

**Katarzyna Smykał-Jankowiak**

***Analiza występowania przeciwciał  
przeciw składowej C1q dopełniacza  
w surowicy chorych na pierwotne i wtórne  
kłębuszkowe zapalenia nerek***

**ROZPRAWA DOKTORSKA**

**PROMOTOR: Prof. dr hab. n. med. Zofia I. Niemir**

**Pracownia Nefrologii Molekularnej  
Katedra i Klinika Nefrologii, Transplantologii i Chorób  
Wewnętrznych  
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego  
w Poznaniu**

Praca finansowana ze środków przyznanych  
przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego  
na realizację grantu promotorskiego

Nr NN 401 031 237

Poznań 2012

Serdeczne podziękowania składam  
**Pani prof. dr hab. n. med. Zofii Niemir**  
Kierownikowi Pracowni Nefrologii Molekularnej  
i Promotorowi  
za cenne uwagi i rady  
oraz cierpliwość  
przy przygotowaniu pracy doktorskiej

Dziękuję także Kierownikom  
Katedry i Kliniki Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych  
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego  
w Poznaniu  
Panu prof. dr hab. n. med. Stanisławowi Czekalskiemu  
oraz  
Panu prof. dr hab. n. med. Andrzejowi Oko  
za umożliwienie mi realizacji pracy naukowej

Pragnę podziękować mojej Rodzinie  
za wsparcie i wyrozumiałość,  
dzięki którym ta praca mogła powstać

## SPIS STOSOWANYCH SKRÓTÓW

### Skróty dotyczące metod

<b>APAAP</b>	- fosfataza zasadowa-antyfosfataza zasadowa (ang. alkaline phosphatase-anti-alkaline phosphatase)
<b>BSA</b>	- albumina surowicy wołu (ang. bovine serum albumin)
<b>cDNA</b>	- komplementarny DNA (ang. complementary DNA)
<b>DEPC</b>	- dietylopirowęglan (ang. diethyl pyrocarbonate)
<b>DMF</b>	- dimetyloformamid
<b>DNA</b>	- kwas deoksyrybonukleinowy (ang. deoxyribonucleic acid)
<b>dNTP</b>	- mieszanina trifosforanów deoksynukleotydów (ang. deoxyribonucleotide triphosphate)
<b>DTT</b>	- ditiotreitól (ang. dithiotreitol, threo-2,3,-dihydroxy-1,4 dithiolbutane)
<b>EDTA</b>	- kwas etylenodiaminotetraoctowy (ang. ethylenediaminetetraacetate)
<b>eGFR</b>	- szacowana filtracja kłębuszkowa (ang. estimated glomerular filtration rate)
<b>ELISA</b>	- metoda immunoenzymatyczna (ang. enzyme-linked immunosorbent assay)
<b>ELISPOT</b>	- ang. enzyme-linked immunosorbent spot assay
<b>FITC</b>	- izotiocyanian fluoresceiny (ang. fluorescein isothiocyanate)
<b>GAPDH</b>	- dehydrogenaza aldehydu 3 fosfoglicerynowego (ang. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)
<b>HRP</b>	- peroksydaza chrzanowa (ang. horseradish

	peroxidase)
<b>IF</b>	- immunofluorescencja
<b>kDa</b>	- tysiąc Daltonów (ang. kilo Daltons)
<b>MDRD</b>	- Modification of Diet in Renal Disease
<b>mRNA</b>	- informacyjny RNA (ang. messenger RNA)
<b>NPV</b>	- negatywna wartość predykcyjna (ang. negative predictive value)
<b>PCR</b>	- reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. polymerase chain reaction)
<b>Polimeraza Taq</b>	- polimeraza pochodząca z bakterii <i>Thermus Aquaticus</i>
<b>PPV</b>	- pozytywna wartość predykcyjna (ang. positive predictive value)
<b>pz</b>	- para zasad
<b>RNA</b>	- kwas rybonukleinowy (ang. ribonucleic acid)
<b>RPM</b>	- obroty na minutę (ang. rotations per minute)
<b>RT-PCR</b>	- reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. real-time polymerase chain reaction)
<b>SEM</b>	- błąd standardowy średniej (ang. standard error of mean)
<b>SD</b>	- odchylenie standardowe (ang. standard deviation)
<b>SNP</b>	- polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism)
<b>TAE</b>	- roztwór buforujący do elektroforezy (ang. Tris-acetate-EDTA electrophoresis buffer)
<b>U</b>	- jednostka aktywności polimerazy
<b>UDG</b>	- uracyl DNA glikozydaza (ang. uracil-DNA glycosylase)
<b>UV</b>	- ultrafiolet (ang. ultraviolet)

