен автоимунитет с МКА Infliximab намира продължение с наблюдаваните странични реакции, получавани при лечението на други съединителнотъканни автоимунни болести като РА, тежък анкилозиращ артрит, псориагичен артрит и др. с напълно хуманизираното МКА Humira (adalimumab), също инхибитор на TNF α [13, 14].

Направените клинични проучвания (ADEPT и др.) освен добрите резултати показват и много тежки странични реакции: тежки инфекции, сепсис, туберкулоза, реактивиране на вирусен хепатит, редки случаи на демиелинизиращи процеси, тежки алергични реакции, увеличаване риска от развитието на малигнитет и лимфоми, увредена чернодробна функция. Тези тежки странични реакции, получени след лечение с МКА срещу TNF α , отново поставят въпроса за ролята на TNF α – на медиатор или протектор при автоимунните болести и *в по-широк план* – за ролята на МКА в получаването на парадоксални имунни реакции в хода на лечението на автоимунните болести (и не само на тях! МКА срещу TNF α – Rimecade се разработва и за лечението на бронхиалната астма). Интересни ще бъдат анализите за резултатите от лечението на бронхиалната астма с това анти тяло.

Предвид данните за влошаване на сърдечната недостатъчност (СН) от инхибиторите на TNF α у нас са правени клинични изследвания за определяне плазмената канцентрация на TNF α , но при болни със сърдечна недостатъчност (СН) [15]. Резултатите от тези изследвания показват: средна стойност за TNF α от 2,55 pg/ml. Не е намерена статистическа зависимост между концентрацията на TNF α и тежестта на СН, както и разлика в концентрацията на TNF α в зависимост от прилаганата терапия. Концентрацията на TNF α не е корелирала с никой от изследваните биохимични показатели при болните със СН.

Парадокси на имунния отговор при лечението на хроничния хепатит с IFN γ . Според редица автори [по 16] някои от екстрахепаталните прояви на хроничната HBV и HCV инфекция (муко-кутанни форми на lichen ruber planus, тиреоидити и тиреоидна дисфункция) провокират или изострят предшестваща автоимунна болест, водят до поява на автоантитела, развитие на манифестен захарен диабет и др. При много от болните тези имунологични промени се свързват с лечението на хроничната чернодробна болест с интерферон алфа (IFN α). Явно въпросът за тези промени предстои да се уточнява предвид обстоятелството, че при някои пациенти с хроничен HBV и HCV хепатит е описана появата на автоантитела. Това се тълкува от някои автори [по 16] по-скоро като генерализирана инфекция с мултиорганно засягане, отколкото като хронично възпаление на чернодробния паренхим. Независимо от това и тук се натъкваме на същия въпрос – за възможната парадоксална (или ятрогенна) реакция на имунната система спрямо терапията с цитокин (IFN α), който предизвиква парадоксални ефекти в имунитета.

В заключение към обсъждането на въпросите за страничните реакции, получавани при лечението на автоимунните и алергични болести с МКА, интерпретирани като „парадоксални“ реакции на имунната система при опитите за лечение с методите за *имунологична интервенция*, трябва да споменем и алтернативната възможност: за *ятрогенния характер* на тези реакции или както го беше казал навремето покойният проф. Чудомир Начев – с нашите методи на лечение понякога не вредим ли повече, отколкото да помагаме?

ЛИТЕРАТУРА

1. Okudaira H. Why atopic diseases prevalent in developed countries. *Allergy & Clin. Immunol* 1998; 4: 110-115.
2. Miossec P. et al. Bypassing the antigen to control RA. *Immunol. Today* 1996; 17: 170-173.
3. Cuss PM. Therapeutic effect of antibodies to IL-5. In: 30years with IgE, Ed. M. van Hamsten & M. Wickman, Munksgaard, Copenhagen, 1998
4. R. Ross. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340: 125-126.
5. Alving C R, and Wassef NM. Naturally occurring antibodies to cholesterol: a new theory of LDL-cholesterol metabolism, *Immunol. Today* 1999;20: 8.
6. Pasceri V. et al. A tale of two diseases: Atherosclerosis and Rheumatoid arthritis. *Circulation* 1999; 100: 2124-2126.
7. Ninov L, Bozhkov B. Uber das myelofibrotische Syndrom bei generalisierter Sclerodermie. *Zschr Ges Inn Med und ihre Grenzgebiete.* 1966; 21: 348-352.
8. Божков Б, Христов Г, Балева М, Димитров В, Попова Д, Стаевска М, Балтаджиева Д, Симидчиев А, Николов К, Попов Д. Алергичен-автоимунен overlap синдром. Алергия и астма 1999; 4: 19-27.
9. Биологична терапия при РА, Инхибитори на TNF β . *MD.* 2007; 11:58-59.
10. Zampieri S et al. TNF α is expressed in refractory skin lesion from patients with SCLE. *Ann Rheum Dis.* 2006; 65:545-548.
11. Klapman J. et al. A lupus-like syndrome associated with infliximab therapy. *Inflamm Bowel Dis.* 2003; 9: 176-8.
12. Антикардиолипинови антитела. *MD* 2006; 8: 24.
13. Тъкнатата локализация на TNF α – потенциална терапевтична цел при субакутен кожен лупус еритематозус. *MD* 2006; 6: 24.
14. Adalimumab (Himura, инхибитор на TNF α) одобрен за лечение на псориаатричен артрит и първа линия терапия за тежък РА. *MD* 2006; 12: 72
15. Станчева Н. Мозъчен натриуретичен пептид, TNF alpha и вариабилитет на сърдечната честота в клинично-прогностичната оценка на сърдечната недостатъчност с понижена спрямо запазена систолна функция. Дисертация, Плевен, 2007 г.
16. Николова МК. Диагностични и прогностични стойности на някои показатели на имунния отговор при пациенти с различни форми гломерулонефрит. Дисертация, С. 2007 г.

„ПАРАДОКСИ НА ИМУННИЯ ОТГОВОР“
(АКО ИМА ТАКИВА?)

Б. Божков

Резюме. Предмет на съобщението са парадоксите на IgE медираните алергични реакции и болести, автоимунитета и автоимунните болести, „парадоксалната“ роля на CD5+ В клетките и синтезираните от тях естествени (натурални) автоантитела в патогенезата на автоимунните болести, приемането на атеросклерозата за болест с автоимунна патогенеза, както и сходството между атеросклерозата и ревматоидния артрит (РА), „парадоксалният“, наречен от нас алергично-автоимунен припокриващ се (overlap) синдром и преходните автоимунни болести, парадоксите на имунния отговор при лечението на субакутния кожен лупус еритематозус с моноклонални антитела – инхибитори на TNF α или на хроничния хепатит с IFN и др. Основният въпрос при всички тези прояви на имунитета е: ИМА ЛИ ВСЕ ПАК ПАРАДОКСИ в имунния отговор?

„PARADOXES OF THE IMMUNE RESPONSE“
(IF THEY EXIST?)

B. Bozkov

Summary. The aim of the present paper is to describe some paradoxal-like immune reactions: IgE – mediated allergic reaction; autoimmunity and autoimmune diseases; paradoxal role of the CD5+ B cells and the natural autoantibodies synthesized by them and their role in the pathogenesis of the autoimmune diseases; the similarity between atherosclerosis and rheumatoid arthritis (RA); the so-called by us „allergic-autoimmune overlap syndrome“ and the transitory autoimmune diseases; paradoxal immunologic reactions after the treatment of patients with subacute skin lupus erythematosus with monoclonal antibodies to TNF α , or the treatment of chronic hepatitis with IFN γ , etc. The main question in all of these immune reactions is: ARE THERE PARADOXAL IMMUNE REACTIONS AT ALL?

ПАТОГЕНЕЗА И ДИАГНОСТИКА НА АВТОИМУННИТЕ ТИРЕОИДНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

И. Атанасова

*Клиничен център по ендокринология и геронтология „Акад. Ив. Пенчев“,
МУ, София*

През 1912 г. Н. Hashimoto [1] описва 4-ма болни с характерни промени в щитовидната жлеза – лимфоцитна инфилтрация. Скоро след това оригинално откритие се появяват клинични и патологоанатомични проучвания и заболяването се нарича тиреоидит на Хашимото, хроничен тиреоидит, лимфоцитарен тиреоидит, лимфаденоидна струма или автоимунен тиреоидит. По това време тиреоидитът на Хашимото се е приемал като рядко заболяване. С увеличаването на диагностичните възможности се установи, че автоимунният тиреоидит е едно от най-честите заболявания и непрекъснато увеличава честотата си. За първи път GA Fromm и съавт. [2] установяват повишена гама глобулинова фракция в серума на тези пациенти.

I Roitt, D Doniach, P Campbell и RV Hudson [3] установяват, че серум от болен с тиреоидит на Хашимото реагира с екстракт от здрава щитовидна жлеза. Следователно в кръвта на човека се образуват антитела не само срещу външни агенти, но и към собствени структури. Изказват предположение, че болестта на Адисон, тиреотоксикозата, микседемът, пернициозната анемия, хипопаратиреоидизмът и захарният диабет вероятно имат сходна патогенеза. Тези данни се появяват през 1956 година и буквално една седмица по-късно са публикувани в Lancet. През знаменателната за имунологията и ендокринологията 1956 година екипите на NR Rose и E Witebsky в САЩ и D Doniach и I Roitt в Англия формулират хипотезата за автоимунната патогенеза на тиреоидита на Хашимото. NR Rose и E Witebsky [4] експериментално предизвикват заболяването чрез имунизирание на зайци с тиреоглобулин. Тиреоглобулинови антитела са открити в серума на имунизирания животни. Тези открития поставят основите на концепцията за автоимунните заболявания. В резултат на тези значими проучвания в наши дни разполагаме с възможностите на диагностичната имунология – определянето на антитела за диагноза, прогноза, мониториране на терапията и оценка на риска от заболяване.

N Rose, понастоящем професор и директор на Център за автоимунни заболявания в Балтимор, обръща внимание върху това, че автоимунните заболявания са сред най-честите и в САЩ са засегнати между 15 и 22 милиона души, от които две трети са жени. Интересите на екипа са насочени към ролята на цитокините за иницирирането и прогресията на тези заболявания в генетично възприемчиви или резистентни мишки с адювант индуциран тиреоидит. Те доказват ключовата роля на IFN- γ и IL-12 за автоимунната патогенеза на заболяването. При генетично възприемчиви към автоимунен тиреоидит мишки е установено, че диетичният йод увеличава честотата и тежестта на заболяването, като усилва антигенните качества на тиреоглобулина.

В наши дни са открити и описани около 80 автоимунни органоспецифични заболявания. Най-чести са автоимунните заболявания на щитовидната жлеза.

КЛАСИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА

Съвременната класификация на автоимунните тиреоидни болести (АТБ) включва хроничен автоимунен тиреоидит или тиреоидит на Хашимото с вариантите му, автоимунен атрофичен тиреоидит или първичен микседем и Базедова болест.

Понастоящем се приема, че:

- АТБ са полигенни, т.е. генетичните фактори, определящи възприемчивостта към заболяване, участват в патогенезата им.
- АТБ са органоспецифични Т-клетъчно медиирани.
- Фактори на околната среда са етиологични, отключващи заболяването – стрес, йод, вирусни инфекции и имунизации и др. при генетично възприемчиви индивиди. Поради загуба на имунен толеранс автореактивни Т клетки, активирани от антиген-презентиращите клетки (АПК), инвазират щитовидната жлеза.

ПАТОГЕНЕЗА (фиг. 1)

● АКТИВИРАНЕ НА ИМУННИТЕ КЛЕТКИ

При антигенна стимулация CD4+ T helper прекурсорни клетките се диференцират в две субпопулации Th1 и Th2. Th1 секретират IL-2, IFN- γ и TNF- α , които регулират клетъчно медиацията на имунен отговор и индуцирането на тъканна увреда посредством активиране на цитолитични клетки и други цитотоксични механизми [5, 6]. Th2 клетките секретират основно IL-4, IL-5, IL-6 и IL-10 и стимулират диференциацията и пролиферацията на специфичен клон В лимфоцити за производство на органоспецифични антитела [5, 6] (табл. 1). Т лимфоцитите разпознават антигенната молекула, представена от главния комплекс на тъканната съвместимост (МНС) на антиген представящите клетки (АПК) (дендритни клетки и макрофаги). Активирането на Т лимфоцита от АПК изисква освен наличие на специфичен за комплекса Т-клетъчен рецептор и ко-стимулаторни сигнали. Такива са клетъчно-повърхностните молекули, експресирани на АПК. От тях най-голямо внимание заслужават протеините от семейството В7 [7]. В7-1 (CD80) стимулира Th1 клетъчната пролиферация, а В7-2 (CD70) – Th2 [8, 9, 10, 53]. В7-1 и В7-2 са лиганди за рецепторите си CD28 и цитолитичния Т лимфоцит асоцииран антиген-4 [11, 12]. Взаимодействието на В7-1 или В7-2 с CD28, експресирана върху неактивирани Т лимфоцити, предизвиква активирането им. CTLA-4, експресирана върху активирани Т лимфоцити, компетитира с CD28 за костимулаторните рецептори В7-1 и В7-2. Свързването на В7 с CTLA-4 води до индуциране на анергия [13, 14].

● МЕХАНИЗМИ НА ИМУННИЯ ТОЛЕРАНС И НАРУШЕНИЯ

В серумите на пациенти с АТБ е установена разтворима форма на CTLA-4 (sCTLA-4), резултат на експресията на генен сплайсинг [15]. Има данни, че този рецептор свързва молекулите от групата на В7 с все още неизвестна роля. Установени са и други лиганд-рецепторни двойки, играещи роля в стимулацията на авто-



Фиг. 1. Патогенеза на аутоимунните заболявания на щитовидната жлеза

имунния процес: Positive regulatory co-receptor inducible co-stimulator (ICOS) свързва B7RP-1 и предава стимулаторни сигнали анергия [16, 17]. Negative regulatory co-stimulator programmed death-1 (PD-1) свързва два лиганда B7-H1 (PD-L1) и B7-DC (PD-L2) и обещава да е твърде важен в процеса на регулация на периферния толеранс и автоимунитет [18, 19]. PD-1 се експресира върху активирани Т и В лимфоцити, докато експресията на лигандите му върху нормални клетки е спорно [20]. Превенцията от автореактивност се гарантира от механизмите, контролиращи автореактивните Т лимфоцити. Контролните механизми включват адаптивния (централен и периферен) толеранс и клоналната анергия, имащи сходни механизми [21, 22].

Значението на централния толеранс стана актуално напоследък с откриването на новия AIRE ген /21q22.3/, който експресира транскрипционен фактор предимно в медуларните тимусни епителни клетки, моноцитите и дендритните клетки [23]. Мутациите в AIRE гена се приемат за етиологични за автоимунния полигландуларен синдром тип 1 (APS-1) или APECED синдрома [24, 25]. APS-1 е моногенно, автозомно рецесивно заболяване, характерно за детската възраст и засягащо няколко ендокринни органа поради нарушение в толеранса към няколко органоспецифични антигена вероятно поради тимусна недостатъчност за елиминиране на автореактивни Т лимфоцити [26]. Проучвания върху AIRE-knock out мишки показва, че те не могат да елиминират органспецифични антиген носещи клетки в тимуса, като например такива с експресия на тиреоглобулин [27]. Очевидно AIRE играе важна роля в имунния толеранс по отношение на тиреоид специфични автоантигени [28].

В поддържането на периферен толеранс участва взаимодействието на АПК с автореактивни CTLA-4-експресиращи Т лимфоцити. МК Oaks и съавт. [15] допускат, че sCTLA-4 е по-активен при почиващи Т лимфоцити и може да се свърже с B7, експресиран върху АПК, и да блокира B7-CD28 връзката, като по този начин интерферира върху ко-стимулацията на Т лимфоцитите и периферния толеранс. ICOS се експресира върху активирани Т лимфоцити и свързвайки се с лиганда си, стимулира клетъчния и хуморалния имунен отговор [17, 29]. Допуска се, че ICOS по-скоро поддържа, отколкото инициира Т лимфоцитния отговор, но точната му роля по отношение на периферния толеранс и/или активирането на имунния отговор предстои да бъде изяснена.

PD-1 също може да участва в периферния толеранс. PD-L1 и PD-L2 инхибират Т-клетъчното активиране и следователно нарушение във функцията им може да рефлектира върху клетъчния и хуморален имунен отговор [19, 30]. PD-1-дефицитни мишки са предразположени към автоимунитет [31, 32]. PD-L1 и PD-L2 вероятно имат различна функция по отношение на регулация на тип 1 и тип 2 имунния отговор. Например, Th1 клетките увеличават PD-L1 на макрофаги, докато Th2 усилват PD-L2 експресията [33].

Табл. 1. Фенотипна характеристика на АТБ

Параметър	Тиреоидит на Хашимото	Базедова болест
Ко-стимулаторни молекули	B7-1	B7-2
CD4+ субпопулации	Th1 преобладаване	Th2 преобладаване
Цитокини	IL-2, TNF- α , IFN- γ \uparrow Fas, Bcl-2, \downarrow sFas, \downarrow TRAIL-рецептори	IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 \downarrow Fas, \uparrow FasL, \uparrow Bcl-2, \uparrow sFas, \uparrow TRAIL
Тиреоидни клетки		
Лимфоцитна инфилтрация	+++	+
Апоптоза на тиреоцити	+++	+

● ГЕНЕТИЧНО ПРЕДРАЗПОЛОЖЕНИЕ ПРИ АТБ

АТБ са полигенни заболявания, резултат от взаимодействието на генетични фактори и отключващи фактори на околната среда. Има достатъчно доказателства, включително и при животни, за генетично детерминирани дефекти в имунния толеранс [34]. Участват както гени на МНС системата, така и не-МНС гени по два възможни начина – посредством увеличаване вероятността и възприемчивостта към заболяване и/или пряка роля в патогенезата на заболяването.

■ Гени на МНС системата – има много популационни проучвания, доказващи участието им [35-38].

■ Гени на инфламаторните цитокини [39, 40] и ко-стимулаторни молекули (CTLA-4) [41, 42, 43].

■ Гените за вариабилния район на Т-клетъчния рецептор (ТКР), както и имуноглобулиновите гени не дават значима асоциация с АТБ [44, 45].

■ Наскоро откритият AIRE ген – полиморфизми, за които до момента няма ясни корелации с генетичното предразположение към АТБ [46, 47].

■ Полиморфизми на CTLA-4 [41, 42, 43].

■ Новооткритият ген за синдром на Pendred (PDS) [48] при тиреоидит на Хашимото и базедова болест.

■ Генетичният скрининг при АТБ на този етап обаче потвърждава реалното участие на HLA (DR3) и CTLA-4 [14].

Патогенезата на АТБ е проучена детайлно при експериментални животни, които спонтанно развиват автоимунен тиреоидит. Те показват, че патогенезата на автоимунния тиреоидит е многостъпална [34].

■ В най-ранната фаза: увеличен брой АПК в щитовидната жлеза [49] в резултат на възпалителни процеси (вируси, бактерии), некротични увреди (механични,

токсични и др.), йоден излишък, промени в метаболизма или микросредата на тиреоидните клетки при генетично предразположени индивиди. На този етап АПК мигрират и представят тиреоидни автоантигени на Т-хелперните лимфоцити в дрениращите тиреоидеята лимфни възли.

■ На следващия етап е налице взаимодействие между АПК и ТКР. В този момент най-важни са механизмите на периферния толеранс и ко-стимулаторните молекули. Дефицит в имунния толеранс води до диференциране и пролифериране на клон/клонове от антиген специфични Т лимфоцити, които от своя страна посредством различна цитокинова продукция стимулират клетъчен и хуморален имуен отговор.

■ Първоначално продукцията на автореактивни Т лимфоцити и антитела се осъществява в дрениращите лимфни възли, но впоследствие лимфоидна тъкан се развива локално в щитовидната жлеза. Самите тиреоидни клетки могат да експресират МНС клас II молекули и да се превърнат в АПК [50, 51] вероятно под въздействието на цитокини (IFN- γ) от активирани Т лимфоцити, инфилтриращи жлезата [52].

■ М. Battifora и сътр. [53] намират B7-1 експресия на тиреоидните фоликуларни клетки при тиреоидит на Хашимото. CD28 експресията на инфилтриращите лимфоцити взаимодейства с B7-1 на тиреоцитите и в резултат е налице индукция на автореактивни Т лимфоцити.

■ Данните по отношение на sCTLA-4 експресията при АТБ са противоречиви. МК Oaks и КМ Hallett [15] съобщават за повишени нива на sCTLA-4 при АТБ, докато Ueda и съавт. през 2003 г. намират намалена mRNA за sCTLA-4 при пациенти с определен CTLA-4 алелен вариант, асоцииран с базедова болест и тиреоидит на Хашимото.

■ В крайната фаза автореактивни Т и В лимфоцити се натрупват в големи количества в тиреоидния паренхим и взаимодействат с тиреоидните клетки. Резултатът от това взаимодействие определя различния клиничен фенотип на заболяванията. Апоптозата играе голяма роля на този етап [54, 55].

Роля на апоптозата в патогенезата и клиничната картина на АТБ

Апоптозата включва верижна активация на серия от протеолитични ензими, известни като каспази. Каспазната каскада се активира по два пътя – чрез рецептора за смърт и по митохондриален път. Лиганди, свързващи този рецептор, или липса на растежни фактори и тропни хормони може да активира апоптозата. Най-добре проученият механизъм, медиран от рецептор, е Fas/Fas Ligand (FasL) системата. Fas е тип I трансмембранен протеин, принадлежащ към TNF-рецепторната фамилия. FasL е тип II трансмембранен протеин, който при свързването си с Fas рецептор експресирайки клетки индуцира апоптоза [56, 57].

TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) е сравнително нов член на TNF фамилията. Съществува в разтворима и мембранно свързана форма и има най-голямо сходство с FasL. TRAIL индуцира апоптоза чрез свързване с рецепторите си TRAIL-R1 (DR4) и TRAIL-R2 (DR5) и каспазната каскада жлезата [58, 59]. TRAIL рецепторите DR4 и DR5 се експресират върху нормални тиреоидни клетки, но те се активират под въздействието на инфламаторни цитокини [60].

Fas/FasL системата играе важна роля в нормалната имунна регулация, като отстранява автореактивни Т и В лимфоцити в края на имунния отговор [61]. Тези молекули могат да бъдат използвани и от имунните ефекторни клетки за убиване на таргети. Тиреоидните клетки експресират Fas [62, 63, 64]. При нормални условия този път е инхибиран вероятно от протеинни инхибитори [63, 65]. Под въздействието на възпалителни цитокини IFN- γ , IL-1 β или TNF- α това състояние в щитовидната жлеза се преодолява и се индуцира Fas-медирана апоптоза.

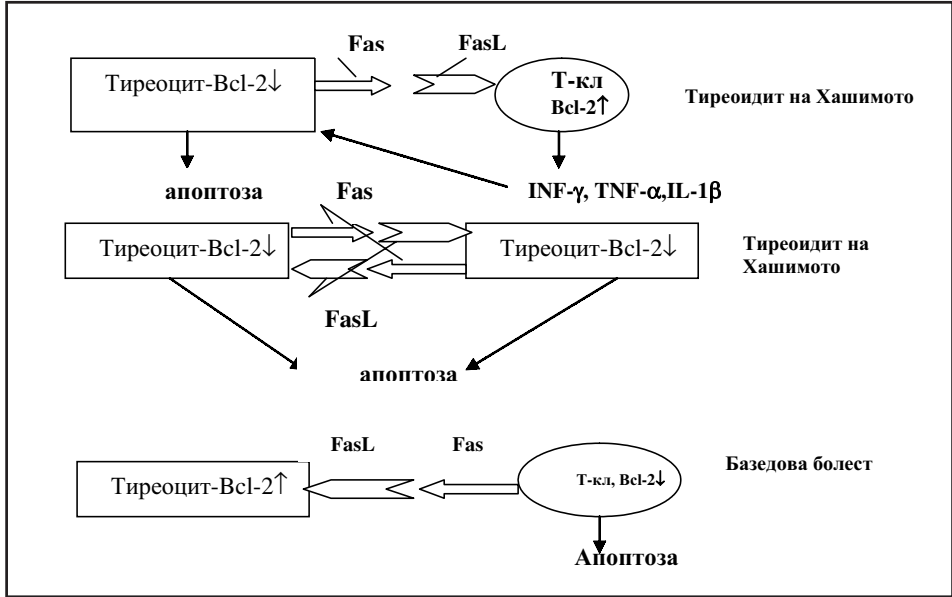
Експресията на FasL в тиреоидните клетки не е еднозначна. Нормално експресията на FasL е ограничена само в активираните лимфоцити и секвестирани тъкани като корnea, тестис. При патологични условия тиреоцитът може да експресира FasL [64]. *In vitro* проучванията показват, че тиреостимулиращият хормон (TSH) потиска Fas-медираната апоптоза, а липсата му я усилва [66].

Има данни, че експресията на антиапоптотични молекули като Bcl-2 може да бъде регулирана в тиреоидните клетки или лимфоцитите с цел избягване на апоптозата [63].

При тиреоидит на Хашимото се установява изразена апоптоза в тиреоидните клетки при наличие на изявена лимфоидна инфилтрация. При Базедова болест лимфоидната инфилтрация е по-слаба и апоптозата не е изразена [67].

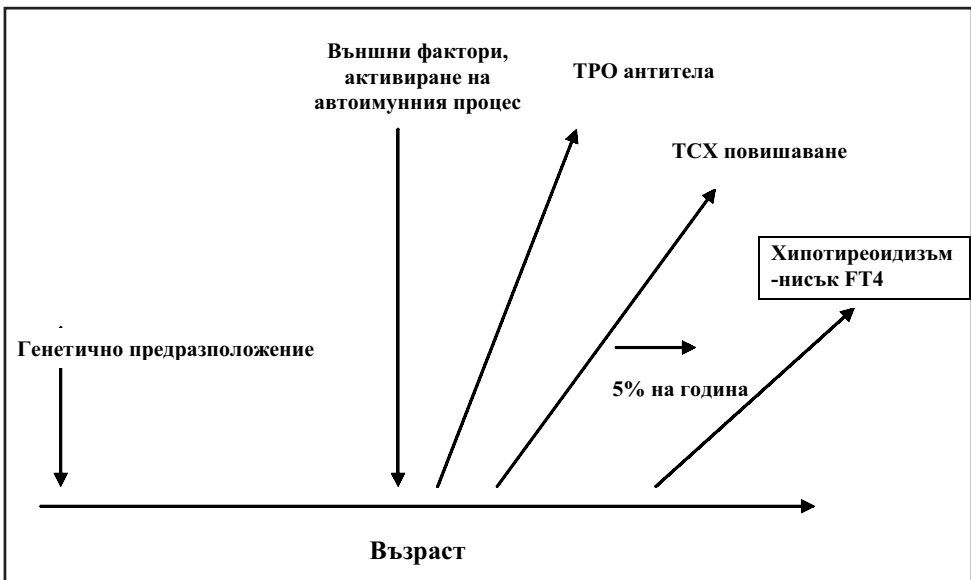
Преобладава мнението, че при тиреоидита на Хашимото Fas-медираната апоптоза се предизвиква от инфилтриращите цитотоксични Т лимфоцити, които експресират FasL и Bcl-2 [63, 65]. Нормално инхибираният в щитовидната жлеза Fas път се активира от проинфламаторни, предимно Th1 цитокини (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β), които се освобождават в резултат на V7-1 костимулацията на АПК от инфилтриращите лимфоцити. Самите тиреоидни клетки са способни да експресират V7-1, като по този начин те осъществяват ко-стимулаторен сигнал на Т лимфоцитите за Th1 цитокинова продукция [53]. По-нови данни показват Th1 цитокинова характеристика не само в тиреоидеята, но и в периферните CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцити при тиреоидит на Хашимото. *In vitro* Fas-медирана клетъчна смърт е била индуцирана при предварително третиране на тиреоидни клетки с IFN- γ в комбинация с IL-1 β или TNF- α .

