**БЪЛГАРСКА АСОЦИАЦИЯ ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ**
**BULGARIAN ASSOCIATION FOR CLINICAL IMMUNOLOGY**

# Годишник на БАКИ 2015

**Издателство „Лице“**
**София, 2016**

© Издателство „Лице“, 2016
e-mail: litse@abv.bg
0888 56 54 39

ISSN 1313-47-52

# СЪДЪРЖАНИЕ

**СТРАНИЦА НА ПРЕДСЕДАТЕЛЯ**
НА УПРАВИТЕЛНИЯ СЪВЕТ
НА СДРУЖЕНИЕ „БЪЛГАРСКА АСОЦИАЦИЯ
ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ“ ..... 5

ИСТОРИЯ НА КЛИНИЧНАТА ИМУНОЛОГИЯ
В УМБАЛ „АЛЕКСАНДРОВСКА“

*Марта Балева и Елисавета Наумова* ..... 8

ПЕРИОПЕРАТИВНИ ИНДЕКСИ
НА CD64-ЕКСПРЕСИЯТА ВЪРХУ ГРАНУЛОЦИТИТЕ

*Д. Попова, Р. Владимирова, Е. Викентиева, В. Кьосев,*
*В. Мутафчийски, К. Василев, Г. Коташев, П. Иванов,*
*Е. Белоконски, Г. Григоров, В. Христова* ..... 17

БИОПОДОБНИТЕ МЕДИКАМЕНТИ В КОНТЕКСТА
НА БИОЛОГИЧНАТА ТЕРАПИЯ
ПРИ ИМУНОМЕДИИРАНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

*Цветелина Великова*..... 31

РЕВМАТОИДЕН ФАКТОР

*Марта Балева и Красимир Николов*..... 36

ИМУНОЛОГИЧНИ АСПЕКТИ
НА МУЛТИПЛЕНАТА СКЛЕРОЗА

*Р. Владимирова, Е. Викентиева, Д. Попова* ..... 48

СРАВНЕНИЕ НА ФЕКАЛНИТЕ МАРКЕРИ КАЛПРОТЕКТИН
И ЛАКТОФЕРИН ЗА ОЦЕНКА
НА МУКОЗНОТО ВЪЗПАЛЕНИЕ ПРИ ПАЦИЕНТИ
С ХРОНИЧНИ ЧРЕВНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

*Цветелина Великова, Зоя Спасова, Екатерина Иванова-Тодорова, Доброслав Кюркчиев, Искра Алтънкова* ..... 61

**ПРОГРАМА**
за дейността на сдружение
„Българска асоциация по клинична имунология“ през 2016 година ..... 74

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

*Уважаеми колеги имунолози,*

Изминаха десет години от учредяването на **Българската асоциация по клинична имунология. Честит юбилей!**

Началото на съвместната ни дейност като организация е през недалечната 2005 година, когато Експертният съвет по имунология на 8 юли същата година взе решение за учредяване на Сдружение с нестопанска цел „Асоциация по клинична имунология“. Прие се Устав, избра се Управителен съвет и Председател на сдружението. Сдружението е съдебно регистрирано на 25.08.2006 г. С решение на Общото събрание от 26.11.2008 г. в името на Сдружението се добави думата „Българска“ и от 21.01.2009 г. официалното название е „Българска асоциация по клинична имунология“ (БАКИ). Поставиха се амбициозни цели, които определиха ролята на БАКИ като обединител, двигател и медиатор.

**ОБЕДИНИТЕЛ – БАКИ обединява и подпомага членуващите в нея имунолози за постигане на общите им цели и задачи.** Съгласно чл. 10. (1) „В сдружението могат да членуват лекари и специалисти с немедицинско образование, работещи в областта на клиничната имунология“. За изминалите десет години членският ни състав от 33 души в началото нарасна до 76 през 2015 година, разпределени както следва: лекари със специалност „Клинична имунология“ – 46 (60%); лекари, работещи в областта на клиничната имунология – 3 (4%); лекари с друга медицинска специалност – 2 (4%); биолози със специалност „Лабораторна имунология“ – 5 (6%); биолози и химици, работещи в областта на лабораторна имунология – 7 (9%); специализиращи клинична или лабораторната имунология – 13 (17%). През 2011 година беше създаден регистър на имунолозите в България.

**ДВИГАТЕЛ – БАКИ популяризира новостите в областта на клиничната имунология и съдейства за развитието на клиничната имунология в България.** През изминалото десетилетие Управителният съвет на БАКИ полагаше усилия за създаване на условия за професионално развитие и изява на своите членове, за популяризиране на новостите в областта на клиничната имунология чрез отпусканите стипендии, награди и командировки за участие на членове от Сдружението в национални и международни научни форуми. Бяха проведени 37 научни конференции, конгреси, училища и работни срещи с разнообразна тематика и с участието на специалисти от различни медико-био-

логични дисциплини, което подобри значително взаимодействието ни с другите специалности. Традиция стана ежегодното честване на Международния ден на имунологията 29 април с различни мероприятия в цялата страна, свързани и със седмицата на първичните имунодефицити (22–29 април). БАКИ участва в работата на UEMS; в постоянна колаборация е с Национален алианс по редки болести, Европейската федерация за имуногенетика, Българското медицинско сдружение по хематология, Българската педиатрична асоциация. Секцията „Поточна цитометрия“ към БАКИ стана член на ISAC и ECN. БАКИ е и пълноправен член на Съюза на българските медицински дружества. В резултат на всичко това **клиничната имунология беще разпозната и се утвърди като основна медицинска специалност с непрекъснато издигаща се роля и значение в медицината.**

**МЕДИАТОР –** Сериозни усилия се положиха от Управителния съвет на БАКИ в подпомагането на работещите в областта на клиничната имунология в диалога и взаимоотношенията им с местната и централната власт, както и с БЛС и НЗОК. Имунологичната общност вече е разпозната от МЗ, НЛС, НЗОК чрез включването в Наредба № 38 от 2012 г. в сила от 01.01.2013 г., на първичните имунодефицити; включването в Наредба № 40 от 2013 г. под № 306 на клинична пътека „Лечение на доказани първични имунни дефицити“; включването в позитивния лекарствен списък на препаратите Имуновенин интакт, Octagam, Gammanorm, Ruconest и Berinert, позволяващи регулярно лечение на болните с първични имунни дефицити (ПИД). В резултат на тясната колаборация с Националната програма за редки болести са разработени съвместни критерии за ПИД експертни центрове у нас. Вписването на тези центрове в регистъра на МЗ чрез комисията за регистриране на редки болести съгласно Наредба №16/2014 г. ще позволи включването им в европейските референтни мрежи за диагностика, консултация и терапия.

Публикационната дейност на БАКИ стана традиция. Ежегодно се издава годишник, в който се отразява дейността на Сдружението през съответната изминала година, публикуват се доклади от конференции, консенсуси, информация за проведени работни срещи и научни форуми, както и регистърът на имунолозите в България.

Медицински стандарти „Клинична имунология“ и „Имунологична подготовка при трансплантация на органи, тъкани и клетки“ бяха актуализирани. Програмите за обучение по специалностите „Клинична имунология“ и „Лабораторна имунология“ са осъвременени и хармонизирани с последната Европейска директива и Синята книга на UEMS.

Създадена беше Национална система за ВОК по имунология, обхващаща почти всички рутинни имунологични тестове, което подобри качеството на имунологичната диагностика и позволи на имунологичните звена да сключват договори с НЗОК.

Особено ползотворна е и тясната колаборация с Българското медицинско

сдружение по хематология и Българска педиатрична асоциация. В резултат на това бяха разработени: консенсусни препоръки за имунофенотипизиране чрез флоуцитомерия в онкохематологията; критерии за започване и продължаване на лечението с гамаглобулин и С1 естеразен инхибитор, алгоритъм за лечение на ПИД, алгоритъм за имуномодулиращо лечение на реципиенти за органна трансплантация; алгоритъм за диагностика и лечение при безплодие и нарушения на бременността с имунен компонент. Определиха се референтни граници при български жени на процента и абсолютния брой на НК клетките ($CD3^-/CD16^+56^+$) в периферна кръв, публикувани в годишника на БАКИ, 2010. В процес на подготовка са и препоръки за диагноза на ПИД.

Медиаторната роля на БАКИ би била затруднена без използването на интернет пространството. През 2006 година беше създадена WEB страница, която с висикоскоростното развитие на комуникационните технологии се наложи да бъде обновена. В ход е изпълнение на заданието, изготвено от WEB комитета на БАКИ. За да бъде запълнено съдържанието на всички раздели, е необходимо активното участие на всички членове.

През изминалите години имунологията от малка дисциплина се превърна в основна медицинска специалност с интердисциплинарен характер благодарение на усилията на всички членовете на БАКИ, координирани от Управителния съвет на Сдружението. Амбицирани сме да направим клиничната имунология още по-разпознаваема и атрактивна за младите специалисти (лекари, биолози и др.) и да привлечем по-голям брой съмишленици. Много е важно да продължим да окуражаваме студентите и колегите си да се присъединяват към нашата асоциация и да използват годишника на БАКИ като трибуна за тяхната изява.

Уважаеми колеги, скъпи приятели, позволете ми да благодаря на всички вас, които правите нашата асоциация толкова специална, и да ви пожелая здраве, успехи и пролетно настроение.

*ПРОФ. Д-Р ЕЛИСАВЕТА НАУМОВА, Д.М.Н.*
*ПРЕДСЕДАТЕЛ НА УС НА БАКИ*

# ИСТОРИЯ НА КЛИНИЧНАТА ИМУНОЛОГИЯ В УМБАЛ „АЛЕКСАНДРОВСКА“

***Марта Балева и Елисавета Наумова***

Клиничната имунология в УМБАЛ „Александровска“ има повече от 40-годишна история. Последователно тя се развива в следните няколко структури:

1. През 1971 г. към Катедрата по нефрология на ИСУЛ (сега УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“) е създадена Имунологична лаборатория от проф. д-р Гена Стефанова, която поставя началото на имунологичната диагностика у нас. През 1976 г. лабораторията е пребазирана на територията на Александровска болница в структурата на Научния институт по нефрология, урология, хемодиализа и трансплантация (НИНУХТ), Медицинска академия. В периода 1986–1988 г. е в структурата на Националния център по сърдечно-съдови заболявания (НЦССЗ). През 1988 г. е обособена като самостоятелно звено – Секция по клинична и трансплантационна имунология към Президиума на МА, а в периода 1989–1990 г. административно преминава към структурата на Научния институт по педиатрия. От 1992 г. тя става част от новосъздадената Катедра по клинична лаборатория и клинична имунология към МФ, София. От 1997 г. териториално и структурно към нея преминава Секцията по туморна имунология и терапия при Националния център по онкология, ръководена от проф. д-р Йордан Стоичков, който е основоположник на направлението „Туморна имунология“ в България. През 2000 г. е обособена като Централна лаборатория по клинична имунология (ЦЛКИ), а от 2009 г. е преструктурирана в Клиника по клинична имунология към УМБАЛ „Александровска“.

От създаването на имунологичната лаборатория до 1997 г. неин ръководител е проф. д-р Гена Стефанова, под чието ръководство са внедрени имунологични методи в клиничната нефрология за установяване на промени в клетъчно-хуморалната имунна реактивност при болни с имунни и автоимунни нефропатии и определяне на HLA системата при реципиенти за бъбречна трансплантация и болести. Проф. Стефанова завършва медицина във ВМИ – София. Преминава през етапите на академичната кариера в МУ – София: асистент, доцент и професор. Защитава дисертации за получаването на научните степени „доктор“ и „доктор на медицинските науки“. Специализира по проблемите на трансплантационната имунология във Франция. Автор и съавтор е на повече от 100 труда в областта на клиничната имунология и органната трансплантация. Научен ръководител е на докторските дисертации на проф. Наумова и проф. Михайлова.

Първите разработки на сътрудниците на ЦЛКИ са свързани с диагностиката на нефрологичните болести, като постепенно се разрастват и в другите области на медицината – автоимунни болести, имунодефицити, солидни тумори, онкохематологични заболявания, имунопатология и алергология, трансплантация

на тъкани, органи и клетки. Във връзка с това за първи път у нас са внедрени имунофенотипизиране с моноклонални антитела и флоуцитометрия, молекулярно-биологични методи за изследване на HLA системата, флоуцитометрична кросмач реакция и алоантитела. От 1983 г. тя е единствената структура в България, отговорна за определяне на тъканната съвместимост между донора и реципиента при трансплантация на органи, тъкани и клетки. Екипът ѝ е участвал в първите сърдечни и чернодробни трансплантации и е създател на първия регистър на болните, чакащи бъбречна трансплантация. Във връзка с това през 1999 г. е отличен с награда за медицинско постижение от редакцията на вестник „Форум Медикус“, през 2005 г. получава награда – грамота за съществен принос при осъществяването на първата чернодробна трансплантация в България с дарен от починал пациент орган.

Проф. д-р Елисавета Наумова, с активното участие на проф. Анастасия Михайлова, доц. д-р Даниела Балтаджиева, доц. Милена Иванова и инж. Даниела Маринова, като членове на екипа ѝ, инициира създаването и ръководи изпълнението на Национална програма за развитие на трансплантацията на стволови клетки в РБългария 2007–2013, в рамките на която са създадени Национална публична донорна банка за стволови клетки и костен мозък и Българският регистър за донори на костен мозък, който става член на Световния регистър за донори на костен мозък (BMDW). През 2010 г. проф. Наумова е удостоена с награда „Проф. д-р Стоян Киркович“ на Медицински факултет, МУ – София за изключителни постижения и цялостен принос в областта на медицинската наука и практика. През 2013 година Министерство на здравеопазването и УМБАЛ „Александровска“ награждават проф. Елисавета Наумова, проф. Анастасия Михайлова, доц. Милена Иванова, ст.м.с. Антоанета Недялкова и инж. Даниела Маринова за активно участие и принос в развитието на трансплантационата дейност в България.

През 1997 г. проф. д-р Елисавета Наумова е избрана за завеждащ Секция по клинична и трансплантационна имунология. Под нейно ръководство през 1998 г. структурата е акредитирана от Европейската федерация по имуногенетика (EFI), което допринася за получаването на статут на Национална референтна лаборатория по тъканно типизиране и имунологичен мониторинг през 2000 г. Това е гаранция, че извършваната от нея лечебно-диагностична дейност отговаря на европейските стандарти и резултатите ѝ се признават в световен мащаб, от една страна, а от друга – тя оказва референтна, контролна и методична функция на национално ниво. Като национален консултант по клинична имунология от 2000 г. проф. Наумова ръководи разработването на медицински стандарти „Клинична имунология“ и „Имунологична подготовка при трансплантация на органи, тъкани и клетки“.

Проф. Наумова постъпва на работа като асистент в Имунологична лаборатория при Клиника по нефрология, НИНУХТ, Александровска болница през 1977 г. Преминава през всички етапи на академичната кариера в МУ – София: асистент, доцент и професор към Катедрата по клинична лаборатория и кли-

нична имунология. Защитава дисертации за получаването на научните степени „доктор“ и „доктор на медицинските науки“. Има признати специалности по вътрешни болести, клинична имунология и здравен мениджмънт. Била е на специализации с различна продължителност в САЩ, Холандия, Германия, Франция. Има над 150 публикации у нас и в чужбина. Участва в написването на 10 монографии у нас и на 3 – в чужбина. Проф. Наумова е член на редколегията на 2 български и 3 чужди списания. Участва в 12 международни проекта, като в 8 е главен изпълнител, координатор за България или съпредседател на работната група. Тя участва и в 20 проекта в България, като в 12 е ръководител на проекта, ръководител на докторанта или председател на работна група. Автор и съавтор на едно изобретение, една рационализация и 2 патента за полезен модел. Тези методологии намират приложение в областта на медицината – терапия на болни с активен лупус, трансплантирани болни, както и при диагнозата на хематологични заболявания.

Проф. Елисавета Наумова инициира създаването и ръководи Централната лаборатория по клинична имунология към УМБАЛ „Александровска“, по-късно – и на първата в страната Клиника по клинична имунология с банка за стволови клетки към тази болница. Тя има изключителна заслуга в създаването на пионерното направление в България – „Диагностика и лечение на първичните имунни дефицити“, на Регистър на тези пациенти и прилагането на иновативни методи за лечение. Въз основа на направения комплексен анализ на имунологичните аспекти на бъбречната трансплантация предлага стратегия за подобряване на дългосрочната преживяемост на графта за нашата популация. Под нейно ръководство е разработен и алгоритъм за посттрансплантационен мониторинг при трансплантация на хемопоетични стволови клетки. Проучванията ѝ в областта на антропологията с помощта на съвременни молекулярно-биологични методи водят до допълването на базата данни за биологичната история на българската популация, до верифициране на историческите данни за произхода на тази популация въз основа на HLA клас I и II генни полиморфизми. Проф. Наумова има определен принос в проучването на клетъчните, хуморалните и генетични механизми в развитието на автоимунните болести, някои инфекциозни заболявания и неоплазиите. В рамките на международната мрежа ImAgingE е направено комплексно проучване върху ролята на имунологичните и имуногенетичните фактори на стареенето у нас и в различните европейски популации, данните от които позволяват да се дефинира имунният отговор при стареенето като проинфламаторен процес и да се определят маркери и стратегии за превенция на остаряването на имунната система.

Проф. Наумова има личен принос в утвърждаването на клиничната имунология като основна медицинска специалност и учебно-преподавателска дисциплина. Автор е и на 16 глави от учебници и учебни помагала. Ръководител е на 2 дипломни работи, 7 успешно защитили докторанта и 10 специализанти. Под нейно ръководство са хабилитирани 4 преподаватели – 3 доценти и 1 професор. Членува в редица национални и международни научни организации.

Председател е на Българската асоциация по клинична имунология. От 2015 г. е председател на Европейската федерация за имуногенетика.

Проф. Анастасия Михайлова започва работа в Имунологична лаборатория, НИНУХТ, от 1978 г. като научен сътрудник. Завършва висше образование – магистър по биохимия и микробиология в СУ „Климент Охридски“ през 1975 г. Преминава през етапите на академичното развитие в МУ, София: асистент, доцент и професор. Защитава дисертация за получаването на научната степен „доктор“. Има признати специалности „Биология на човека“ и „лабораторна имунология“ към МУ, София. Специализирала е във Франция. Основните ѝ дългогодишни интереси са главно научно-приложни, поради това че квалификацията и отговорностите ѝ са свързани с диагностично-лечебния процес. Има съществен принос в разработването, валидирането и внедряването на имунологични методологии и подходи за оценка на имунния отговор и е от първите в България въвеждащи и прилагащи флоуцитометричните методи за имунофенотипизиране, функционални тестове, крос-мач реакция и алоантитела. Проучва промените в клетъчния имунен отговор при различни болестни състояния и с възрастта, както и механизмите на алоимунния отговор при бъбречна трансплантация. Проф. Михайлова е от първите, изследващи ролята на NK-клетъчните рецептори при злокачествени заболявания. В резултат на това е въведено и непрекъснато тематично се обновява иновативно за страната научно направление, свързано с изучаване на NK-клетъчните рецептори и техните лиганди при здраве и болест. През последните години като ръководител на направление „Банка за стволови клетки“ към ККИ работи активно по обработката, експертизата и съхраняването на единици кръв от пъпна връв за алогенна трансплантация и проучването на факторите за получаване на качествен продукт за клетъчна терапия. Участва в 19 национални и международни научни проекта. От 10 години ръководи Външната оценка на качеството (ВОК) на показатели на хуморалния имунен отговор и HLA-B27, организирана от Българската асоциация по клинична имунология. Организира и схеми на ВОК за страните от Балканския регион (Region 8) към EFI – Balkan external proficiency testing (Balkan EPT). Член е на EPT комитета към EFI. Научен ръководител е на дипломанти, докторант и специализант. Има над 120 научни публикации у нас и в чужбина. Участва в написването на 10 монографии и учебници. Активно допринася за осъвременяване и подобряване на учебно-преподавателска дейност по клинична и лабораторна имунология в МФ, МУ, София. Член е на Съюза на учените в България, Българската асоциация по клинична имунология, Българското дружеството по трансплантология, Европейската федерация по имуногенетика.

Доц. Даниела Николова Балтаджиева завършва медицина през 1982 г. в Медицинска академия – София. Специалност по имунология придобива през 1996 г. През 1997 г. придобива научно-образователна степен „доктор“. В периода 1999–2007 г. работи в ЦЛКИ, УМБАЛ „Александровска“. През 2007 г. е избрана за доцент в Катедрата по клинична лаборатория и клинична иму-

нология, МФ, МУ – София. Специализира по генетичните проблеми на ИгЕ отговора при поленова алергия в Лабораторията по алергология и клинична имунология – Балтимор. Основните приноси на доц. Балтаджиева са в следните области: имунология на репродукцията, трансплантационна имунология, имуногенетика, имуномодулация, приложение на нови методи в клиничната практика. Автор и съавтор е на множество статии в наши и чужди списания, както и на няколко монографии. Член е на редица национални и международни научни организации.

Доц. Милена Иванова-Шиварова завършва биохимия през 1997 г. в Софийския университет „Св. Климент Охридски“. Постъпва като докторант в ЦЛКИ, УМБАЛ „Александровска“. От 2000 г. е назначена за билог специалист, а впоследствие асистент. През 2001 г. придобива образователна и научна степен „доктор“. Има призната специалност „Лабораторна имунология“ от 2002 г. От 2012 г. е избрана за доцент в Катедрата по клинична лаборатория и клинична имунология на МУ, Клиника по клинична имунология, УМБАЛ „Александровска“, МУ – София. Специализира в областта на имуногенетиката и трансплантационната имунология в Япония, Англия, Холандия, Италия. Като ръководител направление „Тъканна съвместимост и имуногенетика“ тя разработва и въвежда молекулярно-биологични методи за определяне на тъканна съвместимост, изследване на полиморфни гени на имунната система и гени, асоциирани с развитието на миелопролиферативни заболявания. Доц. Иванова има съществени научни приноси в областта на молекулярната биология, имуногенетиката, трансплантационната имунология. Автор и съавтор е на над 50 публикации, 6 глави на монографии и 3 патента за полезни модели. Ръководител и участник е в 16 национални и международни научни проекта в областта на имуногенетиката. Активно участва за подобряване и осъвременяване на учебно-преподавателската дейност по клинична и лабораторна имунология в МФ, МУ – София. Член е на Българската асоциацията по клинична имунология, Европейската федерация по имуногенетика, World Marrow Donor Association. От 2010 г. е инспектор в акредитационната програма, а от 2014 г. – комисионер за регион 8 в акредитационния комитет на Европейската федерация по имуногенетика.

Доц. д-р Снежина Михайлова Кандиларова завършва медицина в МУ-София през 1999 г. Научната степен „доктор“ придобива през 2007 г. Има призната специалност по „Клинична имунология“ от 2005 г. Преминава през всички степени на академично развитие – редовен докторант, асистент, старши асистент, главен асистент и доцент в периода 2003–2016 г. в Катедрата по клинична лаборатория и клинична имунология на МУ – София и Клиниката по клинична имунология на УМБАЛ „Александровска“. Основните ѝ интереси са в областта на клиничната имунология, имуногенетиката, трансплантацията на органи и клетки. Д-р Михайлова има съществен принос в проучването на гените, контролиращи имунния отговор при болест и здраве; в разработване и въвеждане на имунологични методологии и подходи за оценка на имунния

отговор за нуждите на лечебно-диагностичния процес, особено в сферата на имунните дефицити, туморната имунология. Въвежда и разработва подходи за изследване на хемокини, цитокини и цитокинов генен полиморфизъм, както и за доказване на митохондриални ДНК полиморфизми/мутации. Като отговорник направление „Молекулярна диагностика“ д-р Михайлова разви ново направление, свързано с ролята на вирусната репликация за изхода от трансплантация на клетки и органи. Участва в два международни проекта към Европейски съюз и в 13 национални. На един от проектите е водещ изследовател. Има над 40 научни публикации, глави от монографии и ръководства. Активно участва в подобряване и осъвременяване на учебно-преподавателската дейност по клинична имунология в МФ, МУ – София. Член е на Българския лекарски съюз, Българското дружество по трансплантология, Българската асоциация по клинична имунология, European Society for Immunodeficiencies и EFI.

2. През 1973 г. към Катедрата по вътрешни болести на Висшия медицински институт – София и Първа вътрешна клиника на Александровска болница се създава Имунологична лаборатория. Пръв неин ръководител става проф. д-р Михаил Левов Огнянов, роден през 1927 г. в Тирана, починал през 2013 г. в София. Първите назначени лекари в тази лаборатория са д-р Дора Брадистилова (по-късно работи в САЩ), д-р Марта Балева и д-р Красимир Николов. Няколко години по-късно към тях се присъединява и д-р Искра Алтънкова (днес – проф. Алтънкова). Първите разработки в тази Лаборатория са свързани с диагностиката на вирусния хепатит В: антигени, методи за тяхното определяне в серум и чернодробна тъкан. На тази тематика е посветен и дисертационният труд на проф. М. Балева: „Някои антигени на вируса на хепатит В – методи за определяне и клинично значение в гастроентерологията“, защитен през 1979 г. Съвместно проф. Михаил Огнянов, д-р Марта Балева и д-р Красимир Николов разработват методи за изучаване на секреторния имунен отговор в гастроинтестиналния тракт, имунологични методи за диагноза на редица серумни протеини, на миоглобинурия в серум и урина и др.