**wpw** - w polu widzenia

**Skróty dotyczące chorób nerek**

<b>ANA</b>	- przeciwciała przeciwjądrowe (ang. antinuclear antibodies)
<b>ANCA</b>	- przeciwciała przeciw cytoplazmie granulocytów obojętnochłonnych (ang. anti-neutrophil cytoplasmic antibodies)
<b>aTZN</b>	- aktywne toczniowe zapalenie nerek
<b>AZA</b>	- azatiopryna
<b>BILAG</b>	- Brytyjska Grupa Do Spraw Tocznia (ang. British Isles Lupus Assesment Group)
<b>cANCA</b>	- przeciwciała przeciw neutrofilom typ cytoplazmatyczny (ang. cytoplasmic anti-neutrophil antibodies)
<b>CYC</b>	- cyklofosfamid
<b>CsA</b>	- cyklosporyna A
<b>E</b>	- erytrocyturia (>5 RBC wpw po odwirowaniu próbki moczu)
<b>ECLAM</b>	- Europejski Konsensus do Oceny Aktywności Tocznia Rumieniowatego Układowego (ang. European Consensus Lupus Activity Measurement)
<b>ExGN</b>	- zewnątrzłośniczkowe kłębuszkowe zapalenie nerek (ang. extracapillary glomerulonephritis)
<b>FSGS</b>	- ogniskowe segmentalne stwardnienie kłębuszków nerkowych (ang. focal-segmental glomerulosclerosis)
<b>GBM</b>	- błona podstawna kłębuszków nerkowych (ang. glomerular basement membrane)
<b>IgA-GN</b>	- nefropatia IgA (ang. IgA glomerulonephritis)
<b>IMGN</b>	- błoniaste kłębuszkowe zapalenie nerek (ang.

	idiopathic membranous glomerulonephritis)
<b>iv</b>	- dożylnie (ang. intravenous)
<b>K</b>	- grupa kontrolna
<b>KKI</b>	- krążące kompleksy immunologiczne
<b>KKI-C1q</b>	- krążące kompleksy immunologiczne wiążące C1q
<b>KZN</b>	- kłębuszkowe zapalenie nerek
<b>KZN-NR</b>	- nierozplemowe kłębuszkowe zapalenie nerek
<b>KZN-R</b>	- rozplemowe kłębuszkowe zapalenie nerek
<b>naTZN</b>	- nieaktywne toczniowe zapalenie nerek
<b>NT</b>	- nadciśnienie tętnicze
<b>L</b>	- leukocyturia (>5 WBC wpw po odwirowaniu próbki moczu)
<b>MCD</b>	- submikroskopowe kłębuszkowe zapalenie nerek (ang. minimal change disease)
<b>MesPGN</b>	- mezangialne rozplemowe kłębuszkowe zapalenie nerek (ang. mesangial proliferative glomerulonephritis)
<b>MP</b>	- metylprednizolon
<b>MPGN</b>	- błoniasto-rozplemowe kłębuszkowe zapalenie nerek (ang. membranoproliferative glomerulonephritis)
<b>NK</b>	- nerka zdrowa (ang. normal kidney)
<b>Non-IgA-GN</b>	- wszystkie postacie MesPGN z wyjątkiem nefropatii IgA
<b>pANCA</b>	- przeciwciała przeciw neutrofilom typ okołojądrowy (ang. perinuclear anti-neutrophil antibodies)
<b>PKZN</b>	- pierwotne kłębuszkowe zapalenie nerek
<b>PKZN-NR</b>	- nierozplemowe pierwotne kłębuszkowe zapalenie nerek
<b>PKZN p-C1q(+)</b>	- chorzy na PKZN z wykrywanymi