Вероятни модели на Fas-медирана апоптоза при АТБ: (а) Цитокини, произведени от активирани Т лимфоцити с FasL, индуцират активиране на Fas пътя от тиреоидни клетки, които стават жертва на апоптоза; (b) Едновременна експресия на Fas и FasL на тиреоцити води до унищожаването им; (c) Контактът на тиреоидна клетка с носеща FasL с Т лимфоцит с Fas експресия води до Т-лимфоцитна апоптоза (фиг. 2).



Фиг. 2. Вероятни модели на Fas медирана апоптоза при АТБ

В заключение: АТБ са комплексни, полигенни, органично-специфични аутоимунни заболявания. Взаимодействието на външни фактори, генетично предразположение и ендогенни фактори играе роля в изявата, прогресията и разнообразието в клиничното им протичане.



Фиг. 3. Имунологична диагностика на АТБ

TSH рецепторните антитела (ТРАК) са хетерогенни – могат да имитират функцията на ТСХ и да предизвикват хипертиреозидизъм или да блокират действието на ТСХ, като водят до хипотиреозидизъм. Последните най-често се откриват при новородени от майка с АТБ.

Антитела към тиреоидната пероксидаза (ТПО антителата) участват в тъканния деструктивен процес, причиняващ хипотиреозидизъм при тиреоидита на Хашимото и атрофичен тиреоидит. Появата на ТПО антитела обикновено предшества тиреоидната дисфункция. Има редица проучвания, които показват, че ТПО антителата са цитотоксични.

Патологичната роля на тиреоглобулиновите антитела (ТАТ) все още остава неясна. Тяхното определяне е необходимо при измерване на тиреоглобулина поради това, че интерферират с анализа. В области с йоден дефицит измерването им е необходимо за откриване на аутоимунен процес при пациенти с нодозна струма и за мониториране на йодната терапия при ендемична гуша.

ТПО и/или ТАТ се установяват в серума на болни с АТБ. Рядко, но има пациенти с АТБ, които са негативни за ТАТ/ТПО антитела.

ТРАК се установяват при пациенти с базедова болест. При бременни те са рисков фактор за фетална или неонатална тиреоидна дисфункция поради трансплacentарно преминаване от майката.

Честотата на тиреоидните аутоантитела се увеличава при пациенти с други органоспецифични заболявания като захарен диабет тип 1, пернициозна анемия и др. С възрастта също се увеличава честотата на антителата, както и изявата на АТБ. Клиничното значение на ниско позитивните серуми за тиреоидни антитела при еутиреоидни пациенти не е съвсем ясно, но се счита, че ТПО антителата носят риск от бъдеща тиреоидна дисфункция, вкл. постпартален тиреоидит или аутоимунни усложнения при лечение с някои медикаменти (амиодарон, алфа интерферон, литий).

Изследването на тиреоидните антитела в хода на лечението има значение при базедова болест, защото отговаря на активността на заболяването и върви успоредно с клиничната ремисия.

Измерването на тиреоидните аутоантитела е затруднено от проблеми със специфичността. Данните показват, че резултатите могат да варират твърде много в зависимост от използвания метод поради разлики както в чувствителността, така и в специфичността и липсата на адекватна стандартизация. Аутоантителата са поликлонални и реагират с различни епитопи на антигена. Малки конформационни промени в епитопите водят до големи разлики в резултатите. Следователно, изключително важно е унифицирането на антигенните препарати и стандартизирането към общоутвърден международен референтен препарат. Това предизвиква публикуване на препоръки от Американската тиреоидна асоциация (ATA-Guideline 29. Thyroid Antibody Method Sensitivity & Specificity Differences):

- Резултатите от измерването на тиреоидните антитела са *метод-зависими*.
- С различните методи се разпознават различни антигенни епитопи от хетерогенната антигенна смес в серума. Това води до твърде широки референтни стойности.
- Разликите могат да се получат и от контаминиране с други антигенни препарати.

- Разлики може да има и от характеристиката на методи – компетитивен или некомпетитивен имуноанализ.
- Разлики може да има и от различните използвани стандарти.
- Серумът на болните съдържа смес от антитела, обединени от едно-единствено нещо – способността им да реагират към антигени на щитовидната жлеза! Разликата в специфичността на методите може да доведе до различни резултати дори и когато те са стандартизирани към един и същ международен референтен препарат.
- Разликите в чувствителността на методите може да се дължат на различната им характеристика – RIA, MEIA, ELISA и др., компетитивни или не, сандвич или едностъпкови и пр., както и от апаратите, на които се измерват.
- Препоръчва се всяка лаборатория да изработва *функционална чувствителност* на методите за антитела и ТСХ върху пул от ниско положителни серуми. Функционалната чувствителност се различава от аналитичната.

ТПО АНТИТЕЛА

Тиреоидната пероксидаза е 110 kD мембранно свързан хемо-гликопротеин с голям екстрацелуларен домен и къс трансмембранен и интрацелуларен участък. Тя участва в синтеза на тиреоидни хормони в апикалната част на фоликуларната клетка. АТА и Български национален стандарт по имунология визират препоръчителните методи за измерване на ТПО антитела. Препоръчват се чувствителни, специфични методи с човешки или рекомбинантен ТПО антиген вместо нискочувствителните, полуколичествени аглутинационни или имунофлуоресцентни методи за измерване на МАТ.

Честотата на ТПО антителата сред населението зависи както от използвания метод, така и от популацията.

NHANES III United States епидемиологично проучване, включващо ~17,000 души без видими данни за тиреоидно заболяване, установява ТПО антитела в 12% от населението. Проучването, направено от Българското дружество по ендокринология (БДЕ) през м.01-03.2006 върху 2500 практически здрави лица, показва до 30% ТПО позитивни в някои райони на страната.

Препоръки за използване на ТПО антитела в клиничната практика:

- Диагноза на АТБ
- Оценка на риск от АТБ
- Оценка на риск от АТБ при лечение с алфа интерферон, интерлевкин-2, литий, амиодарон
- Оценка на риск от АТБ при синдрома на Down
- Оценка на риск от тиреоидна дисфункция през бременността и за постпаратален тиреоидит
- Оценка на риск от аборт и неуспех на инвитро фертилизация
- Преди промяна на метода за измерване на ТПО лабораторията трябва да информира лекарите и да установи корелацията между стария и новия метод. Разликата между двата метода не бива да надвишава 10%.

ТИРЕОГЛОБУЛИНОВИ АНТИТЕЛА (ТАТ)

Тиреоглобулинът е високомолекулен (660 kDa) разтворим гликопротеин, състоящ се от две еднакви субединици. Молекулата има 6-8 епитопа, спрямо които се образуват ИгГ антитела – ТАТ. Методите за измерването им оставиха в миналото имунофлуоресцентните анализи на срези и пасивна хемаглутинация. Сега се използват по-чувствителни и специфични методи като ЕИА, МЕИА и др. Все още има лаборатории, които използват старите методи, и това води до големи вариации в резултатите.

Честотата и референтните стойности на ТАТ зависят от чувствителността и специфичността на използваните методи. Според американското проучване NHANESIII честотата на ТАТ позитивност в населението е около 10%, а при диференцирани тиреоидни карциноми – около 20%. Подобно на ТПО антителата и тук не е ясно значението на ниско позитивните серуми. Би могло да се дължат на т.нар. natural antibodies или на антигенно дразнене на имунната система при операции, радиойод или на т.нар. Silent тиреоидит.

Препоръки за използване на ТАТ в клиничната практика:

- В области без йоден дефицит не е икономически ефективно да се измерва ТАТ и ТПО едновременно, защото при ТПО отрицателни пациенти наличието на ТАТ позитивност рядко води до тиреоидна дисфункция.

- В райони с йоден дефицит трябва да се измерва ТАТ поради увеличаване на шанса да се улови тиреоидно автоимунно заболяване особено при нодозни струми.

- Мониториране на йодната терапия при ендемични гуши.

- ТАТ трябва да се измерва при всички пациенти с диференциран тиреоиден карцином (ДТК) преди изследване на тиреоглобулина поради това, че ниско позитивни ТАТ могат да интерферират с тиреоглобулина, в резултат на което може да има фалшиво нисък или висок резултат.

- Трябва да се правят серийни измервания за тиреоглобулин със същия метод при ТАТ положителни ДТК пациенти, защото тогава имат прогностично значение относно успеха на терапията на ДТК.

- Измерването на ТАТ изключва ниско чувствителни методи като аглутинация или имунофлуоресценция, т.е. анализът трябва да бъде количествен, а не качествен.

- Преди промяна на метода за измерване на ТАТ лабораторията трябва да информира лекарите и да установи корелацията между стария и новия метод. Разликата между двата метода не бива да надвишава 10%.

АНТИТЕЛА КЪМ РЕЦЕПТОРА ЗА ТСХ-ТРАК

Измерването на ТСХ рецепторните антитела може да стане чрез биометоди или рецепторни методи. В диагностичната практика се използват рецепторни методи, т.е. TSH Binding Inhibitory Immunoglobulin (ТБИ), които не показват биологичната активност на антителата, а само регистрират наличието на имуноглобулини, блокиращи свързването на ТСХ с рецептора му. ТСХ стимулиращите антитела се свързват с N-терминалния край на екстрацелуларния домен на рецептора за ТСХ и имитират ефекта на ТСХ, като индуцират пост рецепторен сигнал. За разлика от тях блокиращите ТСХ антитела се свързват с C-терминалния край на рецептора и

блокират стимулацията на ТСХ, в резултат на което предизвикват хипотиреоидизъм. Стимулиращите растежа на тиреоидната жлеза антитела са по-малко прочути. На този етап е известно, че липсата на корелация между ТРАК и клинично състояние на пациента е поради тяхната хетерогенност.

Препоръки за изследване на ТСХ рецепторни антитела:

- Да установи причината за хипертиреоидизма, когато диагнозата не е клинично ясна.
- Намаляването им при дълготрайна супресивна терапия предполага ремисия.
- ТРАК е полезен за диагнозата базедова болест, но не и за мониториране на терапията.
- Еутиреоидни бременни жени (\pm L-T4 лечение), които са преминали радиойод лечение за базедова болест, подлежат на ТРАК измерване в началото на бременността, защото високите стойности носят риск за фетален хипертиреоидизъм (2-10%) и в края на бременността поради риск от неонатален хипертиреоидизъм.
- Бременни жени с тиреосупресивна терапия – в третия триместър. При висок ТРАК – се взема серум от новороденото – пълна връв и 4-7 дни след раждането, когато трансплацентарните антитела изчезват.
- За установяване на транзиторен хипертиреоидизъм при новородени.

В заключение, в наши дни изследването на тиреоидни автоантитела е безспорна част от диагностичния процес при тиреоидни автоимунни заболявания. Те навлизат все по-широко и като прогностични маркери за оценка на риска от заболяване. Препоръчва се използването на количествени, високоспецифични методи, стандартизирани към унифициран международен референтен препарат.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hashimoto H. Zur Kenntniss der lymphomatosen Veränderung der Schilddrüse (struma lymphomatosa). Arch Klin Chir 1912; 97: 219.
2. Fromm GA, Lascano EF, Bur GE, Escalenta D. Tiroiditis cronica inespecifica. Rev Assoc Med Arg 1953; 67: 162.
3. Roitt IM, Doniach D, Campbell PN, Hudson RV. Auto-antibodies in Hashimoto's thyroiditis (lymphadenoid goiter). Lancet 1956; 2: 820.
4. Rose NR and Witebsky E. Studies on organ specificity. V. Changes in thyroid glands of rabbits following active immunization with rabbit thyroid extracts. J Immunol 1956; 76: 417.
5. Mosmann TR and Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. Immunol Today 1996; 17: 138-46.
6. Blüher M, Krohn K, Wallaschofski H. et al. Cytokine gene expression in autoimmune thyroiditis in BioBreeding/Worcester rats. Thyroid 1999; 9: 1049-1055.
7. Matsuoka N, Eguchi K, Kawakami A. et al. Lack of B7-1/BB1 and B7-2/B70 expression on thycocytes of patients with Graves' disease. Delivery of co-stimulatory signals from bystander professional antigen-presenting cells. J Clin Endocrin Metabolism 1996; 81: 4137-4143.
8. Kuchroo VK, Das MP, Brown JA. et al. B7-1 and B7-2 co-stimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. Cell 1995; 80: 707-718.

9. Bagnasco M. B7-1 co-stimulatory molecule is expressed on thyroid follicular cells in Hashimoto's thyroiditis, but not in Graves' disease. *J Clin Endocrin Metabolism* 1998; 83: 4130-4139.
10. Salmaso C, Olive D, Pesce G. et al. Co-stimulatory molecules and autoimmune thyroid diseases. *Autoimmunity* 2002; 35: 159-167.
11. Azuma M, Ito D, Yagita H. et al. B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* 1992; 366: 76-79.
12. Freeman GJ, Gribben JG, Boussiotis VA. et al. Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that co-stimulates human T cell proliferation. *Science* 1993; 262: 909-911.
13. Krummel MF and Allison JP. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J exp Med* 1995; 182: 459-465.
14. Weetman AP. Autoimmune thyroid disease: propagation and progression. *Eur J of Endocrin* 2003; 148: 1-9.
15. Oaks MK and Hallett KM. Cutting edge: a soluble form of CTLA-4 in patients with autoimmune thyroid disease. *J Immunol* 2000; 164: 5015-5018.
16. Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC. et al. ICOS is an inducible T cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 1999; 397: 263-266.
17. Guo J, Stolina M, Bready JV. et al. Stimulatory effects of B7-related Protein-1 on cellular and humoral immune responses in mice. *J Immunol* 2001; 166: 5578-5584.
18. Freeman GJ, Gribben JG, Boussiotis VA. et al. Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that co-stimulates human T cell proliferation. *Science* 1993; 262: 909-911.
19. Brown JA, Dorfman D, Ma FR. et al. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J Immunol* 2003; 170: 1257-1266.
20. Bennett F, Luxenberg D, Ling V. et al. Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on co-stimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and IL-21, but not CD28, IL-7, and IL-15 responses. *J Immunol* 2003; 170: 711-718.
21. Ramsdell F and Fowlkes BJ. Clonal deletion versus clonal anergy: the role of the thymus in inducing self tolerance. *Science*, 1990; 248: 1342-1347.
22. Schwartz RH. T cell anergy. *Ann Rev Immunol* 2003; 21: 305-334.
23. Heino M, Peterson P, Kudoh J. et al. Autoimmune regulator is expressed in the cells regulating immune tolerance in thymus medulla. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257: 821-825.
24. Nagamine K, Peterson P, Scott HS. et al. Positional cloning of the APECED gene. *Nature Genetics* 1997; 7: 393-398.
25. Finnish-German APECED Consortium. An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains. *Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy. Nature Genetics* 1997; 17: 399-403.
26. Liston A, Lesage S, Wilson J. et al. Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nature Immunol* 2003; 4: 350-354.
27. Anderson MS, Venanzi ES, Klein L. et al. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 2002; 298: 1395-1401.
28. Derbinski J, Schulte A, Kyewski B. et al. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nature Immunol* 2001; 2: 1032-1039.
29. Smith KM, Brewer JM, Webb P. et al. Inducible co-stimulatory molecule-B7-related protein 1 interactions are important for the clonal expansion and B cell helper functions of naive, Th1, and Th2 T cells. *J Immunol* 2003; 170: 2310-2315.
30. Youngnak P, Kozono Y, Kozono H. et al. Differential binding properties of B7-H1 and B7-DC to programmed death-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 307: 672-677.
31. Nishimura H, Nose M, Hiai H. et al. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 1999; 11: 141-151.

32. Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y. et al. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* 2001; 291: 319-322.
33. Loke P. and Allison JP. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 5336-5341.
34. Ruwhof C. and Drexhage HA. Iodine and thyroid autoimmune disease in animal models. *Thyroid* 2001; 11: 427-436.
35. Hunt PJ, Marshall SE, Weetman AP. et al. Histocompatibility leucocyte antigens and closely linked immunomodulatory genes in autoimmune thyroid disease. *Clin Endocrinol* 2001; 55: 491-499.
36. Ban Y, Davies TF, Greenberg DA. et al. The influence of human leucocyte antigen (HLA) genes on autoimmune thyroid disease (AITD): results of studies in HLA-DR3 positive AITD families. *Clin Endocrinol* 2002; 57: 81-88.
37. Vaidya B, Kendall-Taylor P, Pearce, SH. The genetics of autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metabol* 2002; 87: 5385-5397.
38. Villanueva R, Tomer Y, Greenberg DA. et al. Autoimmune thyroid disease susceptibility loci in a large Chinese family. *Clin Endocrinol* 2002; 56: 45-51.
39. Badenhop K, Schwarz G, Schleusener H. et al. Tumor necrosis factor beta gene polymorphisms in Graves' disease. *Journal of Clin Endocrinol Metabol*, 1992; 74: 287-291.
40. Hunt PJ, Marshall SE, Weetman AP. et al. Histocompatibility leucocyte antigens and closely linked immunomodulatory genes in autoimmune thyroid disease. *Clin Endocrinol* 2001; 55: 491-499.
41. Yanagawa T, Hidaka Y, Guimaraes V. et al. CTLA-4 gene polymorphism associated with Graves' disease in a Caucasian population. *J Clin Endocrinol Metabol* 1995; 80: 41-45.
42. Kotsa K, Watson PF, Weetman AP. 1997 A CTLA-4 gene polymorphism is associated with both Graves' disease and autoimmune hypothyroidism. *Clin Endocrinol* 1997; 46: 551-554.
43. Einarsdottir E, Soderstrom I, Lofgren-Burstrom A. et al. The CTLA4 region as a general autoimmunity factor: An extended pedigree provides evidence for synergy with the HLA locus in the etiology of type 1 diabetes mellitus, Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease. *Eur J Hum Gen* 2003; 11: 81-84.
44. Fakhfakh F, Maalej A, Makni H. et al. Analysis of immunoglobulin VH and TCR cbeta polymorphisms in a large family with thyroid autoimmune disorder. *Exp Clin Immunogen* 1999; 16: 185-191.
45. Pickerill AP, Watson PF, Tandon N. et al. T cell receptor chain gene polymorphisms in Graves' disease. *Acta Endocrinol*, 1993; 128: 499-502.
46. Meyer G, Donner H, Herwig J. et al. Screening for an AIRE-1 mutation in patients with Addison's disease, type 1 diabetes, Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis as well as in APECED syndrome. *Clin Endocrinol* 2001; 54: 335-338.
47. Nithiyananthan R, Heward JM, Allahabadia A. et al. Polymorphism of the CTLA-4 gene is associated with autoimmune hypothyroidism in the UK. *Thyroid* 2002; 12: 3-6.
48. Kacem HH, Rebai A, Kaffel N. et al. PDS is a new susceptibility gene to autoimmune thyroid diseases: association and linkage study. *J Clin Endocrinol Metabol* 2003; 88: 2274-2280.
49. Voorbij, H.A., Kabel, P.J., de Haan, M. et al. Dendritic cells and class II MHC expression on thyrocytes during the autoimmune thyroid disease of the BB rat. *Clin Immunol Immunopathol* 1990; 55: 9-22.
50. Bottazzo GF, Pujol-Borrell R, Hanafusa T. et al. Role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation in induction of endocrine autoimmunity. *Lancet* 1983; 2: 1115-1119.
51. Sospedra M, Obiols G, Babi LF. et al. Hyperinducibility of HLA class II expression of thyroid follicular cells from Grave's disease. A primary defect? *J Immunol* 1995; 154: 4213-4222.
52. Todd I, Pujol-Borrell R, Hammond LJ. et al. Interferon- γ induces HLA-DR expression by thyroid epithelium. *Clin exp Immunol* 1985; 61: 265-273.

53. Battifora M, Pesce G, Paolieri F. et al. B7•1 co-stimulatory molecule is expressed on thyroid follicular cells in Hashimoto's thyroiditis, but not in Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metabol* 1998; 83: 4130-4139.

54. Andrikoula M. et Tsatsoulis A. The role of Fas-mediated apoptosis in thyroid disease. *Eur J Endocrinol* 2001; 144: 561-568.

55. Tsatsoulis A. The role of apoptosis in thyroid disease. *Minerva Medica* 2002; 93: 169-180.

56. Suda T, Takahashi T, Golstein P. et al. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993; 75: 1169-1178.

57. Nagata S. and Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995; 267: 1449-1456.

58. Pan G, Ni J, Wei YF, Yu, G. et al. 1997 An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 1997; 277: 815-818.

59. Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan A. et al. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 1997; 276: 111-113.

60. Bretz JD. and Baker JR Jr Apoptosis and autoimmune thyroid disease: following a TRAIL to thyroid destruction? *Clin Endocrinol* 2001; 55: 1-11.

61. Van Parijs L, Biukians A, Abbas AK. Functional roles of Fas and Bcl-2-regulated apoptosis of T lymphocytes. *J Immunol* 1998; 160: 2065-2069.

62. Hammond LJ, Lowdell MW, Cerrano PG. et al. Analysis of apoptosis in relation to tissue destruction associated with Hashimoto's autoimmune thyroiditis. *J Pathol* 1997; 182: 138-144.

63. Mitsiades N, Poulaki V, Kotoula V. et al. Fas/Fas ligand up-regulation and Bcl-2 down regulation may be significant in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metabol* 1998; 83: 2199-2203.

64. Hiromatsu, Y., Hoshino, T., Yagita, H.,. Functional Fas ligand expression in thyrocytes from patients with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metabol* 1999; 84: 2896-2902.

65. Arscott PL. and Baker JR Jr. Short analytical review. Apoptosis and thyroiditis. *Clin Immunol Immunopathol* 1998; 87: 207-217.

66. Kawakami A, Eguchi K, Matsuoka N. et al. Thyroid-stimulating hormone inhibits Fas antigen-mediated apoptosis of human thyrocytes in vitro. *Endocrinol* 1996; 137: 3163-3169.

67. Tanimoto C, Hirakawa S, Kawasaki H. et al. Apoptosis in thyroid diseases: a histochemical study. *Endocrine J* 1995; 42: 193-201.

ПАТОГЕНЕЗА И ДИАГНОСТИКА НА АВТОИМУННИТЕ ТИРЕОИДНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

И. Атанасова

*Клиничен център по ендокринология и геронтология
„Акад. Ив. Пенчев“, МУ, София*

Резюме. Съвременната класификация на автоимунните тиреоидни болести (АТБ) включва хроничен автоимунен тиреоидит или тиреоидит на Хашимото, автоимунен атрофичен тиреоидит или първичен микседем и Базедова болест. АТБ са полигенни, органоспецифични, Т-клетъчно медиранни заболявания. Взаимодействието на външни фактори, генетично предразположение и ендогенни фактори играе роля в иззявата, прогресията и разнообразието в клиничното им протичане. Съществено значение за фенотипните разлики при АТБ имат механизмите на клетъчната апоптоза. Автоантителата към тиреоглобулина (ТАТ), тиреоидната пероксидаза (ТПО) и рецептора за тиреостимулиращия хормон (ТРАК) са утвърдени диаг-

ностични и прогностични маркери за риск от заболяване. Препоръчва се използването на количествени, високоспецифични методи, стандартизирани към унифициран международен референтен препарат. Литературният обзор представя историческото развитие до съвременното познание за патогенезата на автоимунните тиреоидни заболявания, както и препоръчваните имунологични методи за диагностика и оценка на риска.

PATHOGENESIS AND DIAGNOSIS OF AUTOIMMUNE THYROID DISEASE

I. Atanasova

*Clinical Centre of Endocrinology and Gerontology Acad. Iv. Penchev, Medical
University, Sofia*

Abstract. According to the contemporary classifications the term autoimmune thyroid disease (ATD) includes the following conditions: chronic autoimmune thyroiditis (Hashimoto's thyroiditis), autoimmune atrophic thyroiditis (primary myxoedema) and Graves'-Basedow's disease. ATDs are polygenic organ specific T-cell mediated diseases. Their manifestations, natural history and various clinical course are determined by the complex interaction of exogenous, genetical and endogenous factors. The mechanisms of apoptosis determine the phenotypical differences in ATDs. The three widely accepted diagnostic and prognostic immunological markers of ATDs are the autoantibodies against thyroglobulin (TAT), thyroid peroxidase (TPO) and thyrotropin receptor (TRAb). The use of quantitative, highly specific and well-standardized immunological methods is recommended for their determination. This review presents the historical perspective of pathogenesis of ATDs and the currently recommended immunological methods for their diagnosis and prognostic evaluation.

ТЮТЮНОПУШЕНЕТО – РИСКОВ ФАКТОР ЗА АВТОИМУННИ БОЛЕСТИ НА ЩИТОВИДНАТА ЖЛЕЗА

Д. Попова

*Отделение по трансфузионна хематология и имунология,
МБАЛСМ „Н. И. Пирогов“, София*

Тютюнопушенето в глобален мащаб и у нас – статистически данни

Счита се, че в глобален мащаб около 1,3 милиарда души са пушили през 2006 г. Независимо от всички усилия за повлияване на този вреден навик се очаква броят на пушачите да нараства и да достигне 1,6 милиарда през 2050 г. Европейските статистически данни сочат, че средно 29% от възрастните са пушачи, като преобладават мъжете – 40%, а жените пушат значително по-рядко – в 18% [1]. За нашата страна информацията е изключително тревожна, тъй като всеки втори мъж е пушач (51%), а делът на жените, които пушат, е по-висок от средния за Европа – 30%. Средно за страната пушачите са около 40% от възрастното население. Смущение будят и данните за високия процент на подрастващи, които пушат – 37,4% от учениците на възраст между 13 и 16 г., както сочи проучването GYTS (Global Youth Tobacco Survey – Глобално проучване на тютюнопушенето сред младите), проведено върху 2164 български ученици през 2002 г. През 2005 г. СИНДИ (програма на Европейското бюро на СЗО за профилактика на хроничните неинфекциозни болести) показва, че и сред лекарите 33,9% са пушачи [2]!