3. През 1980 г. д-р Марта Балева и д-р Красимир Николов преминават на работа в Имунологичната лаборатория на Катедрата по алергология. Пръв ръководител на Лабораторията е проф. Г. Костурков, по-късно проф. Б. Божков (роден на 6.6.1930 г. в Нова Загора, починал на 6.1.2014 г. в София), а от 2000 г. – проф. М. Балева. Проф. Божков е известен наш учен – алерголог и имунолог. Завършва Медицинския факултет в София през 1954 г. и работи 3 години като военен лекар, а след това като интернист и зав. ревмокардиологичен кабинет в гр. Перник. Специализирал ревмо-кардиология. От 1963 до 1966 г. е асистент в Катедрата по патофизиология към Медицинския факултет – София, в която защитава докторска дисертация „Експериментални и клинични проучвания на биогенните амини и церулоплазмина при ревматичните болести“. От 1966 г. е научен сътрудник в Катедрата по алергология към Медицинския факултет.

Хабилитиран през 1971 г. в Катедрата по алергология и защитава дисертация за научната степен „доктор на медицинските науки“ на тема „Експериментални и клинични проучвания на медиаторните механизми при алергичните реакции и бронхиалната астма“ . От 1981 г. е ст.н.с. I ст. и от 1990 г. – професор по клинична алергология и клинична имунология. Дългогодишен преподавател по вътрешни болести, алергология и клинична имунология. Придобил е специалности по вътрешни болести (1961), ревмокардиология (1963), патофизиология (1966), клинична алергология (1991) и имунология (1995). Бил е зам.-декан на възстановения Медицински факултет от 1991 г. и декан на Деканата за чуждестранни студенти, аспиранти и специализанти до пенсионирането си през 1995 г.

Автор е на 160 публикации в наши и чужди медицински списания. В тях е публикувал резултатите от научните си изследвания в областта на медиаторните и ензимните промени при алергичните реакции, митохондриални ензими, хинони и металопротеини. Разработил е радиоизотопни методи за изследвания на цикличните нуклеотиди и за изследвания на ензими и други, между които „Церулоплазмина като алостеричен ензим“. В областта на клиничните си изследвания открива първите болни у нас с Наследствен ангиоедем (НАЕ) и описва около 60 фамилии с тази болест, като регистрира и Фондация „НАЕ – София“. Описва и алергично-автоимунния припокриващ се синдром.

Автор и редактор на учебници и монографии в областта на клиничната медицина, алергология и имунология, по-значими от които са: „Имуноензимни методи“ (1988), „Приложна алергология“ (1996), „Клинична имунология“ (1997), „Автоимунитет и автоимунни болести“ (3-то изд. 1997), „Имунотерапия“ (1998), „Алергология – принципи и практика“ (1999), „Имунология“ (2000), „Алергия и астма (2003), „Антихистаминови препарати в клиничната практика (2003). Съавтор на общо 20 учебника, практически ръководства и монографии по вътрешни болести, алергология и имунология, свързани с преподавателската му дейност. Регистрирал е 5 рационализации в областта на експерименталната медицина и алергологичните методи на изследване.

През 1982 г. в Лабораторията по имунология на Катедрата по алергология постъпва на работа д-р Дора Попова. Тя работи главно по имунофенотипизирането на онкохематологичните болести, първични и вторични имунни дефицити, автоимунни болести, туморни маркери, диагноза на алергичните болести. Има специалност по клинична имунология. През 2001 г. защитава дисертационен труд на тема „CD5 положителни В-лимфоцити и нарушена имунна толерантност при В-клетъчна хронична лимфолевкоза и ревматоиден артрит“. През 2006 г. се хабилитира като доцент първоначално в болница „Пирогов“, а по-късно е началник на Имунологична лаборатория във ВМА – София.

От 1988 г. д-р Николов, след защита през 1987 г. на дисертационен труд „Антитела срещу нуклеарни антигени – методи за определяне и клинично значение“, е назначен в Катедрата по кожни и венерически болести – София. През 2004 г. се хабилитира и става ръководител на Катедрата и Клиниката по

дерматология към МУ – Варна. От 2012 г. се връща отново в Александровска болница – Клиника по клинична имунология. В областта на дерматовенерологията доц. Николов работи по проблемите на автоимунните болести. Той има 2 специалности: клинична имунология и дерматовенерология.

През 1991 г. д-р Балева е избрана за доцент. През 1995 г. защитава успешно докторска дисертация на тема: „Показатели на хуморалния имунитет при системния лупус еритематодес – съвременни методи за определяне и анализ на диагностичната им стойност“. През 2000 г. е избрана за професор. Има две специалности: клинична имунология и вътрешни болести. Основните ѝ интереси са насочени в областта на клиничната имунология, диагнозата и лечението на автоимунните болести, алергологията. Участва в Международната група по изучаване на антифосфолипидния синдром: Euro-Antiphospholipid Project – 10-годишно проучване, започнало през 2000 г. В проучването участват учени от 20 европейски университетски центъра. Член е на редколегията на списанията „Ревматология“, „Медицински преглед“, „MedINFO“, Central Eur J Medicine и на Годишника на Българската асоциация по клинична имунология. Самостоятелно и в колектив е написала над 200 статии. Участва в написването на следните монографии: Имуноензимни методи (1988), Клинична имунология (1997), Алергология (1999), Белодробен тромбемболизъм (2000), Клинична алергология (2001), Онкология (2001), Клинична имунология (2001), Вътрешна медицина (2004), Клинична лаборатория и клинична медицина (2005), Нова хипотеза за патогенезата на автоимунните болести и неоплазии (2013), Нефрология (2015).

Съвместно с доц. К. Николов участва в разработването на 6 рационализации и 3 изобретения. Под нейно ръководство успешно са защитили 9 докторанти. Участва в преподаването по вътрешни болести и по клинична имунология. През 2008 г. проф. Балева преминава на работа в Клиниката по клинична имунология.

Основните проблеми, по които се работи в Имунологичната лаборатория на Катедрата по алергология, са: флоуцитометрия при онкохематологични, алергични и автоимунни болести, ELISA методи за определяне на различни антигени и антитела в ниска концентрация: секреторен ИгА, ДНК антитела, ревматоиден фактор, кардиолипинови антитела. Последователно в клиниката се въвеждат следните съвременни изследвания на хуморалния имунен отговор: имунни комплекси, антинуклеарни антитела, антитела срещу негативно заредени фосфолипиди, тотални и специфични ИгЕ, ANCA, С1 естеразен инхибитор и др.

В този материал си позволихме да споменем по-старите и по-дългогодишните служители на структурите по клинична имунология в УМБАЛ „Александровска“, които са имали решаваща роля за лечебно-диагностичната стратегия, научната проблематика и административното ръководство и са допринесли за развитието и утвърждаването на клиничната имунология в България. Не трябва да пропускаме имената и на други дългогодишни служители като: Антоанета Недялкова – ст.мед. сестра на ККИ, инж. Даниела Маринова, Димитрина Дуцова – биолог, д-р Людмила Куин и много други, които също имат безспорен принос.

Накрая трябва да споменем и тези, които са се изградили като специалисти в клиничната и лабораторната имунология и поемат щафетата като: асистент д-р Петя Янкова, д-р Невена Гешева, д-р Спаска Лисичкова, биолозите Атанаска Георгиева и Цветелин Луканов, инж.-химик Валентина Атанасова.

# ПЕРИОПЕРАТИВНИ ИНДЕКСИ НА CD64-ЕКСПРЕСИЯТА ВЪРХУ ГРАНУЛОЦИТИТЕ

***Д. Попова, Р. Владимирова, Е. Викентиева, В. Кьосев, В. Мутафчийски, К. Василев, Г. Коташев, П. Иванов, Е. Белоконски, Г. Григоров, В. Христова***

*Военномедицинска академия*

Имунният отговор при стрес е комплексен и деликатен баланс между про- и антиинфламаторни механизми и включва различни клетки и цитокини. При активирането на имунната система в резултат от инфекция или стрес, в това число оперативен, про- и антиинфламаторната фаза протичат едновременно без превес на едната или другата. При свръхстимулация обаче при синрома на системния възпалителен отговор (ССВО – SIRS) проинфламаторните реакции изпреварват антиинфламаторната фаза с участието на провъзпалителни цитокини и свръхактивиране на левкоцитите. Освободените литични ензими и свободни радикали са причина за увреждане на ендотела, с увеличаване на съдовата пропускливост, настъпването на циркулаторни нарушения и понякога органни увреди. В противовес се отключва синдромът на компенсаторен антиинфламаторен отговор (СКАИО – CARS), който води да имунна супресия. На този етап пациентите са склонни да развиват инфекции (*Rittirsch D. и сътр., 2008*). Без адекватно ранно лечение те могат да прогресират до сепсис, септичен шок или дори смърт със синдром на мултиорганна недостатъчност (СМОН – MODS). Независимо от прогреса в лечението с антибиотици, сепсисът води до фатален изход в около 50% от болните според статистическите данни в края на 20-ти век, като в последните години смъртен изход се регистрира в около 30% от случаите (*Dombrovskiy VY. и сътр., 2007; Kaukonen K. и сътр., 2014*). Това се свързва с късно провежданото лечение, когато органните увреждания са вече необратими. По тази причина ранното разпознаване на сепсиса и стартирането на терапия са от особена важност (*Timsit J.F. и сътр., 2014*). Като златен стандарт в диагнозата на сепсиса се счита кръвната култура. Късното получаване на резултатите от нея (на втория ден), а от друга страна – ненужното изписване на антибиотици показват, че са необходими нови биомаркери за бързо идентифициране на пациентите с риск за развитие на септично състояние.

В последните години се счита, че експресията на CD64 върху гранулоцитите може да ускори диагнозата на сепсиса (*Davis B.H. и сътр., 2005*). CD64 молекулата представлява високоафинитетен рецептор за Fc региона на IgG(FcgRI). С негова помощ биват фагоцитирани микроорганизмите, опсонизирани с IgG1 и IgG3 имуноглобулини. Моноцитите и макрофагите експресират CD64 конституционално, докато неутрофилните гранулоцити в покой носят малко подобни рецептори (около 1000/клетка) (*Barth E. и сътр., 2001*). При активирането им като клетки, участващи

във вродения имунен отговор, в рамките на 4–6 часа, експресията на CD64 нараства значително под влияние на цитокините (интерферон-g, интерлевкин-12 и гранулоцитния колонии-стимулиращ фактор) и се връща към базалните си нива няколко дни след овладяване на стимула, който я е индуцирал (*Davis B.H. и сътр., 2006; Song S.H. и сътр., 2008*). Експресията на CD64 върху гранулоцитите е стабилна за срок от 48–72 часа при съхранение на кръвната проба на стайна температура, а необходимото количество кръв е под 500 ml (*Davis B.H. и сътр., 2005*).

Клинично, определянето на CD64 експресията от гранулоцитите се отличава с висока чувствителност (75%) и специфичност (88%) по отношение развитието на сепсис (*Wang X. и сътр., 2015*), неговата тежест (заедно с интерлевкини -6 и -8) и риска от смъртен изход (с интерлевкин-8) (*Cardelli P. и сътр., 2008; Livaditi O. и сътр., 2006; Gámez-Díaz L.Y. и сътр., 2011*). CD64-експресията е индикатор за тежест и при локални инфекции (*Tanaka S. и сътр., 2011*). Счита се, че повишената експресия на CD64 е показателна за инфекция след сърдечно-съдови операции (*Strohmeyer J.C. и сътр., 2003; Daryapeyma A. и сътр., 2009*). Свързва се и с необходимостта от антибиотично приложение (*Dimoula A. и сътр., 2014*).

Методично експресията на CD64 върху гранулоцитите се изследва флоуцитометрично, като се използват няколко подхода: определяне на процента CD64+ гранулоцити, силата на експресия на CD64 или с помощта на индекси, които отнасят тази експресия към стандартни флуорохром-маркирани микрочастици или към останалите кръвни клетки (*Dimoula A. и сътр., 2014*). Моноцитите служат като вътрешна положителна контрола, докато лимфоцитите се използват като отрицателна.

Всичко това ни даде основание да изследваме в динамика експресията на CD64 върху гранулоцитите при пациенти, оперирани по повод на херния на предната коремна стена или колоректален карцином (КРК), за оценка на клиничната полза от този маркер.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Проучването обхваща 65 последователно оперирани пациенти с КРК (37 лица) и абдоминална херния (28). 9 от последните са класифицирани като клас 1 – здрави лица без оплаквания, според критериите на Американското дружество на анестезиолозите (ASA). Те са разглеждани като здрави контроли, подложени на хирургична интервенция (стрес) (Таблица 1).

**Таблица 1. Характеристика на изследваните пациенти**

| | **Колоректален карцином – 37** | | **Абдоминална херния – 28** | |
|---|---|---|---|---|
| **Възраст** | Средна – 64 г. | От 49 до 86 г. | Средна – 58 г. | От 18 до 81 г. |
| **Пол** | Мъже – 26, жени – 11 | Мъже : жени: 2,36 | Мъже – 28, жени – 0 | |
| **Тип операция** | Лапароскопска – 22 | Отворена – 15 | Лапароскопска – 14 | Отворена – 14 |

Предоперативно, като клинични параметри, за пациентите са регистрирани възрастта, хранителните навици, оценка на общото състояние според ASA, а за пациентите с КРК – туморната локализация и класификацията според хистологичната находка (G) и разпространението на неоплазията (TNM). Във връзка с оперативната намеса са отбелязвани типът операция (миниинвазивна, отворена), нейният обем, времетраене (минути) и кръвозагуба (ml). Следоперативно се следи за наличието на температура, необходимостта от прием на антибиотици, обезболяващи средства, както и моментът на раздвижване, флатуленция/дефекация, захранване, дренаж. Болничният престой отразява тежестта на оперативната намеса и последващия следоперативен период.

Лабораторните параметри са проследявани трикратно – предоперативно (ПО), на първия и седмия следоперативен ден (съответно 1 СОД и 7 СОД). Като възпалителни маркери са измервани серумните нива на С-реактивния протеин (СРП), скоростта на утаяване на еритроцитите (СУЕ), фибриногена, тоталния протеин, албумина и амилазата. Отчитани са и промените, свързани с кръвните клетки: еритроцити, хемоглобин, хематокрит, левкоцити и диференциална кръвна картина.

По отношение на имунния отговор, флоуцитометрично (FACSCanto II – Becton Dickinson) са определяни параметри, свързани с вродения и специфичен имунен отговор (Таблица 2).

**Таблица 2. Изследвани клетъчни параметри на имунния отговор**

| Вроден имунен отговор | Специфичен имунен отговор |
|---|---|
| Моноцити(CD14+)<br>● % CD64 в CD14<br>● % CD163 в CD14<br>● % HLA-DR в CD14 | Т-лимфоцити (CD3+)<br>● % HLA-DR в CD3<br>● % CD38 в CD3<br>● CD279 в CD3 |
| Неутрофилни гранулоцити<br>● % CD64 в гранулоцитите<br>● % CD163 в гранулоцитите<br>● % HLA-DR в гранулоцитите | В-лимфоцити (CD19+)<br>● % CD38 в CD19<br>● % HLA-DR в CD19 |
| NK-клетки (CD3-CD16/CD56+)<br>● % HLA-DR в NK-клетките | |
| NKT-клетки (CD3+ CD16/CD56+) | |

Освен посочените повърхностно-клетъчни маркери, за неутрофилните гранулоцити са изчислени и следните индекси за експресията на CD64 в тях:

***Gr индекс 1 CD64*** **= $MFI_{CD64}$ на Gr/MFI на микрочастици**

*Ly индекс CD64* = $MFI_{CD64}$ на Ly/MFI на микрочастици

*Mo индекс CD64* = $MFI_{CD64}$ на Mo/MFI на микрочастици

***Gr индекс 2 CD64*** **= ($MFI_{CD64\ Gr} - MFI_{CD64\ Ly}$) / ($MFI_{CD64\ Mo} - MFI_{CD64\ Ly}$) x 100.**

***Използвани съкращения:*** *Gr – гранулоцити; MFI – mean fluorescence intensity – среден интензитет на флуоресценцията; Ly – лимфоцити; Mo – моноцити.*

За да се приемат Gr индекси за CD64 като валидни се изисква отрицателната контрола (Ly индекс CD64) да има стойност под 1, а положителната контрола (Mo индекс CD64) да е над 3 (*Icardi M. и сътр., 2009)*.

Изборът на изследваните клетъчни маркери е продиктуван от познанието за участието им в про- и антивъзпалителната фаза на имунния отговор на оперативния стрес (Фигура 1):

| Провъзпалителна фаза | Противовъзпалителна фаза | |
|---|---|---|
| ССВО (SIRS) | СКАИО (CARS) | |
| ВРОДЕН ИМУНИТЕТ | СПЕЦИФИЧЕН ИМУНИТЕТ | Имуносупресия |
| Mo / Mø, Gr, NK, NKT | Ly, T-Ly | Риск от инфекции/сепсис |
| CD64 HLA-DR | CD279 (PD-1) | $CD64_{Gr}$ |
| | Mo | СМОН (MODS) |
| | HLA-DR CD163 | |

**Фигура 1. Изследвани клетъчни маркери в отговор на оперативния стрес**

***Използвани съкращения:*** *ССВО – синром на системния възпалителен отговор; SIRS – Systemic inflammatory response syndrome; Mo/Mø – моноцити/макрофаги; Gr – гранулоцити; NK – natural killers – естествени клетки убийци; СКАИО – синдром на компенсаторен анти-инфламаторен отговор; CARS – compensatory anti-inflammatory response syndrome; Ly – лимфоцити; PD-1 – programmed cell death-1; СМОН – синдром на мултиорганна недостатъчност; MODS – multiple organ dysfunction syndrome*

Молекулата CD279 (PD-1) има регулаторни функции и възпрепятства активирането на Т-лимфоцитите, като осигурява автотолерантност и не позволява развитието на автоимунни реакции. Потискащият ефект на антигена се постига чрез индуциране на апоптоза на антиген-специфичните Т-лимфоцити в лимфните възли, с успоредно намаление на апоптозата на регулаторните Т-клетки (Treg). Увеличената експресия е белег за сепсис-индуцирана имуносупресия (*Biron B. M. и сътр., 2015)*.

Рецепторът CD163 има висок афинитет към комплекса от хемоглобин/хаптоглобин и спомага за неговото елиминиране в хода на различни възпалителни заболявания. Той се индуцира от интерлевкин-6 (IL-6), глюкокортикоиди с IL-10 при съзряването на моноцитите във фагоцитиращи макрофаги и се потиска от интерферон-gи липополизахариди (*Groselj-Grenc M. и сътр., 2008)*.

Резултатите са обработени статистически и са графично онагледени със статистически пакет IBM SPSS Statistics v.21. Използвани са непараметрични

методи на анализ, тъй като 68% от предоперативните групи данни се различават по разпределение от Гаусовото (тест на Колмогоров – Смирнов). За сравнение между групите е използван тестът на Mann – Whitney за независими извадки или свързани данни. За корелационен анализ е приложен тестът на Spearman с оценъчна скала по Colton. За ниво на статистическа значимост се приема $p < 0,05$.

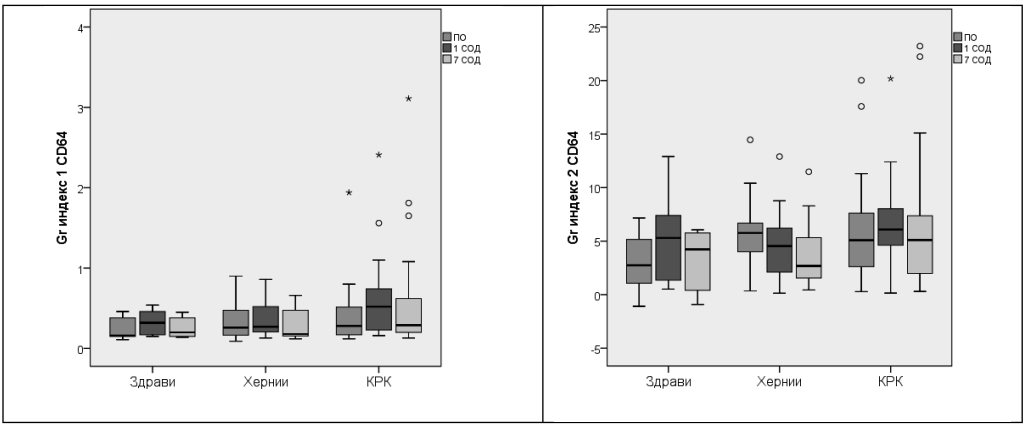
## РЕЗУЛТАТИ

### Гранулоцитна експресия на CD64 при пациенти, оперирани по повод на абдоминални хернии

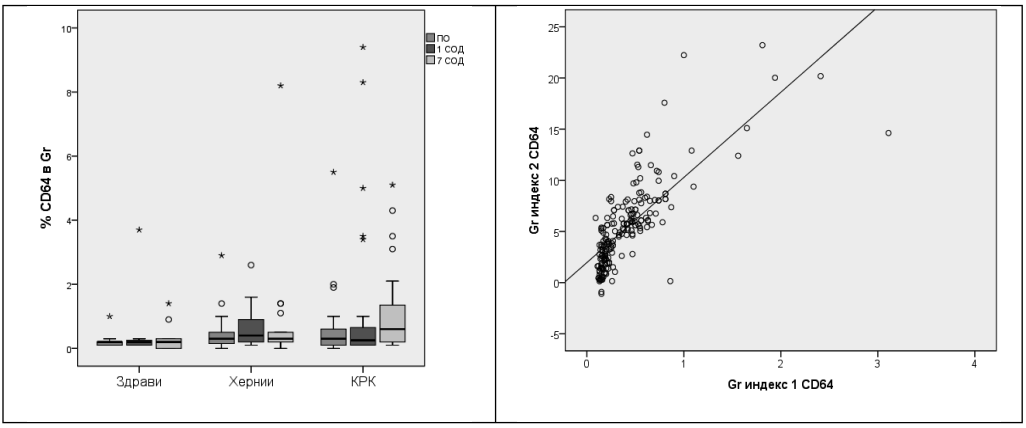
Сравнението на трите изследвани показателя за гранулоцитната експресия на CD64 при пациенти с абдоминална херния с клас 1 и по-горни класове, според критериите на ASA, не показва статистически значими разлики (Фигура 2 и 3). Това означава, че пациентите с абдоминална херния и субективни оплаквания или функционални отклонения, които са включени в проучването, не се отличават от имунологично здравите лица (клас 1 по ASA). По тази причина групата оперирани с абдоминални хернии може да се разглежда като контролна.

### Динамика в гранулоцитната експресия на CD64

Изчислените гранулоцитни индекси за експресията на CD64 показват най-високи стойности на 1 СОД с последваща тенденция към достигане на предоперативните стойности на 7 СОД и дори спад под тях поради включените компенсаторни имуносупресивни механизми. Разликите са статистически значими за двата индекса и процента на CD64 в гранулоцитите при сравненията ПО / 1 СОД (p съответно < 0,001; 0,052; 0,044), както и за сравненията между индексите на 1 СОД / 7 СОД (p съответно 0,009; 0,007) (Фигура 2 и 3).




**Фигура 2. Промени в динамиката на CD64-експресията според изчислените гранулоцитни индекси при оперирани здрави лица, пациенти с абдоминални хернии и КРК**




**Фигура 3. Промени в динамика на процента CD64 в гранулоцитите при оперирани здрави лица, пациенти с абдоминални хернии и КРК. Корелация между изчислените гранулоцитни индекси за експресията на CD64 в гранулоцитите**

**Динамика в гранулоцитната експресия на CD64 в зависимост от повода за хирургична намеса**

При пациентите с хернии на предната коремна стена се намират статистически значими разлики единствено за първия гранулоцитен индекс, измерен следоперативно – между 1 СОД и 7 СОД ($p = 0,04$).

За оперираните по повод на КРК първият гранулоцитен индекс се увеличава значително на 1 СОД ($p = 0,014$), а процентът на CD64 в гранулоцитите не успява да се възстанови следоперативно (разлика между 1 СОД и 7 СОД с $p = 0,019$) (Фигури 2 и 3).

**Гранулоцитна експресия на CD64 в зависимост от повода за хирургична намеса**

Статистически значими разлики се намират между групите на имунологично здравите оперирани лица за абдоминални хернии и пациентите с КРК на 1 СОД за първия гранулоцитен индекс (медианни стойности съответно 0,32 и 0,52; $p = 0,044$) и за процента CD64 в гранулоцитите на 7 СОД (медианни стойности съответно 0,2 и 0,6; $p = 0,033$) (Фигури 2 и 3).