<b>PKZN p-C1q(-)</b>	przeciwciałami przeciw C1q w surowicy - chorzy na PKZN z niewykrywanymi przeciwciałami przeciw C1q w surowicy
<b>PKZN p-dsDNA(+)</b>	- chorzy na PKZN z wykrywanymi przeciwciałami przeciw dwuniciowemu DNA w surowicy
<b>PKZN p-dsDNA(-)</b>	- chorzy na PKZN z niewykrywanymi przeciwciałami przeciw dwuniciowemu DNA w surowicy
<b>PKZN-R</b>	- rozplemowe pierwotne kłębuszkowe zapalenie nerek
<b>TNF</b>	- czynnik martwicy nowotworów (ang. tumour necrosis factor)
<b>TRU</b>	- toczeń rumieniowaty układowy
<b>TZN</b>	- toczniowe zapalenie nerek
<b>TZN p-C1q(+)</b>	- chorzy na TZN z wykrywanymi przeciwciałami przeciw C1q w surowicy
<b>TZN p-C1q(-)</b>	- chorzy na TZN z niewykrywanymi przeciwciałami przeciw C1q w surowicy
<b>TZN p-dsDNA(+)</b>	- chorzy na TZN z wykrywanymi przeciwciałami przeciw dwuniciowemu DNA w surowicy
<b>TZN p-dsDNA(-)</b>	- chorzy na TZN z niewykrywanymi przeciwciałami przeciw dwuniciowemu DNA w surowicy
<b>SLAM</b>	- ocena aktywności tocznia rumieniowatego układowego (ang. Systemic Lupus Activity Measure)
<b>SLEDAI-2K</b>	- wskaźnik aktywności tocznia rumieniowatego układowego (ang. Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index)
<b>SLEDAI-N</b>	- wskaźnik aktywności tocznia rumieniowatego układowego z uwzględnieniem tylko kryteriów dotyczących zajęcia nerek

<b>SVV</b>	- układowe zapalenie naczyń (ang. small vessel vasculitis)
<b>UD</b>	- układ dopełniacza
<b>U<sub>prot</sub></b>	- białkomocz (ang. urinary protein)
<b>WKZN</b>	- wtórne kłębuszkowe zapalenie nerek
<b>ZN</b>	- zespół nerczycowy
<b>ZUM</b>	- zakażenie układu moczowego

**Inne:**

<b>A</b>	- adenina
<b>Aa</b>	- aminokwasy
<b>ANOVA</b>	- jednoczynnikowa analiza wariancji (ang. one- way analysis of variance)
<b>Arg</b>	- arginina
<b>Asp</b>	- arparagina
<b>C</b>	- cytozyna
<b>C1q</b>	- składowa dopełniacza C1q (ang. complement component C1q)
<b>C1qA</b>	- gen kodujący łańcuch A składowej dopełniacza C1q
<b>C1qB</b>	- gen kodujący łańcuch B składowej dopełniacza C1q
<b>C1qC</b>	- gen kodujący łańcuch C składowej dopełniacza C1q
<b>C1q-L</b>	- ekspresja mRNA C1q w leukocytach krwi
<b>C1q-N</b>	- ekspresja mRNA C1q w nerce
<b>C3</b>	- składowa dopełniacza C3 (ang. complement component C3)
<b>C4</b>	- składowa dopełniacza C4 (ang. complement component C4)
<b>CRL-C1q</b>	- koleganopodobny region białka C1q (ang. collagen-like region)
<b>CRP</b>	- białko reaktywne C (ang. C-Reactive Protein)