Автоимунни болести на щитовидната жлеза

За развитието на автоимунни болести на щитовидната жлеза (табл. 1) допринасят някои генетични фактори, както и въздействия на околната среда [3, 4, 5].

- Болест на Graves (базедова болест)
- Тиреоидити:
 - хроничен лимфоцитарен (Hashimoto)
 - автоимунна тиреоидна атрофия
 - следродов
 - безболков (тих)
 - индуциран от лекарства
 - част от полигландуларен автоимунен синдром
 - при системни болести на съединителната тъкан

Табл. 1. Автоимунни болести на щитовидната жлеза

Както повечето автоимунни болести и тези на щитовидната жлеза засягат преимуществено женския пол вероятно поради инактивиране на X хромозомата при жени с автоимунни болести на тиреоидеята [6, 7]. Системните болести на съединителната тъкан могат да се съчетаят с автоимунни болести на щитовидната жлеза с участие на някои генетични варианти на важни имунорегулаторни моле-

кули като лимфоцитната специфична фосфатаза (LYP или PTPN22) или AIRE1 (автоимунен регулаторен елемент 1) [8,9,10]. Патогенезата им е комплексна и се счита, че повече от 20 генетични локуса са свързани с автоимунни болести на щитовидната жлеза. Сред тях най-напред са намерени асоциации с гените за левкоцитните антигени от клас II (HLA-DR3), част от главния комплекс за тъканна съвместимост. По-късно се установява връзка с други гени, кодиращи молекули с отношение към функциите на имунната система. Такива са гените за антигена на цитотоксичните Т лимфоцити CTLA-4 (полиморфизми в поне 4 локуса), цитокини, активационните молекули CD25 и CD40, тиреоглобулина, рецептора за TSH и много други [11]. Фамилните проучвания и най-вече навлизащите нови технологии върху микрочипове дават възможност за широкомащабни генетични изследвания, включително на автоимунните болести на щитовидната жлеза [12,13]. Целта е не само да се подобри диагностиката им, а да се предвиди отговорът към прилаганата терапия в зависимост от генетичните особености на конкретния болен човек.

Сред факторите на околната среда най-голямо значение за развитието на автоимунни болести на щитовидната жлеза има приемът на йодни соли. Като част от замърсителите на околната среда тютюнопушенето също играе съществена роля за индукция на тиреоидния автоимунитет. Допълнителни предразполагащи фактори са инфекциите на жлезата, ситуациите на стрес, бременност и др.

Тютюнопушене и автоимунни болести на щитовидната жлеза

Тютюнопушенето има директно влияние върху имунната система, като променя функцията на антиген-представящите клетки от моноцитоеидния ред в белия дроб и продукцията на провъзпалителни цитокини [14].

Интерес представлява проучването на честотата на болестите на щитовидната жлеза при 132 двойки близнаци от един пол – 121 двойки жени и 11 – мъже. В случай че един от близнаците е пушач, относителният риск (RR) от развитие на болест на щитовидната жлеза при пушачите е средно 3,0, като за хетерозиготните близнаци той е 2,5, а за монозиготните – 5,0. Този резултат недвусмислено показва ролята на външен фактор като тютюнопушенето при идентичен генетичен фонд. По-нататък са подбрани 51 двойки пушещи близнаци, един от които страда от болест на тиреоидеята. Установява се статистически достоверно различие ($p=0,03$) в количеството изпушени цигари (отчетени като кутии/година) от здравия близнак и този с болест на Graves (GD) или друга автоимунна болест на щитовидната жлеза. Това означава, че с увеличаване на пушенето расте рискът от автоимунно тиреоидно заболяване. Подобна зависимост не се отчита по отношение на болести на жлезата, които нямат автоимунен характер [15].

Много са механизмите, по които тютюнопушенето се предполага, че повлиява функциите на щитовидната жлеза, като биологичноактивните съставки понякога са с разнопосочни ефекти. Цигареният дим съдържа две фази: твърда (катрани) и газова фаза. Катраните са частички с размери над 0,1 μm , които се задържат в повече от 99,9% в стъклен филтър, а газовата фаза преминава през него. Катраните съдържат над 10^{17} свободни радикали/g, докато в едно вдишване при пушене се съдържат над 10^{15} свободни радикали [16]. Вдишваният цигарен дим съдържа около 8% катрани и 92% газ. По-голямата част от вредните съставки на газовата фаза от цигарения дим остават във въздуха на помещението, където се пуши [17].

Това поставя сериозния въпрос за оценка на пасивното пушене като рисков фактор за отключване на болести, свързани с тютюнопушенето [18]. Известно е, че никотинът повишава тонуса на симпатиковия дял на вегетативната нервна система и повишава синтеза на тиреоидни хормони [19]. Друг компонент на цигарения дим – бензпиренът, усилва чернодробния метаболизъм и повишава синтеза на тироксин, а оттам и на трийодтиронин. Цианидът се превръща в тиоцианат с висока биологична активност. Метаболизира се активно в щитовидната жлеза и представлява един от субстратите на тиреопероксидазата. Свързвайки се с ензима, тиоцианатът има действие на анти тиреоидно средство. Той потиска транспорта на йода, а това води до намалена синтеза на тиреоидни хормони. Повишава се рискът от развитие на множествени възли на щитовидната жлеза (относителен риск 1,9), особено в области с недостатъчен прием на йод [20]. Наблюдава се увеличаване на размера на щитовидната жлеза при пушачи, като е възможно то да е белег за леки отклонения във функцията ѝ. Предполага се, че при здрави лица тиоцианатът проявява по-скоро стимулиращо тиреоидеята действие. Различните ефекти на цигарения дим се свързват и с другите му съставки като никотин, бензпирен и метаболитите на хидроксипиридина [21].

Тютюнопушенето обратимо намалява нивото на тиреостимулиращия хормон (TSH) [22]. Счита се, че пушенето повлиява структурата на рецептора за TSH, води до промяна в отговора към факторите, индуциращи GD и променени механизми на имуноен толеранс.

Множество изследвания показват провъзпалителния ефект на цигарения дим. Левкоцитите при пушачи са с около 20-25% по-високи, отколкото при непушачите ($7,92 \times 10^9/l$, непушачи – $6,42 \times 10^9/l$) [23,24]. Установява се повишена продукция на проинфламаторни цитокини – IL-1, IL-6 (16% по-висок при пушачи), TNF α (съответно 38% увеличен) [25,26] в съчетание с недостатъчна продукция на естествените им антагонисти при пушачите. Намира се отрицателна корелация между нивата на разтворимия IL-1 рецепторен антагонист (sIL-1RA) и количеството изпушени цигари [27]. Концентрацията на острофазовите белтъци α 1-кисел гликопротеин, церулоплазмин и α 2-макроглобулин са значимо увеличени в плазмата на пушачи в сравнение с непушачи, съответно с 39%, 28% и 12%, фибриногенът от 3,13 на 3,51g/l за пушачите [24,25,26,28]. CRP, класически показател, свързан с възпалителна реакция, се намира повишен при пушачи в сравнение с непушачи [29]. По-късни изследвания показват, че нивото на CRP остава повишено много дълго, дори 20-30 години след спиране на пушенето [24,30].

Освен върху щитовидната жлеза и свързаните с нея хормони, цигареният дим повлиява техните таргетни структури в периферните органи. В резултат от пушенето се намалява свързването на вече синтезирания трийодтиронин с неговите клетъчни рецептори и пострецепторното му действие на нивото на различни тъкани – черен дроб, мускули и др.

От друга страна, състоянието на щитовидната жлеза, особено при нелекувана GD, е причина за безпокойство, което увеличава желанието за пушене [31].

Тютюнопушене и болест на Graves

Рискът от развитие на клинично изявен хипертиреозидизъм е значително по-висок при пушачи (2,37), отколкото при непушачи, а за GD – съответно два пъти по-

висок при пушачи [22]. При това ролята на въздействията на околната среда, сред които и тютюнопушенето, е от по-голямо значение, отколкото генетичните фактори при лица с предразположение към автоимунни болести на щитовидната жлеза, да развият тежка GD [32]. Тиоцианатът е продукт на цианида от цигарения дим. Счита се, че той е най-същественят токсичен фактор от околната среда, който предизвиква некроза на тиреоцитите и/или тиреоидни метаболитни отклонения и по този начин благоприятства процесите на автоимунизация към антигените на щитовидната жлеза и води до развитие на GD [14]. Промените в тиреоидеята под влияние на тютюнопушенето не са трайни, тъй като спирането му свежда относителния риск от GD до стойности, близки до 1,0 (1,27 според Prummel M.F. и съавт. – 1993, и Holm I.A. и съавт. – 2005; 1,41 според Vestergaard P. – 2002) [33, 34, 35].

Тютюнопушене и тиреоид-асоцирана офталмопатия

Развитието на тиреоид-асоцирана офталмопатия (ТАО), най-често в хода на GD, е едно от тежките усложнения, трудно поддаващи се на лечение. Развитието на ТАО засяга много по-често бялата (42% от пушачите с GD), отколкото монголоидната раса (съответно 7,7%) [36]. Тютюнопушенето е сред водещите рискови фактори за ТАО независимо от нивото на свободния тироксин [37,38,39]. Сред болните с автоимунни болести на щитовидната жлеза пушачи са 30% от тези с тиреоидит на Hashimoto, 48% от страдащите от GD и 64%, когато GD е съчетана с ТАО [40]. При пушачи засягането на очите е по-тежко, с по-често развитие на трудно обратимите проптозис и диплопия (RR=3,1 за пушачи и 2,68 за непушачи) [41]. Намален е ефектът от проведената терапия на GD в съчетание с очни прояви при пушачите [42]. Установява се, че при пушачи с GD очната симптоматика по-често прогресира към тежка изява [43].

Според данни на СЗО (2003) сред децата с GD на възраст между 10 и 18 години честотата на ТАО нараства значително в страните с висок процент на деца, които пушат. За децата под 10 години се предполага ролята на пасивното пушене в развитието на ТАО [44]. В експеримент с престой на здрави лица в условията на умерено задимена обстановка, наподобяваща обществено заведение (концентрация на въглероден окис от 23 ± 1 ppm – части на милион), пасивното пушене е съпроводено от достоверно повишаване на енергоразхода при покой ($6,73 \pm 98,06$ преди експеримента и след него – $80,58 \pm 120,91$ Kcal/ден) и хормоналните нива (трийодтиронин – $0,05 \pm 0,11$ и $0,13 \pm 0,12$ ng/ml; свободен тироксин – $0,02 \pm 0,15$ и $0,22 \pm 0,20$ ng/dl) [45].

Изявата на ТАО се свързва с повишената продукция на глюкозаминогликани от фибробластите в очната орбита. Стимулирането им се дължи на освобождаването на цитокини – интерферон- γ , IL-1, TNF- α и TGF β . Те от своя страна повишават експресията на клас-II молекули на главния комплекс на тъканната съвместимост (HLA-DR), белтъци на топлинния шок (HSP) и адхезионни молекули (ICAM-1) [46]. Различни са патогенетичните механизми за по-честото развитие на ТАО при пушачи. Обвиняват се различни компоненти на цигарения дим, някои от които с директно дразнещо действие върху очната ябълка, образуването на свободни радикали, хипоксията, обусловена от пушенето. Тя се свързва с повишено освобождаване на цитокини, които увеличават експресията на клетъчни адхезионни молекули [47]. Вероятно един от механизмите на възникване на ТАО е свързан с

увреждащото действие на IL-1 и този цитокин би могъл да бъде една от терапевтичните прицелни точки [25]. Нивото на разтворимия IL-1-рецепторен антагонист (sIL-1RA) може да послужи за предвиждане терапевтичния отговор към радиотерапия на болните с активна, умерено изразена ТАО [27]. Намира се промяна в състава на сълзите при пушачите с увеличение на цинк – α 2-гликопротеин и лактоферин, с промяна в молекулните им тегла поради дефекти в гликозилирането и различна биологична активност [48]. Допуска се, че под влияние на цигарения дим може да се наруши структурата на рецептора за TSH, така че при съответно генетично предразположени лица да се образуват автоантитела с реактивност и към ретроорбиталните тъкани. Вероятно са нарушени и механизмите на толерантност към тиреоидните автоантигени [31].

Тютюнопушене и тиреоидит на Hashimoto

Резултатите от изключително мащабно проучване върху 15 592 лица, които не приемат медикаменти, свързани с тиреоидеята в САЩ [49], предполагат, че тютюнопушенето (серумен котинин > 15 ng/l) има отрицателна връзка със серологичните белези на тиреоидните автоимунни болести и се свързва с леко намаление на TSH. Основание за това твърдение е по-високата честота при непушачите на намерените антитела срещу тиреопероксидазата (18%, при пушачи – 11%). Установената отрицателна линейна зависимост с тези параметри е дозозависима. Подобна зависимост се намира и при 803 здрави пушещи жени с близки, страдащи от автоимунна болест на щитовидната жлеза [50]. Допуска се, че разликата се дължи на намаления транспорт на йод-съдържащи органични съединения и по-малкото образуване на автоантитела при пушачите [49]. В области с недостатъчен прием на йод обаче честотата на проявения хипотиреоидизъм при пушачите е по-голяма [7]. При пушачите се намират по-ниски нива на TSH ($p < 0,001$), но такава асоциация не се наблюдава, ако се изключат лицата с нодуларна тиреоидея и промени в обема на жлезата. По-малка е честотата на повишение на TSH при пушачите (относителен риск 0,47 – 0,6) [49,20]. Отрицателна е и връзката между тютюнопушенето и рака на щитовидната жлеза [51].

Тютюнопушене, бременност, плод и следродов тиреоидит

Тютюнопушенето е свързано с понижен фертилитет при пушачи. Една от вредните съставки на цигарения дим – тиоцианатът, преминава през плацентарната бариера към плода. Във връзка с неговото увреждащо действие, хипоксията при пушене и повишеното производство на катехоламини при бременни жени, които пушат, се наблюдава тъканна хипоперфузия. Тя е причина за по-ниско тегло и дължина на плода при раждането, както и забавено развитие на децата, кърмени от майки, които пушат [52, 53]. Като цяло се намира, че следродовият тиреоидит едва в 10% от случаите може да се свърже с тютюнопушенето. Пушенето на повече от 20 цигари дневно е свързано с развитието на синдрома [54]. Според Kuijpers J.L. и съавт. (1998) за жените, които някога са пушили, тютюнопушенето представлява независим рисков фактор за развитие на следродов тиреоидит с относителен риск 3,1 в сравнение с родили жени, които никога не са пушили [55]. По тази причина Muller A.F. и съавт. (2001) изследват TSH при млади жени пушачки, а в случаите с отклонения в нивото на хормона се определя и нивото на свободен тироксин. При

данни за субклиничен хипотиреоидизъм се препоръчва и търсене на антитела срещу тиреопероксидазата [14].

Тютюнопушене и ендокринна система

Тютюнопушенето е фактор, който повишава риска от развитие на редица болести на ендокринната система, освен с патологията на щитовидната жлеза и най-вече на GD и ТАО. При пушене се засягат хипофизата, задстомашната, половите жлези, както и калциевият метаболизъм – остеопороза настъпва по-често при пушачи [53]. Тютюнопушенето е свързано с повишена инсулинова резистентност, развитие на тип-2 захарен диабет, както и метаболитен синдром [56-59]. Активирането на възпалението вероятно е един от съществените механизми, по които цигареният дим повишава риска от автоимунни и хронични възпалителни заболявания на ендокринната система (щитовидна жлеза, панкреас, метаболитен синдром) и извън нея (ревматоиден артрит, системен Lupus erythematosus, мултипле склероза, първична билиарна цироза, псориазис и др. [60,61].

Тютюнопушенето значително повишава енергоразхода при покой [62].

Автоимунни болести на щитовидната жлеза и бял дроб

Интерес представляват данните за асоциация между автоимунните болести на щитовидната жлеза и оплакванията от страна на белия дроб. Според Birring S. и съавт. (2005) непушещите жени с лекуван хипотиреоидизъм имат статистически значимо повишение в честотата на сухата кашлица, хриповете, диспнеята и отделянето на спутум в сравнение със здравите контроли. Тази клинична находка се съпровожда с функционални белодробни смущения (bronхиална хиперреактивност по отношение на метахолин) и прояви на възпалителна активност – повишение на неутрофилните гранулоцити и лимфоцитите в индуциран спутум, както и по-високо ниво на IL-8 в спутумни супернатанти [63]. Mund E. и съавт. (2005) намират отклонения в имунокомпетентните клетки (по-високи CD4+; CD8+ Т-лимфоцити и съотношение CD4/CD8) в бронхоалвеоларна лаважна течност при жените над 43 г., т.е. около менопауза, в сравнение с контроли под 40 г. Подобни разлики не засягат лимфоцитите в периферната кръв, не се намират и разлики в сравнение с мъже независимо от възрастта им. Наличието на идиопатична суха кашлица се съпътства от по-висока честота на автоимунни болести, главно на щитовидната жлеза, ако за тях се съди по намираните автоантитела. Предполага се, че кашлицата се дължи на вторично възпаление на дихателните пътища с аберантно натрупване в тях на активирани лимфоцити, свързани с друг органоспецифичен автоимунен процес или такъв, засягащ белия дроб [64]. Затова при жени на възраст около менопауза се допуска, че една от възможните причини за необяснимата суха кашлица би могла да се крие в болест на щитовидната жлеза [65].

Перспективи

Известна е ролята на тютюнопушенето върху сърдечносъдовата, дихателната система и като една от причините за ракови новообразувания. По-малко познати са ефектите на тютюнопушенето върху щитовидната жлеза. Безспорни са данните, че то увеличава риска от развитието на клинично проявена болест на тиреоидеята. Нещо повече, количеството на изпушени цигари е рисков фактор за изява-

та на автоимунни болести на жлезата. Повлияването на човешкия организъм от тютюнопушенето е толкова разностранно, че СЗО приема, че „тютюнопушенето вече не е само рисков фактор, то е сериозно хронично заболяване, то трябва да е *диагноза!*“. Разграничава се употребата на тютюн (Z72.0) от състоянията, при които в семейната среда има тютюнопушене (Z81.2), и зависимостта от тютюн (F17.2) [66]. Счита се, че през XX век с тютюнопушене е била свързана смъртта на около 100 милиона души. Очаква се през XXI век тази цифра да нарасне до един милиард, ако не се предприемат мерки срещу „епидемията от тютюнопушене“ [67]. Предотвратяването ѝ се счита възможно и успехите, постигнати в това направление в някои страни, са окуражителни. Във възрастовата група 50-59 г. пушачите в Обединеното кралство са намалели от 44% през 1984 г. до 24% през 2005 г. [68]. В САЩ възрастните пушачи са били 24,7% през 1997 г. и 20,6% през 2006 г. [69]. Трайната тенденция за намаляване на тютюнопушенето е съпроводена с повишаване броя на лицата, които никога не са пушили (от 43% през 1984 г. на 53% през 2005 г. в Обединеното кралство) [68].

Ясната представа за тютюнопушенето като водеща, но предотвратима причина за болестност и смъртност е в основата и на Националната програма за ограничаване на тютюнопушенето в Република България 2007 – 2010, създадена като продължение на световните и европейските документи в тази насока [1, 2, 67].

ЛИТЕРАТУРА

1. The European Tobacco control Report 2007. WHO Europe. Достъп от: <http://www.euro.who.int/document/e89842.pdf> 1-160.
2. Национална програма за ограничаване на тютюнопушенето в Република България 2007 – 2010. Министерство на здравеопазването. 2007, София. Достъп от: http://www.mh.government.bg/program_and_strategies.php Стр. 1-11.
3. Асланова Н, Атанасова И, Минкова С, Борисова А-М, Ковачева Р, Шинков А, Влахов Й. Измерване на ултрасензитивен hTSH, ТРО антитела и серумни липиди за целите на епидемиологично проучване на населението в България, VIII Национален конгрес по ендокринология, Пловдив, 19-21 октомври 2006, Ендокринология, 11, 3 (Suppl), 126.
4. Борисова А-М, Ковачева Р, Шинков А, Атанасова И, Вуков М, Асланова Н, Влахов Й, Даковска Л. Функционални, имунологични и ехографски промени на щитовидната жлеза в българската популация, VIII Национален конгрес по ендокринология, Пловдив, 19-21 октомври 2006, Ендокринология, 11, 3 (Suppl), 59.
5. Kovatcheva R, Borissova A-M, Shinkov A, Atanassova I, Aslanova N, Vukov M. Reference intervals for anti-thyroid peroxidase antibodies based on National Academy of Clinical Biochemistry criteria and thyroid ultrasonography. 32nd Annual Meeting of the European Thyroid Association, 1-5 September 2007, Leipzig. Abstr. Book.
6. Brix TH, Knudsen GPS, Kristiansen M, Kyvik KO et al. High Frequency of Skewed X-Chromosome Inactivation in Females with Autoimmune Thyroid Disease: A Possible Explanation for the Female Predisposition to Thyroid Autoimmunity. Clin Endocrinol Metab. 2005; 90(11):5949-5953.
7. Vestergaard P. Smoking and thyroid disorders – a meta-analysis. Eur J Endocrinol. 2002;146:153-61.
8. Jacobson EM, Tomer Y. The *CD40*, *CTLA-4*, *thyroglobulin*, *TSH receptor*, and *PTPN22*

gene quintet and its contribution to thyroid autoimmunity: Back to the future. *J Autoimm.* 2007; 28(2-3):85-98.

9. Punzi L, Betterle C. Chronic autoimmune thyroiditis and rheumatic manifestations. *Joint Bone Spine.* 2004;71(4):275-83.

10. Simmonds MJ, Gough SCL. Genetic insights into disease mechanisms of autoimmunity. *Br Med Bull.* 2005; 71(1):93-113.

11. Meilinger M, Schweighofer N, Forjanics A, Dobnig H et al. Autoimmune thyroid disease, genetic predisposition and environment – case-control and family studies. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2007; 115(10):537-540.

12. Aust G, Krohn K, Morgenthaler NG, Schröder S et al. Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis in monozygotic twins: case study as well as transcriptomic and immunohistological analysis of thyroid tissues. *Eur J Endocrinol.* 2006; 154 (1): 13-20.

13. Tomer Y, Davies TF. Searching for the Autoimmune Thyroid Disease Susceptibility Genes: From Gene Mapping to Gene Function. *Endocr Rev.* 2003; 24 (5): 694-717.

14. Muller AF, Drexhage HA, Berghout A. Postpartum Thyroiditis and Autoimmune Thyroiditis in Women of Childbearing Age: Recent Insights and Consequences for Antenatal and Postnatal Care. *Endocr Rev.* 2001;22(5):605-630.

15. Brix TH, Hansen PS, Kyvik KO, Hegedus L. Cigarette smoking and risk of clinically overt thyroid disease: A population-based twin case-control study. *Arch Intern Med.* 2000;160:661-666.

16. Pryor WA, Stone K. Oxidants in cigarette smoke: Radicals, hydrogen peroxide, peroxyacetaldehyde, and peroxyacetylnitrate. *Ann NY Acad Sci.* 1993;686:12-28.

17. Glantz SA, Parmley WW. Passive smoking and heart disease: Epidemiology, physiology, and biochemistry. *Circulation.* 1991;83:1-12.

18. Glantz SA, Parmley WW. Passive and Active Smoking. A Problem for Adults. *Circulation.* 1996;94:596-598.

19. Narkiewicz K, van de Borne PJH, Hausberg M, Cooley RL et al. Cigarette Smoking Increases Sympathetic Outflow in Humans. *Circulation.* 1998; 98(6): 528 – 534.

20. Knudsen N, Bulow I, Laurberg P, Perrild H et al. High occurrence of thyroid multinodularity and low occurrence of subclinical hypothyroidism among tobacco smokers in a large population study. *J Endocrinol.* 2002;175(3):571-576.

21. Tziomalos K, Faidon Charsoulis F. Endocrine Effects of Tobacco Smoking. *Clin Endocrinol* 61(6):664-674, 2004.

22. Esvold BO, Björro T, Nilsen TIL, Vatten LJ. Tobacco Smoking and Thyroid Function. A Population-Based Study. *Arch Intern Med.* 2007;167:1428-1432.

23. Smith CJ, Fischer TH. Particulate and vapor phase constituents of cigarette mainstream smoke and risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis.* 2001;158:257-67.

24. Wannamethee SG, Lowe GDO, Shaper AG, Rumley A et al. Associations between cigarette smoking, pipe/cigar smoking, and smoking cessation, and haemostatic and inflammatory markers for cardiovascular disease. *Eur Heart J.* 2005; 26(17):1765-73.

25. Cawood T. J., P. Moriarty, C. O'Farrelly, and D. O'Shea. Smoking and Thyroid-Associated Ophthalmopathy: A Novel Explanation of the Biological Link. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007; 92(1): 59 – 64.

26. Tappia PS, Troughton KL, Langley-Evans SC, Grimble RF. Cigarette smoking influences cytokine production and antioxidant defences. *Clin Sci.* 1995; 88:485-489.

27. Hofbauer LC, Mühlberg T, König A, Heufelder G et al. Soluble Interleukin-1 Receptor Antagonist Serum Levels in Smokers and Nonsmokers with Graves' Ophthalmopathy Undergoing Orbital Radiotherapy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997;82(7):2244-2247.

28. Mendall MA, Patel P, Asante M, et al. Relation of serum cytokine concentrations to cardiovascular risk factors and coronary heart disease. *Heart.* 1997;78:273-277.