**Корелационни зависимости между експресията на CD64 и останалите изследвани параметри**

Между двата изчислени индекса за експресия на CD64 се намира много добра корелация според оценъчната скала на Colton ($\rho > 0,75$). Това се отнася до всички предоперативни и следоперативни сравнения на двете групи пациенти (абдоминални хернии и КРК), с изключение на болните оперирани за херния в 1 СОД ($\rho = 0,643$ – умерена корелация) (Фигура 3, Таблици 3 и 4).

Гранулоцитните индекси за експресия на CD64 не корелират с типа оперативна намеса – миниинвазивна или отворена ($p > 0,05$).

Интерес представляват значително отклоняващите се стойности за индексите на гранулоцитна CD64-експресия при пациентите с КРК. Регистрират се статистически значими разлики за множество показатели между групата с индекси на гранулоцитна CD64-експресия в референтните граници и тази с увеличени такива. В групата с високи индекси на гранулоцитна CD64-експресия се намират:

- повишени нива за показателите фибриноген, левкоцити, абсолютен брой неутрофилни, еозинофилни и базофилни гранулоцити, абсолютен брой моноцити, лимфоцити, CD3+ Т-лимфоцити, процент CD19+ В-лимфоцити, повишена експресия на CD64 в моноцитите и моноцитен индекс;
- намалени нива за показателите хематокрит, еритроцити, хемоглобин, общ белтък, албумин, абсолютен брой NK-клетки, намалена експресия на CD163 и HLA-DR в моноцитите.

Като обобщаващ показател – болничният престой има медианна стойност 4 дни при пациентите с индекси на гранулоцитна CD64-експресия в референтните граници (до 8 дни), докато в групата с високи индекси на гранулоцитна CD64-експресия болничният престой има медианна стойност 7,5 дни и достига до 12 дни.

За пациентите, оперирани за абдоминални хернии, се установяват следните статистически значими корелации между експресията на CD64 и останалите изследвани параметри, включени в проучването (Таблица 3):

**Таблица 3. Статистически значими корелации (тест на Spearman) между експресията на CD64 и останалите изследвани параметри при пациенти, оперирани за абдоминални хернии**

| Хернии | Гранулоцитен индекс 1 | | | Гранулоцитен индекс 2 | | | % CD64 в гранулоцитите | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Параметър | p | ρ | Параметър | p | ρ | Параметър | p | ρ |
| ПО | Фибриноген | < 0,001 | 0,625 | Възраст | 0,011 | 0,473 | % еозинофили | 0,009 | -0,487 |
| | % HLA-DR в CD3 | 0,009 | -0,484 | Фибриноген | < 0,001 | 0,642 | Ео – абс. брой | 0,018 | -0,444 |
| | Gr индекс 2 | < 0,001 | 0,760 | СРП | 0,021 | 0,435 | | | |
| | % CD64 в Mo | 0,056 | -0,365 | Gr-индекс 1 | < 0,001 | 0,760 | | | |
| | % HLA-DR в Mo | 0,019 | -0,442 | % CD64 в Mo | 0,002 | -0,565 | | | |
| | Mo индекс – CD64 | < 0,001 | 0,736 | % CD163 в Mo | 0,023 | -0,430 | | | |
| | | | | Mo-индекс – CD64 | 0,039 | 0,392 | | | |
| 1 СОД | Общ белтък | 0,054 | 0,361 | % HLA-DR в CD3 | 0,014 | -0,449 | Амилаза | 0,028 | 0,408 |
| | Албумин | 0,012 | 0,460 | Gr-индекс 1 | < 0,001 | 0,643 | % HLA-DR в CD3 | 0,026 | 0,412 |
| | % HLA-DR в CD3 | 0,004 | -0,522 | % HLA-DR в Gr | 0,058 | -0356 | | | |
| | Gr-индекс 2 | < 0,001 | 0,643 | % HLA-DR в Mo | 0,002 | -0,559 | | | |
| | % HLA-DR в Mo | < 0,001 | -0,636 | | | | | | |
| | Ly-индекс– CD64 | 0,014 | 0,451 | | | | | | |
| | Mo-индекс – CD64 | 0,002 | 0,546 | | | | | | |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **7 СОД** | Левкоцити | 0,032 | -0,399 | Амилаза | 0,035 | 0,393 | Левкоцити | 0,029 | -0,405 |
| | % CD19 | 0,009 | 0,474 | % CD19 | 0,012 | 0,461 | Gr – абс. брой | 0,045 | -0,375 |
| | CD19 абс. брой | 0,030 | 0,403 | CD19 абс. брой | 0,012 | 0,458 | % лимфоцити | 0,029 | 0,405 |
| | Gr-индекс 2 | < 0,001 | 0,851 | % NKT-клетки | 0,052 | -0,364 | % CD19 | 0,033 | 0,398 |
| | % HLA-DR в Gr | 0,032 | 0,399 | Gr-индекс 1 | < 0,001 | 0,851 | | | |
| | % HLA-DR в Mo | < 0,001 | -0,679 | %CD163 в Mo | 0,040 | 0,384 | | | |
| | Ly-индекс– CD64 | 0,048 | 0,370 | %HLA-DR в Mo | 0,002 | -0,544 | | | |
| | Mo-индекс – CD64 | < 0,001 | 0,680 | Mo-индекс – CD64 | 0,032 | 0,400 | | | |

***Използвани съкращения:*** *ПО – предоперативно; СОД – следоперативен ден; Mo – моноцити; Ly – лимфоцити; абс. брой – абсолютен брой; СРП – С-реактивен протеин; Gr – гранулоцити; Eo – еозинофили*

При оперираните болни с КРК се намират статистически значими корелации между експресията на CD64 и останалите изследвани параметри както следва (Таблица 4):

**Таблица 4. Статистически значими корелации (тест на Spearman) между експресията на CD64 и останалите изследвани параметри при пациенти, оперирани за КРК**

| **КРК** | **Гранулоцитен индекс 1** | | | **Гранулоцитен индекс 2** | | | **% CD64 в гранулоцитите** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **Параметър** | **p** | ρ | **Параметър** | **p** | ρ | **Параметър** | **p** | ρ |
| **ПО** | % HLA-DR в CD3 | < 0,001 | -0,624 | Възраст | 0,030 | -0,348 | % CD163 в Gr | < 0,001 | 0,545 |
| | Gr индекс2 | < 0,001 | 0,844 | Операция – min | 0,004 | 0,454 | % HLA-DR в Mo | < 0,001 | -0,560 |
| | % CD64 в Gr | < 0,001 | 0,554 | Ly – абс. брой | 0,031 | 0,346 | Ly-индекс– CD64 | 0,047 | 0,320 |
| | % CD64 в Mo | 0,008 | 0,417 | CD3 – абс. брой | 0,057 | 0,307 | Mo-индекс – CD64 | 0,014 | 0,389 |
| | % HLA-DR в Mo | < 0,001 | -0,748 | % HLA-DR в CD3 | 0,013 | -0,393 | | | |
| | Ly-индекс– CD64 | < 0,001 | 0,623 | Gr-индекс 1 | < 0,001 | 0,844 | | | |
| | Mo-индекс – CD64 | 0,001 | 0,507 | % CD64 в Gr | < 0,001 | 0,553 | | | |
| | | | | % HLA-DR в Mo | < 0,001 | -0,546 | | | |
| | | | | Ly-индекс – CD64 | 0,010 | 0,410 | | | |
| **1 СОД** | Антибиотици | 0,006 | -0,446 | Антибиотици | 0,010 | -0,420 | % CD163 в Gr | 0,003 | 0,472 |
| | Болничен престой | 0,051 | 0,323 | % HLA-DR в CD3 | 0,008 | -0,429 | % CD64 в Mo | 0,022 | 0,374 |
| | СРП | 0,019 | 0,385 | Gr-индекс 1 | < 0,001 | 0,826 | Mo-индекс – CD64 | 0,050 | 0,325 |
| | % HLA-DR в CD3 | 0,003 | -0,479 | % CD64 в Mo | 0,034 | 0,349 | | | |
| | Gr-индекс2 | < 0,001 | 0,826 | % HLA-DR в Mo | < 0,001 | -0,662 | | | |
| | % CD64 в Mo | 0,001 | 0,518 | | | | | | |
| | % HLA-DR в Mo | < 0,001 | -0,691 | | | | | | |
| | Ly-индекс– CD64 | 0,005 | 0,452 | | | | | | |
| | Mo-индекс – CD64 | < 0,001 | 0,868 | | | | | | |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **7 СОД** | Възраст<br>Операция – min<br>Обезболяващи<br>Болничен престой<br>Хемоглобин<br>Еритроцити<br>Хематокрит<br>% моноцити<br>СУЕ<br>% HLA-DR в CD3<br>Gr-индекс2<br>% HLA-DR в Gr<br>% CD163 в Mo<br>Ly-индекс–CD64<br>Mo-индекс – CD64 | 0,016<br>0,024<br>0,027<br>< 0,001<br>0,003<br>0,001<br>0,001<br>< 0,001<br>0,001<br>0,024<br>< 0,001<br>0,006<br>0,001<br>0,001<br>< 0,001 | -0,395<br>0,372<br>0,364<br>0,627<br>-0,476<br>-0,511<br>-0,509<br>0,621<br>0,528<br>-0,370<br>0,765<br>0,447<br>-0,538<br>0,505<br>0,804 | Плодове/зеленчуци<br>Консервирани хр.<br>Операция – min<br>Болничен престой<br>Хемоглобин<br>Еритроцити<br>Хематокрит<br>% еозинофили<br>Eo – абс. брой<br>СРП<br>% CD38 в CD19<br>Gr-индекс 1<br>% CD64 в Gr<br>% HLA-DR в Gr<br>% CD163 в Mo<br>% HLA-DR в Mo<br>Ly-индекс–CD64<br>Mo-индекс – CD64 | 0,011<br>0,012<br>0,003<br>0,004<br>0,023<br>0,020<br>0,010<br>0,035<br>0,031<br>0,041<br>0,020<br>< 0,001<br>0,039<br>< 0,001<br>0,008<br>0,007<br>0,004<br>0,017 | 0,411<br>-0,411<br>0,482<br>0,462<br>-0,372<br>-0,380<br>-0,416<br>-0,348<br>-0,355<br>0,338<br>-0,382<br>0,765<br>0,340<br>0,610<br>-0,430<br>-0,435<br>0,461<br>0,389 | Обезболяващи<br>Болничен престой<br>Еритроцити<br>Хематокрит<br>% моноцити<br>СУЕ<br>% CD163 в Mo<br>Mo индекс – CD64 | 0,041<br>< 0,001<br>0,012<br>0,037<br>< 0,001<br>0,008<br>0,037<br>< 0,001 | 0,337<br>0,622<br>-0,410<br>-0,343<br>0,805<br>0,428<br>-0,345<br>0,833 |

***Използвани съкращения:*** *ПО – предоперативно; СОД – следоперативен ден; Gr – гранулоцити; Mo – моноцити; Ly – лимфоцити; СРП – С-реактивен протеин; min – минути; абс. брой – абсолютен брой; хр. – храни*

## ОБСЪЖДАНЕ

Няма единно становище за праговите стойности на изчисляваните гранулоцитни индекси за експресия на CD64 (*Grey D. и сътр., 2011; Chen Q. и сътр., 2014*). Приемаме, че първият гранулоцитен индекс, отнасящ CD64-експресията към тази на съответно маркирани микрочастици, е с праг от 1,2. Той измерва подостоверно абсолютните промени в експресията на антигена от втория индекс, който ги отнася към останалите кръвни клетки – лимфоцити и моноцити. Моноцитите обаче при активиране увеличават повърхностните си CD64 молекули. За втория гранулоцитен индекс приемаме прагова стойност 13.

От представените резултати е видно, че провъзпалителната фаза на следоперативния имунен отговор е изразена непосредствено след оперативната намеса, като в нея участват провъзпалителните серумни маркери като: фибриноген, СРП, общ белтък, албумин, амилаза, СУЕ при пациентите с хернии на предната коремна стена и СРП и СУЕ при болните с КРК, заедно с гранулоцитното активиране.

В последната група на КРК, на 7 СОД, намаляват еритроцитите, хемоглобинът и хематокритът. В ранния следоперативен период (до изписване на пациента – *Jonsson C.A. и сътр., 2011*) се променя реактивността на клетките, участващи във вродения имунен отговор – гранулоцити и моноцити. Активирането на гранулоцитите от оперативния стрес, оценено чрез експресията на FcγRI (CD64), настъпва с максимум на 1 СОД и показва тенденция към възстановяване на 7 СОД. Гранулоцитните индекси за CD64-експресия показват права корелация с ранно повишения антиген CD163 (1 СОД) и късната експресия на HLA-DR при гранулоцитите на пациенти с КРК и обратна корелация със следоперативната HLA-DR-експресия при гранулоцитите на пациентите с хернии.

По отношение на моноцитите, гранулоцитните индекси за CD64-експресия показват права корелация със CD64 върху моноцитите и моноцитния индекс при болните с КРК. Обратни корелации се регистрират за HLA-DR-експресията върху моноцитите при всички изследвания. Това отразява намаления капацитет на моноцитите да представят антигени – една от съществените функционални характеристики на тези клетки. С увеличаване на гранулоцитната активация расте и следоперативната експресия на CD163 с цел отстраняване на клетъчните разпадни продукти при пациентите с хернии.

Клетките на специфичния имунен отговор – лимфоцитите – се включват постъпателно в следоперативните промени. Заедно с гранулоцитното активиране, предоперативно и на 1 СОД намаляват активираните Т-лимфоцити (HLA-DR+), а при пациентите с хернии – на 7 СОД намалява делът на NKT-клетките в периферната кръв, най-вероятно поради участието им във възпалителното огнище. Обратно, в този случай расте относителният дял (процент) и абсолютният брой на кръвните В-лимфоцити.

При пациентите с КРК следоперативните гранулоцитни индекси за CD64-експресия корелират с хранителните навици (недостатъчна консумация на плодове и зеленчуци и употреба на консервирани храни), с продължителността на оперативната намеса, необходимостта от антибиотици и обезболяващи средства и в крайна сметка с болничния престой.

Повечето от повишените индекси на гранулоцитна CD64-експресия са наблюдавани следоперативно, което намалява тяхната приложимост като ранни предоперативни биомаркери, свързани с риск за по-тежко протичане на следоперативния период.Това становище се подкрепя дори за пациенти със сепсис (*Gámez-Díaz L.Y. и сътр., 2011).*

## ИЗВОДИ

Индексите на гранулоцитна CD64-експресия се увеличават след оперативна интервенция и поддържането им във високи стойности корелира с по-продължителното протичане на възстановителния период. Те корелират с познатите маркери за възпаление, както и с функционалните промени в моноцитите и лимфоцитите, като отражение на участието на вродения и специфичен имунен отговор в следоперативните промени.

Индексите на гранулоцитна CD64-експресия не могат да се използват като прогностични или предиктивни маркери в рутинната хирургична практика. Тяхната употреба би могла да се препоръча за мониториране ефекта от антибиотично лечение или при съмнение за системно възпаление или септично състояние.

## ЛИТЕРАТУРА:


1. Barth E, Fischer G, Schneider EM, et al. Differences in the expression of CD64 and mCD14 on polymorphonuclear cells and on monocytes in patients with septic shock. Cytokine. 2001; 14:299–302.
2. Biron BM, Ayala A, Lomas-Neira JL. Biomarkers for Sepsis: What Is and What Might Be? Biomark Insights. 2015 Sep 15;10(Suppl 4):7–17. doi: 10.4137/BMI.S29519. eCollection 2015.
3. Cardelli P, Ferraironi M, Amodeo R, et al. Evaluation of neutrophil CD64 expression and procalcitonin as useful markers in early diagnosis of sepsis. Int J Immunopathol Pharmacol. 2008; 21:43–9.
4. Chen Q, Shi J, Fei A, et al.Neutrophil CD64 expression is a predictor of mortality for patients in the intensive care unit.Int J Clin Exp Pathol. 2014 Oct 15; 7(11):7806–13. eCollection 2014.
5. Daryapeyma A, Pedersen G, Laxdal E, et al. Neutrophil CD64 as a marker for postoperative infection: a pilot study. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2009; 38:100–3.
6. Davis BH, Bigelow NC. Comparison of neutrophil CD64 expression, manual myeloid immaturity counts, and automated hematology analyzer flags as indicators of infection or sepsis. Lab Hematol. 2005; 11:137–47.
7. Davis BH, Olsen SH, Ahmad E, Bigelow NC. Neutrophil CD64 is an improved indicator of infection or sepsis in emergency department patients. Arch Pathol Lab Med. 2006; 130:654–61.
8. Dimoula A, Pradier O, Kassengera Z, et al. Serial Determinations of Neutrophil CD64 Expression for the Diagnosis and Monitoring of Sepsis in Critically Ill Patients. Clin Infect Dis. 2014 Mar; 58(6):820–9. doi: 10.1093/cid/cit936.
9. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. Crit Care Med. 2007; 35:1244–50.
10. Gámez-Díaz LY, Enriquez LE, Matute JD, et al. Diagnostic Accuracy of HMGB-1, sTREM-1, and CD64 as Markers of Sepsis in Patients Recently Admitted to the Emergency Department. Acad Emerg Med. 2011; 18:807–15.
11. Grey D, Sack U, Scholz M, et al. Increased CD64 expression on polymorphonuclear neutrophils indicates infectious complications following solid organ transplantation. Cytometry A. 2011 Jun; 79(6):446–60. doi: 10.1002/cyto.a.21049.
12. Groselj-Grenc M, Ihan A, Derganc M. Neutrophil and monocyte CD64 and CD163 expression in critically ill neonates and children with sepsis: comparison of fluorescence intensities and calculated indexes. Mediat Inflamm. 2008; 2008:202646.
13. Icardi M, Erickson Y, Kilborn S, et al. CD64 index provides simple and predictive testing for detection and monitoring of sepsis and bacterial infection in hospital patients. J Clin Microbiol. 2009; 47:3914–9.
14. Jonsson CA, Stenberg A, Hollman Frisman G. The lived experience of the early postoperative period after colorectal cancer surgery. Eur J Cancer Care. 2011; 20 (2): 248–256.

15. Kaukonen K, Bailey M, Suzuki S, et al. Mortality Related to Severe Sepsis and Septic Shock Among Critically Ill Patients in Australia and New Zealand, 2000–2012. JAMA. 2014; 311(13):1308–1316. doi:10.1001/jama.2014.2637.
16. Kumar A, Roberts D, Wood KE, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. Crit Care Med. 2006; 34:1589–96.
17. Livaditi O, Kotanidou A, Psarra A, Dimopoulou I, Sotiropoulou C, Augustatou K, et al. Neutrophil CD64 expression and serum IL-8: sensitive early markers of severity and outcome in sepsis. Cytokine. 2006; 36:283–90.
18. Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. Nature Rev Immunol. 2008; 8:776–87.
19. Song SH, Kim HK, Park MH, Cho HI. Neutrophil CD64 expression is associated with severity and prognosis of disseminated intravascular coagulation. Thromb Res. 2008; 121:499–507.
20. Strohmeyer JC, Blume C, Meisel C, et al. Standardized immune monitoring for the prediction of infections after cardiopulmonary bypass surgery in risk patients. Cytometry. 2003; 53B:54–62.
21. Tanaka S, Nishino J, Matsui T, et al. Neutrophil CD64 expression in the diagnosis of local musculoskeletal infection and the impact of antibiotics. J Bone Joint Surg. 2009; 91:1237–42.
22. Timsit JF, Soubirou JF, Voiriot G, et al. Treatment of bloodstream infections in ICUs. BMC Infect Dis. 2014 Nov 28; 14:489. doi: 10.1186/1471–2334–14–489.
23. Wang X, Li ZY, Zeng L, et al.Neutrophil CD64 expression as a diagnostic marker for sepsis in adult patients: a meta-analysis.Crit Care. 2015 Jun 10; 19:245. doi: 10.1186/s13054–015–0972–z.

## ПЕРИОПЕРАТИВНИ ИНДЕКСИ НА CD64-ЕКСПРЕСИЯТА ВЪРХУ ГРАНУЛОЦИТИТЕ

***Д. Попова, Р. Владимирова, Е. Викентиева, В. Кьосев, В. Мутафчийски, К. Василев, Г. Коташев, П. Иванов, Е. Белоконски, Г. Григоров, В. Христова***
*Военномедицинска академия*

В последните години експресията на CD64 (високоафинитетен рецептор за IgG) върху гранулоцитите се разглежда като чувствителен и специфичен маркер за системно възпаление, показателен за необходимостта от антибиотично лечение, с промени след сърдечно-съдови операции.

**Цел** на настоящата работа е да се оцени клиничната значимост на индексите на CD64-експресията върху гранулоцитите при пациенти, оперирани по повод на хернии на предната коремна стена и колоректален карцином (КРК).

**Материал и методи**. Изследвани са 65 последователно оперирани лица – 37 с КРК, 28 с абдоминални хернии, от които 9 без оплаквания, т.е. здрави контроли. Трикратно (предоперативно – ПО; на 1 и 7 следоперативен ден – СОД) са проследявани серумни маркери на възпалението, кръвни клетки, субпопулации на моноцитите и гранулоцитите (CD64+, CD163+, HLA-DR+) като клетки на вродения имунен отговор,

основните лимфоцитни популации, както и някои техни субпопулации – представители на специфичния имунитет. Изчислени са два гранулоцитни индекса, отнасящи CD64-експресията към стандартни, флуорохром-маркирани микрочастици или към лимфоцитите и моноцитите на периферната кръв като вътрешни контроли. Пробите са отчетени флоуцитометрично.

**Резултати**. Гранулоцитните индекси за CD64-експресия корелират много добре помежду си (Spearman r> 0,75) и показват най-високи стойности на 1 СОД с тенденция към достигане на ПО нива на първата седмица след операцията. Възстановяването протича по-бавно за групата с КРК. При пациентите с гранулоцитни индекси над референтните стойности (съответно 1,2 и 13) се намират значителни следоперативни отклонения в проследяваните възпалителни маркери, клетъчни популации и субпопулации, както и удължен болничен престой (медианни стойности съответно 4 и 8 дни).

**Заключение**. Индексите на гранулоцитна CD64-експресия се увеличават след оперативна интервенция и поддържането им във високи стойности корелира с по-продължителното протичане на възстановителния период. Те корелират с познатите маркери за възпаление, както и с функционалните промени в моноцитите и лимфоцитите като отражение на участието на вродения и специфичен имунен отговор в следоперативните промени.

Индексите на гранулоцитна CD64-експресия не могат да се използват като прогностични или предиктивни маркери в рутинната хирургична практика. Тяхната употреба би могла да се препоръча за мониториране на ефекта от антибиотично лечение или при съмнение за системно възпалително състояние.

**Ключови думи**: CD64, индекс, оперативен стрес, хернии, колоректален карцином.

Адрес за кореспонденция
Доц. Д. Попова
Военномедицинска академия,
бул. „Св. Г. Софийски“ № 3,
1606 София

## PERIOPERATIVE INDICES OFCD64 EXPRESSION ON GRANULOCYTES

***D. Popova, R. Vladimirova, E.Vikentieva, V. Kyosev, V. Mutafchiyski, K. Vasilev,G. Kotashev, P. Ivanov, E. Belokonski, G. Grigorov, V. Hristova***
*Military Medical Academy*

In recent years, CD64 (high affinity receptor forIgG) expression on granulocytes is considered a sensitive and specific marker of systemic inflammation, indicating the need of antibiotic treatment, with significant changes following cardiovascular surgery.

**The aim**of the present study was toassess the clinical value of CD64 indices of expression on granulocytes in patients operated for abdominal hernia and colorectal carcinoma (CRC).

**Materialand methods**. 65 consecutively operated persons were enrolled in the study – 37 with CRC, 28 with abdominal hernia, of whom 9 with no complaints, as healthy controls. Serum inflammatory markers, blood cells, monocyte and granulocyte subpopulations (CD64+, CD163+, HLA-DR+), as cellular components of innate immune response, main lymphocyte populations (T-, B- and NK-cells), as well as some lymphocyte subpopulations,

were analysed preoperatively (PreO), on the first and seventh post-operative day (POD). Two indices of CD64 expression were calculated, relative to standard fluorochrome-labelled microparticles or using lymphocyte and monocyte CD64 expression as internal controls, upon flow cytometry reading of the samples.

**Results**. Both granulocyte indices of CD64expression show very good correlation (Spearman $\rho > 0,75$),with the highest levels on 1 POD, tending to reach PreO values a week later. Recovery takes longer for the CRC group. In the group of patients with granulocyte indices of CD64 expression above the reference values (1,2 and 13 respectively), significant post-operative changes are recorded for inflammatory markers, cell populations and subpopulations, as well as a longer hospital stay (median values respectively 4 and 8 days).

**Conclusion**. Indices of CD64 expression are found raised upon operationand their sustained increasecorrelates with a longerpost-operative recovery. They also correlate with known inflammatory markers, as well as with functional changes in monocytes and lymphocytes, reflecting post-operative involvement of innate and adaptive immunity.

Indices of CD64 expression are not suitable prognostic or predictive markers in routine surgery practice. Their use could be helpful for monitoring antibiotic treatment or in the cases when systemic inflammation is suspected.