<b>EMILIN</b>	- białko zlokalizowane na powierzchni mikrofibryl elastyny (ang. elastin microfibril interface located protein)
<b>G</b>	- guanina
<b>ghC1q</b>	- tzw. główka C1q (ang. globular head)
<b>Gly</b>	- glicyna
<b>gp41</b>	- glikoproteina o masie 41kDa
<b>gp21</b>	- glikoproteina o masie 21 kDa
<b>Hb</b>	- stężenie hemoglobiny we krwi (ang. hemoglobin)
<b>HCV</b>	- wirus zapalenia wątroby typu C (ang. hepatitis C virus)
<b>HIV</b>	- ludzki wirus niedoboru odporności (ang. human immunodeficiency virus)
<b>HP</b>	- białka związane z hibernacją (ang. hibernation proteins)
<b>hsp</b>	- białka szoku cieplnego (ang. heat shock proteins)
<b>HTLV-I</b>	- ludzki wirus T-limfocytowy typ I (ang. human T-lymphocytes virus type I)
<b>HUVS</b>	- przewlekła pokrzywka z zapaleniem naczyń i hipokomplementemią (ang. hypocomplementemic urticarial vasculitis syndrome)
<b>IL</b>	- interleukina
<b>INF</b>	- interferon
<b>LMW-C1q</b>	- C1q o małej masie cząsteczkowej (ang. low molecular weight C1q)
<b>MAC</b>	- kompleks atakujący błonę (ang. membrane attack complex)
<b>MCTD</b>	- mieszana choroba tkanki łącznej (ang. mixed connective tissue disease)
<b>NLPZ</b>	- niesterydowe leki przeciwzapalne
<b>pc p-AMA-M2</b>	- przeciwciała przeciwmitochondrialne typu M2

	(ang. antimitochondrial antibodies M2)
<b>pc p-β2 glikoproteinie 1</b>	- przeciwciała przeciw β2 glikoproteinie 1
<b>pc p-CENP B</b>	- przeciwciała przeciw centromerom B (ang. antibodies against centromere)
<b>pc p-C1q</b>	- przeciwciała przeciw C1q
<b>pc p-DNA</b>	- przeciwciała przeciw dwuniciowemu DNA
<b>pc p-GBM</b>	- przeciwciała przeciw błonie podstawnej kłębuszka nerkowego (ang. antibodies against glomerular base membrane)
<b>pc p-histonom</b>	- przeciwciała przeciw histonom
<b>pc p-kardiolinie</b>	- przeciwciała przeciw kardiolinie
<b>pc p-La (SS-B)</b>	- przeciwciała przeciw antygenowi La (ang. Sjögren Syndrome-B)
<b>pc p-nRNP/Sm</b>	- przeciwciała przeciw natywnej rybonukleinie U1 (ang. antibodies against native ribonucleoprotein)
<b>pc p-Ns</b>	- przeciwciała przeciw nukleosomom
<b>pc p-PCNA</b>	- przeciwciała przeciw jądrowemu antygenowi proliferujących komórek (ang. antibodies against proliferating cell nuclear antigen)
<b>pc p-Ro (SS-A)</b>	- przeciwciała przeciw antygenowi Ro (ang. Sjögren Syndrome-A)
<b>pc p-rybosomalnemu białku P</b>	- przeciwciała przeciw rybosomalnemu białku P
<b>pc p-Sm</b>	- przeciwciała przeciw antygenowi Sm
<b>PLs</b>	- fosfolipidy (ang. phospholipids)
<b>PLT</b>	- płytki krwi (ang. platelets)
<b>PTX3</b>	- pentraksyna 3 (ang. pentraxin 3)
<b>PSTRU</b>	- podostra skórna postać tocznia rumieniowatego układowego (ang. subacute cutaneous lupus erythematosus)
<b>RBC</b>	- erytrocyty (ang. red blood cells)
<b>SAP</b>	- osoczowy amyloid (ang. serum amyloid protein)
<b>S<sub>cr</sub></b>	- stężenie kreatyniny w surowicy (ang. serum

	creatinine concentration)
<b>T</b>	- tymina
<b>TP</b>	- białko całkowite (ang. total protein)
<b>U</b>	- uracyl
<b>WBC</b>	- leukocyty (ang. white blood cells)
<b>WZW C</b>	- wirusowe zapalenie wątroby typu C (ang. hepatitis C)
<b>WOX</b>	- oksydoreduktaza zawierająca domenę WW (ang. WW domain containing oxydoreductase)
<b>ZO</b>	- zdrowi ochotnicy