29. Das I. Raised C-reactive protein levels in serum from smokers. *Clin Chim Acta*. 1985;153(1):9-13.
30. Tracy RP, Psaty BM, Macy E, Bovill EG et al. Lifetime Smoking Exposure Affects the Association of C-Reactive Protein with Cardiovascular Disease Risk Factors and Subclinical Disease in Healthy Elderly Subjects. 1997;17:2167-76.
31. Tracy RP, Psaty BM, Macy E, Bovill EG et al. Lifetime Smoking Exposure Affects the Association of C-Reactive Protein with Cardiovascular Disease Risk Factors and Subclinical Disease in Healthy Elderly Subjects. 1997;17:2167-76.
32. Krassas GE, Wiersinga W. Smoking and autoimmune thyroid disease: the plot thickens. *Eur J Endocrinol*. 2006;154(6):778-80.
33. Holm IA, Manson JAE, Michels KB, Alexander EK et al. Smoking and Other Lifestyle Factors and the Risk of Graves' Hyperthyroidism. *Arch Intern Med* 2005; 165:1606-1611.
34. Prummel MF, Wiersinga WM. Smoking and risk of Graves' disease. *JAMA*. 1993;269(4):479-82.
35. Vestergaard P, Rejnmark L, Weeke J, Hoek HC et al. Smoking as a Risk Factor for Graves' Disease, Toxic Nodular Goiter, and Autoimmune Hypothyroidism. *Thyroid*. 2002;12(1):69-75.
36. Tellez M, Cooper J, Edmonds C. Graves' ophthalmopathy in relation to cigarette smoking and ethnic origin. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1992;36(3):291-294.
37. Борисова А-М, Захаријева С, Ковачева Р, Лозанов Б, Стоева И, Христов Вл, Коприварова К, Куманов Ф, Танкова Цв, Петкова М, Попиванов Пл. Препоръки за добра практика по тиреоидни заболявания. Българско дружество по ендокринология. 2005, София. Достъп от: <http://www.endo-bg.com/archives.php?id=A2005071> Стр. 1-32.
38. Bahn RS. Pathophysiology of Graves' Ophthalmopathy: The Cycle of Disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2003;88(5):1939-1946.
39. Manji N, Carr-Smith JD, Boelaert K, Allahabadia A et al. Influences of Age, Gender, Smoking, and Family History on Autoimmune Thyroid Disease Phenotype. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:4873-4880.
40. Bartalena L, Martino E, Marcocci C, Bogazzi F et al. More on smoking habits and Graves' ophthalmopathy. *J Endocrinol Invest*. 1989;12:733-737.
41. Pfeilshifter J, Ziegler R. Smoking and endocrine ophthalmopathy: impact of smoking severity and current vs lifetime cigarette consumption. *Clin Endocrinol*. 1996; 45:477-81.
42. Eckstein A, Quadbeck B, Mueller G, Rettenmeier AW et al. **Impact of smoking on the response to treatment of thyroid associated ophthalmopathy.** *Br. J. Ophthalmol*. 2003; 87(6): 773 – 776.
43. Bartalena L, Marcocci C, Tanda ML, Manetti L et al. Cigarette smoking and treatment outcomes in Graves ophthalmopathy. *Ann Intern Med*. 1998;129(8):632-635.
44. Krassas GE, Segni M & Wiersinga WM. Childhood Graves' ophthalmopathy: results of a European questionnaire study. *European Journal of Endocrinology* 2005 153 515-521.
45. Metsios GS, Flouris AD, Jamurtas AZ, Carrillo AE et al. A Brief Exposure to Moderate Passive Smoke Increases Metabolism and Thyroid Hormone Secretion. – *J. clin. Endocrinol. Metab.*, 2007, Vol. 92, No. 1, 208-211.
46. Bahn RS, Heufelder AE. Pathogenesis of Graves' Ophthalmopathy. *N Engl J Med*. 1993;329(20):1468-75.
47. Adams MR, Jessup W, Celermajer DS. Cigarette smoking is associated with increased human monocyte adhesion to endothelial cells: Reversibility with oral L-arginine but not vitamin C. *J Am Coll Cardiol*. 1997;29:491-497.
48. Baker GRC, Morton M, Rajapaska RS, Bullock M et al. Altered Tear Composition in Smokers and Patients With Graves Ophthalmopathy. *Arch Ophthalmol*. 2006;124:1451-1456.
49. Belin RM, Astor BC, Powe NR, Ladenson PW. Serum Thyroid Autoantibodies and Thyrotropin Concentration Elevation and a Higher Prevalence of Mild Thyrotropin Concentration

Suppression in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(12):6077-6086.

50. Strieder TGA, Prummel MF, Tijssen JGP, Endert E et al. Risk factors and prevalence of thyroid disorders in a cross-sectional study among healthy female relatives of patients with autoimmune thyroid disease. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2003;59:396-401.

51. Guignard R, Truong T, Rougier Y, Baron-Dubourdieu D et al. Alcohol drinking, tobacco smoking, and anthropometric characteristics as risk factors for thyroid cancer: A countrywide case-control study in New Caledonia. *Am J Epidemiol.* 2007;166(10):1140-1149.

52. Dorea JG. Maternal Thiocyanate and Thyroid Status during Breast-Feeding. *J Am College Nutrition.* 2004;23(2):97-101.

53. Kapoor D, Jones TH. Smoking and hormones in health and endocrine disorders. *Eur J Endocrinol.* 2005; 152(4): 491-499.

54. Fung HY, Kologlu M, Collison K, John R et al. Postpartum thyroid dysfunction in Mid Glamorgan. *Br Med J.* 1988;296 (6617):241-244.

55. Kuijpers JL, Pop VJ, Vader HL, Drexhage HA, Wiersinga WM. Prediction of post partum thyroid dysfunction: can it be improved? *Eur J Endocrinol.* 1998;139:36-43.

56. Бонева Ж, Боянов М, Попов Д, Йовчевски П, Асьов Я. Влияние на тютюнопушенето върху телесния състав и мастно-тъканното разпределение. *Съвр. Мед.* 2008;59(1):37-44.

57. Mascitelli L, Pezzetta F. Role of systemic inflammation in the relationship between metabolic syndrome and cigarette smoking. *Int Med.* 2007;46(6):333.

58. Miyatake N, Wada J, Nishii K, Makino H. et al. Relationship between metabolic syndrome and cigarette smoking in the Japanese population. *Intern Med.* 2006;45(18):1039-43.

59. Tuomilehto J. Primary prevention of type 2 diabetes: lifestyle intervention works and saves money, but what should be done with smokers? *Ann Intern Med.* 2005;142(5):381-3.

60. Costenbader KH. Cigarette smoking and autoimmune disease: what can we learn from epidemiology? *Lupus.* 2006;15(11):737-45.

61. Hutchinson D, Shepstone L, Moots R, Lear JT, Lynch MP. Heavy cigarette smoking is strongly associated with rheumatoid arthritis (RA), particularly in patients without a family history of RA. *Ann Rheum Dis.* 2001;60:223-227.

62. Kimm S. SYS, Glynn NW, Aston CE, Poehlman ET et al. Effects of Race, Cigarette Smoking, and Use of Contraceptive Medications on Resting Energy Expenditure in Young Women. *American Journal of Epidemiology.* 2001;154(8):718-724.

63. Biring SS, Patel RB, Parker D, et al. Airway function and markers of airway inflammation in patients with treated hypothyroidism. *Thorax.* 2005;60(3):249-253.

64. Biring SS, Brightling CE, Symon FA, Barlow SG et al. Idiopathic chronic cough: association with organ specific autoimmune disease and bronchoalveolar lymphocytosis. *Thorax.* 2003;58(12):1066-1070.

65. Morice AH, McGarvey L, I Pavord on behalf of the British Thoracic Society Cough Guideline Group. Recommendations for the management of cough in adults. *Thorax.* 2006; 61(suppl_1): i1-i24.

66. Кратък справочник по Международната статистическа класификация на болестите и проблемите, свързани със здравето, X ревизия. Т. Чолакова, ред. София. МЗ, НЦЗИ. Стр. 1-212.

67. WHO Report on the Global Tobacco Epidemic, 2008: The MPOWER package. Достъп от: http://www.who.int/tobacco/data_statistics/sgf/sgf_2006/chapters.htm.int/http://www.who.int/tobacco/mpower/mpower_report_full_2008.pdf 1-342.

68. Statistics on smoking: England 2007. <http://www.ic.nhs.uk/pubs/smoking07> 1-180.

69. Centers for Disease Control and Prevention. Cigarette Smoking Among Adults—United States, 2006. *Morbidity and Mortality Weekly Report* [serial online]. 2007;56(44):1157-1161.

ТЮТЮНОПУШЕНЕТО – РИСКОВ ФАКТОР ЗА АВТОИМУННИ БОЛЕСТИ НА ЩИТОВИДНАТА ЖЛЕЗА

Д. Попова

*Отделение по трансфузионна хематология и имунология,
МБАЛСМ „Н. И. Пирогов“, София*

Резюме: По данни на СЗО в Европейския регион около 30% от възрастното население пуши редовно. Тревожната статистика за нашата страна сочи, че пушачите са значително повече – около 40% за възрастните, 35% за децата над 15 години и 34% от лекарите! Интерес представлява отражението на тази „епидемия“ върху автоимунните болести на щитовидната жлеза.

Счита се, че тютюнопушенето е един от външните фактори, причиняващи по-честа клинична изява на автоимунните болести на щитовидната жлеза, както е показано при изследвания върху близнаци. Предполага се, че тиреоидната функция се повлиява поради променена хормоногенеза, промяна в свързването на трийодтиронина с рецепторите му или пост-рецепторното му действие в черния дроб, мускулатурата и други тъкани. С пушенето категорично се свързва повишеният риск от хипертиреоидизъм (болест на Graves), особено при жените. Допускат се различни механизми за действието на цигарения дим – нарушения в структурата на рецептора за TSH, промяна във фактори, нарушаващи имунния толеранс, и др. Тютюнопушенето е независим рисков фактор за развитие на офталмопатия в хода на болестта на Graves, вероятно поради хипоксия в ретробулбарното пространство и освобождаване на цитокини, водещи до повишена експресия на адхезионни молекули. Тя по-трудно се поддава на лечение при пушачите, особено в детската възраст. Допуска се ролята на пасивното пушене в този случай. Според последни данни дори краткият престой в задимена среда води до повишаване на метаболизма и хормоналните нива. От друга страна, преобладава мнението, че тютюнопушенето намалява риска от развитие на автоантитела срещу тиреоидни антигени и съответно – честотата на автоимунно обусловения хипотиреоидизъм. Няма единно становище и по отношение на следродовите автоимунни тиреоидити.

Спирането на пушенето безспорно е препоръчително, независимо че в някои случаи то става причина да се изявят леките нарушения във функцията на щитовидната жлеза.

Ключови думи: тютюнопушене, автоимунни болести, щитовидна жлеза, болест на Graves, офталмопатия

За контакти:

ст. н. с. II ст. д-р Дора Николова ПОПОВА

МБАЛСМ „Н. И. Пирогов“

Отделение по трансфузионна хематология и имунология

Лаборатория по клинична имунология

София 1606

бул. „Ген. Е. Тотлебен“ № 21

тел. 91 54 217

GSM 0887 417 563

e-mail: popova_d@mail.bg

SMOKING AS A RISK FACTOR FOR AUTOIMMUNE THYROID DISORDERS

D. Popova

*Department of Blood Transfusion and Immunology
Hospital for Emergency Medicine „N. I. Pirogov“ – Sofia, Bulgaria*

Summary: According to WHO data, about 30% of the adults in Europe are daily smokers. It is alarming to find that in Bulgaria smoking is more frequent – about 40% of the adults, 35% of children above age 15 and 34% of physicians are smokers! The impact of this “epidemic” on thyroid autoimmune diseases is of interest.

It is assumed that **smoking** is one of the main environmental factors inducing clinically overt autoimmune thyroid diseases, as shown in twins studies. It is believed that thyroid function is affected because of changes in hormone synthesis, triiodothyronine binding to receptors and/or altered post-receptor operation in the liver, muscles and other target tissues. Smoking is definitely related to a higher risk of hyperthyroidism (Graves’ disease), especially in women. Different mechanisms of action are supposed for the deleterious effect of cigarette smoke – THS receptor alteration, changes in immune tolerance et al. Smoking is an independent risk factor for the development of thyroid associated ophthalmopathy (TAO), probably related to hypoxemia in the retrobulbar space and the release of an array of cytokines, inducing overexpression of adhesion molecules. TAO is less responsive to treatment in smokers, particularly in childhood. The role of passive smoking is suggested in this case. According to recent data, even a short stay in an environment containing cigarette smoke, increases the metabolism and thyroid hormone levels. On the other hand it is prevailing thought, that smoking decreases the risk for autoantibodies to thyroid antigens, and therefore the frequency of autoimmune hypothyroidism. Data are conflicting about postpartum autoimmune thyroiditis.

Smoking cessation is hardly recommended, even though in some cases it is related to the clinical manifestation of thyroid functional defects.

Key words: smoking, autoimmune diseases, thyroid, Graves’ disease, thyroid associated ophthalmopathy

Contact address:

Assoc. Prof. Dora POPOVA, M.D., Ph.D.

Lab of Clinical Immunology

Dpt of Blood Transfusion and Immunology

Hospital for Emergency Medicine “N. I. Pirogov”

21, “General E. Totleben” blvd

1606 Sofia, BULGARIA

Ph. + 35 92 91 54 217

Mobile: + 359 887 417 563

e-mail: popova_d@mail.bg

АВТОИМУННИТЕ ЗАБОЛЯВАНИЯ НА ЩИТОВИДНАТА ЖЛЕЗА И СИСТЕМЕН ЛУПУС

М. Балева и Кр. Николов***

Автоимунните заболявания обикновено се разделят на две големи групи: 1. Органоспецифични – диабет I тип, болести на щитовидната жлеза, пернициозна анемия, мултипла склероза и др., и 2. Системни – ревматоиден артрит, системен лупус (СЛЕ), склеродермия и др. Често няколко органоспецифични болести се установяват при един и същи човек, напр. – автоимунните полиендокринопатии. По-рядко няколко системни автоимунни заболявания се доказват при един и същи пациент.

Съчетанието на заболявания на щитовидната жлеза и СЛЕ за пръв път е описано от RG White и съавт. [1] през 1961 г., когато авторите намират положителен анти-нуклеарен фактор в серума на болни с тиреоидит на Hashimoto. Първоначално в литературата се публикуват редица случаи на съчетание между двете заболявания, но постепенно се появяват и студии с по-голям брой изследвани пациенти: през 1986 г. KL Goh и съавт. [2] – 319 болни. На следващата 1987 г. има няколко публикации: AP Weetman и съавт. [3] – 41 болни, FW Miller и съавт. [4] – 332 болни, MA Byron и съавт. [5] – 64 болни, а през 1989 г. – на Y Kohno и съавт. [6] – 24 болни и на S Rodrigue и съавт. [7] – 93 болни. През 1991 г. са представени изследванията на Y Krausz и съавт. [8] – 200 болни, на JL Vianna и съавт. [9] – 100 болни, на BA Eberhad и съавт. [10] – 35 болни, през 1993 г. – на RT Tsai и съавт. [11] – 45 болни. В началото на новия век има още няколко съобщения – през 2000 г. – на JE Donagh и съавт. [12] – 215 болни, 2002 г. – на D Руне и съавт. [13] – 300 болни, и през 2007 г. – на SA Chambers и съавт. [14] – на 401 болни от системен лупус (табл. 1). Прави впечатление фактът, че вече повече от 40 г. този въпрос продължава да е интересен.

Честота на хипотиреоидизма при болните от СЛЕ

От таблица 1 е видно, че данните за хипотиреоидизъм при лупусно болните варират от липса [7, 8] в Израел и Аржентина, до 8,8% в Тайван [11] и 24% във Великобритания [3]. В същото време данните от Великобритания са доста пъстри: в най-старите проучвания от 1987 г. има данни за 24% [3] и за 4,9% [5]. Следващите проучвания в тази страна показват сходни данни: през 1991 г. – 6% [9], през 2000 г. – 4% [12], през 2002 – 5,7% [13] и 6,48% през 2007 г. [14]. Данните за азиатската популация също се различават: 1% [2], 3,9% [15], 5% [6], 8,8% [11].

Честота на хипертиреоидизма при болните от СЛЕ

По-късно се установява, че при СЛЕ може да е налице не само хипофункция, но и хиперфункция на жлезата [16]. Данните за хипертиреоидно заболяване не са така разнопосочни и варират от липса [6, 10, 17] до 2,82% [2]. По-високи са данните на S Rodrigues [7] – 6,45%, на ML Voeu [15] – 8,9%, и на MA Byron [5] – 10,9%.

*Университетска Александровска болница, Медицински университет – София.

** МБАЛ „Св. Анна“, Медицински университет – Варна.

Табл. 1. Честота на аутоимунните заболявания на щитовидната жлеза при болни от системен лупус

Автор	Хипотиреоидизъм (%)	Хипертиреоидизъм (%)	Честота в общата популация (хипотиреоидизъм)	Честота в общата популация (хипертиреоидизъм)
SA Chambers – Великобритания 2007 г. [14]	6,48	1,99	0,8	0,65
JE McDonagh Великобритания 2000 г.[12]	4	2		
D Руне – Великобритания 2002 г.[13]	5,7	1,7	1	1
MA Вурон – Великобритания 1987 г.[5]	4,9	11,5	1	1,9
KL Goh – Малайзия 1986 г. [2]	1 %	2,82 (2,7 % при жените и 5,9 % при мъжете)	0,4	1 %-жени и 0,3 %-мъже
S Rodrigue – Аржентина 1989 г [7]	-	6,45		
RT Tsai – Тайван 1993 г. [11]	4,4	2,2		
ML Воеу - Сингапур 1993 г. [15]	3,9	0,8		
Y Krausz – Израел 1991 г. [8]	-	0,5		
AP Weetman – Великобритания 1987 г.[3]	24	-		
JLVianna – Великобритания –1991 г.[9]	6	2		
VA Eberhad Великобритания – 1991 г.[10]	11,4	0		
FW Miller – САЩ –1987 г. [4]	6,6	0,9		
Y Kohno-Япония –1989 г.[6]	5	0		

Намерихме само 4 източника, които сравняват честотата на автоимунните заболявания на щитовидната жлеза при болни от СЛЕ с тези от общата популация [2, 5, 13, 14]. Анализът на тези данни показва, че в някои от случаите [5, 14] честотата на автоимунното тиреоидно заболяване е по-висока при болните от лупус, отколкото в общата популация. В студията на D Pyne [13] хипотиреоидизмът при лупусно болните е значително по-чест, но хипертиреоидизмът е съизмерим с честотата в общата популация. Обратно – публикацията на KL Goh [2] показва, че честотата на хипотиреоидизма при лупусно болни в Малайзия е съизмерима с тази на общата популация, но случаите на хипертиреоидизъм при лупусно болните са по-чести. Други автори считат, че автоимунните заболявания на тиреоидната жлеза при лупусно болни не са по-чести от наблюдаваните в общата популация [6, 9].

Поява на заболяванията на щитовидната жлеза при болни от лупус

В редица публикации се дискутира въпросът за времето на появата на автоимунното тиреоидно заболяване при болни от лупус. В повечето публикации се съобщава, че това може да бъде преди, по време или след диагностицирането на лупуса (табл. 2):

Табл. 2. Поява на автоимунното тиреоидно заболяване

Автор	Преди лупуса	По време	След лупуса
MA Вугон [5]	7/64 с хипертиреоидизъм и 3/64 с хипотиреоидизъм – 1-17 г.		
S Rodrigue [7]	3/93 с хипертиреоидизъм - 6м.-5г.	2/93 с хипертиреоидизъм	
D Pyne [13]	2/300 с хипертиреоидизъм, 8/300 с хипотиреоидизъм	3/300 с хипотиреоидизъм	3/300 с хипертиреоидизъм, 6/300 с хипотиреоидизъм
RL Goh [2]	8/319 с хипертиреоидизъм 1-11 г., 1/319 с хипотиреоидизъм-2 г.	2/319 с хипотиреоидизъм	1/319 с хипертиреоидизъм-5 г.
SA Chambers [14]	21/401	2/401	5/401

Анализът на таблицата показва, че двете заболявания могат да се появят едновременно или едното да предшества другото. Интересни са данните на JE Donagh и DA Isenberg [12], че в случаите, когато автоимунното тиреоидно заболяване предшества появата на системния лупус, болните са значително по-млади.

Честота на тиреоидните автоантитела при болни от лупус

На табл. 3 са представени данните на различни автори за честотата на анти-тиреоидните антитела в серума на болни от СЛЕ.

Табл. 3. МАТ и ТАТ антитела в серума на болни от СЛЕ

Автор	МАТ	ТАТ	МАТ и ТАТ
S Rodrigue [7]	12 %	9,33 %	8,33 %
AP Weetman [3]	39 %	36,6 %	24,4 %
RT Tsai [11]	46,7%	28,9 %	-
ML Boey [15]	33,33 %	16,27 %	14 %
JL Vianna [9]	19 %	11 %	9 %
BA Eberhad [10]	20 %	28 %	-
FW Miller [4]	18,4 %	7,1 %	-

МАТ-антимикрозомални антитела, ТАТ-анти tireоглобулинови антитела

Анализът на тази таблица показва, че честотата на МАТ антителата в серума на лупусно болни варира от 12 % [7] до 46,7 % [11], а на ТАТ антителата – от 7,1 % [4] до 36,6 % [3].

Данните за промените на хормоните са по-малко. Така напр. AP Weetman и съавт. [3] установяват повишени нива на TSH при 24,4 % от болните, RT Tsai [11] – повишени T4 – при 2,2 %, понижени T4 – при 2,2 %, повишени T3 – при 2,2 %, понижени T3 – при 20 %, повишени TSH при 4,4 %, а FW Miller и съавт. [4] – повишени T4 – при 11,8 %, а FT4 – при 3,6 %, понижени T4 – при 19,1 %, а FT4 – при 14,5 %, повишени T3 – при 17 %, а rT3 – при 14,6 %, понижени T3 – при 34,34 %, а rT3 – при 31,7 %, повишени TSH при 45,6 %. Интересно е проучването на MD Koller и съавт. [18], което показва, че при нелекувани новодиагностицирани болни от системен лупус има значителни промени в оста хипофиза–щитовидна жлеза и хипофиза–гонади, като първично увредени са периферните ендокринни органи, а увредата на хипофизната жлеза е вторична и не толкова изразена.

Антинуклеарни антитела при автоимунни заболявания на щитовидната жлеза

Редица автори съобщават, че при болни с автоимунни тиреоидити често могат да се открият положителни антинуклеарни антитела (ANA) и положителни DNA антитела. Така напр. при 58/168 (35%) от болните с тези заболявания MG Tektonidou и съавт. [19] установяват положителни ANA, а 7/58 (12%) са положителни и за DNA антитела. Всички тези седем пациенти имат някои от симптомите, характерни за системно заболяване: артралгия, улцерации в устната кухина, ливедо, левкопения, феномен на Raynaud. A Loviseli и съавт. [20] намират, че 7% от болните с хипертиреоидизъм са положителни за ANA, 13% за DNA антитела и 2% за антихистонови антитела. Всички 6 пациенти на S. Rodrigue и съавт. [7] с едновременно наличие на системен лупус и тиреотоксикоза имат положителни ANA, а 4 от тях и DNA антитела.

Фамилни проучвания

В обширна студия върху 1138 болни от СЛЕ RH Scofield и съавт. [21] установяват, че 169 имат синдром на Sjogren, а 50 от тях (29,6%) имат и автоимунно тиреоидно заболяване. От 939 болни от СЛЕ без данни за синдром на Sjogren 119 (12,7%) имат автоимунно тиреоидно заболяване, като разликите са статистически значими. Изследвайки 2291 роднини на болни от СЛЕ по първа (родители, деца) и по втора линия (лели, чичовци, братовчеди), които нямат данни за СЛЕ, те намират, че 44 имат синдром на Sjogren, а 16 от тях (36,4%) имат и заболяване на тиреоидеята; 265 от 2247 (11,8%) имат автоимунна болест на щитовидната жлеза, но нямат синдром на Sjogren. Авторите считат, че болните от СЛЕ и техните роднини, в чиито семейства има поне 2-ма болни от лупус, имат по-висока вероятност да заболят и от автоимунно заболяване на тиреоидната жлеза.

Напоследък излязоха и съобщения, в които се обсъждат и някои генетични мутации, свързани с високата честота на няколко автоимунни заболявания в едно и също семейство. LA Criswell и съавт. [22] докладват за полиморфизъм rs2476601, кодиращ R620W във втреклетъчната тирозинфосфатаза (PTPN22), свързан с повишен риск от следните заболявания: първи тип диабет, ревматоиден артрит, системен лупус, тиреоидит на Hashimoto.

Лупус, индуциран след лечение с тиреостатици

Описани са редица случаи на лупус, индуцирани от лечение с тиреостатици, но няма данни за по-обширни проучвания. Така напр. RP Searles и съавт. [23] през 1981 г. описват баща и син, при които след лечение съответно с метимазол и пропилтиоурацил се наблюдават лупус-подобни синдроми – артралгия, кожен обрив и положителни ANA. Други автори също обсъждат възможността за поява на лупус-подобни синдроми след лечение с пропилтиоурацил [24, 25, 26].

В настоящия момент има поне 4 мнения относно връзката между системния лупус и автоимунните заболявания на щитовидната жлеза:

1. Съчетание на двете заболявания [7, 27].
2. Възможност за лекарствено-индуциран лупус след лечение с тиреостатици [24, 25].
3. Наличие на автоимунни нарушения, свързани с щитовидната жлеза, при болни с лупус [2, 15, 28].
4. Възможност за лекарствено-индуцирани серологични промени след лечение с тиреостатици без данни за лупус, напр. позитивиране на ANA от различен вид [29].

Няма достатъчно категорични данни, за да се обяснят различните варианти на съчетание между автоимунните болести на щитовидната жлеза и системния лупус. Предполага се, че причина за това могат да бъдат както общата им автоимунна патогенеза, така и приложението на някои лекарства. Необходими са множество мултицентрови клинични, имунологични и генетични проучвания, за да се достигне до консенсус по този въпрос.

ЛИТЕРАТУРА

1. White RG, Bass BH, Williams E. Lymphadenoid goitre and the syndrome of SLE. *Lancet* 1961;1: 368-373.
2. Goh KL, Wang F. Thyroid disorders in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1986;45: 579-583.
3. Weetman AP, Walport MJ. The association of autoimmune thyroiditis with SLE. *Br J Rheum* 1987; 26: 359-61.
4. Miller FW, Moore GF, Weintraub BD et al. Prevalence of thyroid disease and abnormal thyroid function test results in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthr Rheumat* 1987 ; 30: 1124-31.
5. Byron M, Mowat AG. Thyroid disorders in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1987; 46: 174-175.
6. Kohno Y, Naito N, Saito K, Hoshioika A et al. Anti thyroid peroxidase antibody in patients with SLE. *Clin exp Immunol* 1989; 75: 217-221.
7. Rodrigue S, Laborde H, Catoggio PM. Systemic lupus erythematosus and thyrotoxicosis: a hitero little recognized association. *Ann Rheum Dis* 1989; 48: 424-427.
8. Krausz Y, Blum A, Rubinow A. Hyperthyroidism and systemic lupus erythematosus: chance or genetic predisposition? *Clin exp Rheumatol* 1991; 9: 438-9.
9. Vianna JL, Haga HJ, Asherson RR, Swana G et al. A prospective evaluation of anti thyroid antibody prevalence in 100 patients with SLE. *J Rheumatol* 1991; 18: 1193-1195.
10. Eberhad BA, Laxer RM, Eddy AA et al. Presence of thyroid abnormalities in children with systemic lupus erythematosus. *J Pediatr* 1991; 119: 277-9.
11. Tsai R-T, Chang T-C, Wang C-R et al. Thyroid disorders in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 1993; 13: 9-13.
12. Donagh JE, Isenberg DA. Development of additional autoimmune diseases in a population of patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2000; 59: 230-232.
13. Pyne D, Isenberg DA. Autoimmune thyroid disease in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 70-72.
14. Chambers SA, Charman SC, Rahman A et al. Development of additional autoimmune diseases in a multiethnic cohort of patients with systemic lupus erythematosus with reference to damage and mortality. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 1173-1177.
15. Boey ML, Fong PH, Lee JSC et al. Autoimmune thyroid disease in SLE patients in Singapore. *Lupus* 1993; 2: 51-4.
16. Scofield RH. Autoimmune thyroid disease in SLE and Sjogren's syndrome. *Clin exp Rheumatol* 1996; 14: 321-330.
17. Foster H, Fay A, Kelly C, Charles P et al. Thyroid disease and other autoimmune phenomena in family study of primary Sjogren's syndrome. *Br J Rheumatol* 1993; 32: 36-40.
18. Koller MD, Templ E, Riedl M et al. Pituitary function in patients with newly diagnosed untreated systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 1677-1680.
19. Tektonodou MG, Anapliotou M, Vlachoyiannopoulos P et al. Presence of systemic autoimmune disorders in patients with autoimmune thyroid diseases. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 1159-1161.
20. Loviselli A, Vellutzi F, Pala R et al. Circulating antibodies to DNA related antigens in patients with autoimmune thyroid disorders. *Autoimmunity* 1992; 14: 33-6.
21. Scofield RA, Brunner GR, Harleg JB, Namjon B. Autoimmune thyroid disease is associated with a diagnosis of secondary Sjogren's syndrome in familial systemic lupus. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 410-413.
22. Criswell LA, Pfeiffer KA, Lum RF et al. Analysis of families in multiple autoimmune

disease genetics consortium (MADGC) collection: the PTPN22 620W allele associates with multiple autoimmune phenotype. *Am J Hum Genet* 2005; 76: 561-571.