**Keywords**: CD64, index, operative stress, hernia, colorectal carcinoma.

Address
Assoc. Prof. D. Popova
Military Medical Academy
St. G. Sofiiski str.
Sofia 1606

# БИОПОДОБНИТЕ МЕДИКАМЕНТИ В КОНТЕКСТА НА БИОЛОГИЧНАТА ТЕРАПИЯ ПРИ ИМУНОМЕДИИРАНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

***Цветелина Великова***

*Лаборатория по клинична имунология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, София*
*Катедра по клинична лаборатория и клинична имунология – Медицински университет, София*

През последните 30 години **биологичните лекарства** навлязоха широко в практиката. Биологичното лекарство е обикновено голяма молекула, която се произвежда от жива клетка или нейни продукти и която се използва за превенция, диагностика или лечение на различни заболявания, най-често туморни и възпалителни [1]. Още през 80-те години на миналия век започват да се произвеждат биологични версии на хормони и ензими, а в последствие – цитокини, моноклонални антитела, слети протеини и други. Наречени още „блокбъстъри“, „оригинални“ или „референтни“, биологичните лекарства заемат вече 19% от фармацевтичната индустрия. Характерно за биологичните медикаменти е, че тяхното производство включва сложна серия от стъпки, които подлежат на строги законови регулации [2].

В следващите няколко години се очаква част от най-използваните биологични препарати да загубят патента си, сред които са Rituxan (Rituximab), Enbrel (Etanercept) и Remicade (Infliximab). Това, както и огромният успех на биологичната терапия, са предпоставки за създаването и на т.нар. **биоподобни медикаменти** [3].

**Биоподобните медикаменти са** известни също като „копия“, „високо подобни“ или „взаимнозаменяеми“ лекарства. През 2006 г. е одобрен първият биоподобен медикамент, а през 2009 г. е дадено определението, а именно – „силно подобен на оригиналния медикамент и без клинично значими разлики с него от гледна точка на безопасността, чистотата, токсичността, ефикасността на продукта и възможните странични реакции, което е доказано от аналитични, експериментални животински и клинични проучвания“ [4].

Биоподобните лекарства също са големи и сложни молекули, проектирани така, че да са много близки на съществуващите биологични лекарствени продукти. Производителите на биоподобните медикаменти трябва да извършат анализи на структурата им с помощта на най-съвременни технологии, за да се докаже, че предложеният биоподобен продукт ще има една и съща първична аминокиселинна последователност като референтния продукт [4, 5]. С проучвания върху животни се оценява токсичността на продукта, а при подходяща група от хора се изследват фармакокинетиката, фармакодинамиката и имуногенността. Производството на биоподобните препарати преминава изключително

сериозен контрол по отношение на примесите, стабилността и качеството на лекарството [5].

Освен по структурата си обаче, биологичните и биоподобните лекарства трябва да си съответстват и по функция. Това може да бъде оценено чрез сравнително клинично проучване между биологичния и съответния биоподобен медикамент. За да има взаимозаменяемост между биологичните и биоподобните медикаменти, трябва да има натрупани данни, показващи, че вероятно и двата вида водят до близки клинични резултати. Предполага се, че биоподобните препарати използват същите механизми на действие, начин на приложение, дори дози като съответстващите им биологични. От друга страна, биоподобните лекарства трябва да могат да се приложат или редуват с референтния препарат, без създаване на нови рискове от гледна точка на поява на странични ефекти или намаляване на ефикасността [6].

Една от сериозните разлики между биологичните и конвенционалните лекарства се дължи в огромна степен на сложността на молекулите на биологичните медикаменти. Това е причината произведените биоподобни молекули да имитират ефектите на биологичните препарати, но да не са никога напълно идентични с тях [7]. Даже напротив, поради комплексната структура и производствените процеси биоподобните лекарства могат да имат уникални характеристики. Ако искаме да си представим нагледно разликите между конвенционалните и биологичните лекарства, то може да поговорим малко за напитки. За да копирате коктейла от местния бар, то просто трябва да смесите съставките, посочени в рецептата на бармана в определените пропорции – и готово, получава се същата напитка, която сте опитали. Така се произвеждат конвенционалните лекарства, които са напълно еднакви. Когато обаче говорим за биологична терапия, то тя може да се сравни по-скоро с невероятното вино, от което сте били възхитени преди няколко години на почивката ви. Ако искате да копирате това вино, трябва да вземете предвид не само сорта грозде, района, в който е отглеждано, но и уникалния процес на ферментиране, на отлежаване и т.н. Производството на вино е много по-сложно, отколкото смесването на съставките за един коктейл. Толкова сложно е и производството на биологичната терапия. Именно поради това е толкова трудно тези молекули да се преповторят, а копията да се наричат „подобни“. Нещо повече, самите биологични медикаменти с едно наименование могат да варират леко помежду си в различните партиди от производствения процес [8].

По тази причина, за да бъдат уверени лекарите, че използваното биоподобно вещество е по същество даденият референтен продукт, сравнителните опити за ефективност се провеждат със същата строгост като плацебо-контролираните проучвания за всяко ново лекарство. Освен проследяване до 3-ти, 6-и месец и 1 година, важно е да се следи за ефикасността и безопасността на препарата в дългосрочен план. В момента повечето проучвания не намират значими разлики в честотата на неблагоприятните събития (нежелани лекарствени реакции и други) при двете групи медикаменти, включително реактивиране на латентна туберкулоза [3].

Потенциалната възможност даден биоподобен препарат да предизвика имунен отговор, или т.нар. **имуногенност**, е сериозен проблем. Най-често имуногенността се проявява в образуване на антитела към съответния медикамент, което го прави неефективен. Наличните в момента модерни технологии позволяват да се оценят промените, които претърпява молекулата след създаването си, за които е известно, че причиняват имуногенност [9]. Например дадено биологично лекарства може като структура да е аналогично на дадено биоподобно, но второто да има допълнително прикачени въглехидрати към структурата си. Така имунната система на пациента може да разпознае двете структури по различен начин и да образува антитела само към единия продукт. За съжаление повечето от определящите имуногенността фактори остават неизвестни. По тази причина само клинични проучвания ще бъдат в състояние да отчетат потенциалната имуногенност на биоподобния продукт, както и най-добрия начин на приложение, дозиране, съобразени с особеностите на пациента (напр. генетични и други индивидуалности) [9].

Това означава, че ако пациентът има антитела срещу Infliximab и се опита лечение с биоподобен медикамент, вероятно и към него ще се образуват антитела и ефикасността му ще е намалена [6].

Биоподобните медикаменти се предписват за същите заболявания, за които и биологичните, тъй като може да се приеме, че двете лекарства ще действат по един и същ механизъм за дадените болести. Ако се стигне до момент, в който застрахователното дружество или осигурителен институт ще избират кой препарат да се използва за терапия, обикновено това е най-евтиният лекарствен продукт при т.нар. немедицинска смяна на лечението. Това обаче носи риск поради факта, че все още не е известно как даденият пациент ще реагира на смяната с новото лекарство [9].

**Икономическият анализ** показва, че една от съществените разлики между биологичните и биоподобните медикаменти е в цената им – вторите обикновено са с 30% по-ниска цена. Икономистите прогнозират, че в рамките на следващите 10 години ще бъдат спестени над 1 трилион долара при лечение с биоподобни продукти за същите заболявания, лекувани до момента с биологична терапия. Повечето изследователи смятат, че това ще бъде по-полезно за обществото като цяло, защото повече пациенти ще могат да получат лечение, но не толкова полезно за отделния пациент, освен ако профилите на ефикасност и безопасност не са еднакви за двата типа лечение [10].

Нещо повече, много средства се влагат в момента за разработване на биоподобни медикаменти, които с иновативната си структура не просто копират, а дори надхвърлят ползите от референтното лекарство, затова са наречени „biobetters“ (био- по-добри) или „biosuperiors“ (биопревъзходни) [7].

Повечето производители на биологична терапия, както и 90% от практикуващите дерматолози, ендокринолози, онколози, нефролози, невролози и ревматолози биха искали етикетирането да бъде различно, т.е. биоподобните препарати изрично да са отбелязани като такива, защото в противен случай

това може да предизвика объркване, че приложението ще бъде същото като за биологичния агент. И наистина, 61% от анкетираните европейски лекари смятат, че идентичните препарати имат и идентични показания. А всъщност всичко това трябва да се докаже в допълнителни проучвания. 82% от клиничните лекари биха искали листовката на продукта да включва аналитични и клинични данни за ефикасността и безопасността, сравнение с референтния продукт [9]. Анкетата показва още, че 34% от лекарите, които редовно предписват генеричните лекарства, биха предписвали и съответните им биоподобни. Около една четвърт от анкетираните лекари обаче все още не могат да дадат определение за биоподобни лекарства или не са чували за тях. Много полезна в случая ще бъде „**Виолетовата книга“ (Violet book)**, в която ще бъдат изброени всички одобрени биоподобни с информация и за техните референтни продукти. Тази книга ще е като „братовчед“ на „Оранжевата книга“ (Orange book), в която са описани генеричните биологични лекарства [11].

В крайна сметка решението за това какво лекарство да се предпише за дадения пациент трябва да бъде взето от лекуващия медицински специалист, спрямо познанията му и индивидуалните особености на пациента.

## ЛИТЕРАТУРА:


1. Demaria S et al. Cancer and inflammation: promise for biologic therapy. J Immunother. 2010. Vol. 33(4):335–51.
2. Rosman Z et al. Biologic therapy for autoimmune diseases: an update. BMC Medicine 2013. Vol. 11:88.
3. McNamara, D. Biosimilar drugs will disrupt gastroenterology. Conference News – Medscape Medical News 2015.
4. Information on Biosimilars. Accesed at: http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/HowDrugsareDevelopedandApproved/ApprovalApplications/TherapeuticBiologicApplications/Biosimilars/
5. Kay, J. An update on Biosimilars. 2015. Commentary at Medscape Rheumatology.
6. Kay, J. Biosimilars: as good as the originals? Medscape Rheumatology, 2014.
7. Paget, S. Biosimilars: Unanswered Questions. Medscape 2015.
8. Brookes, L. Anxiety and Optimism on the Brink of Biosimilars. Medscape Family Medicine 2015.
9. Gordon, E. FDA Heads Into Uncharted Territory of ‘Biosimilar’ Drugs. Kaiser Health News 2015.
10. Epstein M et al. Biosimilars: The Need, The Challenge, The Future. American J Gastroenterol 2014; 109(12):1856–1859.
11. Feldman, SR. 6 biosimilar questions answered. Commentary at Medscape Rheumatology 2015.

# БИОПОДОБНИТЕ МЕДИКАМЕНТИ В КОНТЕКСТА НА БИОЛОГИЧНАТА ТЕРАПИЯ ПРИ ИМУНОМЕДИИРАНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

***Цветелина Великова***

*Лаборатория по клинична имунология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, София*
*Катедра по клинична лаборатория и клинична имунология – Медицински университет, София*

Биологичната терапия през последните години навлезе широко за лечението на имуномедиирани заболявания във всички области на медицината, включително в ревматологията, хематологията, гастроентерологията и т.н. Безспорният пробив в терапията на някои заболявания с имунна патогенеза чрез биологични средства, както и високата им цена, създадоха предпоставки за възникване на подобни на биологичните медикаменти лекарства, или т.нар. „биоподобни“ (biosimilars). Целта на настоящето ревю е да направи сравнително разглеждане на биоподобните медикаменти в контекста на биологичните такива, като специално внимание е обърнато на аспекти като: имуногенност, безопасност и икономическа ефективност на биоподобните лекарства.

***Ключови думи:*** биологична терапия, биоподобни медикаменти, имуногенност.

# BIOSIMILARS IN THE CONTEXT OF BIOLOGICS FOR IMMUNOMEDIATED DISEASES

***Tsvetelina Velikova***

*Laboratory of Clinical laboratory, University Hospital St. Ivan Rilski, Sofia*
*Department of clinical laboratory and clinical immunology, Medical University of Sofia*

Biological therapy in recent years has entered widely in the treatment of immune-mediated diseases in all areas of medicine, including rheumatology, hematology, gastroenterology, etc. The indisputable breakthrough in the treatment of some diseases with immune pathogenesis by biological agents, as well as their high cost, have created conditions for the emergence of similar to the biological drugs or so called “biosimilars“. The purpose of this review is to make a comparative evaluation of biosimilar drugs in the context of biological drugs. Special attention is paid to aspects such as immunogenicity, safety and economic efficiency of biosimilar therapy.

***Keywords:*** biologics, biosimilar,biosimilars, immunogenicity.

# РЕВМАТОИДЕН ФАКТОР

***Марта Балева и Красимир Николов***
*Клиника по клинична имунология, УМБАЛ „Александровска“*

През 1937 г. E. Waaler установява в серума на болни с ревматоиден артрит (RA) белтък, който аглутинира сенсибилизирани овнешки еритроцити [1, 2]. След 11 г. – в 1948 г., H. Rose и сътр. [3] преоткриват този фактор, наречен една година по-късно ревматоиден фактор (RF). Едва през 1962 г. се възприема становището, че RF представлява автоантитяло от клас IgM, насочено към Fc участъка на IgG и е важен диагностичен маркер при RA [4], тъй като се позитивира при около 70% от болните с това заболяване – т.нар. серопозитивен артрит. По-късно се установява, че важен антиген за RF е областта Cγ2–Cγ3 на Fc-фрагмента [5]. Счита се, че в този участък липсва галактоза, вследствие на което се появяват нови епитопи или са налице конформационни промени [6].

По-късно аглутинацията се извършва с латексови или бентонитови частици (по 7), а впоследствие се прилага и нефелометрия [8]. Трябва да подчертаем, че с аглутинационните методи се определя само RF от клас IgM. Предимство на ELISA-методите е, че с тях може да се определи не само IgM RF, но и от IgG- и IgA-клас [9, 10, 11]. Редица автори посочиха, че особено важно е определянето на IgA RF, тъй като той се свързва с по-лоша прогноза на RA [10, 12, 13, 14, 15]. Описани са и радиоимунологични методи за определяне на класа на RF [16, 17].

Съществуват няколко хипотези, опитващи се да обяснят произхода на RF. През петдесетте години на миналия век се е считало, че той е анти-антитяло, насочено към променена в резултат на различни въздействия молекула на IgG. По-късно се изказва становището за участието на различни вирусни (EBV, HCV, парвовирус 19, човешки ендогенни ретровируси), бактериални, паразитни или туморни антигени в тези промени (по 4, 18).

През последните 4–5 десетилетия в литературата доминираше становището, че в основата на патогенезата на ставните увреждания са промените в Т-лимфоцитите. Напоследък обаче, особено след проучванията на J. Edwards и сътр. [19], в центъра на изследователския интерес отново са промените в В-лимфоцитите. Настоящият Delphi панел на група водещи ревматолози потвърди, че най-голяма стойност за определяне на тежестта на болестта има изследването на RF [20]. Важно потвърждение за водещата роля на продуцирания от В-лимфоцитите RF е установяването на факта, че само при положителните за RF болни лечението с биологични средства (като rituximab и infliximab) има ефект. Предполага се дори, че механизмите на развитие на RF (+) и RF (-) случаи са различни, което впоследствие се потвърди и от данните за различна HLA-формула при двете групи и установяването на ген, асоцииран с апоптозата – PD-1,3A [21].

Предполага се, че ревматоидните фактори имат важна биологична роля в регулацията на имунния отговор. RF може да свърже IgG-антителата, реагирали

с антигена, и така да повиши силата на тяхната връзка към антигена, както и да увеличи фиксирането на комплемента към имунните комплекси (ИК). Вероятно това води до повишаване на антимикробната активност на антителата и улеснява отстраняването на потенциално вредните ИК. Известно е, че IgM RF повишава размера и намалява разтворимостта на съществуващите ИК [4]. От друга страна, IgG RF могат да се свързват помежду си. При това всяка молекула IgG RF реагира като бивалентно антитяло и бивалентен антиген [22]. Така IgG RF образува големи комплекси. Известно е, че те вземат участие при освобождаването на простагландини и колагеназа от моноцитите.

**Заболявания, при които се установява RF**

Освен при ревматоидния артрит, където доказването на RF е един от критериите на болестта, се установиха и други заболявания, при които може да се намери положителен RF от различен клас – ювенилен ревматоиден артрит (JRA), системен лупус и пр. [11, 23, 24, 25, 26, 27], като и в тези случаи се подчертава по-лошата прогноза при носителство на IgA RF и IgM RF [10, 11, 23]. При болни от системен лупус могат да се установят различни класове RF: IgM RF – при 31% с аглутинация и при 59% с ELISA, IgA RF – при 36%, IgG RF – при 27% и дори IgE RF – при 9%. В публикации от седемдесетте и осемдесетте години на миналия век редица автори с използването на аглутинационните тестове за определяне на RF се опитват да установят връзка между лупусната нефропатия и титъра на RF. Според някои автори [28, 29] има сигнификантна негативна корелация между тях, а според други [26, 30, 31] – няма никаква корелация. Интересна в това отношение е полемиката между групите на H. Helin [25] и R.M. Pinillos [32]. V. Riccieri и сътр. [33] установяват, че при лупусно болни класът на RF корелира негативно с IgG ACL. Честотата на АФС е различна при пациентите със или без IgG RF (съответно 8,7% и 30,9%). При болните с IgG RF по-рядко се срещат серозит и хематологични отклонения. Те считат, че при системен лупус ревматоидните фактори не са маркери за тежест на болестта, но негативната асоциация между IgG RF и IgG ACL се дължи на различната роля на тези антитела в патогенезата на болестта, където този изотип може би определя болните с по-малък риск от развитие на АФС. През 2005 г. I. Hoffman и сътр. [34] установяват, че при 12,9% от болните със системен лупус RF е положителен, което е много по-често от намирането на антицитрулиновите антитела.

При 60% от болните с първичен синдром на Sjogren [35] ревматоидният фактор е положителен и то по-често при мъжете. Според някои автори този процент е още по-висок и достига 75–90% [36].

Повечето от проучванията върху RF са направени с използването на аглутинационните методи. Така напр. през 1998 г. MM Ward [52] представя следното процентно разпределение за RF при различни заболявания:

| | |
|---|---|
| Смесена криоглобулинемия | 90–100% |
| Синдром на Sjogren | 75–90% |
| Смесена съединително тъканна болест | 50–60% |
| Системен лупус | 20–30% |
| Склеродермия | 20–30% |
| Ювенилен артрит | 20% |
| Полимиозит | 5–10% |
| Хиперсензитивен васкулит | 5–15% |
| Туберкулоза | 10–20% |
| Саркоидоза | 5–33% |
| Сифилис | 10% |
| Подостър бактериален ендокардит | 25–50% |
| Салмонелоза | 15–40% |
| Различни остри вирусни инфекции | 15–65% |
| Паразитози | 20–90% |
| Хронични чернодробни заболявания | 25–40% |
| Първична билиарна цироза | 50–70% |

Авторът подчертава, че при неселекционирана популация чувствителността на определянето на RF е 80%, а специфичността – 95% по отношение на RA. Тъй като тази болест засяга относително малък процент от населението – около 1%, позитивната предиктивна стойност на този показател в тази група също е ниска – 20–30% от положителните могат евентуално да заболеят от RA. Много от положителните резултати са фалшиво положителни поради многото състояния (вж. по-горе), които могат да индуцират образуването на RF.

Обратно – ако се подбере група с ревматологични заболявания – позитивната предиктивна стойност на този показател се увеличава до 80%. RF може да не се установи в началото на болестта при около 50% от пациентите с типична клиника на ревматоиден артрит, като някои от тях го позитивират още в първите две години, но около 20% остават негативни през целия курс на болестта. Негативната предиктивна стойност на теста е около 95%.

## ELISA за определяне на RF

Въвеждането на имуноензимните методи за определяне на RF стана възможно след детайлно проучване на условията за тяхното провеждане. Редица публикации бяха посветени на използвания антиген за натоварване – IgG, изолиран от човешки [37, 38, 39, 40], заешки серум [7, 37, 38, 41, 42] или миши серум [37, 43] и др. Изучена е детайлно необходимостта от предварителната обработка на плаката с албумин [7, 44, 45, 46, 47], както и начинът на изразяване на резултата [37, 38, 40, 48, 49]. Установи се, че съществува корелация между имуноензимните и аглутинационните методи [50, 51], между лазерната нефелометрия и ELISA [52]. Важно е да се отбележи, че ревматоидните фактори и

хетерофилните антитела могат да имат известна идентичност или припокриване, което може да причини фалшиво позитивиране на резултата при сандвичевите методи, което налага предварително блокиране на серумите и добър контрол на резултата [53].

## Проучвания в България

В края на 80-те и през 90-те години на XX век в България се провеждат голям брой изследвания върху ролята на RF в развитието на ревматичните заболявания. Голяма част от тези изследвания са направени благодарение на въведения в практиката от К. Николов и М. Балева ELISA-метод за определяне на класа на RF [54]. Първите резултати от това изследване при здрави и болни са представени на Таблица 1 [55]:

**Таблица 1. Изотип на RF при здрави и болни**

| Група | IgG | IgA | IgM |
|---|---|---|---|
| Здрави | 0,176 ± 0,152 | 0,036 ± 0,069 | 0,106 ± 0,115 |
| RA | 0,460 ± 0,360 | 0,280 ± 0,250 | 0,350 ± 0,310 |
| SLE | 0,450 ± 0,240 | 0,290 ± 0,210 | 0,240 ± 0,200 |
| диабет | 0,108 ± 0,080 | 0,032 ± 0,027 | 0,127 ± 0,108 |
| Др. артрити | 0,216 ± 0,079 | 0,127 ± 0,073 | 0,157 ± 0,090 |
| IgA GN* | 0,230 ± 0,210 | 0,163 ± 0,161 | 0,243 ± 0,192 |
| Бр. астма | 0,165 ± 0,184 | 0,115 ± 0,083 | 0,047 ± 0,055 |

*IgA GN* – IgA-гломерулонефрит*

Анализът на данните в тази таблица показва, че най-високи са стойностите на IgG и IgA RF при пациентите с ревматоиден артрит и лупус ($p<0,001$) по отношение на здравите лица. IgM RF е най-висок при болните с RA – $p<0,001$ в сравнение със здравите. Пациентите с лупус също имат по-високи нива на IgM RF в сравнение със здравите, но повишението не е статистически значимо ($p>0,1$).

Не съществува статистически значима разлика в стойностите на IgG и IgA RF при пациентите с ревматоиден артрит и лупус ($p>0,1$), но при болните с RA IgM RF е по-висок ($p<0,05$).

Всички болни с различни артрити са с отрицателни аглутинационни тестове за RF. Средните нива на всички изотипове RF не са повишени спрямо тези при здравите, но все пак IgA и IgM RF са по-високи при 6/23 – 43%. Интерес представляват болните с IgAGN, които също са негативни по аглутинационните тестове, но с имуноензимните тестове те имаха значително по-високи нива на IgM RF ($p<0,001$) от тези при здравите.

При болните от бронхиална астма и диабет не е установен RF нито с аглутинационните, нито с имуноензимните методи.

Сравнението на ELISA с аглутинационния метод за определяне на RF

показва следното: положителни за RF с аглутинационните тестове са 27/36 (75%) от болните с RA. 8/9 от отрицателните с аглутинация за RF болни го позитивират при изследване с имуноензимни тестове: 4 – IgA RF, 1 – IgM RF, 3 – IgG RF. По този начин положителни за RF стават 97% от болните с RA. Ако разгледаме процента на положителните резултати при болните с RA, ще видим, че той е най-висок за IgM RF – 66%, следван от този за IgA RF – 57%, и накрая – IgG RF – 50%.

Стойностите на отделните класове RF при болните от RA с положителни и отрицателни аглутинационни тестове са:

| | (+) аглутинация | (-) аглутинация |
|---|---|---|
| IgG RF | 0,472 ± 0,385 | 0,332 ± 0,151 |
| IgA RF | 0,255 ± 0,234 | 0,227 ± 0,142 |
| IgM RF | 0,378 ± 0,246 | 0,256 ± 0,142 |

Наблюдават се определено по-високи средни стойности при всички изотипове при болните с (+) аглутинация, но разликите не са статистически значими ($p>0,1$).

При болните с RA не съществува корелационна зависимост между данните, получени с аглутинационен и с имуноензимен метод (IgG и IgA RF), но е налице висока корелационна зависимост с IgM RF $r = 0,68$. Данните от сравнителното изследване по двата метода, както и сравнението с лупусно болните, са представени на Таблица 2.

**Таблица 2. Сравнителен анализ на методите за определяне на RF**

| Болни | (+) аглутинация | (+) ELISA |
|---|---|---|
| RA | 27/36 (75%) | 35/36 (97%) |
| SLE | 10/33 (30%) | 26/33 (78%) |
| SLE и артрит | 7/19 (36%) | 14/19 (74%) |
| SLE без артрит | 3/14 (21%) | 12/14 (86%) |
| SLE и LN | 4/13 (31%) | 10/13 (77%) |
| SLE без LN | 6/20 (30%) | 16/20 (80%) |

С. Владева и сътр. [56] намират изразена корелация между IgM RF и степента на активност на артрита при РА. Сравнителните проучванията на З. Коларов, Й. Шейтанов и М. Балева при болни от RA и остеоартроза [57, 58, 59] в края на 90-те години на XX век показват, че възпалителната ставна реакция е свързана с повишен синтез на IgM RF, IgA RF и IgG RF в серума и ставната течност и при двете заболявания, много по-силно изразена при РА. Нивата на TNF-alpha и sIL-6R в серума и ставната течност са по-високи при болните с положителен IgM RF [60].