## **SPIS TREŚCI**

SPIS STOSOWANYCH SKRÓTÓW	3
SPIS TREŚCI	12
1. WSTĘP	16
1.1. Budowa składowej dopełniacza C1q	17
1.2. Funkcje C1q	18
1.3. Gen kodujący C1q	19
1.3.1. Budowa genu	19
1.3.2. Mutacje w genie C1q	20
1.4. Przeciwciała przeciw C1q	23
1.4.1. Historia wykrywania pc p-C1q	23
1.4.2. Charakterystyka pc p-C1q	24
1.4.3. Występowanie pc p-C1q w chorobach autoimmunologicznych	24
1.4.4. Występowanie pc p-C1q w chorobach infekcyjnych	27
1.4.5. Udział pc p-C1q C1q w patogenezie KZN	27
1.5. Inne markery immunologiczne	29
1.5.1. Przeciwciała przeciw dsDNA	29
1.5.2. Składowe dopełniacza C3 i C4	30
1.6. Uzasadnienie dla przeprowadzenia analizy występowania pc p-C1q w surowicy chorych na PKZN i WKZN	31
2. CEL PRACY	32
3. MATERIAŁ I METODY	33
3.1. Chorzy	33
3.1.1. Opracowanie materiału do badań	40
3.2. Badania immunoenzymatyczne	41
3.2.1. Wykrywanie pc p-C1q	42
3.2.2. Wykrywanie pc p-dsDNA	42
3.2.3. Wykrywanie KKI-C1q	43
3.2.4. Oznaczanie stężenia C1q w surowicy	44
3.3. Dodatkowe badania laboratoryjne	44
3.3.1. Parametry immunologiczne	44

3.3.2. Badania biochemiczne	45
3.4. Izolacja DNA	46
3.5. Amplifikacja DNA metodą PCR	47
3.6. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR na żelu agarozowym	48
3.7. Przygotowywanie produktów PCR do dalszych analiz	48
3.8. Analiza restrykcyjna produktów amplifikacji DNA	49
3.9. Izolacja RNA	49
3.10. Reakcja odwrotnej transkrypcji	50
3.11. Amplifikacja cDNA metodą RT-PCR	50
3.12. Analiza restrykcyjna produktów amplifikacji	54
3.13. Immunohistochemia	55
3.14. Immunofluorescencja	57
3.15. Metody statystyczne	57
4. WYNIKI	58
4.1. Wykrywanie pc p-C1q w surowicy	58
4.1.1. Częstość występowania pc p-C1q w surowicy	58
4.1.2. Średnie stężenia pc p-C1q w surowicy	59
4.2. Wykrywanie pc p-dsDNA w surowicy	61
4.2.1. Częstość występowania pc p-dsDNA w surowicy	61
4.2.2. Średnie stężenia pc p-dsDNA w surowicy	62
4.3. Wykrywanie KKI-C1q w surowicy	62
4.3.1. Częstość występowania KKI-C1q w surowicy	62
4.3.2. Średnie stężenia KKI-C1q w surowicy	63
4.4. Oznaczenie składowych dopełniacza C1q, C3 i C4 w surowicy	64
4.4.1. Częstość występowania obniżonego stężenia składowych dopełniacza C1q, C3 i C4 w surowicy	64
4.4.2. Średnie stężenia składowych dopełniacza C1q, C3 i C4 w surowicy	66
4.5. Różnice w wykrywaniu badanych markerów immunologicznych w zależności od aktywności TRU i TZN	69
4.6. Oznaczenie immunoglobulin klasy IgG w surowicy	71
4.7. Wykrywanie DNA C1q i ocena występowania mutacji w genie C1q kodującym łańcuch A	72

4.8. Ekspresja mRNA C1q w leukocytach krwi	73
4.9. Ekspresja mRNA C1q w nerkach	76
4.10. Ekspresji produktu białkowego C1q w kłębuszku nerkowym	77
4.11. Porównanie wybranych danych klinicznych i laboratoryjnych pomiędzy chorymi z dodatnimi i ujemnymi pc p-C1q	79
4.11.1. Porównanie wybranych danych klinicznych i laboratoryjnych pomiędzy chorymi na TZN z dodatnimi i ujemnymi pc p-C1q	79
4.11.2. Porównanie wybranych danych klinicznych i laboratoryjnych pomiędzy chorymi na PKZN z dodatnimi i ujemnymi pc p-C1q	83
4.12. Porównanie wybranych danych klinicznych i laboratoryjnych pomiędzy chorymi z dodatnimi i ujemnymi pc p-dsDNA	85
4.13. Porównanie wybranych danych klinicznych i laboratoryjnych pomiędzy chorymi ze stwierdzonym ZN i bez ZN	87
4.14. Porównanie wybranych danych klinicznych i laboratoryjnych pomiędzy chorymi ze stwierdzoną E i bez E	89
4.15. Badanie wzajemnych korelacji między wybranymi parametrami immunologicznymi, klinicznymi i biochemicznymi	91
4.15.1. Badanie wzajemnych korelacji między wybranymi parametrami immunologicznymi, klinicznymi i biochemicznymi u chorych na TZN	91
4.15.1.1. Badanie wzajemnych korelacji między wybranymi parametrami immunologicznymi, klinicznymi i biochemicznymi u chorych na aTZN i naTZN	91
4.15.1.2. Badanie wzajemnych korelacji między wybranymi parametrami immunologicznymi, klinicznymi i biochemicznymi u chorych na TZN p-C1q(+) i TZN p-C1q(-)	92
4.15.2. Badanie wzajemnych korelacji między wybranymi parametrami immunologicznymi, klinicznymi i biochemicznymi u chorych na PKZN	94
4.15.2.1. Badanie wzajemnych korelacji między wybranymi parametrami immunologicznymi, klinicznymi i biochemicznymi u chorych na PKZN-R i PKZN-NR	94