23. Searles RP, Plymate SR, Troup GM. Familial thioamide lupus syndrome in thyrotoxicosis. *J Rheumatol* 1981; 8: 498-500.

24. Àmrheim JA, Kenny FM, Ross D. Granulocytopenia, lupus like syndrome and other complications of propylthiouracil therapy. *J Pediatr* 1970; 76: 54-63.

25. Horton RC, Sheppard MC, Emery P. Propylthiouracil – induced lupus erythematosus. *Lancet* 1989; 2: 8662, 568.

26. Sato-Matsumura KC, Koizumi H, Tatsumura T et al. Lupus erythematosus – like syndrome induced by thiamazole and propylthiouracil. *J Dermatol* 1994; 21: 501-507

27. Abraham Z, M Rozenbaum M, Feuerman EJ et al. Adolescent systemic lupus erythematosus and Grave's disease. *Clin exp Rheumatol* 1994; 12: 90-1.

28. Kosmo J, Naito N, Saito K et al. Anti-thyroid peroxidase antibody activity in sera of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin exp Immunol* 1989; 75: 217-221.

29. Wing SS, Fantus IG. Adverse immunological effects of antithyroid drugs. *Can Med Assoc J* 1987; 136: 121-127.

АВТОИМУННИТЕ ЗАБОЛЯВАНИЯ НА ЩИТОВИДНАТА ЖЛЕЗА И СИСТЕМЕН ЛУПУС

М. Балева и Кр. Николов***

**Университетска Александровска болница,
Медицински университет – София.*

*** МБАЛ „Св. Анна“, Медицински университет – Варна.*

Резюме. Съществуват 4 мнения относно връзката между системния лупус и автоимунните заболявания на щитовидната жлеза: 1. Съчетание на двете заболявания; 2. Възможност за лекарствено-индуциран лупус след лечение с тиреостатици; 3. Наличие на автоимунни нарушения, свързани с щитовидната жлеза при болни с лупус; 4. Възможност за лекарствено-индуцирани серологични промени след лечение с тиреостатици без данни за лупус, напр. позитивиране на ANA от различен вид. Няма достатъчно категорични данни, за да се обяснят различните варианти на съчетание между автоимунните болести на щитовидната жлеза и системния лупус. Предполага се, че причина за това могат да бъдат както общата им автоимунна патогенеза, така и приложението на някои лекарства. Необходими са множество мултицентрови клинични, имунологични и генетични проучвания, за да се достигне до консенсус по този въпрос.

Ключови думи: системен лупус, автоимунни болести на щитовидната жлеза.

Адрес за кореспонденция:

Марта Балева, Университетска Александровска болница,
бул. „Св. Г. Софийски“ 1, София, 1431, ПК 45
e mail: marta_baleva@yahoo.com

AUTOIMMUNE THYROID DISEASES AND SYSTEMIC LUPUS

M. Baleva and Kr. Nikolov*****University Hospital Alexandrovska, Medical University, Sofia.**** St Anna Hospital, Varna, Medical University, Varna.*

Abstract. Four hypotheses concerning the link between systemic lupus erythematosus (SLE) and autoimmune thyroid disease have been proposed: (1) association of both diseases; (2) drug-induced lupus after thyreostatic treatment; (3) thyroid autoimmunity in lupus patients; (4) drug-induced serological changes (i.e. positive ANA of different type) without overt SLE. There is no sufficient and discriminative data explaining the different associations between autoimmune thyroid diseases and SLE. Common autoimmune pathogenesis underlying both conditions and drug influences have been proposed to explain these associations. Multicentric clinical, immunological and genetic studies are needed to clarify these associations and reach consensus.

Key words: systemic lupus erythematosus, autoimmune thyroid diseases.

Address for correspondence:

Marta Baleva, University Hospital Alexandrovska,

1G. Sofiiski str, Sofia 1431, PO Box 45

e mail: marta_baleva@yahoo.com

ОПРЕДЕЛЯНЕ НИВА НА ТРОМБОЦИТНО-ЛЕВКОЦИТНИ АГРЕГАТИ ПРИ ЖЕНИ С ИНФЕРТИЛИТЕТ, ПРИДОБИТИ ТРОМБОФИЛИЧНИ ФАКТОРИ И АНТИТИРЕОИДНИ АНТИТЕЛА

Г. Велева, Цв. Луканов,

П. Петрова, Е. Конова

*Секция по клинична имунология,
Медицински университет, Плевен, България*

ВЪВЕДЕНИЕ

Антифосфолипидният синдром (APS) е антияло, медирано тромботично заболяване. Не всички пациенти с антифосфолипидни антитела (aPL) обаче развиват APS, което дава основание да се смята, че за изявата на клиничните черти значение има участието на допълнителни фактори. Съществуват проучвания, имащи за цел да идентифицират факторите, чието наличие е необходимо, за да могат aPL да усилят кръвосъсирването [1]. Такъв допълнителен фактор биха могли да бъдат други автоантитела. Фактът, че жени, които имат антитиреоидни антитела (ATA), правят спонтанни аборти два пъти по-често от жени без регистрирани ATA [2], насочва вниманието към ролята на тези автоантитела в патогенезата на феталните загуби, свързани с нарушение на плацентарната микроциркулация.

През последните години интересът на много автори е насочен към тромботично-левкоцитните агрегати (PLA) – хетеротипни клетъчни комплекси, в границите на които взаимодействието между двата типа клетки повлиява функцията им при участието в процесите на хемостаза и възпаление [3]. Повишени нива на PLA са установени при пациенти с остър коронарен синдром [4, 5], церебрална исхемия [6], захарен диабет, миелопролиферативни заболявания [7, 8], автоимунни нарушения [9] и при пациенти с хронична бъбречна недостатъчност на хемодиализно лечение [10]. Доказана е патогенетичната роля на PLA за възникване на тромбози при тези заболявания. Интерес представляват възможностите за използване на PLA като прогностичен маркер при жени с репродуктивни неуспехи и тромбофилични фактори.

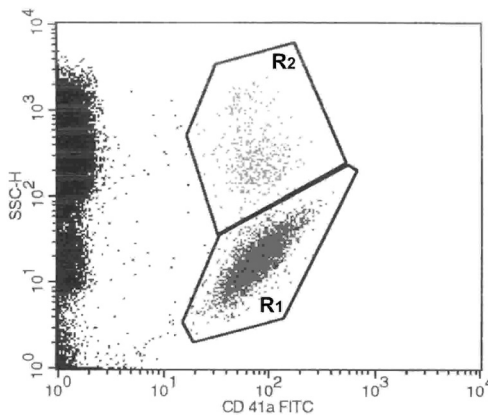
Цел на настоящото проучване е да се определят нива на PLA при жени с анамнеза за репродуктивни неуспехи, доказани придобити тромбофилични фактори (антифосфолипидни антитела) и повишени нива на ATA. Въз основа на получените резултати да се обсъди значението на автоимунните тиреоидни нарушения като допълнителен фактор за клинична изява на APS при aPL – позитивни пациентки.

ПАЦИЕНТИ И МЕТОДИ

Проучването е проведено в МДЛ по имунология на УМБАЛ „Д-р Г. Странски“ – Плевен. При наличие на информирано съгласие беше взета кръв от 32 жени на възраст от 21 до 41 години с анамнестични данни за инфертилитет и доказани

придобити тромбофилични фактори (антифосфолипидни антитела), при които са установени повишени нива на АТА. Контролната група включваше 18 клинично здрави жени без данни за репродуктивни неуспехи на възраст от 18 до 35 години.

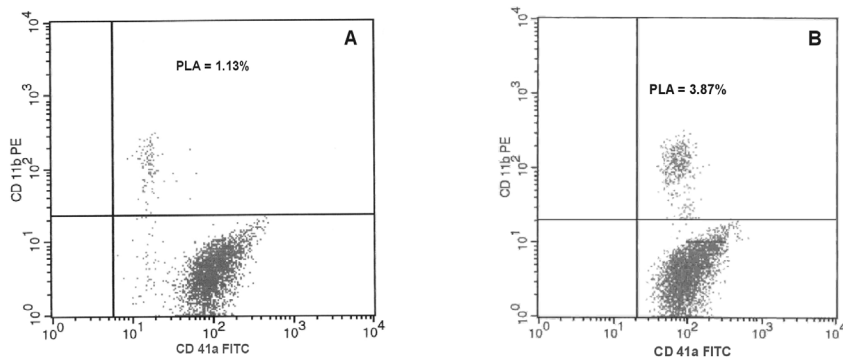
За флоуцитометрично определяне на тромбоцитно-левкоцитни агрегати беше използвана свежа, цяла венозна кръв, взета във вакутейнер с K_2EDTA . До 20 минути от вземане на кръвта беше приложено директно двуцветно имунофлуоресцентно оцветяване с комбинация от идентификационни, тромбоцитно-специфични моноклонални антитела (МоАт) (CD41a) и левкоцитно-специфични МоАт (CD11b) на фирмата Becton Dickinson (BD), USA. В полистиренова епруветка бяха прибавени по 50 μ l кръв и по 15 μ l от МоАт за пациент или контрола. Следва инкубиране за 20 минути на стайна температура и фиксиране с 1ml 1% разтвор на параформалдехид за 30 минути на тъмно при температура от 2 до 8°. Така приготвените проби бяха приети до 1 час. Приемането на пробите и анализа на резултатите беше извършено на флоуцитометър FACSort (BD, USA) и програма CellQuest. На двумерна точкова графика беше формиран флуоресцентно регион по CD41a около тромбоцити, тромбоцитно-тромбоцитни агрегати и PLA (фиг. 1).



Фиг. 1. CD41a/SSC точково изображение с регион R1 (тромбоцити) и R2 (тромбоцитно-левкоцитни, тромбоцитно-тромбоцитни агрегати).

Резултатите бяха представени като процент на PLA, които експресират изследваните гликопротеини, и сравнени с резултатите от контролната група здрави лица (фиг. 2).

За определяне на aPL (антикардиолипинови антитела от клас IgG и IgM, антитела срещу бета две гликопротеин едно от клас IgG и IgM), както и на АТА – анти-тиреоглобулин автоантитела (ТАТ), анти-микрозомални автоантитела (ТРО), тиреоидни хормони (FT4, TSH) бяха използвани ELISA метод и реактиви на фирма ClinPro, USA. Стойностите са отчетени с ELISA Reader „Ceres UV 900c“ на фирма Bio-Tek.



Фиг. 2 CD41a/CD11b точково изображение на процент на PLA при здраво лице (A) и пациентка с инфертилитет, придобити тромбофилични фактори и повишени нива на АТА (B).

РЕЗУЛТАТИ

Всички 32 пациентки, включени в таргетната група, имаха анамнестични данни за инфертилитет, тиреоидни хормони в референтни граници, положителни АТА (ТАТ и/или ТРО) и aPL (антикардиолипинови антитела от клас IgG и IgM и/или антитела срещу бета две гликопротеин едно от клас IgG и IgM).

Нивата на PLA при контролната група пациентки беше в границите от 0,3 до 1,7%. Повишени нива на PLA (>1,7%; от 1,93% до 4,32%) бяха установени при 28 (87,5%) от пациентките. Четири (12,5%) от пациентките бяха с нива на PLA съизмерими с тези при контролната група.

ОБСЪЖДАНЕ

Концепцията за тромбозата като мултифакторно заболяване стана по-актуална през последните години [11]. Цел на проучванията на много автори е да се идентифицират факторите, чието наличие е необходимо, за да могат aPL да усилят кръвосъсирването [1]. Създадена е двуетапна теория от Fishetti и съавт., според която aPL повишават риска от възникване на тромботично събитие, потенцирайки прокоагулантния ефект на друго тромбофилично състояние [12]. В съответствие с тази хипотеза като рискови фактори за тромбози, идентифицирани при над 50% от пациентите с APS, се посочват:

- хирургична интервенция или продължителна имобилизация, асоциирани с венозна тромботична оклузия;

- дислипидемия и артериална хипертония в асоциация с артериални тромбози.

Същите автори показват, че антителата срещу β 2GP-I засилват коагулацията при наличието на проинфламаторен фактор [12]. Инфекциите също могат да бъдат фактор за начало на APS, като честотата им при пациенти с катастрофален APS е над 24% [12].

Наличието на протромботичен генетичен дефект също може да повлияе развитието на APS-свързани клинични черти в субпопулация от aPL – позитивни пациенти. Някои изследователи проучват влиянието, което оказва наличието на гене-

тични причини за тромбофилия при пациентите с aPL [11]. Подобно проучване беше проведено и от нашия екип, като определихме нивата на PLA при пациентки с инфертилитет и тромбофилични фактори. Установихме по-значимо повишение на стойностите на PLA спрямо контролна група от здрави лица при пациентки, носещи комбинация от генетични и придобити тромбофилични фактори, сравнено с повишението при пациентки, носещи само един от тромбофиличните фактори. Подобно значимо повишение на PLA спрямо стойностите на контролите намерихме и при настоящото изследване на пациентки с инфертилитет и едновременно повишение на нивата на aPL и АТА. По време на един хроничен имунологичен дисбаланс, какъвто наблюдаваме при изследваните пациентки, субпопулация от тромбоцити се намира в хиперреактивно състояние, т.е. те могат да генерират прокоагулантни медиатори при минимален стимул. Част от циркулиращите тромбоцити са активирани, експресират висок брой адхезионни молекули и се свързват с други тромбоцити, моноцити и неутрофили. При тези условия засиленото формиране на хомо- и хетеротипни агрегати обуславя ускорен процес на тромбообразуване.

В заключение, АТА биха могли да изпълняват роля на благоприятстващ фактор за възникване на тромботично събитие при aPL-позитивни пациенти. PLA са подходящ маркер за оценка на прокоагулантното състояние на организма. Необходимо са допълнителни и подробни проучвания, които да потвърдят нашите първоначални наблюдения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Meroni PL, Riboldi P. Pathogenic mechanism of antiphospholipid syndrome: a new autoimmune disease. *Drug Disc Today*. 2004;1:309-3016.
2. Coulam C, N Hemenway. Immunology may be key to pregnancy loss. Last Updated: July 15, 2005:1-6.
3. Li N, Hu H, Lindqvist M et al. Platelet-Leukocyte Cross Talk in Whole Blood. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2000;20:2702-2708.
4. Evangelista V, Manarini S, Dell'Elba G et al. Clopidogrel inhibits platelet-leukocyte adhesion and platelet-dependent leucyte activation. *Thromb Haemost*. 2005;94:568-577.
5. Furman MI, Barnard MR, Krueger LA et al. Circulating monocyte-platelet aggregates are an early marker of acute myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2001;38:1002-1006.
6. Htun P, Fateh-Moghadam S, Tomandl B et al. Course of Platelet Activation and Platelet-leukocyte Interaction in Cerebrovascular Ischemia. *Stroke*. 2006;37:2283-2287.
7. Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larran A, Reverter J et al. Increased platelet and leukocyte activation as contributing mechanisms for thrombosis in essential thrombocythemia and correlation with JAK2 mutational status. *Haematologica*. 2006;91:169-175.
8. Falanga A, Marchetti M, Evangelista V et al. Polymorphonuclear leucocyte activation and hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood*. 2000;96(13):4261-4266.
9. Joseph JE, Harrison P, Mackie IJ et al. Increased circulating platelet-leukocyte complexes and platelet activation in patients with antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Br. J. Haematol*. 2001;115(2):451-459.
10. Ashman N, Macey M, Fan S. Increased platelet – monocyte aggregates and cardiovascular disease in end – stage renal failure patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2003;18:2088 – 2096.

11. Forastiero R, Martinuzzo M, Adamczuk Y et al. The combination of thrombophilic genotypes is associated with definite antiphospholipid syndrome *Haematologica*. 2001;86(7):735-741.

12. Fishetti F, Durigutto P, Pellis V et al. Thrombus formation induced by antibodies to β 2-glycoprotein I is complement dependent and requires a priming factor. *Blood*. 2005;106(7):2340-2346.

ОПРЕДЕЛЯНЕ НИВА НА ТРОМБОЦИТНО-ЛЕВКОЦИТНИ АГРЕГАТИ ПРИ ЖЕНИ С ИНФЕРТИЛИТЕТ, ПРИДОБИТИ ТРОМБОФИЛИЧНИ ФАКТОРИ И АНТИТИРЕОИДНИ АНТИТЕЛА

Г. Велева, Цв.Луканов, П. Петрова, Е. Конова

*Секция по клинична имунология,
Медицински университет, Плевен, България*

РЕЗЮМЕ.

Въведение: Не всички пациенти с антифосфолипидни антитела (aPL) развиват антифосфолипиден синдром (APS), което дава основание да се смята, че за изявата на клиничните черти значение има участието на допълнителни фактори. Такъв спомагач фактор биха могли да бъдат други автоантитела и по-специално антитиреоидни автоантитела (ATA). През последните години интересът на много автори е насочен към тромбоцитно-левкоцитните агрегати (PLA) – хетеротипни клетъчни комплекси, в границите на които взаимодействието между двата типа клетки повлиява функцията им при участието в процесите на хемостаза и възпаление. Интерес представляват възможностите за използване на PLA като прогностичен маркер при жени с репродуктивни неуспехи и тромбофилични фактори.

Цел: Да се определят нива на PLA при жени с анамнеза за репродуктивни неуспехи, доказани придобити тромбофилични фактори (антифосфолипидни антитела) и повишени нива на ATA.

Пациенти и методи: Изследвани са 32 пациентки с анамнеза за репродуктивни неуспехи, доказани придобити тромбофилични фактори (антифосфолипидни антитела) и повишени нива на ATA. Контролната група включва 18 клинично здрави жени без данни за репродуктивни неуспехи. Нива на PLA са определени от цяла кръв с флоуцитометричен метод чрез експресия на антигените CD41a и CD11b.

Резултати: Повишени нива на PLA бяха установени при 28 (87,5%) от пациентките. 4 (12,5%) от пациентките бяха с нива на PLA, съизмерими с тези при контролната група.

Заклучение: ATA биха могли да изпълняват роля на благоприятстващ фактор за възникване на тромботично събитие при aPL-позитивни пациенти. PLA са подходящ маркер за оценка на прокоагулантното състояние на организма.

Ключови думи: Антитиреоидни антитела, инфертилитет, флоуцитометрия, тромбоцитно-левкоцитни агрегати.

Адрес за кореспонденция:

Плевен, 5800, ул. „Ген. Владимир Вазов“ №91,

II Клинична база, МДЛ по имунология

Тел.: 064/886-778; 0888/205-976, Fax 064/802-773

e-mail: galenalv@mail.bg

Лице за кореспонденция: д-р Галина Велева

DETECTION OF PLATELET-LEUKOCYTE AGGREGATE LEVELS IN
WOMEN WITH INFERTILITY, ACQUIRED THROMBOPHILIC FACTORS
AND ANTITHYROID ANTIBODIES

G. Veleva, T. Lukanov, P. Petrova, E. Konova
Clinical Immunology section,
Medical University, Pleven, Bulgaria

ABSTRACT

Introduction: Not all patients with antiphospholipid antibodies (aPL) develop antiphospholipid syndrome (APS), which gives a reason to believe that the clinical presentation depends also on other factors. Such factors might be other antibodies and especially the antithyroid ones (ATA). In the last several years the interest of different authors has been focused upon the platelet-leukocyte aggregates (PLA) – heterotypical cell complexes, in which the interactions between both cell-types influence their functions in hemostasis and inflammation. The possibility of using the PLA as prognostic markers of reproductive failure and thrombophilic factors is of specific interest.

Aim: To monitor the levels of PLA in women with previous history of reproductive failure, acquired thrombophilic factors (antiphospholipid antibodies) and positive ATA.

Patients and methods: 32 patients with previous history of reproductive failure с анамнеза за репродуктивни неуспехи, acquired thrombophilic factors (antiphospholipid antibodies) and positive ATA. The control group was comprised of 18 healthy women without previous history of infertility. The levels of PLA were detected in whole blood by flow cytometry by the means CD41a and CD11b expression.

Results: Elevated PLA were detected in 28 (87,5%) patients. 4 (12,5%) patients had PLA levels as the ones in the control group.

Conclusion: ATA might be a predisposing factor for the development of a thrombotic event in aPL-positive patients. PLA are a convenient marker for the evaluation of the human procoagulant state.

Key words: antithyroid antibodies, infertility, flow cytometry, platelet-leukocyte aggregates

IL-2/IL-4 ДИСБАЛАНС ПРИ ПАЦИЕНТИ С БОЛЕСТТА НА БАЗЕДОВ И ВРЪЗКАТА МУ С ПРОГРЕСИЯ НА ЗАБОЛЯВАНЕТО

Кр. Халачева, Ж. Геренова***

ВЪВЕДЕНИЕ

Болезтта на Базедов е автоимунно заболяване, манифестиращо се с хипертиреоидизъм като резултат от продукцията на автоантитела срещу рецептора за тиреоид стимулиращия хормон [1]. Нарушената функция на имунната система при пациенти с болестта на Базедов включва и промени в продукцията на различни разтворими медиатори на имунната функция като цитокини. Цитокините регулират възпалителната реакция при базедовата болест чрез активиране на Т и В лимфоцитите, което води до продукцията на антитела и тъканна увреда [2,3]. Th1 лимфоцитите секретират интерферон-гама (IFN- γ), интерлевкин-2 (IL-2), активират моноцитите, спомагат за развитието на клетъчния имунитет и процесите на цитотоксичност. Th2 лимфоцитите секретират IL-4, IL-5, IL-10, стимулират хуморалния имунитет и водят до продукция на автоантитела.

Съвременните проучвания показват важната роля на промяната в баланса на цитокините с Th1 и Th2 произход в патогенезата на автоимунните тиреоидни заболявания [4]. Установена е нарушена продукция на IL-2 и IL-4 при базедова болест, но данните по отношение на техния баланс са противоречиви [5, 6, 7, 8].

Тиреостатичното лечение потиска хипертиреоидната симптоматика при почти всички пациенти с базедова болест. Схващанията за имуномодулиращото действие на тиреостатиците се базира предимно на ин витро постановки [9]. Изучаване на динамиката на цитокиновите серумни нива би допринесло за задълбочаване на познанията на имунните механизми на заболяването, както и за разработване на алтернативни методи за лечение на базедовата болест на базата на цитокинови антагонисти.

Целта на настоящото проучване е да се проследи динамиката на серумните нива на IL-2 и IL-4 при пациенти с базедова болест преди, по време и след спиране на тиреостатичното лечение с метимазол. Допълнително анализирахме промените в серумните нива на цитокините според ефекта от тиреостатичното лечение и настъпването на рецидив или ремисия на заболяването.

Материали и методи

Изследвани бяха 30 пациенти с базедова болест, разделени ретроспективно на две групи – 14 с дълготрайна ремисия след тиреостатичната терапия и 16 с релапс на хипертиреоидизма след спиране на лечението. 25 здрави донори послужиха като контроли. Стойностите на IL-2 и IL-4 при пациентите бяха определени

*Катедра по молекулярна биология и имунология, Медицински факултет, Тракийски университет, Стара Загора.

**Клиника по ендокринология, Университетска болница, Медицински факултет, Тракийски университет, Стара Загора.

(i) при поставяне на диагнозата, (ii) 6 месеца след старта на терапията с метимазол и (iii) два месеца след спиране на терапията.

Диагнозата базедова болест се постави на основата на повишени серумни нива на тиреоидните хормони (FT3, FT4), при супресия на TSH ($TSH < 0.35$ mUI/ml; наличие на поне един от следните показатели: повишени серумни нива на TRAb, анти-TPO, ехографски данни за хипоехогенна структура на щитовидната жлеза. Лечението се проведе с метимазол в начална дневна доза 30-40 мг, която се понижава според нивата на тиреоидните хормони. Тиреостатичното лечение е прекратявано след двукратно нормални стойности на нивото на TSH през тримесечен интервал, но не по-рано от 18 месеца от началото на лечението или независимо от стойността му 24 месеца от започването му.

Серумните цитокинови нива бяха определени чрез имуноензимен метод (ELISA) с готови набори на фирмата Biosource (Cytoscreen Immunoassay kit) съгласно инструкциите на производителя.

Резултатите са обработени с компютризирана програма „Statistics for Windows“. Използвани са дескриптивна статистика, Mann-Whitney U test, дисперсионен анализ (F-тест), регресионен анализ (stepwise backward multiple regression analysis). Статистическа достоверност е приемана при $p < 0.05$.

Резултати

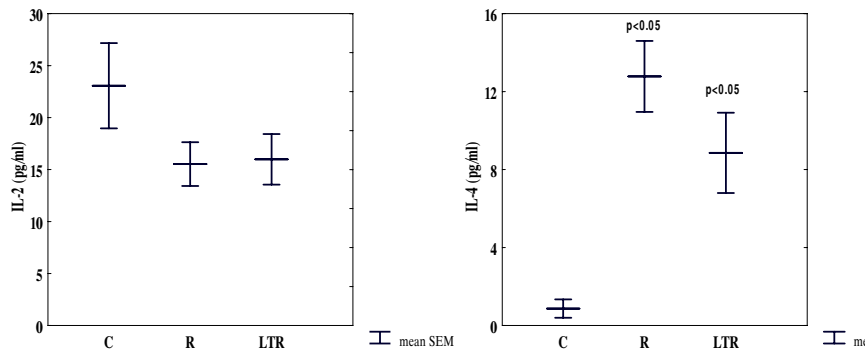
Пациентите с базедова болест и в двете изследвани групи преди започване на терапията демонстрираха сигнификантно повишени стойности на IL-4 и понижени нива на IL-2 в сравнение със здравите контроли (фиг. 1).