При болни с ювенилен хроничен артрит Б. Върбанова и сътр. [61] до-

казват, че IgM RF се среща при 33% от тези болни, най-често при полиартритната (60%) и разширената олигоартритна форма (42%).

По наши данни 10/33 (30%) от болните със SLE имаха положителен RF, определен с аглутинация. След изпозването на ELISA-тест този процент се увеличи на 78% – 26/33 болни. При болните с лупус най-често се установява IgG RF – 52%, следван от за IgA RF – 47,3%, и накрая – IgM RF – 42% [55]. При 19/33 (57,7%) от лупусно болните имаше данни за ставно засягане. От тях положителни за RF с аглутинация бяха 7/19 болни – 36%, но с ELISA – 14/19 (73,68%).

Във втората група – лупусно болни без данни за ставно засягане, попаднаха 14/33 – 42,43%. 3/14 имаха положителни аглутинационни тестове – 21,4%, но с ELISA-тест този процент е по-висок – 12/14 болни – 85,71% (Таблица 3).

**Таблица 3. RF при лупусно болни със и без ставно засягане**

| | SLE и артрит (19) | SLE без артрит (14) |
|---|---|---|
| RF (-) аглутинация | 12/19 (64%) | 11/14 (79%) |
| RF (+) аглутинация | 7/19 (36%) | 3/14 (21%) |
| RF (-) ELISA | 2/19 (26%) | 2/14 15%) |
| RF (+) ELISA | 14/19 (74%) | 12/14 (85%) |

С използването на по-чувствителния имуноензимен тест честотата на положителния RF се увеличава, при това и в двете изследвани групи, като разликите са статистически значими само при сравнение на положителните резултати с използването на двата метода: аглутинационният метод е с по-ниска чувствителност, а ELISA – с по-висока ($p < 0,01$). Не се установяват съществени различия между носителството на RF и данните за ставно увреждане при лупусно болните.

13/33 (39%) от болните с лупус имат лупусна нефропатия (LN), доказана клинично, лабораторно (протеинурия, седимент, висок креатинин и урея) и хистологично при 9 от тях (4 – мембранопролиферативен, 4 – мембранозен и 1 – мезангиопролиферативен ГН), останалите – 41% – без бъбречно засягане. 4/13 болни с лупусна нефропатия (31%) имат положителен RF, определен с аглутинация. Същият е и процентът на положителен RF, определен с аглутинация при болните без данни за лупусна нефропатия – 6/20 (30%). 10/13 (77%) от пациентите с лупусна нефропатия имаха поне един от класовете RF, определен с ELISA. Подобен е и процентът на положителните резултати с ELISA и при пациентите без лупусна нефропатия – 16/20 (80%) (Таблица 4).

**Таблица 4. RF при болни със и без лупусна нефропатия**

| | SLE и LN (13) | SLE без LN (20) |
|---|---|---|
| RF (-) аглутинация | 9/13 (69%) | 14/20 (70%) |
| RF (+) аглутинация | 4/13 (31%) | 6/20 (30%) |
| RF (-) ELISA | 2/13 (15%) | 5/20 (25%) |
| RF (+) ELISA | 11/13 (85%) | 15/20 (75%) |

Видно е, че с използването на по-чувствителния имуноензимен тест честотата на положителния RF се увеличава, при това и в двете изследвани групи, като разликите са статистически значими само при сравнение на положителните резултати с използването на двата метода: аглутинационният метод е с по-ниска чувствителност, а ELISA – с по-висока ($p < 0,01$). Не се установяват съществени различия между носителството на RF и данните за бъбречно увреждане при лупусно болните.

При 11 (1 мъж и 10 жени) пациенти (33%) лупусното заболяване се манифестира с включването на много органи (Таблица 5).

**Таблица 5. Мултиорганно засягане при системен лупус**

| Болен | Кожа | Стави | Бъбрек | Б. дроб | Сърце | Мозък | Ч. дроб | Хемат. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ♀ | + | | + | | + | | | + |
| ♀ | + | + | | + | + | + | | |
| ♀ | + | + | | + | + | | | |
| ♀ | + | + | + | + | + | | | |
| ♂ | + | + | + | | | + | | |
| ♀ | + | + | + | | | | | |
| ♀ | + | + | + | | | + | | |
| ♀ | + | | + | | | + | | + |
| ♀ | + | + | | + | | | + | + |
| ♀ | + | + | + | | + | | | + |
| ♀ | + | + | + | | | | | + |

При 5 от тези болни (45%) RF е положителен по аглутинационния метод. Ако сравним този резултат с данните от Таблица 3, ще видим, че този процент е много по-висок от процента, намерен с аглутинационния метод при цялата група лупусно болни – 30%. Данните за класа на RF са както следва:

| | IgG RF | IgA RF | IgM RF |
|---|---|---|---|
| X | 0,27 | 0,17 | 0,25 |
| SD | 0,29 | 0,18 | 0,188 |

Анализът на данните показва, че тези резултати са по-високи от намерените при здрави лица, но разликата не е статистически значима ($p > 0,1$) и са по-ниски от тези на общата група на лупуса, като разликата също не е статистически значима ($p > 0,1$).

На Таблица 6 е представен процентът на положителните за отделните изотипове RF болни от RA и SLE:

**Таблица 6. Изотип на RF при болни от RA и SLE**

| Изотип на RF | RA | SLE |
|---|---|---|
| IgG | 50% | 52% |
| IgA | 57% | 47,3% |
| IgM | 66% | 42% |

Видно е, че при болните от RA най-често се установява IgM RF, а най-рядко – IgG RF. Обратно – при пациентите с SLE – най-често се доказва IgG RF, а най-рядко – IgM RF.

Анализът на тези данни показва, че RF, определен и с двата метода, най-често се позитивира при болните от RA. Болните от системен лупус в 30 до 36% от случаите имат положителен RF, определен с аглутинация. Прилагането на имуноензимен метод за доказване на RF повишава значително процента на положителните резулатати и при лупусно болните, като няма съществени разлики в резултатите в зависимост от органното засягане при лупуса.

В заключение: 70 години след първоначалните съобщения за ревматоидния фактор, значимостта на този показател в диагностиката на автоимунните заболявания продължава да е актуална. Въвеждането на имуноензимните методи значително промени обаче и вижданията ни за многообразието на този феномен при различните заболявания.

## ЛИТЕРАТУРА:


1. Waaler E. A factor in human serum activating the specific agglutination of sheep corpuscles. 3rd Int congress Microbiol. NY, 1939, 351.
2. Waaler E. On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles. Acta pathol microbiol scand. 17, 1940, 172–178.
3. Pike R.M., S.E.Sulkin, H.C. Coggesshall. Serological reactions in rheumatoid arthritis. II. Concerning the nature of the factor in rheumatoid arthritis serum responsible for increased agglutination of sentisized sheep erythrocytes. Immunol. 63, 1949, 447–463.
4. Milgrom F. Development of rheumatoid factor research through 50 years. Scand J Rheumatol, 1988, Suppl 75, 2–12.
5. Artandi S.E., K. L. Calame, S. L. Morrison et al. Monoclonal rheumatoid factors bind IgG at a discontinious epitope comprised of amino acid loops from heavy-chain constant-region domains o2 and 3. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89, 94–8.
6. Westwood O.M.R. A.J. Soltis, B. M. Austen et al. Molecular modeling of IgG Fc reveals clustering of linear sequence to form potential conformational epitopes for binding rheumatoid factors. Clin exp Rheumatol, 1994, 12, 110.
7. Kleveland G., T. Egeland et T. Lea. Quantitation of rheumatoid factor IgM, IgA and IgG isotypes by a simple sensitive ELISA. Scand J rheumatol, 1988, Suppl. 75, 15–24.
8. Viella G., M. Waller et H.H. Fudenberg. Nephelometric method for determination of rheumatoid factor. J Immunol. Meth. 22, 1978, 2, 247–251.

9. Moore T.L., R. W. Dorner. Rheumatoid factors. Clin Biochem, 26, 1993, 75–84.
10. Teitsson I. IgA rheumatoid factor as a predictor of disease activity. Scand J rheumatol, 1988, Suppl. 75, 233–237.
11. Walker S.M. et al. High prevalence of IgA rheumatoid factor in severe polyarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis as measured by ELISA. Arthr Rheum, 33, 1990, 2, 199–204.
12. Carpenter A., E. Smailer. Measurment of rheumatoid factor isotypes in the clinical laboratory. Immunol Invest 18, 1989, 765–773.
13. Eegmelmeijer F. et al. Significance of rheumatoid factor isotypes in seronegative rheumatoid arthritis. Rheumatol Int, 1990, 43–46.
14. Zlabinger G. et al. Rheumatoid factor isotypes and circulating immune complexes in rheumatoid arthritis. Clin exp Rheumatol. 8, 1990, 113–119.
15. Nakano M. et al. Determination of IgA– and IgM-rheumatoid factor in patients with rheumatoid arthritis with and without nephropathy. Ann Rheum Dis, 55, 1996, 520–524.
16. Koopman W.J., R.E. Schrohenloher et A. Solomon. A quantitative assay for IgA-rheumatoid factor. J Immunol. Meth. 50, 1982, 1, 89–98.
17. Wernick R. et al. Serum IgG and IgM rheumatoid factors by solid phase radioimmunoassay. A comparison between adult and juvenile rheumatoid arthritis. Arthr Rheum, 24, 1981, 3, 501–511.
18. Westwood O.M.R., P.N. Nelson, F.C.Hay. Rheumatoi factors: What's new? Rheumatology, 2006, 45, 379–385.
19. Edwards J.C., Szczepanski, J. Szechinski et al. Efficasy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. N Engl J Med, 2004, 350, 2572–81.
20. Cabral D., J.N. Katz, M.E. Weinblatt et al. Development and assessment of indicators of rheumatoid arthritis severity: results of Delphi panel. Arthr Rheum, 2005,53, 61–66.
21. Prokunina L., L. Padyukov, A. Bennet et al., Association of the PD-1.3A allele of the PDCD1 gene in patients with rheumatoid arthritis. Arthr Rheum, 2004,50, 1770–3.
22. Nardella P.A., D.C. Teller, M. Manik. Histidine involvement in the antigenic site for selfassociation of IgG rheumatoid factor. Arthr. Rheum. 25, 1982, 1, 60–65.
23. Jarvis J.N. et al. Detection of IgM-rheumatoid factor by enzyme-linked immunosorbent assay in children with juvenile rheumatoid arthritis. Correlation articular disease and laboratory abnormalities. Pediatrics, 90, 1992, 6, 945–949.
24. Suisbururry F.T. Prevalenve of IgM, IgA and IgG rheumatoid factors in juvenile rheumatoid arthritis. Clin exp Rheumatol. 8, 1990, 513–517.
25. Helin H. et al. Rheumatoid factor in rheumatoid arthritis associated renal diseases and in lupus nephritis. Ann Rheum Dis, 45, 1986, 5, 508–511.
26. Turner-Stokes L., M. Jones, J Addison et al. Does rheumatoid factor protect lupus patients from development of nephritis? Ann Rheum Dis, 48, 1989, 1, 14–16.
27. Tarkowski A., G. Westberg. Rheumatoid factor isotypes and renal diseses in systemic lupus erythematosus. Scand J rheumatol, 16, 1987, 3, 309–312.
28. Davis J.S., A.J.Bollet. Complement levels, rheumatoid factor and renal disease in systemic lupus erythematosus (SLE). Arthr Rheum 1966, 9, 499–500.
29. Hill G.S., N. Hinglais, F Tron et al. Systemic lupus erythematosus. Morphologic correlations with immunologic and clinical data at the time of biopsy. Am J Med, 64, 1978, 61–79.

30. Kantor G.L., Y.B. Bickel, E.V. Barnett. Coexistence of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. Am J Med, 647, 1969, 433–44.
31. Baldwin D.S., J Lowenstein, N.F. Rothfield et al. The clinical course of the proliferative and membranous forms of lupus nephritis. Ann Inern Med, 73, 1970, 929–42.
32. Pinillos R.M., Nola I Sole J.M., Juandola I Rosa X. et al. Rheumatoid factor in patients with systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis, 46, 1986, 11, 877–878.
33. Riccieri V., S. Terracina, T. Rinaldi et al. Class specific rheumatoid factors and antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus. Lupus, 2000, 9, 1, 56–60.
34. Hoffman I.E.A., I. Peene, L. Cebecauer et al. Presence of specific rheumatoid factor and antibodies to citrullinated peptides in systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis, 2005, 64, 330–332.
35. Diaz-Lopez C., C. Geli, H. Corominas et al. Are there clinical or serological differences between male and female patients with primary Sjogren's syndrome? J Rheumatol, 2004, 31, 1352–5.
36. Ward M.M. Laboratory testing for rheumatic diseases. Postgrad med, 103, 2, 1998, 93–103.
37. Grunett N., G. T. Espersen. Comparative studies on RF-IgA and RF-IgM ELISA. Human or rabbit IgG as antigen? Scand J Rheumatol 1988, suppl 75, 36–39.
38. van Leewen M.A. J. Westra, P.C. Limburg et al. Quantification of IgM, IgA and IgG rheumatoid factor by ELISA in rheumatoid arthritis and other rheumatic disorders. Scand J Rheumatol 1988, suppl 75, 25–31.
39. Zrein M., G. de Marcillag, M.H.V. van Repenmortel. Quantitation of rheumatoid factors by enzyme immunoassay using regulated human IgG. JIM 87, 1986, 2, 229–237.
40. Ruschen S., G. Lenun, H. Warnats et al. An ELISA for IgM, IgA and IgG rheumatoid factor measurement. I. Parameters of the assay. Scand J Rheumatol 1988, suppl 75, 32–35.
41. Cohen P.L., R.L. Cheek, J.A. Hadler et al. The subclass distribution of human RF. J Immunol 139, 1987, 1466–1472.
42. Teitson, I., H. Valdimarsson. Use of monoclonal antibodies and F(ab)2 enzyme conjugates in ELISA for IgM, IgA and IgG rheumatoid factors. JIM 71, 1984, 2, 149–161.
43. Jones M.G., M.E. Shipley, J.P. Hearin et al. Specificity of rheumatoid factors in relation to the disease state in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 49, 1990, 10, 757–762.
44. Hoier-Madsen M., N. Grunnet, A. Wiik. A Danish interlaboratory study of IgM RF by ELISA. Scand J Rheumatol 1988, suppl 75, 50–53.
45. Mottonen T., P. Hannonen, I. Yokinen et al. Relation between bone errosions and rheumatoid factors IgA and IgM isotypes in recent onset rheumatoid arthritis. Scand J Rheumatol 1988, suppl 75, 244–249.
46. Wiloch H.W., K.Thompson, A. Yong et al. IgA and IgG rheumatoid factors as markers of later erosive changes in rheumatoid arthritis. Scand J Rheumatol 1988, suppl 75, 238–243.
47. Johnson T., J.A. Arnason, H. Waldimarsson. ELISA screening test for rheumatoid factor. Rheumatol Int., 6, 1986, 5, 199–204.
48. Nishimaki T., S. Watanabe, H. Yoshida et al. Immunoglobulin class of rheumatoid factors detected by ELISA. Clin Rheumatol., 2, 1983, 2, 145–151.
49. Espersen G.T., E. Ernst, M. Westergaard et al. ELISA estimation of rheumatoid arthritis

patients with high disease activity. DTT treatment studies. Scand J Rheumatol 1988, suppl 75, 40–45.
50. Grippenberg M., F. Wafin, H. Isoniaki et al. A simple enzyme immunoassay for demeonstration of rheumatoid factor. JIM 31, 1979, 1–2, 109–118.
51. Bampton J. L., T.E. Cawston, M.K. Kyle et al. Measurement of rheumatoid factors by an ELISA and comparison with other methods. Ann Rheum Dis 44, 1985, 1, 13–19.
52. Lopez-Gonzalez M.A., A. Torrifos, J. Gifon et al. A simple method for rheumatoid factor quantification by laser-nephelometry. Clin Chim Acta, 150, 1985, 3, 262–266.
53. Holm BE, Sandhu N, Tronsrom J et al. Species cross-reactivity of rheumatoid factors and implications for Immunoassays. Scand J Clin & Lab Invest 2015; 75: 51–63.
54. Балева, М, Николов К, Капанова А, Стоянова М. Метод за определяне на ревматоидния фактор по клас. Рационализация № 86/10.9.91 г.
55. Балева, М. Показатели на хуморалния имунитет при системния лупус еритематодес – съвременни методи за определяне и анализ на диагностичната им стойност. Докторска дисертация. София, 1994 г.
56. Владева, С., Балева, М., Николов, К., Ле тху Ха. Проучване на изотиповете ревматоидни фактори при ревматоиден артрит. – Ревматология, 1994; 2 (3–4): 26–28.
57. Коларов, Зл., Шейтанов, Й., Балева, М. IgM-ревматоиден фктор при ревматоиден артрит и остеоартроза. – Ревматология, 1998; 6 (3): 51–54.
58. Коларов, Зл., Шейтанов, Й., Балева, М. IgA-ревматоиден фктор при ревматоиден артрит и остеоартроза. – Ревматология, 1998; 6 (4): 38–41.
59. Коларов, Зл., Шейтанов, Й., Балева, М. Ig-G ревматоиден фктор при ревматоиден артрит и остеоартроза. – Ревматология, 1999; 7 (1): 32–35.
60. Коларов, Зл., Алтънкова, Шейтанов, Й., Стоилов, Р., Балева, М. и сътр. Изследване на Il-1 alpha, TNF-alpha, Il-6, IFN-gamma и sIL6R в серума и синовиалната течност на болни с ревматоиден артрит и връзката им с основните клинични, хуморални (IgM-ревматоиден фактор) и генетични (HLA-DR4) показатели на болните. – Ревматология, 1995; 3 (2): 12–16.
61. Върбанова, Б., Балева, М., Николов, К., Дянков, Е. Диагностична стойност на IgG, IgA и IgM-ревматоиден фактор при болни с ювенилен хроничен артрит. – Ревматология, 1997; 5 (3–4): 59–64.

## РЕВМАТОИДЕН ФАКТОР

***Марта Балева и Красимир Николов***

Ревматоидният фактор (RF) е автоантитяло, насочено към Fc-участъка на IgG и е важен диагностичен маркер при ревматоидния артрит (RA), тъй като в зависимост от използвания метод и фазата на болестта се позитивира при 70%–95% от болните с това заболяване. При неселекционирана популация чувствителността на определянето на RF е 80%, а специфичността – 95% по отношение на RA. За определянето на RF се използват аглутинационни, имуноензимни, радиоимунологични и нефелометрични методи. В статията се обсъждат данните от определянето на класа на RF, определен с имуноензимен метод, при болни от RA, ювенилен артрит, системен лупус.

***Ключови думи:*** ревматоиден артрит, ревматоиден фактор.

Адрес за кореспонденция:
проф. Марта Балева
Клиника по клинична имунология с банка за стволови клетки
УМБАЛ „Александровска“
ул. „Св. Г. Софийски“ 1
1431 София

## RHEUMATOID FACTOR

***Marta Baleva and Krasimir Nikolov***

The Rheumatoid Factor (RF) is an autoantibody to Fc fragment of IgG and is an important diagnostic marker in rheumatoid arthritis (RA), because in the relation of the method for the method of its determination and of the phase of the disease, is positive in 70%–95% of patients with this disorder. In non-selected patients the sensitivity of RF is 80% and the specificity – 95% for RA. For the determination of RF the following tests are used; agglutination, immunoenzyme methods, radioimmunoassay and nephelometry. The results of determination of the class of RF with ELISA in patiens with RA, juvenile arthritis, systemic lupus are discussed.

***Keywords:*** rheumatoid arthritis, rheumatoid factor.

Address for correspondence:
Prof. Marta Baleva
Department of Clinical Immunology with cord-blood bank
Unversity Hospital „Alexandrovska“
1 St. G. Sofiiski str.
Sofia 1431

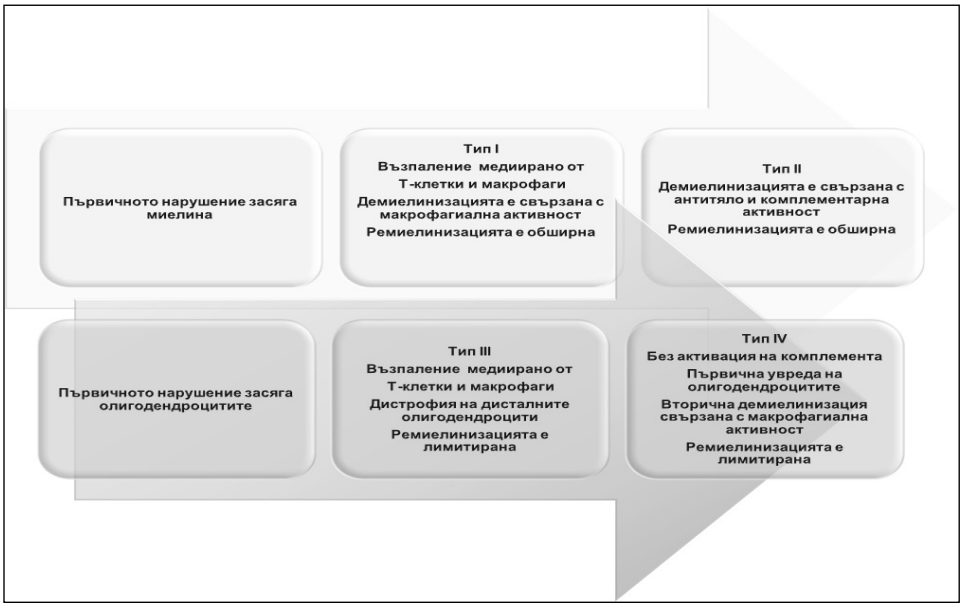
# ИМУНОЛОГИЧНИ АСПЕКТИ НА МУЛТИПЛЕНАТА СКЛЕРОЗА

***Р. Владимирова, Е. Викентиева, Д. Попова***

*Военномедицинска академия, София*

## ВЪВЕДЕНИЕ

Мултиплената склероза (МС) е хронично невровъзпалително заболяване на централната нервна система (ЦНС), водещо до сериозни физикални нарушения при млади хора [1]. Вариациите в клиничните прояви корелират с разпространението и местата на лезиите в ЦНС [2]. Лезиите са отличителна черта на МС и са резултат от инфилтрация на клетки на имунната система, преминаващи през кръвно-мозъчната бариера (КМБ) и предизвикващи възпаление, демиелинизация, реактивна глиоза и дегенерация на аксони с краен ефект нарушение на невронните сигнали и прогресивна неврологична дисфункция [3]. МС е автоимунно заболяване, резултат от действието на автореактивни лимфоцити, генериращи и поддържащи аберантни отговори срещу автоантигени в ЦНС. Широко прието е схващането, че патогенезата на МС включва автоимунно медиирано разрушаване на миелина, но детайлните механизми остават неизяснени. Патологията на заболяването се характеризира със зони на демиелинизация в бялото и сивото вещество (лезии/плаки) на главния и гръбначния мозък индикиращи загуба на миелинова обвивка и олигодендроцити (Фигура 1).




**Фигура 1. Видове демиелинизация в бялото вещество**

Аксоните и невроните са запазени в ранната фаза на МС, като прогресията на заболяването води до постепенната им загуба, корелираща с мозъчна атрофия. Демиелинизираните области в бялото вещество могат да бъдат частично възстановени чрез ремиелинизация. Демиелинизация се наблюдава и в сивото вещество, и в гръбначния мозък [4]. Възпалителни реакции са наблюдават във всички стадии на МС, като са усилени в острите фази за разлика от хроничните. Ранните лезии са инфилтрирани с периферни имунни клетки, като макрофагите доминират в инфилтрата. Втората значима популация са CD8+ Т-клетки. Броят на CD4+ Т-клетки, В-клетките и плазматичните клетки е значително по-малък [5]. С прогресията на заболяването се наблюдават дифузни възпалителни Т- и В-клетъчни инфилтрати, активация на микроглията и астроцитите, дифузна редукция на миелина и разрушаване на аксоните, като резултатът е атрофия в бялото и сивото вещество [4]. При развитие на заболяването Т-клетъчният състав не се променя значимо в инфилтратите, повишават се пропорциите на В-клетките и плазматичните клетки [3].