4.15.2.2. Badanie wzajemnych korelacji między wybranymi parametrami immunologicznymi, klinicznymi i biochemicznymi u chorych na PKZN p-C1q(+) i PKZN p-C1q(-)	95
5. OMÓWIENIE I DYSKUSJA	96
5.1. Analiza występowania pc p-C1q i innych markerów immunologicznych w surowicy	96
5.2. Analiza występowania mutacji w genie C1qA	106
5.3. Analiza ekspresji mRNA C1q w leukocytach krwi	107
5.4. Analiza ekspresji mRNA C1q i produktu białkowego w nerkach	108
6. PODSUMOWANIE	110
7. WNIOSKI	112
8. PIŚMIENNICTWO	113
9. SPIS TABEL I RYCIN	130
10. STRESZCZENIE	133
11. SUMMARY	136

## 1. WSTĘP

Rola układu dopełniacza (UD) w patogenezie chorób o podłożu autoimmunologicznym od lat stanowi przedmiot zainteresowania badaczy, zarówno naukowców, jak i praktyków klinicznych. Z jednej strony wrodzone niedobory składowych UD predysponują do rozwoju ciężkich, nawracających infekcji oraz chorób z autoagresji, z drugiej strony nadmierna aktywacja UD może doprowadzić do niekontrolowanego procesu zapalnego, a w efekcie do destrukcji tkanek i niewydolności narządów [1,2,3,4]. Wyniki ostatnich badań dowiodły także, że UD może stanowić cel nieprawidłowej odpowiedzi immunologicznej, czego wyrazem jest pojawienie się w surowicy autoprzeciwciał skierowanych przeciw składowym UD [5].

UD to ponad 30 różnych białek znajdujących w surowicy lub związanych z błonami komórkowymi. Stanowią one skomplikowany system powiązanych ze sobą elementów, wśród których znajdują się czynniki aktywujące kaskadę reakcji enzymatycznych prowadząc do uaktywnienia jednego z najważniejszych wrodzonych nieswoistych mechanizmów efektorowych układu odpornościowego. Inne elementy hamują nadmierną i niekontrolowaną aktywację UD zapewniając zachowanie równowagi między procesami destrukcyjnymi i regeneracyjnymi w organizmie.

Aktywacja UD może zachodzić na drodze klasycznej, alternatywnej i lektynowej. Chociaż początkowe etapy przebiegają w nieco odmienny sposób, to wspólnym końcowym ogniwem jest powstanie tzw. kompleksu atakującego błonę (ang. membrane attack complex- MAC), doprowadzającego do bezpośredniej lizy komórki. Do innych funkcji UD należą m.in.: opsonizacja, chemotaksja, modulacja odpowiedzi swoistej, a także usuwanie kompleksów immunologicznych (KI) i komórek apoptotycznych, gdzie szczególną rolę odrywa składowa dopełniacza C1q [1,6,7]. Wrodzony niedobór C1q stanowi najsilniejszy czynnik predysponujący do rozwoju tocznia rumieniowatego układowego (TRU), w którym dochodzi do nadmiernej kumulacji KI i ciał apoptotycznych w organizmie [8]. Wykrycie przeciwciał skierowanych przeciw C1q (pc p-C1q) u chorych z chorobami z autoagresji, a w szczególności ich postulowany udział w rozwoju toczniowego zapalenia nerek (TZN), stały się podstawą do rozpoczęcia intensywnych badań nad rolą C1q i pc p-C1q w patogenezie chorób autoimmunologicznych, w tym kłębuszkowych zapaleń nerek (KZN) [5,6].