Серумните нива на IL-4 при пациенти с ремисия по време и след тиреостатичното лечение останаха по-високи спрямо тези на здравите контроли ($p < 0.05$), но показаха тенденция за понижение в хода на прилаганата терапия (фиг.2). Обратно на това, IL-2 показва статистически значима тенденция за повишаване на серумните нива в хода на прилаганото лечение (фиг. 2).

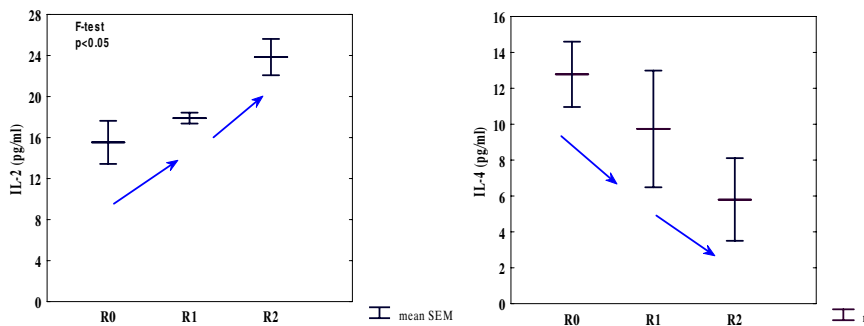
Пациентите с релапс на хипертиреоидизма показаха сигнификантно повишени нива на IL-4 и сигнификантно ниски стойности на IL-2, измерени 2 месеца след спиране на лечението, в сравнение с пациентите в ремисия (фиг. 3). Динамиката на серумните нива на IL-2 показва сигнификантни различия в стойностите преди, по време на и след спиране на терапията (F-test). Серумните нива на IL-2, измерени два месеца след спиране на антитиреоидната терапия, корелират сигнификантно с отговора към приложената терапия (зависима вариабилна) (stepwise backward multiple regression analysis).

Обсъждане

Резултатите от нашето проучване показват различия в динамиката на IL-2 и IL-4 при пациенти с ремисия и рецидив на заболяването. Пациентите с базедова болест и в двете изследвани групи преди започване на терапията демонстрираха сигнификантно повишени стойности на IL-4. IL-4 е един от главните цитокини на Th2-имунния отговор и по литературни данни се открива повишен при почти всички пациенти с базедова болест [2, 6, 8, 10]. Различията в серумните нива на IL-4, които наблюдавахме между пациенти с рецидив и ремисия, стават особено изразени 2 месеца след спиране на лечението. Това доказва, че в хода на провежданото

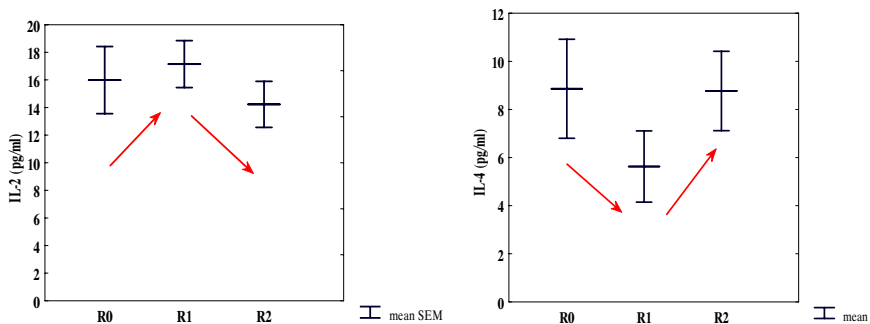


Фиг. 1. Сравнителен профил на инициалните стойности на IL-2 и IL-4 в контроли (C); пациенти с релапс на заболяването (R) и пациенти с дълготрайна ремисия (LTR).



Фиг. 2. Динамика на серумните нива на IL-2 и IL-4 при пациенти с ремисия на заболяването.

R0 – инициални стойности преди старта на терапията
 R1 – 6 месеца след прилагане на терапията
 R2 – 2 месеца след спиране на терапията



Фиг. 3. Динамика на серумните нива на IL-2 и IL-4 при пациенти с релапс на заболяването.

R0 – инициални стойности преди старта на терапията
 R1 – 6 месеца след прилагане на терапията

лечение съществува различие в динамиката на IL-4 при различните пациенти, което е показател за различен терапевтичен отговор.

Серумните нива на IL-2 – един от главните цитокини, участващи в Th1-имунния отговор [6, 11, 12], също бележат динамика в хода на провежданото тиреостатично лечение. При пациенти с рецидив на заболяването нивата на IL-2 се задържат в стойности, близки до изходните, а при тези с ремисия те се повишават трайно и достигат стойности както при здравите лица. При пациентите с ремисия на заболяването IL-2 отразява както възстановяването на еутиреоидното състояние, така и промяната на цитокиновата характеристика към Th1 имунен отговор.

В заключение нашите проучвания демонстрират дисбаланс на основните Th1 и Th2 цитокини в посока на Th2-имунен отговор при пациенти с базедова болест. Промените в серумните нива на цитокините се различават при пациенти с релапс и ремисия и измерването им може да бъде полезно за оценка за клинично изявен релапс на заболяването. На базата на проследяване на цитокиновия профил на пациентите с базедова болест те могат да се разделят на „респондери“ и „нереспондери“ на класическите тиреостатици. Пациентите, неотговарящи на лечението с тироурацилови препарати, биха били подходящи за алтернативна схема на лечение с цитокинови антагонисти.

ЛИТЕРАТУРА

1. Weetman AP, McGregor AM. Autoimmune thyroid disease: further developments in our understanding. *Endocrinol Rev* 1994; 6: 788-830
2. Ajjan RA, Watson PF, Weetman AP. Cytokines and thyroid function. *Adv Neuroimmunol* 1996; 6: 359-386.
3. Ajjan RA, Wetmann AP. Cytokines in thyroid autoimmunity. *Autoimmunity* 2003;36:351-359.
4. Guo J, Rapaport B, McLachlan S. Balance of Th1/Th2 Cytokines in Thyroid Autoantibody Synthesis in vitro. *Autoimmunity* 1999; 30: 1-9.
5. Watson PF, Pickerill AP, Davies R, Weetman AP. Analysis of cytokine gene expression in Graves' disease and multinodular goiter. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 355-360
6. Heurer M, Aust G, Ode-Hakim S, Scherbaum WA. Different cytokine mRNA profile in Graves' disease, Hashimoto thyroiditis and non-autoimmune thyroid disorders determined by RT-PCR. *Thyroid* 1996; 6: 97-105.
7. Kallman BA, Huther M, Tubes M et al. Systemic bias of cytokine production toward cellular mediated immune regulation in IDDM and toward humoral immunity in Graves' disease. *Diabetes* 1997; 46:237-243
8. Roura-Mir C, Catalfamo M, Sospedra M et al. Single-cell analysis of intrathyroidal lymphocytes shows differential cytokines expression in Hashimoto thyroiditis and Graves' disease. *Eur J Immunol* 1997; 27: 3290-3302.
9. Volpe R. Evidence that the immunosuppressive effects of antithyroidal are mediated through actions on the thyroid cell, modulating thyrocyte-immunocyte signaling. *Thyroid* 1994; 4: 217-223
10. Hirooka, Y, Kayma M, Ohga S et al. Deregulated production of Interleukin 4 in autoimmune thyroid disease assayed with a new radiassay. *Clin Chim Acta* 1993; 216: 1-10.
11. Eisenstein Z, Engelsman E, Weiss M et al. Modulation of the IL-12 production defect in vitro in Graves' disease. *Clin Exp Immunol* 1994; 96: 323-328
12. Weetman AP. Cellular immune response in autoimmune thyroid disease. *Clin. Endocrinol* 2004;61:405-413

IL-2/IL-4 ДИСБАЛАНС ПРИ ПАЦИЕНТИ
С БОЛЕСТТА НА БАЗЕДОВ И ВРЪЗКАТА МУ
С ПРОГРЕСИЯ НА ЗАБОЛЯВАНЕТО

Кр. Халачева*, Ж. Геренова**

**Катедра по молекулярна биология и имунология,*

***Клиника по ендокринология, Университетска болница,
Медицински факултет, Тракийски университет, Стара Загора*

Резюме. Съвременните проучвания показват важната роля на промяната в баланса на цитокините с Th1 и Th2 произход в патогенезата на автоимунните тиреоидни заболявания. Установена е нарушена продукция на IL-2 и IL-4 при базедова болест, но данните по отношение на техния баланс са противоречиви.

Целта на настоящото проучване е да се проследи динамиката на серумните нива на IL-2 и IL-4 при пациенти с базедова болест преди, по време и след спиране на тиреостатичното лечение с метимазол. Анализирахме допълнително промените в серумните нива на цитокините според ефекта от тиреостатичното лечение и настъпването на рецидив или ремисия на заболяването.

Изследвани бяха 30 пациенти с базедова болест (14 с дълготрайна ремисия и 16 с релапс на хипертиреозидизма след спиране на лечението) и 25 здрави контроли. Стойностите на IL-2 и IL-4 при пациентите бяха определени (i) при поставяне на диагнозата, (ii) 6 месеца след старта на терапията с метимазол и (iii) два месеца след спиране на терапията, чрез имуноензимен метод (ELISA) с готови набори на фирмата Biosource (Cytoscreen Immunoassay kit).

Пациентите с базедова болест демонстрираха сигнификантно повишени стойности на IL-4 и понижени нива на IL-2 в сравнение със здравите контроли. Пациентите с релапс на хипертиреозидизма показаха сигнификантно повишени нива на IL-4 и сигнификантно ниски стойности на IL-2, измерени 2 месеца след спиране на лечението в сравнение с пациентите в ремисия.

В заключение нашите проучвания демонстрират дисбаланс на основните Th1 Th2 цитокини в посока на Th2 имуноен отговор при пациенти с базедова болест. Промените в серумните нива на цитокините се различават при пациенти с релапс и ремисия и измерването им може да бъде полезно за оценка за клинично изявен релапс на заболяването.

Ключови думи: болест на Базедов, IL-2, IL-4

e mail: khalacheva@mf.uni-sz.bg

IL-2 / IL-4 IMBALANCE IN PATIENTS WITH VON BASEDOW DISEASE
AND ITS ASSOCIATION WITH DISEASE PROGRESSION

Kr. Halacheva*, J. Gerenova**

**Department of Molecular Biology and Immunology;*

***Department of Endocrinology, University Hospital, Faculty of Medicine,
Thracian University, Stara Zagora*

Abstract. Recent studies have revealed the crucial role of the imbalance in Th1 and Th2 cytokines in the pathogenesis of autoimmune thyroid diseases. Some authors have found altered IL-2 and IL-4 production in von Basedow – Graves' disease but the data concerning IL-2 / IL-4 imbalance remain controversial.

The aim of our study was to follow the changes in the serum levels of IL-2 and IL-4 in patients with von Basedow – Graves' disease before, during and upon cessation of thyrostatic treatment with metimazol treatment – in accordance with the drug effect, disease recurrence and remission.

We investigated 30 patients with von Basedow – Graves' disease (14 with long-standing remission and 16 with recurrent hyperthyroidism upon drug cessation) and 25 healthy control subjects. In patients with autoimmune thyroid disease IL-2 and IL-4 levels were determined in the following time-points: (i) at the diagnosis; (ii) on month 6 of metimazol treatment; (iii) two months after the cessation of metimazol, using an ELISA method (Cytoscreen Immunoassay kit, Biosource).

In patients with von Basedow – Graves' disease we found significantly increased IL-4 and significantly decreased IL-2 levels compared to healthy controls. The patients with recurrence of hyperthyroidism had significantly elevated IL-4 and significantly decreased IL-2 levels two months after the cessation of metimazol compared to the patients in remission.

In conclusion, the results of our study reveal imbalance in Th1 and Th2 cytokines towards Th2-mediated immune response in patients with von Basedow – Graves' disease. There are significant differences in the changes in serum IL-2 and IL-4 levels between patients with recurrence and remission of hyperthyroidism and their evaluation could contribute to the diagnosis of clinically manifested disease relapse.

Key words: Basedow's disease, IL-2, IL-4

e mail: khalacheva@mf.uni-sz.bg

ВЪНШНА ОЦЕНКА НА КАЧЕСТВОТО – СХЕМИ 1, 2 И 3: ИМУНОГЛОБУЛИНИ, КОМПЛЕМЕНТ, С-РЕАКТИВЕН ПРОТЕИН, АВТОАНТИТЕЛА, HLA-B27. СРАВНИТЕЛЕН АНАЛИЗ НА ДАННИТЕ ЗА 2006/2007 г.

А. Михайлова, П. Бонева, Е. Наумова

*Централна лаборатория по клинична имунология,
МБАЛ „Александровска“, София*

ВЪВЕДЕНИЕ

През последните години както лабораториите, така и акредитационните органи все повече разбират значението на качествения контрол за демонстриране и оценка на възможностите на дадена лаборатория за специфични измервания, тествания и анализи. Системното и регулярно участие в организирани програми за външна оценка на качеството (ВОК) води до намаляване на междулабораторните вариации и стандартните отклонения за съответните проби (1, 2, 3) и до значимо подобряване на качеството на изследванията (3, 4, 5, 6) и съвпадението на резултатите между отделните лаборатории (7). Ето защо външният качествен контрол трябва да бъде неразделна част от политиката за качествен контрол на всяка медико-диагностична лаборатория. Днес ВОК е основна част и от акредитационната процедура. Провеждането на междулабораторен сравнителен контрол по флоуцитометрично определяне на лимфоцитни популации през 2004 г. постави началото на организирана програма за ВОК по имунология в България. През 2005 г. започна ВОК на показатели от хуморалния имунен отговор, включваща няколко схеми. Участниците могат да се регистрират за схеми по избор, както и за отделни или за всички параметри от дадена схема. В настоящата статия е направен сравнителен анализ на резултатите от междулабораторния качествен контрол на показатели от хуморалния имунен отговор, проведен през 2006 и 2007 г. Допълнително са представени данните от въведената през 2006 г. ВОК за определяне на HLA-B27.

МАТЕРИАЛ, МЕТОДИ И РЕЗУЛТАТИ

Схема 1: имуноглобулини, комплемент, С-реактивен протеин (СРП)

През 2006 г. в тази схема за качествен контрол са взели участие 20 лаборатории, а през 2007 г. броят им е нараснал на 26. Проведени са 4 цикъла за 2006 г. и 3 – за 2007 г., с по две проби на цикъл.

Имуноглобулини, комплемент

В схема 1 за показателя имуноглобулини (ИгА, ИгГ и ИгМ) са участвали всички регистрирани за ВОК лаборатории, но 3 от тях не са определяли С3 и С4 фракции на комплемента. Използваните методи са: радиална имунодифузия (РИД) с плаки от два производителя, нефелометрия (НМ) и турбидиметрия (ТД). Относителният дял на лабораториите, използващи РИД, е най-голям и постоянен в го-

дините (2006 г. – 55%; 2007 г. – 54%). Нарастването на броя участници, прилагащи турбидиметрични методи, и константният брой на тези с нефелометрични методи водят до инвертиране на съотношението между двата метода през 2007 г. (НМ – 19%; ТД – 27%) в сравнение с 2006 г. (НМ – 25%; ТД – 19%).

Разглеждането на индивидуалните стойности по параметри показва, че повечето лаборатории дават резултати в границите на вариации, определени от INSTAND. Най-значими отклонения (табл.1) се установяват за ИгГ (под долна граница) и за С4 фракцията на комплемента (над горна граница). Анализът на тези резултати показва, че за ИгГ по-ниски от допустимите стойности се наблюдават при пробите с висока консенсусна концентрация (табл. 2), като за някои от тях девиациите достигат до –57,14% от прицелната стойност. За разлика от това, отклоненията за С4 фракцията на комплемента са над приетата горна граница (табл. 3) и се наблюдават в 87,5% (7/8) от пробите през 2006 г. и в 75% (3/4) от тези през 2007 г. Независимо от това като цяло през 2007 г. се установява намаляване на процента неприемливи резултати в сравнение с 2006 г. (табл. 1). Съпоставянето на данните в зависимост от използваните методи показва, че повече и по-значими отклонения от приетите граници на вариации продължават да се наблюдават при радиалната имунодифузия. Лабораториите, използващи автоматизирани методи, показват единични незначителни отклонения, поради което имат в по-голяма степен приемливи резултати. Единични участници продължават да представят резултатите като „>“ или „<“ от дадена стойност. Наблюдават се и стойности, различаващи се десетократно от консенсусните, което най-вероятно се дължи на размяна на резултатите за ИгА с тези за ИгГ при попълването на окончателните данни (табл. 4).

С-реактивен протеин (СРП)

В качествения контрол по този показател през 2006 г. са участвали 16, а през 2007 г. 19 лаборатории. Използвани са 4 метода: турбидиметрични (47,4%), латекс-аглутинационни (31,5%), нефелометрични (15,8%) и радиална имунодифузия (5,3%). Индивидуалните лабораторни стойности за СРП продължават да варират в много широки диапазони (табл. 5). Латекс-аглутинационните методи, използвани от 6-ма участници, показват най-значими девиации при количествено определяне на СРП, а някои лаборатории представят резултатите като отрицателни или положителни (в различна степен). Лабораториите, прилагащи автоматизирани методи, дават като цяло резултати в допустимите граници на вариации, а отклоненията не са така значими.

Схема 2: Автоантитела

Схемата, предназначена за определяне на различни автоантитела в серум, е разделена на отделни подсхеми, провеждани еднократно за годината с по две проби за съответния показател.

Схема 2А: Антинуклеарни антитела (АНА) и анти-ДНК антитела

През 2006 г. в тази подсхема са участвали 16 лаборатории за двата и 1 за един (АНА) от показателите. Девет от тях са използвали индиректна имунофлуоресценция (ИИФ), а 8 – имуноензимен метод (ИЕМ) за определяне на АНА. Имуноензимният тест за изследване на анти-ДНК антитела е предпочитан от повече

то участници (12/16; 75%). Две лаборатории са използвали ИИФ с *Crithidia luciliae* и 2 – радиоимунологичен метод.

Двете проби имат следните характеристики:

Проба 1: Серумът е на пациентка с първична билиарна цироза, разреден 1:3 с говежди серум. При ИИФ се наблюдава нуклеарно точковидно светене, причинено от антитела срещу разтворим ядрен протеин SP 100. Този вид флуоресценция е установен само от 3 лаборатории (33,3%), използващи ИИФ. Пет (55,6%) от участниците са открили слабото митохондриоподобно светене, характерно за този серум. Две лаборатории са определили некоректно типа светене: едната като хомогенно мембранно, а другата като едро-зърнисто (анти-U1snRNP). Отнесен към консенсуса на INSTAND ($\geq 1/320$), титърът на антителата е коректен за половината участници (фиг. 1). Четири лаборатории определят титър 1/160, който би могъл да бъде приемлив като резултат. Нито един от участниците, използващи ИЕМ, не е успял да установи реактивността срещу SP 100. Резултатите съответстват на данните от INSTAND, според които над 50% от участниците, прилагащи методи, различни от ИИФ, дават отрицателен резултат за АНА. Пробата не съдържа анти-ДНК антитела. Коректен резултат за този показател е даден от 93,75% от лабораториите независимо от използвания метод. Само един участник е определил некоректно пробата (положителна за анти-ДНК антитела чрез ИЕМ).

Проба 2: Серумът е на пациентка със СЛЕ, разреден 1:8 с говежди серум. При използване на Нер-2 клетки е наблюдавано хомогенно светене, дължащо се на антитела срещу ДНК. Тази специфичност е установена от всички лаборатории независимо от използвания метод. Коректният според INSTAND титър на АНА е $\geq 1/80$ и е определен приемливо от болшинството (88%) участници (фиг. 1).

Схема 2Б: Антитела срещу U1nRNP, Sm, SSA, SSB, Scl70, Jo1

През 2006 г. в тази подсхема са участвали 14 лаборатории, като осем от тях са определяли всички показатели. Имуноензимният метод е предпочитан от повечето участници (85,7 %). Две лаборатории са използвани Western blot.

Пробите са със следните характеристики:

Проба 1: Серумът е от пациентка със смесена съединителнотъканна болест. Разреден е 1:4 с говежди серум, поради което съдържа нискотитърни антитела срещу U1nRNP и SS-A/Ro-52 антигени. Откриват се и антитела срещу двойноверижна ДНК, които не се изследват в тази схема на ВОК. Всички участници са оценили приемливо нивото на анти-RNP антителата (≥ 1) независимо от използвания метод (фиг. 2). Ниският титър на анти-Ro-52 антителата е причина за несъответствие в резултата между референтните лаборатории на INSTAND. Поради това всички резултати (0) се приемат от INSTAND за коректни. Една лаборатория установява в тази проба допълнителна реактивност към Sm и Jo-1, а друга – към SSB/La антигени.

Проба 2: Пробата, разредена 1:4 с говежди серум, е на пациентка със СЛЕ и показва фино зърнисто светене при индиректна имунофлуоресценция, дължащо се на антитела към SSA/Ro (Ro52, Ro60) и SSB/La. Двете референтни лаборатории определят анти-SSA и анти-SSB специфичностите като ясно положителни при използване на различни методи. Резултатите се приемат от INSTAND за коректни при оценка ≥ 2 за реактивността срещу SSA и ≥ 1 за тази към SSB. Всички лабора-

тории са оценили коректно анти-La антителата (фиг. 3). Десет лаборатории (77%) са дали приемливи резултати за анти-Ro реактивността, но 3 (23%) са посочили гранични стойности (оценка 1). Лабораторията, определила проба 1 като положителна за анти-Jo-1 антитела, открива тази специфичност и в проба 2.

Схема 2В: Анти-неутрофилни цитоплазмени антитела (ANCA)

Подсхемата е включена във ВОК през 2006 г. и за първата година в нея са участвали 12 лаборатории, като 4 са използвали ИИФ за определяне на ANCA, 5 – имуноензимни методи за изследване на антитела срещу протеиназа-3 (PR3) и миелопероксидаза (MPO), а 2 са прилагали и двата метода. През 2007 г. броят на участниците се е увеличил (n=17), с преобладаване на ИЕМ спрямо ИИФ (8 vs. 4). Четири лаборатории са определяли както ANCA с ИИФ, така и антитела срещу протеиназа-3 и миелопероксидаза чрез ИЕМ.

Пробите са със следните характеристики:

Проба 1/2006 г.: Материал от плазмафереза на пациент с бързо прогресиращ гломерулонефрит. Пробата е неразредена и съдържа високи титри анти-GBM антитела. ANCA не се откриват нито с ИИФ, нито със специфични за PR3 и MPO тестове. Отрицателен за ANCA резултат е даден от всички лаборатории.

Проба 2/2006 г.: Пробата е идентична с проба 1. Резултатите съответстват на тези за проба 1.

Проба 1/2007 г.: Пробата и резултатите са идентични с проби 1 и 2 от 2006 г.

Проба 2/2007 г.: Серумът е на пациент с Вегенерова грануломатоза и съдържа високи титри антитела към PR3 (оценка ≥ 1), причина за ясното цитоплазмено светене (cANCA, титър ≥ 80) на ИИФ. В зависимост от използвания метод пробата е оценена коректно за вид флуоресценция, титър ($\geq 1/320$) и/или реактивност към PR3 от всички участници.

Схема 3: Определяне на HLA-B27

В края на 2006 г. се проведе пилотен качествен контрол за определяне на HLA-B27 антиген, оформен впоследствие като схема 3 на националната система за ВОК по имунология. Проведени бяха 2 цикъла с по пет проби (един за 2006 г. и един за 2007 г.). В тях взеха участие 14 лаборатории: 6 от България и 8 от балкански страни (Гърция – 4, Румъния – 2, Кипър – 1, и Турция – 1), включени в Регион 8 на Европейската федерация по имуногенетика (EFI). Характеристиката на пробите, е представена в таблица 6. Освен положителни и отрицателни за HLA-B27 проби бяха включени и такива с кръстосано реагиращи антигени (HLA-B7 и B40). Използвани са флуцитометрични (ФЦ – 43%), серологични (лимфоцитотоксичен тест, ЛЦТ – 36%) и молекулярно-биологични (21%) методи. През 2006 г. всички участници определят коректно пробите, но през 2007 г. 92,8% от резултатите са коректни. Интересно е да се отбележи, че наблюдаваните несъответствия и проблеми са свързани с едни и същи проби (табл. 7). Една лаборатория при ФЦ определя дава отрицателен резултат за HLA-B27 положителната проба 01 и невалиден резултат за две проби (03 – HLA-B27 негативна, HLA-B7 позитивна и 05 – HLA-B27 положителна). Друга, използваща ДНК техника, съобщава за недостатъчно количество проба 01. Трета лаборатория, използваща ЛЦТ, не е тествала проба 05 поради липса на живи клетки.

ОБСЪЖДАНЕ

Проведеният междулабораторен контрол на качеството в имунологията на национално ниво показва увеличаване на броя участници в схемите за хуморалните фактори на имунния отговор през 2007 г. в сравнение с 2006 г. Програмата за ВОК бе разширена с включване на нови тестове (ANCA, HLA-B27) с диагностично значение. Наблюдаваното намаляване на неприемливите резултати за имуноглобулини и фракции на комплемента е показател за подобряване на работата и аналитичните възможности на участващите лаборатории, което съответства на данните на други автори (5, 6). Персистира обаче значителният дял на отклонения за ИгГ под долна допустима граница при проби с високи концентрации (ИгГ ≥ 21 г/л). Обратно, все още не малък процент са и определените по-високи стойности на комплемент С4 за серуми с понижена концентрация на тази съставка. Отклонения от допустимите от INSTAND граници на вариации в схема 1 могат да се обяснят с използването на различни техники. Представянето на резултати за имуноглобулините и фракциите на комплемента като „<“ или „>“ от определена стойност се дължи на ограниченията на методите. За нуждите на диагностичния процес такива резултати могат да бъдат приемливи и информативни, но не могат да бъдат адекватно оценени при ВОК поради липса на точна количествена стойност. Те биха могли в еднаква степен да се приемат за коректни или некоректни, което противоречи на принципите на ВОК. Най-големи вариации в схема 1 са наблюдавани за С-реактивен протеин. Полуколичествените латекс-аглутинационни методи с екстраполиране на крайните разреждания в единици показват значими отклонения от допустимите граници и са изключително неточни (8). Друг проблем при тази техника е представянето на резултатите за СРП като отрицателни или положителни, поради което те не могат да бъдат адекватно оценени при ВОК. В схемата за автоантитела (АНА, анти-ДНК, ЕНА профил, ANCA) се наблюдава много добра съпоставимост между резултатите на участниците. При имунофлуоресцентно определяне на АНА титрите варират в широки диапазони за една и съща проба, като се наблюдава тенденция за по-ниска количествена оценка вероятно поради използването на различни субстрати и антитела. Хомогенният профил на АНА се определя коректно от всички участници, но малко от тях (33,3%) успяват да дефинират точковидното ядро на светене, дължащо се на антитела към SP 100. Подобни резултати от определяне на АНА са наблюдавани и в други програми за ВОК (9, 10). Имуноензимните методи са с ограничени възможности за откриване на редки специфичности АНА, но в повечето случаи достатъчни за изследване на клинично значими автоантитела. Приемливите резултати за анти-ДНК антитела са 93,8% за отрицателната и 100% за положителната проба. Коректното определяне на антителната специфичност на АНА е много важно за диагностичната класификация на системните автоимунни болести. В схемата за ЕНА профил всички участници откриват специфичните антитела. Различията се наблюдават при оценка на резултата – граничен, ниска или умерена концентрация на антитела за една и съща проба, установено и от други автори (9). Това би могло да се обясни с използването на китове от различни производители, съответно различни мерни единици (индекс, Е/мл и др.) и различни критерии за степенуване на положителен резултат. Откриването от единични участници на допълнителни антителни специфичности (реактивност към Sm

в анти-RNP и към SSB/La в анти-SSA/Ro позитивни проби) най-вероятно се дължи на онечиствания в антигенните препарати. Определянето на ANCA, анти-PR3 и анти-MPO антитела показва 100% коректни резултати както за положителните, така и за отрицателните проби.