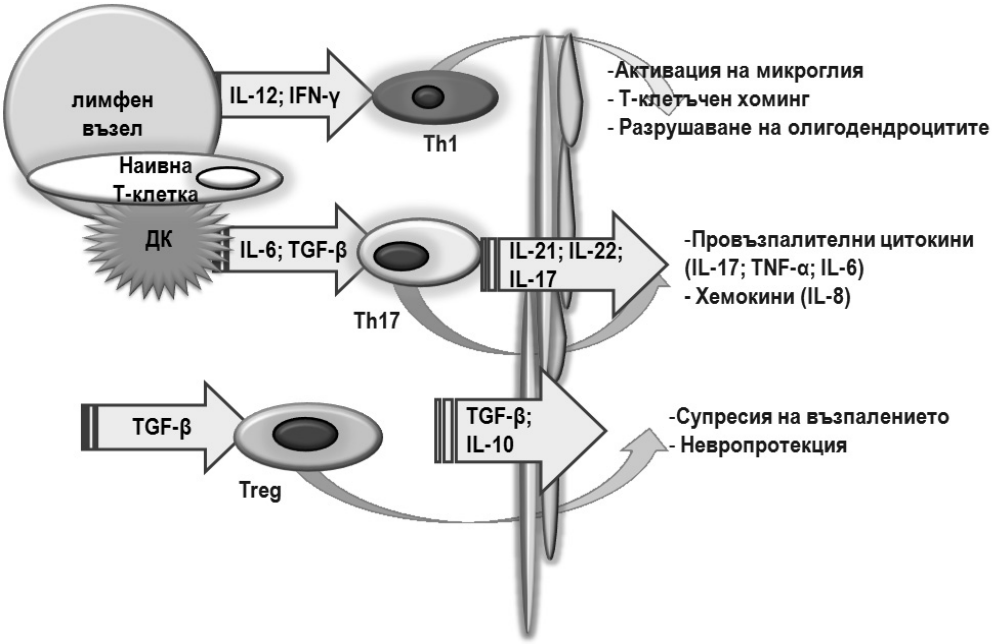
Във фокуса на настоящия обзор са Т- и В-лимфоцитите и имунологичните им характеристики с пряко отношение към МС.

## Т-КЛЕТКИ

***Автореактивни Т-клетки.*** Демиелинизацията е ключово събитие при невропатологията на МС, поради което се предполага, че протеиновите антигени на миелина са основните автоантигени. Основният миелинен протеолипиден протеин (Myelin Basic Protein - MBP) и миелинният олигодендроцитен гликопротеин (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein – MOG) се разпознават от циркулиращи CD4+ Т-клетки на пациенти с мултиплена склероза, но също така и от клетки на здрави хора, като данните за възможните разлики в честотата и авидитета им при двете групи са противоречиви [6, 7]. Това наблюдение, както и липсата на доминантен Т-клетъчен автоантиген би могло да се дължи на технически ограничения, на вариации между пациентите или на разлики в изследваните епитопи [8], но прилагането на комбинация от методи би помогнало в бъдеще за подобряване на разбирането за имунния отговор, насочен срещу миелина.

При експерименталния енцефаломиелит (EAE) CD4+ Т-клетки в ЦНС инфилтрата се реактивират от антиген представящите клетки (АПК), включително CD11c+ дендритни клетки, като в резултат възпалителният отговор води до моноцитна инфилтрация в ЦНС, активация на наивни Т-клетки и усилване на възпалението [9]. Th1-клетките и Th17-клетките са основните CD4+ Т-клетъчни подтипове, ангажирани в заболяването. Счита се, че промяна в Т-клетъчната диференциация към Th2-клетъчен фенотип е добра терапевтична концепция [10, 11]. Кой от двата Т-клетъчни подтипа е с по-голямо значение за патогенезата на заболяването подлежи на доуточняване (Фигура 2)? Данните от проучванията в тази посока са противоречиви, както за доминирането на единия клетъчен подтип при поставяне на диагнозата, така и при прогресия. [12, 13]. Сравнението на

пациенти с МС със здрави лица показва, че миелин автореактивните периферни CD4+ Т-клетки на групата с МС експресиращи СС-хемокинов рецептор 6 (CCR6) са с повишена експресия на Th1 и Th17 характерните цитокини IFNγ и IL-17A [14]. Установено е,че CD4+ Т-клетки в лезиите могат да имат междинен фенотип, експресирайки едновременно IFNγ и IL-17A [15].




**Фигура 2. CD4+ Th-клетки при МС. Наивните CD4+ Т-клетки се активират в периферния лимфен възел от миелиноподобни пептиди върху дендритните клетки (ДК). Специфични цитокини насочват диференциацията на активираните Th-клетки към Th1 (IL-12, INF-γ), Th17 (IL-6, TGF-β) и Treg (TGF-β). Активираните Th-клетки мигрират в ЦНС, където взаимодействат с микроглията, реактивират се от миелинови антигени и секретират цитокини и хемокини, активиращи (Th1 иTh17) или супресиращи (Treg) възпалителната каскада**

Лезиите на бялото и сивото вещество съдържат по-голям процент CD8+ Т-клетки отколкото CD4+ Т-клетки, като се установява значима корелационна зависимост със степента на увреда на аксоните [3]. Доказателство за ключовата роля на тези клетки в патогенезата на заболяването е, че миелин специфични автореактивни CD8+ Т-лимфоцити лесно се активират в CD4+ Т-клетъчен EAE с помощта на антигенно представяне от дендритни клетки от ЦНС [8]. Немиелиновият астроцитен антиген също активира процеса в миши модел, като остават дълго живеещи CD8+ Т-лимфоцити в ЦНС [16]. Курсът на заболяването и патологията при този модел се активира чрез вирус и модулира от В-клетки, което показва комплексното действие на факторите на средата и клетките на

имунната система. При хора една четвърт от CD8+ Т-лимфоцити в активните лезии продуцират IL-17 [17] и автоложната костно-мозъчна трансплантация при пациенти с активност на заболяването води до дълготрайно изчезване на тези клетки, което говори за важната им роля в патогенезата на МС [18]. Точните пропорции на имунните клетки след автоложна костно-мозъчна трансплантация не са достатъчно изяснени и изискват бъдещи проучвания.

***Регулаторни Т-клетки.*** Действието на автореактивните В-клетки и Т-клетки при МС е следствие от нарушение във функцията на регулаторни лимфоцити, като FOXP3 експресиращите CD4+ регулаторни Т-клетки (Treg) [19] и IL-10 продуциращите Т регулаторни тип 1 клетки (TR1) [20]. Свързаните със заболяването HLA клас II варианти възпрепятстват тимусната селекция, при което регулаторните Т-клетки в периферията неадекватно супресират автореактивните ефекторни Т-клетки [19]. Други гени, несвързани с *HLA* системата, като вариации в регион 10 на *BACH2*-гена, също биха могли да имат отношение към нарушената функция на Treg, тъй като транскрибционният фактор BACH2 играе основна роля в тяхното развитие [21] и действа като активатор за Т-клетъчна диференциация [22].

Проучванията върху Treg-клетките намират както понижение в броя им, така и в супресивния им капацитет [23, 24] в периферната кръв на пациенти с МС в сравнение със здрави лица. Установен е и редуциран брой на наивни циркулиращи Treg-клетки (CD45RA+ CD31+) успоредно с компенсаторно, но неефективно повишение на паметовите Treg-клетки [23]. Друго обяснение за действието на автореактивните ефекторни Т-клетки освен нарушение в супресията при МС е, че те сами по себе си са резистентни към супресивни сигнали, като IL-6 индуцираните сигнали към сигналния трансдюсер и активатор на транскрибцията 3 (signal transducer and activator of transcription 3 - STAT3) имат пряко отношение [25, 26]. В допълнение, при пациентите с МС се установява повишение на цитотоксичната функция на CD8+ регулаторна Т-клетъчна субпопулация след лечение с glatiramer acetate [27] и експанзия на предполагаеми регулаторни CD103+CD8+ Т-клетки при пациенти, лекувани с natalizumab [28].

Дисрегулацията на взаимодействието между ефекторни и регулаторни Т-клетки води до натрупване на автореактивни имунни клетки, инфилтриращи и увреждащи ЦНС.

## В-КЛЕТКИ

***Автореактивни В-клетки.*** За разлика от Т-клетките броят на инфилтриращите ЦНС В-клетки варира в по-широки граници при прогресия на заболяването. Клонално разрастнали се В-клетки се намират в менингите, паренхима и ГМТ. Интратекалните В-клетки секретират антитела, които са с диагностично значение и се отчитат електрофоретично в ГМТ. Броят на секретиращите антитела плазматични клетки се повишава с възрастта при пациенти с първична или вторична прогресивна мултиплена склероза [3]. Менингите на пациенти

с вторично прогресивно заболяване често съдържат лимфоидни структури от агрегирани плазматични клетки, В-клетки, Т-клетки и фоликуларни дендритни клетки [29], които са продукт на продължително възпаление и се наблюдават и при други хронични възпалителни или инфекциозни заболявания [30], докато първично прогресивното заболяване се характеризира с дифузна менингиална инфилтрация без подобни структури [31].

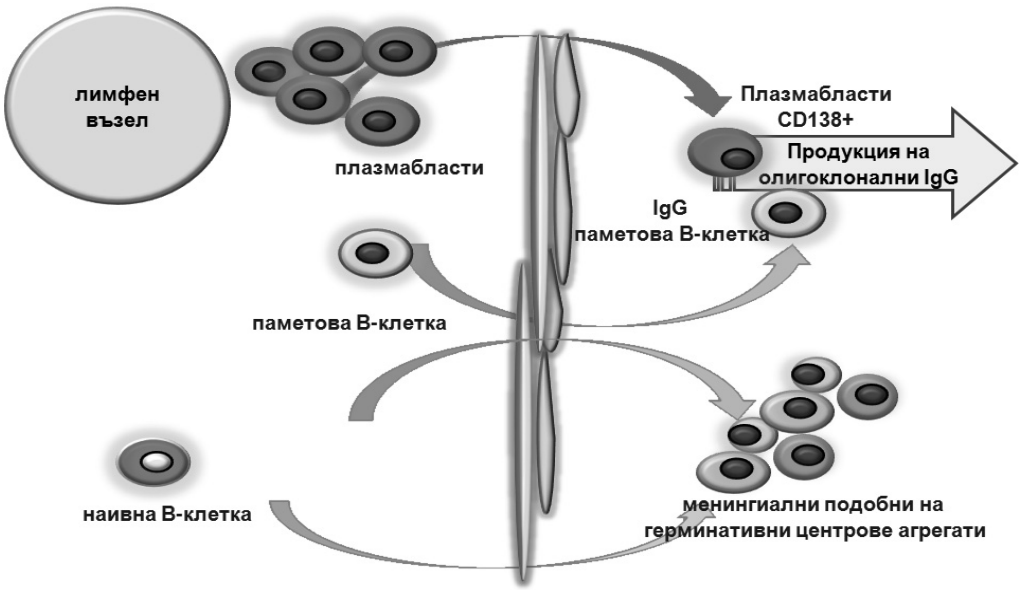
Най-значимото доказателство за важната роля на В-лимфоцитите при МС идва от проучванията за ефикасност на анти-CD20 терапията. Началната цел на елиминиращата В-клетки терапия е отстраняване на плазматичните клетки, секретиращи автоантитела при експериментални автоимунни енцефалити, тези проучвания показват ролята на антитяло-отговора в развитието на демиелинизацията [32]. Освен това е намерено, че антигенната презентация, осъществявана от В-клетките, е необходима стъпка за иницииране на автоимунни реакции срещу MOG [33]. В-лимфоцитите могат да провеждат активационни сигнали и да осъществяват ефекторни функции, обобщавани като провъзпалителни, антивъзпалителни и регулаторни. Към момента не са известни точните таргетни антигени на патогенетичните В-клетъчни отговори въпреки знанието, че свързаните със заболяването В-клетки са резултат на антиген-стимулирано узряване.

***Периферни В-клетки.*** В норма В-клетъчната толерантност е необходима за контрол на автоимунните реакции. Централната В-клетъчна толерантност, която редуцира автоимунния потенциал на В-лимфоцитите, не е засегната при болшинството от пациентите, за разлика от регулаторните механизми на В-клетъчна толерантност на клетките, циркулиращи в периферните лимфоидни тъкани [34]. Цервикалните лимфни възли се описват като възможни места за развитие на автореактивни В-клетки, насочени срещу антигени на ЦНС при хора [35]. Паметовите В-клетки са антиген-представящи клетки [36], а миелин-реактивни паметови В-клетки са намерени в периферната кръв на пациенти с МС [37]. Паметовите В-клетки експресират високи нива CD20 и се елиминират ефективно при терапия с анти-CD20 моноклонални антитела, като последващото възстановяване на популацията е бавно [38] и съпроводено с трайна супресия на активността на заболяването [39]. В лимфоцитите при МС секретират високи нива на IL-6 в сравнение със здрави лица, като повишение на този провъзпалителен интерлевкин не се намира при В-клетъчното възтановяване 12 месеца след моноклонална терапия [40]. Предполага се, че повишената IL-6 продукция при пациенти с МС е функция, свързана с паметовите В-клетки. Паметовите В-лимфоцити също така ефективно подпомагат Т-клетъчно обусловените имунни механизми, тяхното отстраняване редуцира продукцията на IL-17 от периферно-кръвните лимфоцити, което показва ролята на В-клетките за Th17-имунния отговор [33, 40]. В-клетките на пациенти с МС отговарят на неспецифични активационни стимули, като IFN-γ с увеличен провъзпалителен цитокинов профил. Установено е, както при хора, така и върху миши модел, че IL-10 секретиращите В-клетки (В10-клетки) играят регулаторна роля, супресирайки Th1-клетъчната диференциация [41, 42] и продукцията на TNF-α от моноцитите [43]. Съоб-

щават се противоречиви данни за B10 субпопулацията. При едно проучване е намерено, че тази субпопулация принадлежи към активираните паметови B-клетки, което предполага, че B10-клетките осъществяват антиген-специфични регулаторни функции. Повишен брой на IL-10 секретиращите B-лимфоцити е установен при автоимунни заболявания, но голяма част от пациентите с МС в това проучване са лекувани с имуносупресори или имуномодулатори [43]. Други автори намират, че IL-10 секрецията е предимно функция на наивните B-клетки и превключването от регулаторни B10-клетки към провъзпалителни B-клетки се случва при прехода от наивен към паметов фенотип [36]. При EAE, B10-клетките потискат автоимунния T-клетъчен отговор, ефекторната функция, зависима от IL-21 и CD40, и опосредстваните взаимодействия с T-лимфоцитите [44]. Влошаване на заболяването в резултат на таргетна CD20 терапия не е установено при хора, но е отчетено повишение на провъзпалителния моноцитен фенотип след лечение с rituximab [45]. Установено е, че при МС олигоклоналните B-клетки притежават антиген-специфична имунологично активна връзка между периферията и гръбначно-мозъчната течност. Продуциращите олигоклонални бандове B-клетки се намират освен в ЦНС и в периферната кръв. Следователно антиген-стимулираните B-лимфоцити осъществяват активна имунна връзка между ЦНС и периферията [46], което е в подкрепа на важната патологична роля на периферните B-клетки при МС.

***B-клетки в ЦНС.*** B-лимфоцитите се намират предимно в активните лезии при МС в значимо по-малък брой от T-клетките [3]. Лимфоидни фоликулоподобни B-клетъчни структури, наподобяващи характеристиките на герминативни центрове, се наблюдават в менингите на пациенти с вторична прогресивна МС [47] и се свързват със загуба на кортикални неврони и демиелинизация [48]. Патологичното значение на тази находка за автоимунното заболяване не е напълно разбрано, но наличието на CD35+ фоликуларни дендритни клетки заедно с пролифериращи B-лимфоцити, експресията на CXCL13 (хемокин, привличащ B-клетките) и на B-клетъчния активационен фактор (BAFF) предполага активни имунни реакции в менингите при пациенти с вторична прогресивна МС [47]. Освен това CXCL13 и BAFF са описани в лезиите [49, 50], където тези биологично активни молекули биха могли да опосредстват локалното B-клетъчно привличане и узряване в местата на активна демиелинизация. B-клетките в ЦНС и гръбначно-мозъчната течност (ГБМ) експресират IgG и са със соматични хипермутации в имуноглобулиновите гени, което предполага интратекална матурация [51]. Паметовите B-лимфоцити в ГБМ са с повишена експресия на костимулаторни молекули, предпоставка за активно B- T-клетъчно взаимодействие, освен това в ГБМ присъстват различни стадии на B-клетъчна диференциация [52], като плазматичните клетки секретират клонални IgG. Доказано е многократно, че антиген-специфичните B-клетки доминират в ЦНС и ГБМ, повече от 90% от B-клетките в ГБМ експресират паметовия B-лимфоцитен маркер CD27 и фракция от тях експресира CD138 и/или CD38. Тези находки подкрепят наличието на стимулация и узряване на клонално активирани паме-

тови В-клетки в антитяло секретиращите плазмобласти и плазматични клетки [53] (Фигура 3). Нивата на CD27-IgD+ наивните В-клетки са значимо понижени в сравнение с периферната кръв [54]. Към момента патологичното значение на автоантителата при МС е неясно, независимо от наличието на олигоклонални IgG и IgM и отлагането на IgG-молекули в някои лезии [55]. Бързият отговор към таргетна В-клетъчна терапия не променя значимо нивата на наличните автоантитела [56], което води до заключението за по-незначителната им роля в патогенезата на заболяването, но наличието им в ЦНС и възможността им да фиксират комплемента обяснява патогенетичната им функция.




**Фигура 3. Модел на В-клетъчния трафик при МС. А: Мигриращите В-клетки от периферията към ЦНС са предимно паметови В-клетки или плазмобласти. Наличието в ГМТ на В-клетъчни клонове, подобни на тези в герминативните центрове, предполага, че и наивни В-клетки преминават бариерата, разполагат се в менингиалните агрегати, подобни на герминативни центрове, и се диференцират до ЦНС-рестриктирани паметови В-клетки. Б: Мигриращите плазмобласти и паметови В-клетки оформят пул от антитяло секретиращи клетки в ЦНС. Паметовите В-клетки могат също да навлязат в менингиалните лимфоидни агрегати, като резултатът е клонална експанзия**

## ВЪЗПАЛЕНИЕ И ПРОГРЕСИВНА НЕВРОДЕГЕНЕРАЦИЯ

Използваните съвременни имуномодулаторни подходи при лечението на МС понижават честотата на рецидивите, но не задължително и прогресията в дългосрочен план. Това предполага, че автоимунните реакции предизвикват потенциално самоподдържащ се хроничен невродегенеративен процес, дори в отсъствието на имунна клетъчна инфилтрация от периферията. Счита се, че

невродегенерацията при МС е следствие от поредица от събития, случващи се в аксоните и невроните, включително оксидативен стрес, енергийна недостатъчност, йонен дисбаланс, както и нарушения в регенеративните механизми [57], като хроничното възпаление в ЦНС може да подпомага тези процеси.

Проникналите в ЦНС адаптивни имунни клетки могат да подпомагат продължителното възпаление чрез евентуално формиране на третични лимфоидни структури [58]. Клетките на ЦНС улавят хомеостатични нарушения (предимно микроглия и астроцити), те също могат да произвеждат различни невротоксични възпалителни медиатори (цитокини, хемокини и реактивни кислородни форми), които увреждат аксоните и по този начин подпомагат невродегенерацията [57]. Тези клетки играят роля не само в късните фази на МС, когато имунните клетки от периферията са инфилтрирали ЦНС, но и в началото на заболяването. Дори след първата проява на заболяване, увеличаване на броя и повишение на активационния статус на микроглията и макрофагите се наблюдават в лезиите и в нормално изглеждащото бяло вещество [59]. В допълнение, при разпространяване на дегенеративния процес микроглията в околностите на аксоните, произлизащи от дистално увредени неврони, може да се активира. Следователно тези клетки могат да служат като ядро за образуване на нови лезии и също да допринасят за общата атрофия на мозъка в началото на заболяването [5]. Активираната микроглия подпомага развитието на астроцитна дисфункция. Подобно на микроглията, астроцитите могат да показват провъзпалителни и противовъзпалителни свойства и имат решаваща за ЦНС бариерна функция. Тяхната дисфункция може да позволи и дори улесни периферната клетъчна инфилтрация на лимфоцити в ранна фаза на МС чрез продукцията на хемокини. Освен това, при стимулирана от микроглията активация, астроцитите произвеждат CC-хемокинов лиганд 2 (CCL2) и GM-CSF, което повишава активацията на микроглията и могат да предотвратят ремиелинизацията в местата на нервно увреждане на аксоните чрез инхибиране образуването на зрели олигодендроцити [60]. Следователно, таргетна терапия срещу провъзпалителните медиатори, секретирани от астроцитите, би могла да инхибира периферната клетъчна инфилтрация и възпалението в ЦНС.

Трябва да се отбележи, че провъзпалителното действие на ЦНС-резидентни клетки на вродения имунен отговор в прогресивната невродегенерация може да бъде свързано с хроничността на МС. Възпалението в ЦНС би могло да се разглежда като стресов отговор за поддържане на тъканната хомеостаза, както клетките на вродения имунен отговор, така и клетките на ЦНС улавят множество стресови сигнали (йони, ниско pH, температурни промени, хормони, цитокини) [61], и дори в отсъствие на заболяване процесите в ЦНС се увеличават като функция от времето при възрастово свързаната невродегенерация [62]. При множествена склероза допълнителното възпаление, индуцирано и/или усилено чрез инфилтрация на периферни имунокомпетентни клетки и от ЦНС-резидентни клетки, допринася за ускоряването на неизбежните процеси на стареене в ЦНС и тежестта на стрес-отговора е твърде голяма за поддържане на хомеостаза, от което следва изразена прогресивна невродегенерация.

## ЛИТЕРАТУРА:


1. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. Lancet 2008; 372: 1502–17.
2. Kearney H, Altmann DR, Samson RS, et al. Cervical cord lesion load is associated with disability independently from atrophy in MS. Neurology 2015; 84: 367–73.
3. Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, et al: The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. Brain 2009; 132: 1175–89.
4. Popescu B F, Lucchinetti C F. Pathology of demyelinating diseases. Annu. Rev. Pathol. 2012; 7: 185–17.
5. Chard D T, Griffin CM, Parker GJ, et al. Brain atrophy in clinically early relapsing-remitting multiple sclerosis. Brain 2002; 125: 327–37.
6. Bielekova B, Sung MH, Kadom N, et al. Expansion and functional relevance of high-avidity myelin-specific CD4+ T cells in multiple sclerosis. J. Immunol. 2004; 172: 3893–04.
7. Hellings N, Barée M, Verhoeven C, et al. T-cell reactivity to multiple myelin antigens in multiple sclerosis patients and healthy controls. J. Neurosci. Res. 2001; 63: 290–02.
8. Ji Q, Castelli L, Goverman J M. MHC class I restricted myelin epitopes are cross-presented by Tip-DCs that promote determinant spreading to CD8+ T cells. Nat. Immunol. 2013; 14: 254–61.
9. McMahon E J, Bailey S L, Castenada C V, et.al. Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. Nat. Med. 2005; 11: 335–39.
10. Miller, A. Shapiro S, Gershtein R, et al. Treatment of multiple sclerosis with copolymer-1 (Copaxone): implicating mechanisms of Th1 to Th2/Th3 immune-deviation. J. Neuroimmunol. 1998; 92: 113–21.
11. Zoghi S, Amirghofran Z, Nikseresht A, et al. Cytokine secretion pattern in treatment of lymphocytes of multiple sclerosis patients with fumaric acid esters. Immunol. Invest. 2011; 40: 581–96.
12. Frisullo G, Nociti V, Iorio R, et al. IL17 and IFNγ production by peripheral blood mononuclear cells from clinically isolated syndrome to secondary progressive multiple sclerosis. Cytokine 2008; 44: 22–5.
13. Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. Am. J. Pathol. 2008; 172: 146–55.
14. Cao Y, Goods BA, Raddassi K, et al. Functional inflammatory profiles distinguish myelin-reactive T cells from patients with multiple sclerosis. Sci. Transl. Med. 2015; 7: 274-87.
15. Kebir H, Ifergan I, Alvarez JI, et al. Preferential recruitment of interferon-γ- expressing TH17 cells in multiple sclerosis. Ann. Neurol. 2009; 66: 390–02.
16. Sasaki K, Bean A, Shah S, et al. Relapsing–remitting central nervous system autoimmunity mediated by GFAP-specific CD8 T cells. J. Immunol. 2014; 192: 3029–42.
17. Willing A, Leach OA, Ufer F, et al. CD8+ MAIT cells infiltrate into the CNS and alterations in their blood frequencies correlate with IL-18 serum levels in multiple sclerosis. Eur. J. Immunol. 2014; 44: 3119–28.
18. Abrahamsson S V, Angelini DF, Dubinsky AN, et al. Non-myeloablative autologous haematopoietic stem cell transplantation expands regulatory cells and depletes IL-17 producing mucosal-associated invariant T cells in multiple sclerosis. Brain 2013; 136: 2888–03.