### 1.1. Budowa składowej dopełniacza C1q

Cząsteczka C1q jest glikoproteiną o masie 460 kDa składającą się z 3 typów łańcuchów: A, B i C. Każdy z nich ma długość ok. 200 par zasad (pz) i zbudowany jest z N-końcowego odcinka (3-9 aa), z regionu kolagenopodobnego (ang. collagen-like region- CRL-C1q; około 81 aa) i C-końcowego odcinka zwanego główką (ang. globular head- ghC1q) składającą się z około 135 aa. Każdy z regionów łańcucha pełni odrębną funkcję. Dzięki obecności seryny w N-końcowym odcinku możliwe jest utworzenie mostków disulfidowych między poszczególnymi łańcuchami. W wyniku tego procesu powstaje 18-peptydowa struktura składająca się z sześciu dimerów łańcuchów A-B i 3 dimerów C-C. ghC1q umożliwia reakcję cząsteczki ze swoistymi ligandami, natomiast CLR-C1q odpowiada za  $Ca^{2+}$ -zależną aktywację kompleksu  $C1r_2C1s_2$ . Obraz cząsteczki C1q w mikroskopie elektronowym porównywany jest do bukietu tulipanów [6,9,10,11].

Dzięki złożonej, ale i plastycznej strukturze przestrzennej oraz odpowiedniemu rozkładowi ładunków elektrycznych na powierzchni, C1q rozpoznaje różnego typu ligandy, dzięki czemu bierze udział w wielu procesach fizjologicznych, ale i patologicznych. Oprócz immunoglobulin klasy IgM i IgG, do białek rozpoznawanych przez ghC1q należą: białko C reaktywne (ang. C-Reactive Protein- CRP), osoczowy amyloid (ang. serum amyloid protein- SAP), pentraksyna 3 (PTX3),  $\beta$ -amyloid, fosfolipidy (phospholipids- PLs), elementy ściany bakteryjnej (lipopolisacharyd, lipid A), białka retrowirusów (gp41 HIV, gp21 HTLV-I) oraz ciała apoptotyczne [6,11-27]. Region ghC1q każdego z 3 typów łańcuchów wykazuje swoistość wobec różnych ligandów: ghA rozpoznaje agregaty IgM oraz białka otoczki wirusa HIV, ghB odgrywa szczególną rolę w wiązaniu IgG i  $\beta$ -amyloidu, natomiast ghC jest odpowiedzialny za reakcje z IgM i gp21 wirusa HTLV-I. Dzięki specyficznym interakcjom między ghA i ghB możliwe jest połączenie C1q z pentametryczną cząsteczką CRP należącą do grupy białek ostrej fazy [11,14].

Ważnym odkryciem w ostatnich latach było stwierdzenie podobieństw w strukturze przestrzennej fragmentu ghC1q z grupą białek pochodzących z różnych tkanek i narządów oraz pełniących różnorodne funkcje. Należą do nich kolagen typu VIII i X oraz adiponektyna. Podobną strukturę posiadają białka znajdujące się na powierzchni mięśni gładkich (ang. elastin microfibril interface located protein- EMILIN) oraz białka związane z hibernacją u ssaków (HP-20,-25,-27). Do tej grupy zaliczono również substancje białkowe występujące w uchu wewnętrznym oraz

precerebelinę, związaną z komórkami Purkiniego [14,28]. C1q wykazuje także podobieństwo (zarówno w strukturze przestrzennej, jak i budowie genu) do tzw. rodziny białek czynnika martwicy nowotworów (ang. tumour necrosis factor- TNF), które odgrywają istotną rolę w procesach zapalnych, kształtowaniu odpowiedzi swoistej i utrzymaniu równowagi między procesami proliferacji komórek a apoptozą [14,29].