При определяне на HLA-B27 лабораториите дават средно 96,4% коректни резултати за двата цикъла. Интересно е да се отбележи, че наблюдаваните несъответствия и проблеми са свързани с едни и същи проби. Невъзможността за флуоцитометрично определяне на HLA-B27 би могло да се обясни с методологичен или технически проблем, както и с наличието на кръстосано реагиращ антиген. Буди недоумение обяснението за „недостатъчно проба“ при използване на ДНК-базирани техники. Според политиката на ВОК и в двата случая пробите се приемат за нетестувани, което намалява необходимия брой изследвания за успешно участие във ВОК по този показател.

Трябва да се отбележи и съществуването на причини, характерни за самия процес на ВОК, които могат да окажат влияние върху достоверността на резултатите от качествения контрол. Например, технически и математически грешки (размяна на резултати, некоректни мерни единици и др.) при попълване на данните са вероятна причина за неприемливи стойности на единични участници в схема 1 от ВОК. Поради самата процедура на качествения контрол те се приемат за некоректни при крайната оценка на индивидуалните резултати. Освен това пробите от ВОК обикновено са обект на по-специално внимание при изследването им. Независимо от инструкциите за тестване на контролните материали чрез рутинните лабораторни методи и процедури разпространена практика е тези проби да бъдат изследвани по-обстойно – повторен анализ, тестване на материала от най-опитния или от повече лаборанти, използване на повече от един метод. Така в много случаи ВОК отразява най-добрите възможности на лабораторията, а не рутинната ѝ дейност.

Независимо от това регулярното участие в схемите на ВОК по имунология показва значимо подобряване на аналитичните възможности на лабораториите и намаляване на неприемливите резултати, което потвърждава ползата от междулабораторни сравнителни програми за качествен контрол. Организираната програма за ВОК по имунология в България дава възможност участниците да оценят предимствата и недостатъците на използваните методи и стандарти, случайните и системните грешки, квалификацията на персонала, политиките и процедурите за качествен контрол в ежедневната лабораторна дейност, при необходимост да предприемат съответни коригиращи действия, което безспорно ще подобри качеството на предлаганите медико-диагностични услуги.

Таблица 1. Средни резултати (%) извън допустимите граници на вариации

Параметър	По-високи стойности		По-ниски стойности	
	2006	2007	2006	2007
ИгА	8%	2,2%	8%	7,8%
ИгГ	7,5%	0	13%	26,6%
ИгМ	14,4%	8,9%	8%	6,7%
С3	7,4%	2,6%	10,6%	3,8%
С4	35,2%	20,5%	4,9%	3,8%

Таблица 2. Резултати за ИгГ под долна допустима граница

Проба	Лабораторни стойности	Граници на вариации
	(г/л)	(г/л)
02/2006	14,2 ÷ 18,67	21,6 ÷ 32,4
06/2006	11,5 ÷ 18,67	21,46 ÷ 32,2
02/2007	15,9 ÷ 20,8	23,3 ÷ 33,46

Таблица 3. Резултати за комплемент С4 над допустимата горна граница

Проба	Лабораторни стойности	Граници на вариации
	(г/л)	(г/л)
01/2006	0,14 ÷ 0,24	0,0368 ÷ 0,1
02/2006	0,15 ÷ 0,28	0,0626 ÷ 0,117
03/2006	0,22 ÷ 0,27	0,091 ÷ 0,169
04/2006	0,25 ÷ 0,36	0,122 ÷ 0,228
05/2006	0,10 ÷ 0,21	0,0363 ÷ 0,0676
06/2006	0,15 ÷ 0,28	0,063 ÷ 0,117
07/2006	0,17 ÷ 0,20	0,0769 ÷ 0,144
01/2007	≥ 0,1	0,0391 ÷ 0,0728
03/2007	0,24 ÷ 0,25	0,0902 ÷ 0,168
04/2007	0,19 ÷ 0,24	0,0476 ÷ 0,0884

Таблица 4. Стойности, дължащи се на вероятни технически грешки

Проба	ИГА г/л		ИГГ г/л	
	Лабораторен резултат	Допустими вариации	Лабораторен резултат	Лабораторен резултат
05/2006	8,4	1,63 ÷ 2,67	1,28	7,71 ÷ 11,58
06/2006	13,8	2,59 ÷ 4,25	2,46	21,46 ÷ 32,2
01/2007	12,5	1,67 ÷ 2,73	2,26	8,48 ÷ 12,74
02/2007	24,6	2,69 ÷ 4,41	3,14	22,3 ÷ 33,46

Таблица 5. Индивидуални лабораторни стойности на СРП за проба 03/2007*

мг/л	Метод	мг/л	Метод
36,0	Латекс аглутинация	35,0	Турбидиметрия
48,0	Латекс аглутинация	36,73	Турбидиметрия
90,4**	Латекс аглутинация	37,8	Турбидиметрия
>96,0**	Латекс аглутинация	39,22	Турбидиметрия
(++)	Латекс аглутинация	46,0	Турбидиметрия
(+++)	Латекс аглутинация	66,9**	Турбидиметрия
20,4#	Турбидиметрия	30,84	РИД
27,3#	Турбидиметрия	32,88	Нефелометрия
32,0	Турбидиметрия		

* прицелна стойност на INSTAND – 39,1 мг/л; граници на вариации: турбидиметрия – 27,7÷48,3 мг/л; други методи – 28,5 ÷ 49,7 мг/л

** – стойности над горна граница; # – стойности под долна граница

Таблица 6. Характеристика на пробите за HLA-B27

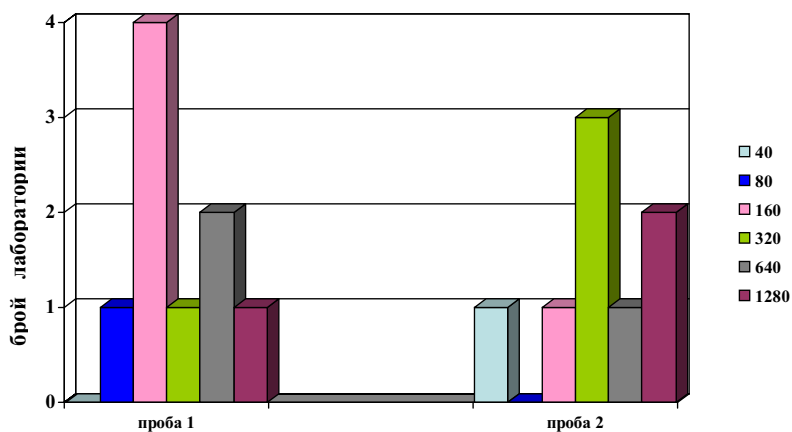
Проба	HLA-B27	HLA-B
01/06	отрицателна	B*50, *51
02/06	отрицателна	B*13, *35
03/06	положителна	B*27, *38
04/06	отрицателна	B*51, *40
05/06	отрицателна	B*18, *51
01/07	положителна	B*27, *44
02/07	положителна	B*18, *27
03/07	отрицателна	B*7, *62
04/07	отрицателна	B*18, *49
05/07	положителна	B*27, *38

Таблица 7. Несъответствия и проблеми при определяне на HLA-B27

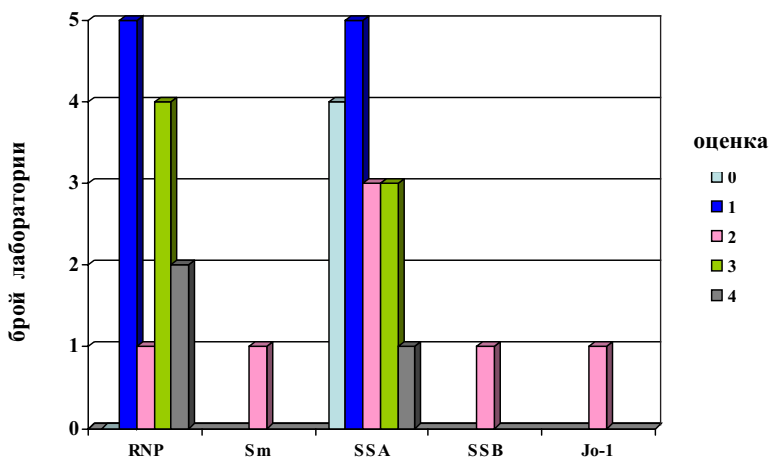
HLA-B27 Консенсус	Проба 01/07 Положителна	Проба 02/07 Положителна	Проба 03/07 Отрицателна	Проба 04/07 Отрицателна	Проба 05/07 Положителна
Лаб.# (ФЦ)	Отрицателна	Положителна	Невалиден резултат	Отрицателна	Невалиден резултат
Лаб.# (ЛЦТ)	Положителна	Положителна	Отрицателна	Отрицателна	Умрели клетки
Лаб.# (ДНК)	Недостатъчно проба	Положителна	Отрицателна	Отрицателна	Положителна

ФЦ – флоуцитометрия; ЛЦТ – лимфоцитотоксичен тест

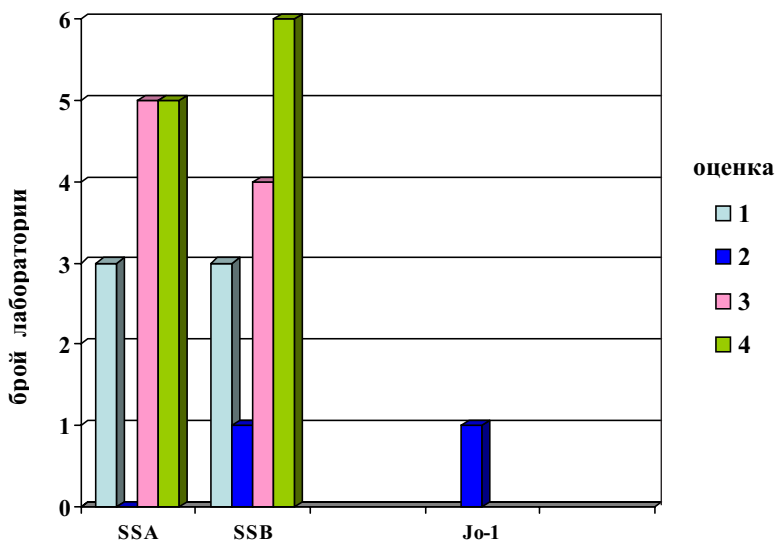
Фигура 1. Разпределение на лабораториите в зависимост от резултатите им за титър на антинуклеарни антитела



Фигура 2. Лабораторни резултати за ENA профил (схема 2Б) на проба 1



Фигура 3. Лабораторни резултати за ЕНА профил (схема 2Б) на проба 2



ЛИТЕРАТУРА

1. Hanson, D.J. Improvements in medical laboratory performance. *Postgra. Med.*, 46, 1969, 51-56.
2. Hain, R.F. Proficiency testing in the physician's office laboratory: an ounce of prevention. *S. Med. J.*, 65, 1972, 608-610.
3. Rickman, W.J., C.Monical and M.J.Waxdal. Improved precision in the enumeration and absolute numbers of lymphocyte phenotypes with long-term monthly proficiency testing. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 677, 1993, 53-58.
4. Taylor, R.N. and K.M.Fulford. Assessment of laboratory improvement by the Center for Disease Control Diagnostic Immunology Proficiency Testing Program. *J.Clin.Microbiol.*, 13, 1981, 356-368.
5. Nakamura, R.M. and J.H.Rippey. Quality assurance and proficiency testing for autoantibodies to nuclear antigen. *Arch.Pathol.Lab.Med.*, 109, 1985, 109-114.
6. Tholen, D., N.S.Lawson, T.Cohen et al. Proficiency test performance and experience with College of American Pathologists' programs. *Arch.Pathol.Lab.Med.*, 116, 1995, 307-311.
7. Stull, T.M., T.L.Hearn, J.S.Hancock et al. Variation in proficiency testing performance by testing site. *JAMA*, 279, 1998, 463-467.
8. Immunology QAP Newsletter, PCPA Quality Assurance Programs Pts Limited – Immunology, South Australia, 2006, 3-7.
9. Bizzaro, N., R.Tozzoli, E.Tonutti et al. Variability between methods to determine ANA, anti-dsDNA, and anti-ENA autoantibodies: a collaborative study with the biomedical industry. *J. Immunol. Methods*, 219, 1998, 99-107.
10. Pham, B.N., S.Albarede, A.Guyard et al. Impact of external quality assessment on antinuclear antibody detection performance. *Lupus*, 14, 2005, 113-119.

ВЪНШНА ОЦЕНКА НА КАЧЕСТВОТО –
СХЕМИ 1, 2 И 3: ИМУНОГЛОБУЛИНИ,
КОМПЛЕМЕНТ, С-РЕАКТИВЕН ПРОТЕИН,
АВТОАНТИТЕЛА, HLA-B27.
СРАВНИТЕЛЕН АНАЛИЗ НА ДАННИТЕ ЗА 2006/2007 г.
А. Михайлова, П. Бонева, Е. Наумова
Централна лаборатория по клинична имунология,
МБАЛ „Александровска“, София

Резюме. Направен е сравнителен анализ на резултатите от междулабораторен качествен контрол на показатели от хуморалния имунен отговор и определяне на HLA-B27, проведен през 2006 и 2007 г. в рамките на националната система за ВОК по имунология. Установено е намаляване на неприемливите резултати за имуноглобулини (А, Г, М) и фракции на комплемента (С3, С4). Персистира обаче значителният дял на отклонения за ИгГ под долна допустима граница при проби с високи концентрации (ИгГ ≥ 21 г/л). Обратно, резултати, повисоки от допустимите, са причина за големия процент несъответствия за комплемент С4 при серуми с понижена концентрация на тази съставка. Повече и по-значими отклонения от приетите граници на вариации продължават да се наблюдават при радиалната имунодифузия. Най-големи девиации за С-реактивен протеин се установяват при използване на латекс-аглутинационни методи. При имунофлуоресцентно определяне на АНА титрите варират в широки, но допустими диапазони. Хомогенният профил на АНА е коректно определен от всички участници, но малко от тях (33,3%) дефинират точковидното ядрено светене, дължащо се на антитела към SP 100. От лабораториите, използващи имуноензимни методи, нито една не е открила тази антителна специфичност. Коректните резултати за анти-ДНК антитела са 93,8% за отрицателната и 100% за положителната проба. При определяне на ENA профил междулабораторните различия се наблюдават при степенуване на положителен резултат. При изследване на ANCA, анти-PR3 и анти-MPO антитела се установяват 100% коректни резултати. Определянето на HLA-B27 показва средно 96,4% коректни резултати за двете години (100% за 2006; 92,8% за 2007). В заключение, регулярното участие в организираната програма за ВОК по имунология в България показва значимо подобряване на аналитичните възможности на лабораториите и намаляване на неприемливите резултати, което безспорно ще подобри качеството на предлаганите медико-диагностични услуги.

Ключови думи: автоантитела, имуноглобулини, комплемент, HLA-B27, качествен контрол.

Адрес за кореспонденция:

А. Михайлова
Централна лаборатория по клинична имунология
МБАЛ „Александровска“
Ул. „Г. Софийски“ 1
София 1431

EXTERNAL QUALITY CONTROL - SCHEMES 1, 2 AND 3:
IMMUNOGLOBULINS, COMPLEMENT, CREATIVE PROTEIN,
AUTOANTIBODIES, HLA-B27. COMPARATIVE ANALYSIS OF THE DATA
FOR 2006/2007

A. Mihailova, P. Boneva, E. Naumova

*Central laboratory of clinical immunology, University Hospital Aleksandrovska,
Sofia*

A comparative analysis of the results for the interlaboratory quality control of the humoral immune response and the HLA-B27 determinants was held in 2006 and 2007 within the national external quality control (EQC) program in immunology. There was a decrease in the ineligible results for immunoglobulins (A, G, I) and the complement fractions (Ñ3, Ñ4). There were considerable and persistent deviations of IgG below the lower reference values in the specimens with high concentrations (IgG \geq 21 g/l). Contrariwise, the results higher than the referent ones were responsible for the prevalence of discrepancies of C4 in the sera with low concentrations of this complement fraction. The majority of the significant deviations in the referent variation values are still present in radial immunodiffusion. The biggest variations of C-reactive protein were observed in latex-agglutination tests. The titres of ANA were strongly but affordably variable in immunofluorescent detection. The homogenous profile of ANA was correctly determined by all participants but some of them (33,3%) were defining the spot-like nuclear fluorescent areas, which were due to the antibodies against SP 100. None of the laboratories using immunoenzymatic methods described this antibody specificity. The correct results for anti-DNA antibodies were 93,8% for the negative and 100% for the positive test. The interlaboratory differences in the detection of the ENA profile were mainly in the grading of the positive result. The detection of ANCA, anti-PR3 and anti-MPO antibodies was 100% correct. The detection of HLA-B27 revealed a mean of 96,4% correct results for both years (100% for 2006; 92,8% for 2007). In conclusion, the frequent participation in the EQC program in immunology in Bulgaria revealed a considerable improvement in the analytical capabilities of the laboratories and a decrease of the unsatisfactory results, which in favor will contribute for a quality improvement of the provided medico-diagnostic services.

Key words: autoantibodies, immunoglobulins, complement, HLA-B27, quality control

ВЪНШНА ОЦЕНКА НА КАЧЕСТВОТО ПО ИМУНОЛОГИЯ 2007: ФЛОУЦИТОМЕТРИЧНА ИМУНОФЕНОТИПИЗАЦИЯ

М. Николова

Централна лаборатория по имунология, НЦЗПБ, София

Участието на медицинските лаборатории в междулабораторни сравнителни изпитвания е основен елемент от системата за осигуряване на качеството на провежданите изследвания съгласно утвърдените в рамките на Европейската общност стандартни документи. Действащите в България стандарти за акредитация на медицински лаборатории: ISO/IEC 17025:2005 (касаещ всички лаборатории, извършващи изпитване и/или калибриране) и ISO/IEC 15 189: 2004 (разработен специално за лабораториите, извършващи медицински изследвания), изискват участието в системи за външна оценка на качеството като задължително условие за акредитацията и нейното поддържане. Наредба №13/30.07.2003 г. на МЗ също така определя участието на медицинските лаборатории във ВОК като задължителен критерий за акредитация на лечебните заведения [1-3]. Това условие е и задължителен елемент при сключването на договори между медицинските лаборатории и НЗОК.

Като клиничен метод на изследване флоуцитометрията се отличава с изключителна мощност, обективност и прецизност. Съвременните флоуцитометри позволяват едновременното и индивидуално характеризиране на огромен брой частици с голяма скорост (5000-70 000 /sec), многопараметърен анализ (10 параметъра при апаратите от последно поколение, лицензирани за *in vitro* медицинска диагностика, и до 18 параметъра при апаратите, предназначени за изследователски цели), както и идентифициране на изключително редки събития (напр. клетки с концентрация под 0,01% в пробата). Същевременно точно тези характеристики на метода го правят особено зависим от качеството на изпълнение и изискват спазването на строги правила за сравнимост на измерванията. Това даде основание през 2004 г. да се постави началото на Национална програма за качествен контрол по флоуцитометрия (НПККФ), която да осигури един по-бърз, достъпен и гъвкав механизъм за управление на качеството на този тип изследвания. През 2007 г. тази програма зае своето естествено място в системата за Външна оценка на качеството (ВОК) по имунология, провеждана от Асоциацията по клинична имунология.

ОРГАНИЗАЦИЯ, МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Организирането на ВОК се свежда до три ключови елемента: 1) избор на метод, който ще се контролира, и параметри, които ще се изпитват; 2) избор на подходящ материал за изпитване (сравнителен стандартен образец); 3) избор на схема за провеждане. На практика организирането и координирането на ВОК по флоуцитометрия се осъществява от Референтната лаборатория по имунология към НЦЗПБ като акредитирана от БСА лаборатория по флоуцитометрия, с дългогодишно успеш-

но участие в международните програми за контрол SEQUAL и INSTAND. През 2007 г. ВОК по флоуцитометрия включваше за пръв път два цикъла по избор. В цикъл №1 се оценяваше най-често прилаганият метод: „Определяне на процент и абсолютен брой на левкоцитни популации в периферна кръв“. В цикъл №2 се оценяваше определянето на процента и абсолютният брой на CD34+ стволови клетки. Оценяваните параметри са посочени в Табл. 1. Референтните материали и за двата цикъла са стандартни образци с дефинирани от производителя референтни стойности и интервали, съответно: стабилизирани човешки левкоцити и еритроцити, BD Multicheck control (BD Biosciences, Cat N340912) и стабилизирани човешки левкоцити, еритроцити и периферни стволови клетки, BD Stem cell control Kit (BD Biosciences, Cat N340991). Последният включва две проби – с ниско и високо съдържание на CD34+ клетки. В цикъл №1, както и досега, беше включена реална проба – прясно взета венозна кръв с антикоагулант хепарин, която бе транспортирана своевременно, така че всички участници да имат възможност да я обработят едновременно. Етапите на провеждане бяха, както следва: предварителна подготовка (предложение за участие и информация за начина на провеждане на ВОК, събиране на заявки за участие, кодиране на лабораториите), подготовка на пробите и изпращане до участниците, събиране и обработка на резултатите, изпращане на окончателните резултати и издаване на сертификат в случай на успешно участие.

Оценката и класифицирането на резултатите се извършваше само въз основа на резултатите, получени за стандартните образци, като база за оценка бяха съответните сертифицирани стойности и тяхната неопределеност, указани в сертификата на образца. Лабораториите, получили успешен резултат за над 75% от показателите в Цикъл 1 и за четирите показателя в Цикъл 2, получиха сертификат за успешно преминал контрол.

Таблица 1. Изследвани параметри (ВОК по флоуцитометрия, 2007 г.)

Левкоцитни популации	%*	Абсолютен брой (клетки / μ л)
Цикъл №1 (проби 1 и 2)		
Лимфоцити	-	+
Т лимфоцити, CD3+	+	+
Т хелперни лимфоцити, CD3+CD4+	+	+
Т цитотоксични лимфоцити, CD3+CD8+	+	+
Т лимфоцити, активирани CD3+HLA-DR+	+	**
В лимфоцити, CD19+	+	+
НК клетки, CD3-CD56+CD16+	+	+
Цикъл №2 (проби 3 и 4)		
Стволови клетки CD34+	+	+

* В цикъл №1 съответната популация се определя като процент от лимфоцитите.

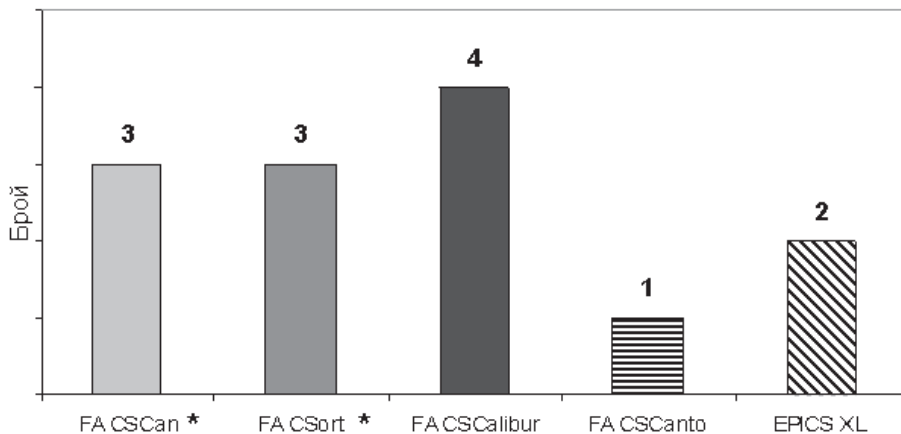
** Абсолютният брой на активираните Т лимфоцити се съобщава от участниците за целите на сравнителния анализ, но не се включва при формиране на резултата, тъй като в сертификата на ССО BD MultiCheck Control не е посочен референтен интервал за този параметър.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

През 2007 г. в Цикъл № 1 на ВОК по флоуцитометрия участваха всички 13 лаборатории, извършващи флоуцитометрични изследвания в България, а 9 от тях се включиха и в Цикъл № 2. През 2007 г. почти всички флоуцитометрични лаборатории бяха екипирани с апарат, реагенти и консумативи на фирмата BD Biosciences, което е гаранция за сравнимостта на получените резултати. От друга страна, опитът показва, че успешното включване на лаборатории, които работят с апарат и реагенти на фирмата Beckman Coulter, е напълно осъществимо (фиг. 1). Тенденцията е многопараметърната флуоресценция да навлиза все по-широко и апаратите да се обновяват, което е предпоставка за повишаване на лабораторната точност. Прави впечатление обаче фактът, че въпреки наличния потенциал за многоцветно фенотипизиране и директно определяне на абсолютен брой на клетъчни популации, все още масово се използва панел за двуцветна флуоресценция (69% от лабораториите) и индиректен метод за определяне на абсолютен брой (78% от лабораториите), (фиг. 2).