19. Venken K, Hellings N, Broekmans T, et al. Natural naive CD4+CD25+CD127 low regulatory T cell (Treg) development and function are disturbed in multiple sclerosis patients: recovery of memory Treg homeostasis during disease progression. J. Immunol. 2008; 180: 6411–20.
20. Martinez-Forero I, Garcia-Munoz R, Martinez-Pasamar S, et al. IL-10 suppressor activity and ex vivo Tr1 cell function are impaired in multiple sclerosis. Eur. J. Immunol. 2008; 38: 576–86.
21. Roychoudhuri R, Hirahara K, Mousavi K, et al. BACH2 represses effector programs to stabilize Treg-mediated immune homeostasis. Nature 2013; 498: 506–10.
22. Vahedi G, Kanno Y, Furumoto Y, et al. Super-enhancers delineate disease-associated regulatory nodes in T cells. Nature 2015; 520: 558–62.
23. Venken K, Hellings N, Thewissen M, et al. Compromised CD4+CD25high regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level. Immunology 2008; 123, 79–89.
24. Feger U, Luther C, Poeschel S, et al. Increased frequency of CD4+CD25+ regulatory T cells in the cerebrospinal fluid but not in the blood of multiple sclerosis patients. Clin. Exp. Immunol. 2007; 147: 412–18.
25. Schneider A, Long SA, Cerosaletti K, et al. In active relapsing-remitting multiple sclerosis, effector T cell resistance to adaptive Tregs involves IL-6-mediated signaling. Sci. Transl. Med. 2013; 5: 115–70.
26. Bhela S, Kempsell C, Manohar M, et al. Nonapoptotic and extracellular activity of granzyme B mediates resistance to regulatory T cell (Treg) suppression by HLA-DR–CD25hiCD127lo Tregs in multiple sclerosis and in response to IL-6. J. Immunol. 2015; 194: 2180–89.
27. Tennakoon D K, Mehta RS, Ortega SB, et al. Therapeutic induction of regulatory, cytotoxic CD8+ T cells in multiple sclerosis. J. Immunol. 2006; 176: 7119–29.
28. Mattoscio M, Nicholas R, Sormani MP, et al. Hematopoietic mobilization: potential biomarker of response to natalizumab in multiple sclerosis. Neurology 2015; 84: 1473–82.
29. Howell O W, Reeves CA, Nicholas R, et al. Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. Brain 2011; 134: 2755–71.
30. Drayton DL, Liao S, Mounzer R H, et. al. Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. Nat. Immunol. 2006; 7: 344–53.
31. Choi S R, Howell OW, Carassiti D, et al. Meningeal inflammation plays a role in the pathology of primary progressive multiple sclerosis. Brain 2012; 135: 2925–2937.
32. Lyons JA, Ramsbottom MJ, Cross AH. Critical role of antigen-specific antibody in experimental autoimmune encephalomyelitis induced by recombinant myelin oligodendrocyte glycoprotein. Eur J Immunol 2002; 32: 1905–13.
33. Molnarfi N, Schulze-Topphoff U, Weber MS, et al. MHC class II-dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelinspecific antibodies. J Exp Med 2013; 210: 2921–37.
34. Kinnunen T, Chamberlain N, Morbach H, et al. Specific peripheral B cell tolerance defects in patients with multiple sclerosis. J Clin Invest 2013; 123: 2737–41.
35. Stern JN, Yaari G, Vander Heiden JA, et al. B cells populating the multiple sclerosis brain mature in the draining cervical lymph nodes. Sci Transl Med 2014; 6: 107–48.

36. Duddy M, Niino M, Adatia F, et al. Distinct effector cytokine profiles of memory and naïve human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. J Immunol 2007; 178: 6092– 99.
37. Harp CT, Ireland S, Davis LS, et al. Memory B cells from a subset of treatment-naive relapsing-remitting multiple sclerosis patients elicit CD4(+) T-cell proliferation and IFN-γ production in response to myelin basic protein and myelin oligodendrocyte glycoprotein. Eur J Immunol 2010; 40: 2942–56.
38. Roll P, Palanichamy A, Kneitz C, Dorner T, Tony HP. Regeneration of B cell subsets after transient B cell depletion using anti-CD20 antibodies in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2006; 54: 2377–86.
39. Hauser S, Li D, Calabresi P, et al. (eds): Week 144 Results of a Phase II, Randomized, Multicenter Trial Assessing the Safety and Efficacy of Ocrelizumab in Patients with Relapsing–Remitting Multiple Sclerosis (RRMS) (S31.004). San Diego, CA, 2013.
40. Barr TA, Shen P, Brown S, et al. B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. J Exp Med 2012; 209: 1001–10.
41. Blair PA, Norena LY, Flores-Borja F, et al. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic lupus erythematosus patients. Immunity 2010; 32: 129–40.
42. Matsushita T, Yanaba K, Bouaziz JD, et. al. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. J Clin Invest 2008; 118: 3420–30.
43. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, et al. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. Blood 2011; 117: 530–41.
44. Yoshizaki A, Miyagaki T, DiLillo DJ, et al. Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. Nature 2012; 491: 264–68.
45. Lehmann-Horn K, Schleich E, Hertzenberg D, et al. Anti-CD20 B-cell depletion enhances monocyte reactivity in neuroimmunological disorders. J Neuroinflammation 2011; 8: 146–50.
46. Bankoti J, Apeltsin L, Hauser SL, et al. In multiple sclerosis, oligoclonal bands connect to peripheral B-cell responses. Ann Neurol 2014; 75: 266–76.
47. Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, et. al. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. Brain Pathol 2004; 14: 164–174.
48. Howell OW, Reeves CA, Nicholas R, et al. Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. Brain 2011; 134: 2755–71.
49. Krumbholz M, Theil D, Cepok S, et al. Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment. Brain 2006; 129: 200–11.
50. Krumbholz M, Theil D, Derfuss T, et al. BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma. J Exp Med 2005; 201: 195–200.
51. Beltran E, Obermeier B, Moser M, et al. Intrathecal somatic hypermutation of IgM in multiple sclerosis and neuroinflammation. Brain 2014; 137: 2703–14.
52. Corcione A, Casazza S, Ferretti E, et al. Recapitulation of B cell differentiation in the

central nervous system of patients with multiple sclerosis. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101: 11064–69.
53. Cepok S, Rosche B, Grummel V, et al. Shortlived plasma blasts are the main B cell effector subset during the course of multiple sclerosis. Brain 2005; 128: 1667–76.
54. Haas J, Bekeredjian-Ding I, Milkova M, et al. B cells undergo unique compartmentalized redistribution in multiple sclerosis. J Autoimmun 2011; 37: 289–99.
55. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, et. al. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. Ann Neurol 2000; 47: 707–17.
56. Kappos L, Li D, Calabresi PA, et al. Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial. Lancet 2011; 378: 1779–87.
57. Friese M A, Schattling B and Fugger L. Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. Nat. Rev. Neurol. 2014; 10: 225–38.
58. Howell, O. W. Cheryl A R, Nicholas R, et al. Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. Brain 2011; 134: 2755–71.
59. Giannetti P, Politis M, Su P, et al. Increased PK11195-PET binding in normal-appearing white matter in clinically isolated syndrome. Brain 2015; 138: 110–19.
60. Mayo L, Trauger SA, Blain M, et al. Regulation of astrocyte activation by glycolipids drives chronic CNS inflammation. Nat. Med. 2014; 20: 1147–56.
61. Friese M A, Craner MJ, Etzensperger R, et al. Acid-sensing ion channel-1 contributes to axonal degeneration in autoimmune inflammation of the central nervous system. Nat. Med. 2007; 13: 1483–89.
62. Baruch K, Deczkowska A, David E, et al. Aging-induced type I interferon response at the choroid plexus negatively affects brain function. Science 2014; 346: 89–93.

## ИМУНОЛОГИЧНИ АСПЕКТИ НА МУЛТИПЛЕНАТА СКЛЕРОЗА

***Р. Владимирова, Е. Викентиева, Д. Попова***
*Военномедицинска академия, София*

Мултиплената склероза представлява голям личностен и социално-икономически проблем. Понастоящем прогресията на заболяването не се повлиява напълно от съвременните имуномодулиращи терапии, чийто таргет е периферната активация на имунокомпетентните клетки и инфилтрацията им в централната нервна система (ЦНС). Освен участието на имунната система в този процес има и допълнителен възпалителен компонент в ЦНС, който се влияе незначително от периферния имунологичен контрол и има отношение към постепенната загуба на аксони и миелин продуциращи олигодендроцити. Този възпалителен компонент в ЦНС е по-слабо дефиниран, но се предполага продължителна активация на клетки на вродения имуннен отговор. Установено е, че тези клетки преобладават в зоните на демиелинизация, но присъстват и дифузно в цялото нормално изглеждащо бяло вещество. В настоящия обзор е обобщено разбирането за участието на имунната система в развитието на мултиплената склероза. Дискутира се ролята на периферните имунни клетки, включително ефекторни и регулаторни лимфоцити и тяхното участие в патогенезата и развитието на заболяването.

***Ключови думи:*** мултиплена склероза Т-клетки, В-клетки, Регулаторни клетки.

*Адрес за кореспонденция:*
Росица Владимирова Андреева
Лаборатория по цитогенетика и имунология
Военномедицинска академия
София 1606
Бул. „Георги Софийски“ № 3
Тел: 0888 351 777
e-mail: rossy_vladimirova@yahoo.com

## IMMUNOLOGIC ASPECTS OF MULTIPLE SCLEROSIS

***R. Vladimirova, E. Vikentieva, D. Popova***
*Military Medical Academy, Sofia*

Multiple sclerosis poses a major personal and socioeconomic burden. Although disease progression is not greatly influenced by the available immunomodulatory therapies, which target peripheral immune cell activation and entry into the CNS, immunological involvement is implicated in this process: there is an additional inflammatory component residing in the CNS that is only marginally influenced by peripheral immune control and that contributes to gradual neuroaxonal loss and demise of myelin-producing oligodendrocytes. This CNS-resident inflammatory arm of the disease is less well defined but is likely to involve continuous activation of innate immune cells; these cells have been found to predominate in demyelinated areas, but they are also present diffusely throughout normal-appearing white matter. In this Review, we evaluate how our understanding of the involvement of the immune system in driving the development of multiple sclerosis. We discuss the role of peripheral immune cells, including effector and regulatory lymphocytes in promoting pathogenesis as the disease takes its course.

***Keywords:*** Multiple sclerosis, T-cells, B-cells,Regulatory cells.

Address:
R. Vladimirova
Laboratory for cytogenetics and immunology
Military Medical Academy, Sofia
3 G.Sofiiski str
Sofia 1606
e-mail: rossy_vladimirova@yahoo.com

# СРАВНЕНИЕ НА ФЕКАЛНИТЕ МАРКЕРИ КАЛПРОТЕКТИН И ЛАКТОФЕРИН ЗА ОЦЕНКА НА МУКОЗНОТО ВЪЗПАЛЕНИЕ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ХРОНИЧНИ ЧРЕВНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

***Цветелина Великова[1], Зоя Спасова[2], Екатерина Иванова-Тодорова[1], Доброслав Кюркчиев[2], Искра Алтънкова[3]***

*[1]Лаборатория по клинична имунология – УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, София, Катедра по клинична лаборатория и клинична имунология, Медицински университет, София*

*[2]Клиника по гастроентерология – УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, София, Катедра по вътрешни болести – „Медицински университет“, София*

*[3]Университетска болница „Лозенец“ – Софийски университет – Медицински факултет, София*

## ВЪВЕДЕНИЕ

Всяко възпаление, включително това при хроничните възпалителни чревни заболявания (ХВЧЗ), започва като остро възпаление, което, независимо от причините, които го предизвикват, протича на ниво микроциркулация с два основни ефекта – ексудация на течност и екстравазация на полиморфонуклеарни левкоцити (неутрофили) [1]. При наличие на повече адхезионни молекули по ендотелните клетки шансът преминаващите с кръвния поток възпалителни клетки да „прилепнат“ и да мигрират към местата на локално чревно възпаление се увеличава. Веднъж попаднали в тъканите, неутрофилите започват да осъществяват фагоцитоза, съпроводена с изразена консумация на кислород в процес, наречен „респираторен взрив“. Обикновено острото възпаление отшумява в рамките на часове до дни, колкото живеят и самите неутрофили [1]. Неутрофилите са основен източник и на калпротектин и лактоферин – цитозолни белтъци, които се отделят в лумена на гастроинтестиналния тракт при острото възпаление. Фекалният калпротектин оказва бактериостатичен и фунгистатичен ефект, като възпрепятства свързването и интернализирането на бактериални агенти [2], а лактоферинът действа директно токсично върху микроорганизмите [3]. Фекалните биомаркери за оценка на чревното възпаление са все по-застъпени в гастроентерологичната практика от гледна точка на тяхната специфичност за червата. Такива маркери, свързани с възпалението, са калпротектин (ФК), лактоферин (ФЛ), фекалният S100A12, лизозим, левкоцитна естераза, еластаза и други [4].

**Калпротектинът** е описан от Fagerhol et al. през 1979 година като хетеродимерен белтък, съставен от два малки анионни протеина (MRP8 и MRP14), принадлежащи към фамилията на калций-свързващите белтъци [5]. Калпротек-

тинът представлява до 60% от протеините в цитозола на неутрофилите, като са открити ниски концентрации и при моноцити и активирани макрофаги, но липсва при тромбоцити и лимфоцити [6]. Той се експресира на повърхността на клетките или във вътрешността на сквамозния епител на мукозата и кожата. Бактериостатичният и фунгистатичният му ефект се свързва с възпрепятстване проникването на бактериални агенти [5]. Епителните клетъчни линии, които експресират постоянно калпротектин, са по-малко възприемчиви към инвазия на патогени като: Листерия и някои Салмонели [6]. Определянето на ФК отразява индиректно активация на гранулоцити и техния инфлукс в чревния лумен [7]. Изследването на ФК дава още една възможност да се диагностицира заболяването болест на Крон (БК), особено когато засегнатата област от ГИТ е недостижима за ендоскопско изследване [8].

Друг фекален маркер, който тепърва навлиза в диагностиката на ХВЧЗ, е **фекалният лактоферин** (ФЛ). Лактоферинът е белтък, принадлежащ към семейството на трансферините – гликопротеини, които свързват желязото. Състои се от единична полипептидна верига с молекулно тегло 78 kDa, секретира се във вторичните гранули на неутрофилите [3]. Той се открива в почти всички екскрети – сълзи, носен секрет, слюнка, интестинален мукус и генитални секрети. Лактоферинът е значим компонент на първата линия на защита при бозайниците и неговата експресия се повишава в отговор на възпалителни стимули в дихателната или гастроинтестиналната системи, както и от алергени [3]. Лактоферинът е мултифункционален протеин с много физиологични функции като: подпомагане на абсорбцията на желязо в червата и растежа на чревните клетки, противовъзпалителна роля в гастроинтестиналния тракт, директна токсичност към микробни агенти, регулация на миелопоезата, стимулиране пролиферацията и диференциацията на остеобластите и инхибиране на остеокластите [9]. Общоприето е, че ФЛ, подобно на ФК, отразява активността на неутрофилите и е полезен неинвазивен маркер за интестинално възпаление при пациенти с ХВЧЗ [10].

Създадени са имуноензимни търговски набори за определяне на ФК и ФЛ във фецес, но съществуват и бързи тестове тип „до леглото на болния“ [11, 12].

Целта на настоящото проучване бе да се съпоставят ФК и ФЛ, изследвани с метода тест-плочка, като показатели за оценка на чревното възпаление.

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

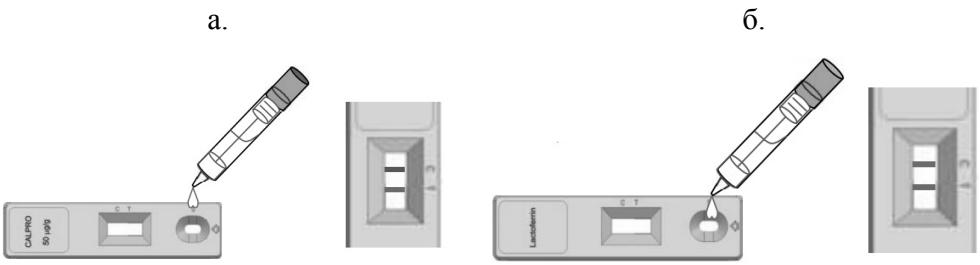
В проучването бяха включени 29 лица с поставена диагноза ХВЧЗ (доказана клинично, хистологично и ендоскопски според диагностичните критерии на ECCO Consensus за болест на Крон – БК (2010) и улцерозен колит – УК (2012) (Published ECCO Guidelines: https://www.ecco-ibd.eu/publications/ecco-guidelines-science/published-ecco-guidelines.html) и контролна група от лица без ХВЧЗ и без данни за други чревни или извънчревни тежки придружаващи заболява-

ния – 25 лица. С УК бяха 15 пациенти, а с БК – 14. Пациентите бяха на средна възраст 41±4 години и съотношение мъже – жени 1:1. В стадий на активност бяха 78,7% от тях (по съответните скали CDAI за БК и Mayo score за УК), новооткрити – 23,4%, а с давност на заболяването между 1–20 години – 77% от тях. Без усложнения бяха 62%, а с поне едно усложнение (фистули, структури и др.) – 38%. Всички пациенти бяха информирани за естеството на проучването и подписаха Информирано съгласие според изискванията на Етичната комисия към Медицинския университет – София.

Фекалните проби бяха взимани в химически чисти контейнери, надписвани, картотекирани и съхранявани в хладилна камера на -20ºC според изискванията за добра лабораторна практика и според инструкциите на търговските китове. Преди да бъдат тестирани, пробите бяха размразени напълно на стайна температура.

ФК беше определен чрез готов търговски набор One-Step Card CerTest Calprotectin (CerTest Biotec, Spain), а ФЛ – чрез One-Step Card CerTest Lactoferrin (CerTest Biotec, Spain) според инструкциите на производителя. Определянето на ФК и ФЛ с тест-плочка са бързи и с ниска степен на сложност за изпълнение качествени методи. Позволяват измерване на единични проби бързо и с ниска степен на сложност. Технологията представлява едностъпален цветен имунохроматографски метод с тест-плочка, която е предварително натоварена с антитела срещу човешки ФК или ФЛ, съответно (Фигура 1а и 1б).

**Фигура 1. Тест-плочка за определяне на фекален калпротектин (а) и фекален лактоферин (б). На плочката са визуализирани контролна „С“-линия и тест „Т“-линия**




Аналитичната чувствителност на двата теста е 50 mg/kg (резултатът е положителен при ФК/ФЛ > 50 mg/kg). Ако в „Т“-региона не се визуализира ивица, тестът е отрицателен.

## РЕЗУЛТАТИ

При 29 пациента с ХВЧЗ и 12 контролни лица с метода тест-плочка бяха определени ФК и ФЛ (Таблица 1).

**Таблица 1. Фекален калпротектин и лактоферин, определени чрез метода тест-плочка, при различните изследвани групи лица. Резултатите са представени като брой (%) лица**

| | **Пациенти с ХВЧЗ** n=29 | **Пациенти с УК** n=15 | **Пациенти с БК** n=14 | **Здрави лица** n=12 |
|---|---|---|---|---|
| **ФК (+) пол.** | 21 (72,4%) | 9/15 | 12/14 | 0 |
| **ФК (-) отр.** | 8 (27,6%) | 6/15 | 2/14 | 12/12 |
| **ФЛ (+) пол.** | 13 (44,8%) | 7/15 | 6/14 | 0 |
| **ФЛ (-) отр.** | 16 (55,2%) | 8/15 | 8/14 | 12/12 |

*ХВЧЗ – хронични възпалителни чревни заболявания, УК – улцерозен колит; БК – болест на Крон*

От данните се вижда, че не установихме положителен тест за ФК или ФЛ при нито едно от здравите лица. Положителни за ФК бяха общо 21 от 29 пациенти с ХВЧЗ (72%). Сред тях 12/14 от болните с БК са били положителни за ФК, в сравнение с 9/15 от пациентите с УК. От таблицата прави впечатление, че по-малко от половината от пациентите с ХВЧЗ са положителни за ФЛ – 13 от 29 (44,8%). Диагностичната чувствителност и специфичност на теста, както и PPV и NPV, изчислени по съответните формули, са представени на Таблица 2.

**Таблица 2. Сравнение на характеристиките на тестовете тест-плочки за фекален калпротектин и фекален лактоферин, изследвани при пациенти с хронични възпалителни чревни заболявания**

| | | **Фекален калпротектин** | **Фекален лактоферин** |
|---|---|---|---|
| **Диагностична чувствителност** | ХВЧЗ | 72,4% | 44,8% |
| | УК | 60% | 46,7% |
| | БК | 85,7% | 42,9% |
| | Производител | 94% | - |
| **Диагностична специфичност** | ХВЧЗ | 100% | 100% |
| | УК | 100% | 100% |
| | БК | 100% | 100% |
| | Производител | 93% | 92% |
| **PPV** | ХВЧЗ | 100% | 100% |
| | УК | 100% | 100% |
| | БК | 100% | 100% |
| **NPV** | ХВЧЗ | 60% | 42% |
| | УК | 66,7% | 60% |
| | БК | 85,7% | 60% |

Диагностичната специфичност на теста за ФК е 100% поради факта, че нито едно от здравите лица не е било положително за ФК. Диагностичната чувствителност на теста за определяне на пациентите с УК е 60%, за пациентите с БК

е по-висока – съответно 85,7%, а общо за ХВЧЗ е 72,4%. PPV от 100% показва високата вероятност за диагноза ХВЧЗ при пациенти, които са показали положителен резултат за ФК. NPV от 60% общо за ХВЧЗ показва, че отрицателният резултат не изключва диагнозата ХВЧЗ. NPV е по-висока за пациентите с БК. Това показва, че отрицателен резултат при даден индивид в най-голяма степен изключва възможността пациентът да има БК.

Диагностичната специфичност на теста за ФЛ също е 100%. Диагностичната чувствителност на теста за определяне на пациентите с ХВЧЗ, както и съответно за пациентите с УК и БК, е ниска – под 50%. Стойността на PPV от 100% показва висока способност на положителния резултат на ФЛ при пациенти със съмнение за ХВЧЗ да имат това заболяване. Ниската NPV от 42% общо за ХВЧЗ показва, че отрицателният резултат не изключва диагнозата ХВЧЗ. Тази стойност е 60% за отделните заболявания УК и БК.

От Таблица 2 правим заключение, че диагностичната чувствителност на ФК е значително по-висока в сравнение с тази на ФЛ както общо за ХВЧЗ, така и за отделните нозологични единици. Двата показателя показват специфичност и PPV от 100%. Стойностите на NPV са по-ниски за ФЛ, което показва слабостта на показателя при изключване на ХВЧЗ при тестваните лица.

По отношение на клиничната значимост на ФК и ФЛ получихме сигнификантна зависимост между продължителността на заболяването в години и наличието на ФК. Положителните за ФК пациенти имат по-дълга продължителност на заболяването в сравнение с пациентите, които са отрицателни за ФК. Корелацията е слаба към умерена (коефициент на корелация $r=0,369$, $p=0,027$). Установихме още, че наличието на усложнения (чревни и/или извънчревни) корелира умерено ($r=0,395$) само с нивата на ФК – пациентите, които са положителни за ФК, демонстрират по-често усложнения. Получихме също сигнификантна асоциация между нивата на ФК и вида на провежданата терапия (без, с неимуносупресивно или имуносупресивно лечение), като най-високи нива на ФК установихме при пациенти, които са без терапия ($p<0,01$).

По отношение на някои лабораторни показатели на пациентите с ХВЧЗ данните показаха, че повишените нива на ФК корелират статистически значимо с повишения тромбоцитен брой на пациентите в цялата група на ХВЗЧ, както и отделно при пациентите с БК и УК. Наличието на повишен ФК показва обратна корелация с нивото на серумно желязо ($p<0,05$) и правопропорционална корелация със СУЕ ($p<0,05$). Не установихме значима връзка между нивата на ФК и CRP, хемоглобина, албумина или левкоцитния брой.

Установихме, че наличието на усложнения корелира умерено с положителния за ФЛ резултат ($r=0,553$). Положителните за ФЛ пациенти имат и по-високи стойности на С-реактивния протеин ($p = 0,023$), хемоглобина ($p = 0,056$) и тромбоцитния брой ($p = 0,001$) в сравнение с пациентите, които са отрицателни за ФЛ.

Не получихме статистически значима зависимост между активността на заболяването както при УК, така и при БК, и нивото на ФЛ (метода $\chi^2$, $p>0,05$).

Изчисленото Likelihood ratio (LR) = 2,73 (p>0,05) за УК, както и LR = 0,071 (p>0,05) също не е статистически значимо.

Двата качествени теста корелират с умерена сила помежду си (метода $\chi^2$, Cramer`s v coeff – 0,552, p<0,05).

## ДИСКУСИЯ

С оглед съкращаване на времето за диагностициране и намаляване броя на инвазивните изследванията в последните години научните изследвания бяха насочени в търсене на по-прости, неинвазивни, бързи, евтини и надеждни методи за оценка на чревното възпаление и мукозното възстановяване след успешна терапия. От проучваните в последните години маркери най-обещаващи бяха произлизащите от неутрофилите ФК и ФЛ [15]. Изследването на чревното съдържимо за фекални маркери на възпалението е лесно достъпно и надеждно, защото чревното съдържимо е в постоянен и близък контакт с чревните стени. Ако мукозата е възпалена, молекулите на ФК, ФЛ и други продукти на възпалителни клетки могат лесно да преминат от лигавицата в чревното съдържимо и да бъдат измерени там [15]. Постепенно в практиката започват да навлизат и по-прости, по-бързи и по-лесни методи за определяне както на ФК, така и на ФЛ [16, 20].