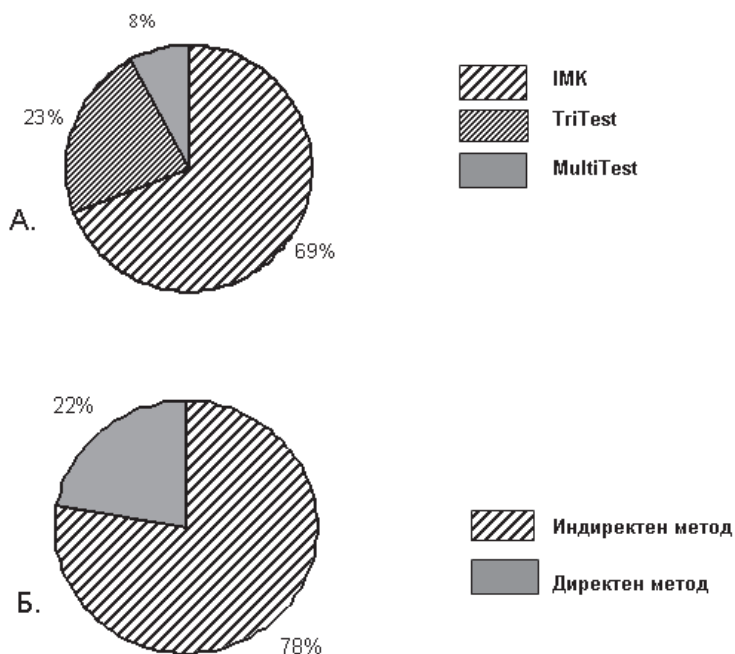
Анализът на резултатите от Цикъл №1 на базата на сертифицирания сравнителен материал показва много добро изпълнение*: над 75% съвпадение на резултатите за процент и над 86% – за абсолютен брой. Сертификат на базата на 75% успешни резултати получиха 92% (12/13) от лабораториите. Подробните данни за резултатите по лаборатории и показатели са отразени в табл. 2. Анализът на изпълнението по показатели разкрива тенденция за по-точно определяне на процента на „големите“ лимфоцитни популации (общи Т лимфоцити, CD4+ Т, CD8+ Т), в сравнение с „малките“ популации (В лимфоцити, NK клетки и активирани Т клетки), както по отношение на процента, така и по отношение на абсолютния брой. Въпреки че средният процент на съвпадение на резултатите нараства от 2004 г. насам, все още има какво да се желае по отношение на определянето на процента на малките субпопулации и особено – на активираните Т лимфоцити (HLA-DR+CD3+), където вариациите между резултатите на отделните лаборатории са най-големи (фиг. 3). Анализът на отклоненията дава възможност да се направят изводи за най-вероятните причини за грешки. Така например при анализа на проба № 2, Цикъл №1 (MultiCheck Control) преобладаващата част несъответни резултати (67%) са получени в една и съща лаборатория (код 7). Отклоненията засягат както определянето на процента, така и на абсолютния брой, което при известен брой на левкоцитите в пробата и използването на индиректен метод означава, че грешката е свързана именно с флоуцитометричното изследване. При това отклоненията не са еднопосочни, което изключва системна грешка, свързана с техническа неизправност (неточна пипета и пр.). От друга страна, единични отклонения като отчетения по-висок абсолютен брой CD56+ клетки от лаборатория с код 11 или по-нисък процент HLA-DR+ Т клетки от лаборатория с код 6 имат по-скоро случаен характер.

* Изпълнението се характеризира със съпадението между получените от лабораторията резултати за изследваните параметри и съответните приписани стойности с тяхната неопределеност. 100% съвпадение означава, че всички получени от лабораторията резултати попадат в съответните сертифицирани интервали.



Фиг. 1. Оборудване с флоуцитометри

*Апаратите разполагат с филтър за анализ на трета флуоресценция

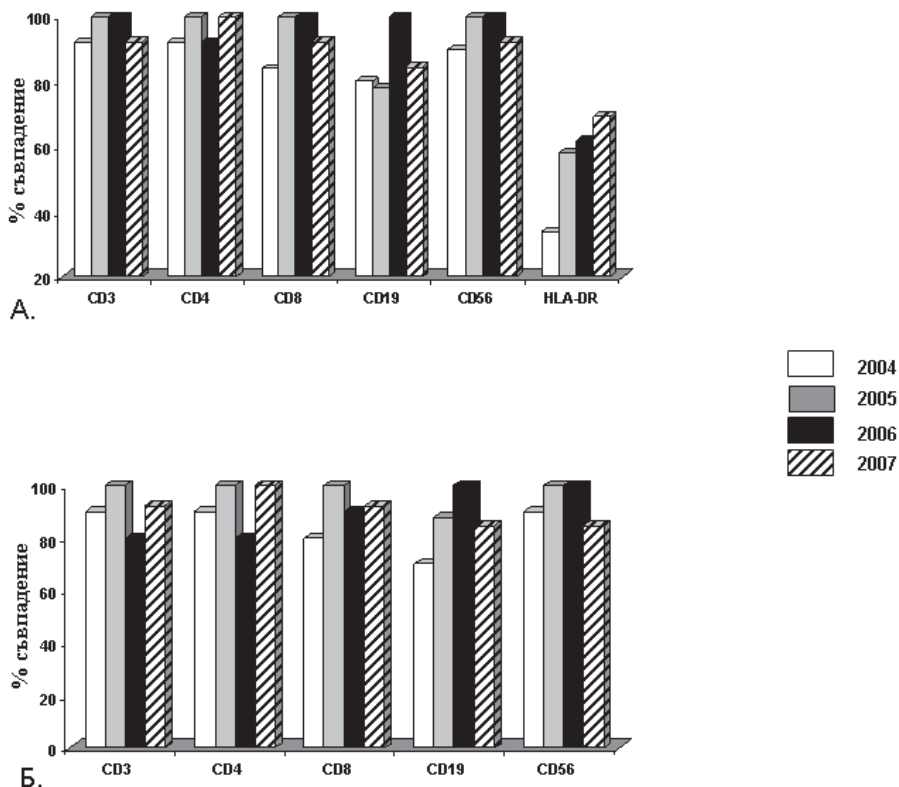


Фиг. 2. Използвани методи за анализ

А: Разпределение на лабораториите, използвали панели от моноклонални антитела за двуцветна (IMK), трицветна (TRITest) и четирицветна (MULTITest) флуоресценция. Б. Разпределение на лабораториите, използвали индиректен и директен метод за определяне на абсолютен брой.

Таблица 2. Обобщени резултати: ВОК по флуцитометрия, 2007, Цикъл №1

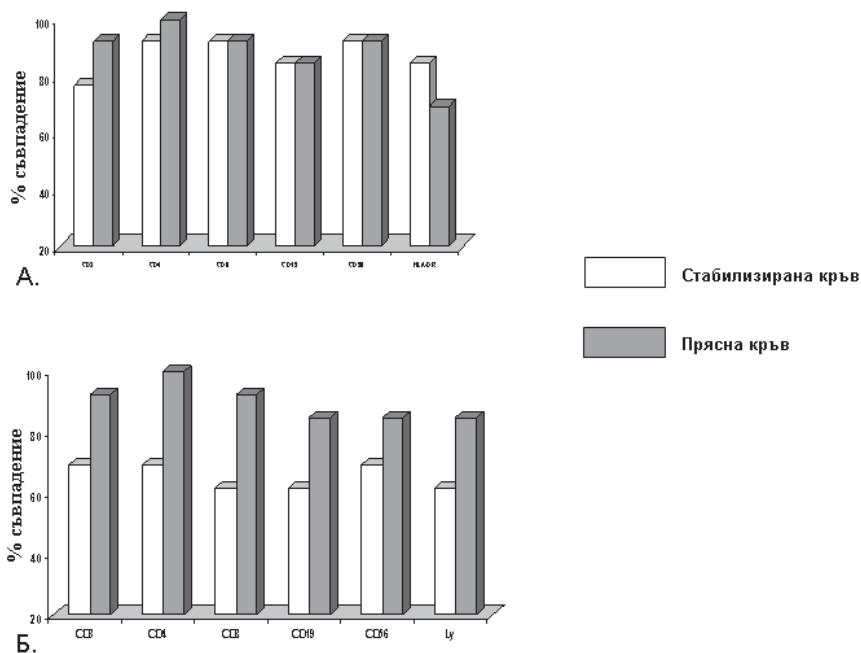
Показател/Код	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	av	Ref min	Ref max
ПРОЦЕНТ																
<i>Проба N1</i>																
CD3+	67	68	69	68	67	69	69	70	69	67	67	68	70	68	67	69
CD3+CD4+	41	44	44	43	40	45	44	44	45	41	42	34	44	42	39	45
CD3+CD8+	26	27	26	27	26	26	26	25	24	27	24	20	27	25	23	27
CD19+	13	11	7	8	9	9	10	8	10	8	7	9	7	9	7	11
CD3-CD16+CD56+	20	24	22	20	20	21	20	17	17	23	26	21	24	21	18	24
CD3+HLA-DR+	7	NA	6	2	8	3	3	1	1	NA	10	15	NA	6	1	10
АБСОЛЮТЕН БРОЙ																
<i>Проба N1</i>																
CD3+	2400	2268	2005	1180	2345	2383	2870	2688	2776	2048	3800	2596	2120	2421	1822	3020
CD3+CD4+	1608	1548	1383	1140	1571	1654	2000	1890	1945	1562	2535	1667	1486	1691	1348	2035
CD3+CD8+	984	998	882	720	938	1086	1260	1193	1279	953	1606	890	935	1056	826	1285
CD19+	624	612	521	460	609	627	740	659	669	627	927	533	554	628	513	743
CD3-CD16+CD56+	312	249	140	130	211	216	290	218	295	186	273	247	132	223	161	285
ПРОЦЕНТ																
<i>Проба N2</i>																
CD3+	72	72	71	73	74	72	89	69	69	73	70	70	74	72	62.3	82.3
CD3+CD4+	51	50	51	51	53	50	57	48	47	50	48	46	52	51	44.6	57.6
CD3+CD8+	19	20	20	19	20	19	32	18	17	19	22	20	19	20	12.5	26.5
CD19+	12	13	13	13	12	13	7	15	17	9	15	11	14	13	8.6	16.6
CD3-CD16+CD56+	13	13	14	12	12	13	4	8	8	14	13	17	11	13	6.4	20.4
CD3+HLA-DR+	4	NA	4	5	2	2	1	2	2	NA	5	3	NA	3	1.5	4.5
АБСОЛЮТЕН БРОЙ																
<i>Проба N2</i>																
CD3+	1030	1076	1215	1680	981	1157	1227	1064	1088	1599	1000	1225	1100	778.7	622.9	934.4
CD3+CD4+	808	775	863	870	725	838	1087	735	763	790	703	846	752	550.3	385.2	715.5
CD3+CD8+	576	536	620	600	520	577	700	514	519	539	482	559	549	210	134.4	285.6
CD19+	215	216	243	230	196	218	387	189	186	205	221	248	199	135.7	93.9	177.5
CD3-CD16+CD56+	136	140	158	150	118	151	90	155	186	97	146	133	152	144.3	76.5	212.1



Фиг. 3. Съвпадение на резултатите за процент (А) и абсолютен брой (Б) по показатели за периода 2004 – 2007 г.

100% съвпадение означава, че всички получени от лабораторията резултати попадат в съответните сертифицирани интервали.

Заслужава внимание сравнението на резултатите, получени с двата типа стандартни образци: стабилизирана и прясна кръв. Докато изпълнението за показателите по процент е сходно (съответно 86% и 85%), при определяне на абсолютен брой разликите са значими: съответно 80% и 41% (фиг. 4, А и Б). Докато при изследване на стабилизираната кръв единственият показател с изпълнение под 75% е процентът HLA-DR+T клетки, при изследване на абсолютния брой изпълнението по всички показатели е под 75%. Това означава, че ако резултатите се оценяваха на базата на пробата от прясна кръв, само 9/13 лаборатории (69%) щяха да преминават успешно контрола. Нашият анализ показва, че тези вариации не се дължат на разлики във времето до обработката на пробите, нито на транспортирането на сравнителния материал. Фактът, че вариациите засягат изключително определянето на абсолютния брой, а не – процента на лимфоцитните популации, означава, че най-вероятната причина е индиректният (двуплатформен) метод за определяне на абсолютен брой, който се прилага, както беше отбелязано по-горе, в над 80% от лабораториите. Абсолютният брой на левкоцитите в стабилизираната кръв, указан



Фиг. 4. Сравнение между съвпадението на резултатите за процент (А) и абсолютен брой (Б), получени със стабилизирана и прясна кръв.

в сертификата, се съдържаеше в информацията за подготовка на пробите (Приложение №1), докато за прясната кръв този брой трябваше да се определи самостоятелно от участниците. Следователно, именно тази стъпка е най-критична и води до големи вариации. Този факт изтъква предимството на директния метод и необходимостта от повсеместното му въвеждане, още повече че необходимото за това оборудване е налице. Считаме, че използването на прясна кръв като образец за изследване трябва да продължи, тъй като доближава максимално условията на оценяване до реалните условия на работа, когато често се налага транспортиране и/или забавяне на изследването на материала в рамките на допустимите 24 часа.

Особено внимание при качествения контрол беше обърнато на определянето на абсолютния брой на CD4+ Т лимфоцитите. Този показател е решаващ за диагностиката и терапевтичното поведение при HIV инфекция. Резултатите за стабилизирана кръв показват 100% съвпадение както за процента, така и за абсолютния брой на CD4 Т лимфоцитите, като коефициентът на вариация е съответно 5,6% и 10%. Резултатите за прясна кръв са съответно 100% съвпадение за процент ($CV=7\%$) и 85% съвпадение за абсолютен брой ($CV=20\%$). Високият коефициент на вариация означава, че независимо от успешните резултати отделни лаборатории имат значителни отклонения в рамките на референтния интервал. Трябва да се има предвид, че при измерването на клетки с по-ниска концентрация средната грешка относително нараства. Ето защо качественият контрол при измерването на нис-

кобройни проби (левкопения, лимфопения, намален брой CD4) изисква специално разработени стандартни образци [4]. В съответствие с тенденцията за децентрализиране на обслужването на HIV+ пациенти през 2008 г. у нас се предвижда извършване на флоуцитометричен мониторинг на HIV+ лица в София, Варна, Плевен и Пловдив. Във връзка с това считаме, че е полезно и необходимо в бъдеще ВОК да включва изпитване на стабилизирана кръв с нисък брой CD4 лимфоцити (BD MultiCheck CD4 low control, Cat.N 340914).

Друга област с нарастващо значение, която изисква идентифицирането на клетки с ниска концентрация, е определянето на процента и абсолютния брой на CD34+ стволови клетки в материал от пъпна връв, периферна кръв или костен мозък. Тъй като методът се контролира за пръв път, бяха дадени подробни указания за обработката на пробите и анализа им. Беше обърнато особено внимание на следните моменти:

- да се използват анти-CD34 моноклонални антитела от II клас (разпознаващи епитопи, резистентни на гликопротеаза), конюгирани с PE, или от III клас (разпознаващи епитопи, резистентни на гликопротеаза и невраминидаза), конюгирани с произволен флуорохром;

- да се използва конюгирано с ФИТЦ анти-CD45 моноклонално антитяло, което открива всички изоформи и гликоформи на антигена;

- да се работи с цяла кръв по процедурата лизиране без измиване, като се използва лизиращ реагент с NH_4CL без фиксиране;

- пробите, обработени по този начин, да се анализират до 1 час след лизиране, като се съхраняват в лед;

- определянето на CD34+ клетките да е двукратно за всяка проба, като за резултат се взема средната стойност за CD34. При това вариациите между двете проби да са < 5%;

- за анализ се препоръчва протоколът на ISHAGE и неговите модификации [5]. Получените първи резултати са много добри, като 89% (8/9) от участващите лаборатории получиха резултати, попадащи в референтните граници (табл. 3). Считаме, че провеждането на този цикъл е полезно и в бъдеще ще представлява интерес за все по-голям брой участници.

ЛИТЕРАТУРА

1. EA Policy for Participation in National and International Proficiency testing Activities, EA-2/10 (rev.00) Aug **2001**.

2. Процедура за провеждане на междулабораторни сравнения и изпитвания за пригодност, BAS QR 18 на ИС на БСА, 12 август **2004**.

3. Наредба №13 от 30 юли 2003 г. за критериите, показателите и методиката за акредитация на лечебните заведения, ДВ, бр. 80 от 09.09.2003 г., изм. ДВ бр. 28/2004 г.

4. Centers for Disease Control. Revised guidelines for performing CD4+ T-cell determinations in persons with human immunodeficiency virus (HIV). *MMWR* **1997**;46(No. RR-2):1-29.

5. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. QBEnd10 (CD34) antibody is unsuitable for routine use in the ISHAGE CD34+ cell determination assay. *J Hematother* **1996**; 5: 601–603.

6. Gratama JW, Sutherland DR, Keeney M, Papa S. Flow cytometric enumeration and immunophenotyping of hematopoietic stem and progenitor cells *J Biol Regul Homeost Agents* **2001**; 15: 14-22.

Таблица 3. Обобщени резултати: ВОК по флоудигмометрия, 2007г., Цикъл №2

Показател/ Код	1	2	3	5	6	7	8	10	11	av	Ref min	Ref max
Проба N3	CD34+ КЪЛЕТКИ											
ПРОЦЕНТ	0.04	0.04	0.054	0.025	0.03	0.05	0.2	0.04	0.03	0.030	0.000	0.063
АБСОЛЮТЕН БРОЙ	1.64	1.64	2.21	0.95	1.25	2.0	8.0	1.64	1.22	1.2	0.000	2.6
Проба N4	АБСОЛЮТЕН БРОЙ											
ПРОЦЕНТ	0.61	0.69	0.435	0.72	0.58	0.42	1.3	0.65	0.54	0.567	0.407	0.727
АБСОЛЮТЕН БРОЙ	24.95	28.23	17.8	29.46	23.87	17.0	53.0	26.59	22	23.2	16.7	29.7

ВЪНШНА ОЦЕНКА НА КАЧЕСТВОТО
ПО ИМУНОЛОГИЯ 2007:
ФЛОУЦИТОМЕТРИЧНА ИМУНОФЕНОТИПИЗАЦИЯ

М. Николова

Централна лаборатория по имунология, НЦЗПБ, София

Дванадесет флоуцитометъра в пет от големите градове на страната извършват ежегодно хиляди флоуцитометрични измервания с широко приложение в диагностиката и мониторинга на вродените и придобити имунни дефицити, онкохематологичните заболявания, трансплантологията, алергологията и пр. Външният качествен контрол по флоуцитометрия, осъществяван от секция Флоуцитометрия на Асоциацията по клинична имунология, се утвърди като безспорно полезно и достъпно допълнение на съществуващите международни схеми. По-нататъшното осъществяване на тази програма изисква активен диалог със заинтересованите лаборатории за постигане на 100% участие и задоволяване интересите на всички участници. Възможностите за развитие на ВОК по флоуцитометрия са свързани с включването на допълнителни стандартни сравнителни образци, както и с разширяването на набора от контролирани методи и параметри. В областта на най-масово използвания метод – имунофенотипизация на левкоцитни субпопулации, очакваме повишаване качеството на определяне на абсолютния брой на базата на директен метод с помощта на многопараметърната флоуцитометрия. В зависимост от интересите на всяка лаборатория е възможно включването на допълнителни параметри като по-рядко изследвани маркери/популации (напр. регулаторни Т клетки, маркери на левкозни клетки, цитокин-секретиращи Т клетки и пр.). Това ще позволи и съгласуване на критериите при по-сложен тип анализ, напр. маркери с непрекъснат тип на експресия, маркери, отличаващи се по интензивността на експресия или интрацелуларни маркери. Включването в програмата на специални нискобройни стабилизирани образци ще повиши качеството на измерванията на проби от пациенти с имуноен дефицит, минимална остатъчна болест след лечение на левкемии, трансплантирани пациенти и пр. Една цяла област, която очаква разработването и въвеждането на методология за качествен контрол, са функционалните флоуцитометрични изследвания.

Ключови думи: качествен контрол, флоуцитометрия, междулабораторно сравнително изпитване МСИ

Адрес за кореспонденция

д-р Мария Николова, ст.н.с. II ст.

Централна лаборатория по имунология,

Национален център по заразни и паразитни болести,

ул. „Янко Сакъзов“ №26, София 1504,

тел. 943 56 36

email mstoimenova@ncipd.org

EXTERNAL QUALITY CONTROL IN IMMUNOLOGY 2007: FLOW CYTOMETRIC IMMUNOPHENOTYPISATION

M. Nikolova

Central laboratory of clinical immunology, NCIPD, Sofia

Annually thousands of flow cytometric tests are being performed by 12 flow cytometers in 5 major cities of Bulgaria. They are widely used in the diagnostics and monitoring of the acquired and innate immune deficiencies, oncohaematological diseases, transplantology, allergology, etc. The external quality control (EQC) in flow cytometry, performed by the Flow cytometry section of the Clinical immunology association is well established as a useful and affordable addition to the present international schemes. The continuation of this program demands for an active dialogue with the concerned laboratories, thus aiming a 100% involvement and satisfaction for all involved parties. The possibilities of developing an EQC in flow cytometry include supplementary standard reference samples as well as an extension of the control methods and parameters set. The most widely used method – immunophenotypisation of leukocyte subpopulations is expected to become more precise in the detection of the absolute count, based on a direct method of multiparametric flow cytometry. The inclusion of supplementary and more rare parameters/populations is possible depending on the interest of every laboratory (such as regulatory T-cells, leucosis cell-markers, cytokine-secreting T-cells, etc.). This would allow an agreement of the criteria in more complicated analysis, such as the markers with an uninterrupted expression, intracellular markers and markers with various intensity of expression. The inclusion of low-count stabilized specimens in the program will improve the quality of the analysis in patients with immune deficiency, minimal residual disease after the treatment of leukemia, patients with transplants, etc. The flow cytometric tests are an entirely new for the development and implementation of the methodology for quality control.

Key words: external quality control, flow cytometry

НАЦИОНАЛНА ПРОГРАМА ЗА РАЗВИТИЕ НА ТРАНСПЛАНТАЦИЯТА НА СТВОЛОВИ КЛЕТКИ В РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ 2007-2013 г.

*Е. Наумова¹, Д. Бобев², А. Михайлова¹, Д. Балтаджиева¹,
М. Иванова¹, Д. Маринова¹, М. Енчев³, Р. Замфирова³*

Националната програма за развитие на трансплантацията на стволови клетки в Република България 2007-2013 г. е разработена в съответствие с изискванията на Закона за трансплантация на органи, тъкани и клетки, Директива 2004/23/ЕС и препоръките на Световната асоциация за донори на костен мозък (World Marrow Donor Association – WMDA), като са отчетени националните особености, съществуващата констелация от социално-икономически и имуно-генетични фактори и хода на реформата в здравеопазването.

Програмата има за **цел** развитие на трансплантацията на стволови клетки в Р. България, като:

- увеличава възможностите за намиране на подходящи алогенни донори за пациенти, за които не може да се намери подходящ донор в семейството и BMDW;
- повишава достъпа на пациентите, чието лечение може да се осъществи ефективно чрез трансплантация на стволови клетки, до този вид терапия;
- повишава икономическата ефективност чрез осигуряване извършването на трансплантацията в страната вместо в чужбина, както и възможност за връщане на болния към нормална социално-икономическа активност.

За успешно реализиране на програмата е необходимо изпълнение на поставените **задачи**:

- промоция на донорството на стволови клетки от пълна връв в страната;
- създаване на национална мрежа за набиране на доброволни донори на стволови клетки за трансплантация;
- увеличаване на броя на донорите в Българския костномозъчен регистър, пълноправен член на BMDW;
- създаване на национална банка за кръв от пълна връв в съответствие с установените международни стандарти с цел бързо и ефективно осигуряване на качествени клетъчни проби за трансплантация;
- съхраняване на хемопоеични стволови клетки от пълна връв съобразно етническата структура на популацията, включващи чести за българите HLA хаплотипи, както и единици с редки HLA хаплотипи, които нормално не са представени в костномозъчните донорни регистри;

¹ Централна лаборатория по клинична имунология, УМБАЛ „Александровска“, София

² СБ АЛДОХЗ, София

³ Министерство на здравеопазването

- повишаване на познанието относно законовите, етичните и други въпроси, свързани с донорството и използването на биологичните проби;
- изготвяне на стандарти за определяне критериите за подбор на донори на плацентарна кръв и създаване на стандарти за добра медицинска практика при осигуряване, вземане, експертиза, обработка, съхраняване и предоставяне на стволови клетки от пъпна връв за трансплантация;
- изработване на логистика за осъществяване на взаимодействието между банка, лечебни заведения, донори;
- акредитиране на Българския регистър за донори на стволови клетки от костен мозък и периферна кръв от WMDA и на Националната банка за стволови клетки от пъпна връв от NETCORD и FANCT;
- организиране на национална система за външна оценка на качеството на вземане, транспортиране, съхранение и документиране на биологичните материали при биобанкирането.

ОЧАКВАНИ РЕЗУЛТАТИ

- създадена съвременна структура за осигуряване на стволови клетки от периферна кръв и костен мозък за прилагане на съвременна терапия при редица заболявания;
- набрани най-малко 5000 характеризирани донори в Българския регистър за донори на стволови клетки от костен мозък и периферна кръв;
- създадена Националната банка за стволови клетки от пъпна връв с предварително характеризирани 5000 единици стволови клетки за трансплантация ;
- интегриране на Българския регистър за донори на стволови клетки от костен мозък и периферна кръв и Националната банка за стволови клетки от пъпна връв със сродни международни организации.

УКАЗАНИЯ ЗА АВТОРИТЕ

Ръкописите се оформят като стандартни машинописни страници (30 реда, 60 знака) с достатъчен интервал между редовете и се предават на магнитен носител и две разпечатки. Под имената на авторите се посочва местоработата им.

Резюме: до 250 думи, като се посочват и ключови думи. Посочва се адрес за кореспонденция.

На английски език се превеждат заглавието, имената на авторите (транскрибирани), местоработата, резюмето, ключовите думи, адресът за кореспонденция.

Литературната справка се подрежда по реда на появата ѝ в текста. Изписва се по следния начин: Koller MD, Tempi E, Riedl M, et al. Pituitary function in patients with newly diagnosed untreated systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 1677-1680. При цитиране на български автори се изписват всички имена. Останалите се представят до третия вкл., след което се пише et al. Напр. Koller MD, Tempi E, Riedl M, et al.

В текста номерът на литературния източник се цитира в квадратни скоби, напр. [5]. В текста авторите се цитират с името на първия, а останалите – като съавтори, напр. MD Koller и съавт. [5].

Таблицы, скици, снимки и фигури се придружават от заглавие и легенда на български език.

Всеки ръкопис се придружава от декларация, че материалът не е публикуван досега, освен като резюме на съобщение, изнесено на научен форум.

**ГОДИШНИК
на БАКИ
2007**

Българска
Първо издание

Книгоиздател ПАВЕЛ СЛАВЯНСКИ
Коректор СТОЯНКА ДУШЕВА
Предпечат МАРИАНА ХРИСТОВА

Формат 70/100/16
Печатни коли 6,75

ISSN 1313-47-52

© Издателство „Лице“, 2008
e-mail: litse@abv.bg
0888 56 54 39; 089 794 85 70