Метаанализи от различни проучвания определят стойности за ФК от 89% (70–100% ) за PPV и 81% (51–91%) за NPV при диагностициране на болните с ХВЧЗ [17, 18, 19, 20, 21, 24]. Нашите данни за PPV и NPV на ФК се вместват в границите на водещите проучвания в света. А резултатите, в съзвучие с тези от литературата, показват още, че ФК е чувствителен, но не напълно специфичен маркер за интестинално възпаление. ФК не е болестно-специфичен показател, защото увеличение може да се наблюдава при всяко гастроинтестинално състояние, при което присъстват неутрофили в чревната лигавица. Въпреки това той остава най-добрият маркер за установяване на възпаление по хода на гастроинтестиналния тракт до момента.

Установихме сигнификантно по-високи нива на ФК при пациентите с ХВЧЗ, които са без терапия (p<0,01), както и сигнификантна правопропорционална корелация между нивата на ФК и тромбоцитния брой в кръвта. Пациенти, които са положителни за ФК, имат и по-високо ниво на тромбоцитите в кръвта. Множество автори съобщават за такава корелация независимо от продължителността или формата на заболяването [22]. Възможно обяснение се крие в публикуваните наскоро данни за различни хемостазни нарушения при пациентите с възпалителни състояния. Това повдига въпроса и за подценяването на тромбоцитния брой като полезен маркер на активно възпаление [22]. Нивата на ФК показват правопропорционална корелация още с нивото на серумно желязо (p<0,05) и със СУЕ (p<0,019). Ние не установихме корелация между нивата на ФК и серумния маркер за възпаление С-реактивен протеин и левкоцитния брой при болни с ХВЗЧ, за разлика от други автори, които установяват такава корелация [21, 22, 23, 24].

Множество проучвания търсят и разкриват корелации между ФК и клиничната активност на отделните форми на ХВЧЗ, като повечето автори установяват корелации между ФК и активността при пациентите с БК, а други – при пациенти с УК [25, 26]. Ние установихме повишен ФК при болни с активна болест, изчислена по съответните индекси. И при двете форми на ХВЧЗ – УК и БК, ФК бе положителен в по-голямата част от болните, които са с активност на заболяването. Всички болни с УК в ремисия бяха отрицателни за ФК, докато 33% от пациентите с БК в ремисия бяха положителни за ФК. Всички пациенти с БК в активност бяха положителни за ФК, но една трета от болните с УК и активно заболяване бяха отрицателни за ФК. Тези разнопосочни данни ни показват, че ФК може да бъде положителен при болни както в активнност, така и в ремисия, освен това може да бъде отрицателен пак в двата случая, което трябва да се има предвид. Статистически значима корелация между нивата на ФК и активността на заболяването установихме само за пациентите с БК ($p = 0,024$ и $LR = 4,319$, $p= 0,038$), което показа, че положителният резултат за ФК корелира с голяма сигурност с активност на заболяването. За пациентите с УК не установихме корелация между стойностите на ФК и болестната активност, както и Kolho и сътр. не съобщават за такава [11].

Лактоферинът е друг белтък, отделян от неутрофилите, който може да бъде установен в чревното съдържимо. ФЛ е доста по-малко изучаван от ФК, макар за него да съществуват както количествени имуноензимни методи, така и бързи качествени тестове. По литературни данни чувствителността на ФЛ за определяне на ХВЧЗ се движи между 67–87%, специфичността между 85–100%, PPV – 87–100%, NPV – 77-87% [10, 13, 18]. Прави впечатление ниската чувствителност, която получихме за болните с УК и БК – под 50%. Вероятно това е свързано с факта, че използвахме качествен метод с тест-плочка, а публикуваните данни са получени основно с ELISA методи. Въпреки тези резултати, при част от болните изследването на ФЛ може да бъде полезно в установяването на чревно възпаление. Потърсихме асоциации на ФЛ с някои клинични и лабораторни данни, както и с клиничната активност на болните с ХВЧЗ. Получихме потвърждаващи данни, че наличието на усложнения корелира умерено с наличието на ФЛ във фецеса ($r=0,553$), т.е. пациентите с по-високи нива на ФЛ имат и по-често усложнения. Положителна, статистически значима корелация установихме между нивата на ФЛ и С-реактивния протеин ($p<0,05$), хемоглобина ($p=0,054$) и тромбоцитния брой ($p<0,01$). В литературата има оскъдни данни само за наличие на корелация между ФЛ и CRP [22, 24].

Когато разделихме болните с УК и БК на такива с активност и такива в ремисия, отново получихме разнопосочни данни за наличието на ФЛ, подобно на данните за ФК. И при двете форми на ХВЧЗ с активно заболяване само около половината болни бяха положителни за ФЛ. Всички болни с УК, които бяха в ремисия, бяха отрицателни за ФЛ, докато 33% от пациентите с БК в ремисия бяха положителни за ФЛ. По данни на няколко проучвания е установено сигнификанто по-висок ФЛ при активно заболяване, отколкото при ремисия [10,

27, 28, 29]. Според тези изследователи ФЛ може да се прилага за измерване активността на ХВЧЗ, както и за предвиждане на обостренията. Смятаме, че е възможно наблюдаваното разминаване с нашите резултати да е свързано със сравнително малкия брой изследвани болни с ХВЧЗ и/или с различния метод на изследване.

Тъй като ФЛ е по-малко изследван показател, ние сравнихме клиничната му значимост с по-утвърдения ФК. Диагностичната чувствителност на ФК е значително по-висока в сравнение с тази на ФЛ както общо за ХВЧЗ, така и за отделните нозологични единици. Двата теста показват специфичност и PPV от 100%. Стойностите на NPV са по-ниски за ФЛ, което показва слабостта на показателя при изключване на диагнозата ХВЧЗ при тестваните лица.

Двата показателя корелират обаче с умерена сила помежду си в нашето изследване (Cramer`s v coeff – 0,552, $p<0,05$), което е установено и от други две групи от изследователи, правили подобни сравнителни проучвания върху двата фекални маркера [23, 30, 31].

Що се отнася до наличие на асоциации с болестната активност, и двата маркера ФК и ФЛ корелират правопропорционално с тромбоцитния брой в кръвта, като ФК корелира още с нивата на серумно желязо, а ФЛ – с нивата на CRP и хемоглобина. Когато проучвахме за асоциация между нивата на показателите и някои клинични характеристики на пациентите, установихме зависимост за ФК с продължителността на заболяването, а за ФЛ – с наличието на усложнения при пациентите с ХВЧЗ.

На базата на нашите сравнителни проучвания, тестът за определяне на ФК показва по-добри характеристики в сравнение с теста за ФЛ. Публикациите, които сравняват двата показателя, са оскъдни и често противопоставящи се, дори с конфликтни резултати. Някои проучвания заключават, че двата фекални маркера са еквивалентни в способността им да детектират чревно възпаление [18, 19], докато други, както и ние, смятат ФК за превъзхождащ ФЛ [32]. Не са изключение и проучвания, които доказват по-голяма точност на ФЛ в различаването на болни от ХВЧЗ от здрави лица, но те са по-малко [33]. Интересно проучване на Langhorst и сътр. разкрива по-голяма чувствителност на ФК за откриване на пациентите с БК (81,4%), докато ФЛ – по-голяма чувствителност (83,3%) – за болните с УК [31]. Ние установихме по-висока чувствителност на ФК за определяне на болните и с двете заболявания – УК и БК, в сравнение с ФЛ.

В литературата има данни за значението на ФЛ в диференциално-диагностичен план за разграничаване на пациентите с активна чревна възпалителна болест от тези със синдрома на дразнимото черво (СДЧ) [34]. При СДЧ нивата на ЛФ са близки до тези на здравите контроли, а при инфекция на червата са умерено повишени [35]. Нещо повече – в процес на проучване е участието ФЛ в модулацията на мукозното чревно възпаление, както и други негови все още не напълно изяснени имунорегулаторни функции [36].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение можем да обобщим, че ФК и ФЛ са сравнително добре документирани биомаркери при неутрофилното възпаление на червата. Те са подходящи скрининг-показатели за идентифициране на пациенти, които да бъдат насочени към последваща ендоскопия за по-нататъшно доказване на заболяването. ФК и ФЛ могат да корелират добре с болестната активност при УК и БК, както и да бъдат обективни показатели за мукозно заздравяване и следене на ефекта от прилаганата терапия.

Въз основа на нашите проучвания, въпреки умерената корелация между получените резултати при едни и същи пациенти с ХВЧЗ, тестът за определяне на ФК показва по-добри характеристики в сравнение с теста за ФЛ (Таблица 32), но двата теста корелират с различни клинико-лабораторни показатели и могат да бъдат използвани комбинирано за по-добро характеризиране на болните.

## ЛИТЕРАТУРА:


1. McDonald T. Immunology and Diseases of the Gut 2006.
2. Hestvik E, Tumwine JK, Tylleskar T, Grahnquist L, Ndeezi G, Kaddu-Mulindwa DH, et al. Faecal calprotectin concentrations in apparently healthy children aged 0–12 years in urban Kampala, Uganda: a community-based survey. BMC pediatrics.11:9.
3. Conneely O. Antiinflammatory activities of lactoferrin. Journal of the American College of Nutrition. 2001; 20(5):396S–397S.
4. Desai D, Faubion WA, Sandborn WJ. Review article: biological activity markers in inflammatory bowel disease. Alimentary pharmacology & therapeutics. 2007 Feb 1; 25(3):247–255.
5. Fagerhol MK. Calprotectin, a faecal marker of organic gastrointestinal abnormality. Lancet. 2000 Nov 25;356(9244):1783–1784.
6. Nisapakultorn K, Ross KF, Herzberg MC. Calprotectin expression in vitro by oral epithelial cells confers resistance to infection by Porphyromonas gingivalis. Infection and immunity. 2001 Jul; 69(7):4242–4247.
7. Roseth AG, Aadland E, Jahnsen J, Raknerud N. Assessment of disease activity in ulcerative colitis by faecal calprotectin, a novel granulocyte marker protein. Digestion. 1997; 58(2):176–180.
8. Gaya DR, Lyon TD, Duncan A, Neilly JB, Han S, Howell J, et al. Faecal calprotectin in the assessment of Crohn‘s disease activity. Qjm. 2005 Jun; 98(6):435–441.
9. Naot D, Chhana A, Matthews BG, Callon KE, Tong PC, Lin JM, et al. Molecular mechanisms involved in the mitogenic effect of lactoferrin in Bone. 2011; 49(2):217–224.
10. Kane SV, Sandborn WJ, Rufo PA, Zholudev A, Boone J, Lyerly D, et al. Fecal lactoferrin is a sensitive and specific marker in identifying intestinal inflammation. The American journal of gastroenterology. 2003 Jun; 98(6):1309–1314.
11. Kolho KL, Turner D, Veereman-Wauters G, Sladek M, de Ridder L, Shaoul R, et al. Rapid test for fecal calprotectin levels in children with Crohn disease. Journal of pediatric gastroenterology and nutrition. 2012 Oct; 55(4):436–439.

12. Schoepfer AM, Trummler M, Seeholzer P, Criblez DH, Seibold F. Accuracy of four fecal assays in the diagnosis of colitis. Diseases of the colon and rectum. 2007 Oct; 50(10):1697–1706.
13. Sipponen T. Diagnostics and prognostics of inflammatory bowel disease with fecal neutrophil-derived biomarkers calprotectin and lactoferrin. Dig Dis. 2013; 31(3–4):336–344
14. Otten CM, Kok L, Witteman BJ, Baumgarten R, Kampman E, Moons KG, et al. Diagnostic performance of rapid tests for detection of fecal calprotectin and lactoferrin and their ability to discriminate inflammatory from irritable bowel syndrome. Clin Chem Lab Med. 2008;46(9):1275–1280.
15. Arijs I, De Hertogh G, Machiels K, Van Steen K, Lemaire K, Schraenen A, et al. Mucosal gene expression of cell adhesion molecules, chemokines, and chemokine receptors in patients with inflammatory bowel disease before and after infliximab treatment. The American journal of gastroenterology. Apr; 106(4):748–761.
16. Atarashi K, Tanoue T, Umesaki Y, Honda K. Regulation of Th17 cell differentiation by intestinal commensal bacteria. Beneficial microbes. Nov; 1(4):327–334.
17. Costa F, Mumolo MG, Bellini M, Romano MR, Ceccarelli L, Arpe P, et al. Role of faecal calprotectin as non-invasive marker of intestinal inflammation. Dig Liver Dis. 2003 Sep; 35(9):642–647.
18. D'Inca R, Dal Pont E, Di Leo V, Ferronato A, Fries W, Vettorato MG, et al. Calprotectin and lactoferrin in the assessment of intestinal inflammation and organic disease. International journal of colorectal disease. 2007 Apr; 22(4):429–437.
19. Schroder O, Naumann M, Shastri Y, Povse N, Stein J. Prospective evaluation of faecal neutrophil-derived proteins in identifying intestinal inflammation: combination of parameters does not improve diagnostic accuracy of calprotectin. Alimentary pharmacology & therapeutics. 2007 Oct 1; 26(7):1035–1042.
20. Tibble J, Teahon K, Thjodleifsson B, Roseth A, Sigthorsson G, Bridger S, et al. A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. Gut. 2000 Oct;47(4):506–513.
21. Наков, В. Фекален калпротектин – неинвазивен маркер за оценка на чревното възпаление. Дисертация. София: Медицински университет – МФ; 2011.
22. Eder P, Stawczyk-Eder K, Krela-Kazmierczak I, Linke K. Clinical utility of the assessment of fecal calprotectin in Lesniowski-Crohn's disease. Polskie Archiwum Medycyny Wewnetrznej. 2008 Nov; 118(11):622–626.
23. Schoepfer AM, Beglinger C, Straumann A, Trummler M, Renzulli P, Seibold F. Ulcerative colitis: correlation of the Rachmilewitz endoscopic activity index with fecal calprotectin, clinical activity, C-reactive protein, and blood leukocytes. Inflammatory bowel diseases. 2009 Dec; 15(12):1851–1858.
24. Vieira A, Fang CB, Rolim EG, Klug WA, Steinwurz F, Rossini LG, et al. Inflammatory bowel disease activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrin: correlation with laboratory parameters, clinical, endoscopic and histological indexes. BMC research notes. 2009; 2:221.
25. Walkiewicz D, Werlin SL, Fish D, Scanlon M, Hanaway P, Kugathasan S. Fecal calprotectin is useful in predicting disease relapse in pediatric inflammatory bowel disease. Inflammatory bowel diseases. 2008 May; 14(5):669–673.
26. D'Haens G, Ferrante M, Vermeire S, Baert F, Noman M, Moortgat L, et al. Fecal

calprotectin is a surrogate marker for endoscopic lesions in inflammatory bowel disease. Inflammatory bowel diseases. Dec; 18(12):2218–2224.
27. Gisbert JP, Bermejo F, Perez-Calle JL, Taxonera C, Vera I, McNicholl AG, et al. Fecal calprotectin and lactoferrin for the prediction of inflammatory bowel disease relapse. Inflammatory bowel diseases. 2009 Aug; 15(8):1190–1198.
28. Parsi MA, Shen B, Achkar JP, Remzi FF, Goldblum JR, Boone J, et al. Fecal lactoferrin for diagnosis of symptomatic patients with ileal pouch-anal anastomosis. Gastroenterology. 2004 May; 126(5):1280–1286.
29. Walker TR, Land ML, Kartashov A, Saslowsky TM, Lyerly DM, Boone JH, et al. Fecal lactoferrin is a sensitive and specific marker of disease activity in children and young adults with inflammatory bowel disease. Journal of pediatric gastroenterology and nutrition. 2007 Apr; 44(4):414–422.
30. Schoepfer AM, Beglinger C, Straumann A, Safroneeva E, Romero Y, Armstrong D, et al. Fecal calprotectin more accurately reflects endoscopic activity of ulcerative colitis than the Lichtiger Index, C-reactive protein, platelets, hemoglobin, and blood leukocytes. Inflammatory bowel diseases. Feb; 19(2):332–341.
31. Langhorst J, Elsenbruch S, Koelzer J, Rueffer A, Michalsen A, Dobos GJ. Noninvasive markers in the assessment of intestinal inflammation in inflammatory bowel diseases: performance of fecal lactoferrin, calprotectin, and PMN-elastase, CRP, and clinical indices. The American journal of gastroenterology. 2008 Jan;103(1):162–169.
32. Silberer H, Kuppers B, Mickisch O, Baniewicz W, Drescher M, Traber L, et al. Fecal leukocyte proteins in inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. Clinical laboratory. 2005; 51(3–4):117–126.
33. Schoepfer AM, Vavricka S, Zahnd-Straumann N, Straumann A, Beglinger C. Monitoring inflammatory bowel disease activity: clinical activity is judged to be more relevant than endoscopic severity or biomarkers. Journal of Crohn‘s & colitis. May;6(4):412–418.
34. Burri E, Beglinger C. The use of fecal calprotectin as a biomarker in gastrointestinal disease. Expert review of gastroenterology & hepatology. Feb; 8(2):197–210.
35. Dai J, Liu WZ, Zhao YP, Hu YB, Ge ZZ. Relationship between fecal lactoferrin and inflammatory bowel disease. Scandinavian journal of gastroenterology. 2007 Dec;42(12):1440–1444.
36. Hayakawa T, Jin CX, Ko SB, Kitagawa M, Ishiguro H. Lactoferrin in gastrointestinal disease. Internal medicine (Tokyo, Japan). 2009; 48(15):1251–1254.

# СРАВНЕНИЕ НА ФЕКАЛНИТЕ МАРКЕРИ КАЛПРОТЕКТИН И ЛАКТОФЕРИН ЗА ОЦЕНКА НА МУКОЗНОТО ВЪЗПАЛЕНИЕ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ХРОНИЧНИ ЧРЕВНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

***Цветелина Великова[1], Зоя Спасова[2], Екатерина Иванова-Тодорова[1], Доброслав Кюркчиев[2], Искра Алтънкова[3]***

*[1]Лаборатория по клинична имунология – УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, София, Катедра по клинична лаборатория и клинична имунология – Медицински университет, София*

*[2]Клиника по гастроентерология – УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, София, Катедра по вътрешни болести – Медицински университет, София*

*[3]Университетска болница Лозенец – Софийски университет – Медицински факултет, София*

Диагнозата на хроничните възпалителни чревни заболявания на червата (ХВЧЗ), както и оценката на активността на заболяването, може да бъде предизвикателство в практиката. Целта на проучването е да се оценят в сравнителен план качествата на бързи тестове за определяне на фекалните маркери калпротектин (ФК) и лактоферин (ФЛ) при пациенти с ХВЧЗ. Изследвахме 29 пациенти с ХВЧЗ (15 с улцерозен колит – УК, и 14 с болестта на Крон – БК), както и 12 здрави лица за наличие на ФК и ФЛ, определени чрез имунохроматографски метод (тест-плочка). Приблизително 83% от пациентите бяха с активно заболяване. Резултатите от проучването показаха чувствителност за ФК и ФЛ съответно 72,4% и 44,8%, специфичност и положителна предиктивна стойност (PPV) 100% и за двата теста, както и отрицателна прогностична стойност (NPV) 60% и 42%, съответно. Бяха потърсени и асоциации между фекалните маркери и някои лабораторни и клинични находки. Открихме корелация между активността на заболяването при пациентите с БК и нивата на ФК ($p = 0,024$, $r = 0,583$) с Likelihood ratio (LR) =4,31 ($p = 0,038$). ФК демонстрира също асоциация с броя на тромбоцитите ($p = 0,007$), серумното желязо ($p = 0,031$) и продължителността на заболяването ($p = 0,027$). ФЛ показа корелация с броя на тромбоцитите ($p = 0,001$), CRP ($p = 0,023$) и наличието на усложнения ($p = 0,017$).

Въпреки че двата бързи теста показаха ефективност в диагностицирането на пациентите с ХВЧЗ, ФК показа предимство през ФЛ. ФК може да се използва за оценка на активността на заболяването, а ФЛ – за наличието на усложнения.

***Ключови думи***: фекален калпротектин, фекален лактоферин, тест-плочка, чревно възпаление, хронични възпалителни чревни заболявания, улцерозен колит, болест на Крон.

# COMPARISON OF FECAL MARKERS CALPROTECTIN AND LACTOFERRIN FOR THE ASSESSMENT OF MUCOSAL INFLAMMATION IN PATIENTS WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASES

***Tsvetelina Velikova[1], Zoya Spassova[2], Ekaterina Ivanova-Todorova[1], Dobroslav Kyurkchiev[1], Iskra Altankova[3]***

*[1]Laboratory of clinical immunology – University Hospital „St. Ivan Rilski“; Department of Clinical Laboratory and Clinical Immunology – Medical University of Sofia*

*[2]Clinic of Gastroenterology – University Hospital „St. Ivan Rilski“; Department of Internal Medicine – Medical University of Sofia*

*[3]University Hospital Lozenets – Sofia University, Medical faculty*

The diagnosis of IBD (Inflammatory bowel disease) as well as the assessment of disease activity can be challenging. The aim of the study was to evaluate the qualities of one-step card test for fecal calprotectin (FC) and fecal lactoferrin (FL) in IBD. We have examined fecal samples for FC and FL obtained from 29 patients with IBD (15 with ulcerative colitis – UC, and 14 with Crohn's disease – CD) and 12 healthy persons. We have used qualitative one-step card test for each marker. Most of the patients (83%) were in exacerbation state.

We obtained for FC and FL, respectively, sensitivity 72,4% and 44,8%, specificity 100% and positive predictive value (PPV) 100% for both tests, and negative predictive value (NPV) 60% and 42%. We have assessed the associations between fecal markers and some laboratory and clinical findings. We found correlation between disease activity of CD patients and FC level (p=0,024, r=0,583) with Likelihood Ratio (LR) = 4,31 (p=0,038). FC demonstrated also association with platelet count (p=0,007), serum iron (p=0,031) and disease duration (p=0,027). FL showed association with platelet count (p=0,001), CRP (p=0,023) and presence of complications (p=0,017).

The one-step card test for fecal markers is useful in diagnosis of IBD. However, FC showed better performance than FL. FC can assess the severity of CD, while FL is elevated in complicated IBD.

***Keywords:*** fecal calprotectin, fecal lactoferrin, one-step card test, intestinal inflammation, inflammatory bowel disease, ulcerative colitis, Crohn's disease.

# ПРОГРАМА
## за дейността на сдружение „Българска асоциация по клинична имунология“ през 2016 година

**1. Организационна дейност**

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

1.2. WEB страница на БАКИ

- Доизграждане на новия сайт, започнат в края на 2015 г.
- През 2016 г. ще продължи отразяването на дейността на БАКИ, в т.ч. информация за национални и международни форуми в областта на имунологията, трансплантологията, печатни издания и други новини.
- Ще се публикува информация, насочена към младите специалисти, желаещи да специализират и да придобият специалност в България, както и информация за награди и стипендии за участие в национални и международни форуми.
- Ежедневно проверяване на електронната поща.

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

**2. Публикационна дейност**

- Издаване на годишник (9-и брой) на Сдружението с информация за проведените курсове и конференции през 2015 година.

**3. ВОК:**

- Продължаване на схемите:

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

*Схеми 2А* (АНА и анти-ДНК антитела), 2Б (ЕНА антитела); 2В (АНЦА), 2Г – антикардиолипинови и β2-GP антитела – 1 цикъл с 3 проби; 2Д-ССР6, РФ-1 цикъл с 2 проби от INSTANT и по възможност 1 наша.

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

**4. Провеждане на конференции:**

4.1. Честване на **Международния ден на имунологията** 29 април и седмицата на ПИД 22–29 април 2016 по места с различни прояви.

4.2. **Юбилейна научна конференция „10- години Българска асоциация по клинична имунология“** – място: София, хотел Балкан, дати: 28–29 октомври

4.3. **Лятно училище за ПИД – пациенти и родители** – съвместно между БАКИ, МУ – Пловдив, и Център „Джефри Модел“ – България, Почивна база на МУ – Пловдив в Цигов Чарк, 15–16 април 2016

4.4. Да се участва в **Конференцията по редки болести с отделна ПИД сесия,** гр. Пловдив, 9–10 септември 2016 г.

4.5. Работна среща на тема „**Проблеми и перспективи пред клиничната имунология в условията на извършваща се здравна реформа**“ – предложение от проф. Кр. Халачева.

4.6. Провеждане на съвместни **web-инари** по предварително обявена програма от BD-предложение от проф. М. Николова.

4.7. Популяризиране на ICCE: **international cytometry certification examination** – предложение от проф. М. Николова.

**ГОДИШНИК**
**на БАКИ**
**2015**

Българска
Първо издание

Книгоиздател ПАВЕЛ СЛАВЯНСКИ
Предпечат МАРИАНА ХРИСТОВА
Коректор СТЕЛА ЗИДАРОВА

Формат 70/100/16
Печатни коли 4,75

© Издателство „Лице“, 2016
e-mail: litse@abv.bg
0888 56 54 39

ISSN 1313-47-52