## 1.2. Funkcje C1q

Do podstawowych funkcji C1q należy aktywacja UD drogą klasyczną, co stanowi element nieswoistej odpowiedzi immunologicznej. Aktywacja UD może zachodzić drogą zależną od immunoglobulin (klasy IgM, IgG1, IgG3, słabiej IgG2), albo niezależnie od nich, co uwarunkowane jest istnieniem szeregu ligandów rozpoznawanych przez C1q (omówionych w poprzednim rozdziale). W klasycznym modelu aktywacji UD, C1q wiąże Ig związane z antygenem na komórce docelowej, dzięki czemu dochodzi do zmian konformacyjnych w cząsteczce C1q umożliwiających połączenie z C1r i C1s, które mają właściwości proteaz serynowych. Kompleks C1 aktywuje następnie składowe dopełniacza C4 i C2, czego skutkiem jest powstanie konwertazy C3 klasycznej drogi aktywacji UD. Kolejne etapy kaskady aktywacji UD stanowią wspólne ogniwo dla wszystkich 3 dróg aktywacji i dzięki rozkładowi enzymatycznemu C5, a następnie przyłączeniu składowych C6, C7, C8 i C9 powstaje MAC umożliwiający bezpośrednią lizę komórki [1,2,6].

Poza aktywacją UD, do funkcji C1q należy opsonizacja umożliwiająca fagocytozę bakterii przez komórki żerne, chemotaksja i pobudzenie granulocytów obojętnochłonnych do wybuchu tlenowego [11,30]. Udowodniono wpływ C1q na procesy proliferacji, różnicowania, adhezji, migracji i apoptozy komórek dendrytycznych, fibroblastów, granulocytów, eozynofili oraz komórek mikrogleju [7,31,32]. C1q zwiększa adhezję i agregację płytek krwi, co sprzyja rozwojowi zakrzepicy, miażdżycy i zapaleniu naczyń [33]. Poza tym wykazano, że C1q może aktywować jeden z czynników supresji nowotworu- WOX1 (ang. WW domain containing oxydoreductase), który hamuje proliferację komórek raka prostaty [34]. C1q może mieć także wpływ na wczesny etap ciąży, a jego niedobór sprzyja poronieniom [35]. C1q moduluje też odpowiedź humoralną i komórkową, wpływając na aktywność limfocytów B i T i w ten sposób produkcję cytokin pozapalnych

[36,37,38,39,40]. C1q przyczynia się do utrzymania tolerancji układu immunologicznego wobec własnych komórek poprzez usuwanie krążących KI (KKI) i ciał apoptotycznych, a także udział w negatywnej selekcji autoreaktywnych limfocytów B [7,27,41-46]. Na skutek przedłużonej ekspozycji na antygeny jądrowe i cytoplazmatyczne może dochodzić do wytwarzania autoprzeciwciał i rozwoju tzw. chorób z autoagresji. Nagromadzenie ciał apoptotycznych na skutek braku lub nieprawidłowego funkcjonowania C1q stwierdzono nie tylko w TRU, lecz także w niektórych chorobach neurodegeneracyjnych [8,47,48].

### **1.3. Gen kodujący C1q**

#### **1.3.1. Budowa genu**

Składowa dopełniacza C1q może być syntetyzowana przez komórki dendrytyczne, chondrocyty, komórki epitelium, lecz głównym źródłem C1q w surowicy są monocyty i makrofagi [6,49]. Warunkiem powstania w pełni funkcjonalnej cząsteczki jest obecność 3 łańcuchów kodowanych przez 3 geny: C1qA, C1qB i C1qC, zlokalizowane na krótkim ramieniu chromosomu 1 (1p 34,1–1p 36,3). W ich sąsiedztwie znajdują się też geny kodujące inne elementy UD, m.in. składową dopełniacza C8, białko wiążące C4, receptor UD typu 1 i 2 oraz czynnik F. Geny C1q obejmują 24 kb DNA, a każdy z nich składa się z 2 eksonów oddzielonych 1 intronem. Poszczególne geny zlokalizowane są w kolejności 5'-A-C-B-3', a transkrypcja wszystkich 3 genów jest ściśle ze sobą zsynchronizowana. Porównanie ludzkiego i mysiego białka C1q wykazało 50% podobieństwo w sekwencji hydrofobowego peptydu początkowego łańcucha A i B, który ostatecznie jest usuwany w procesie potranslacyjnym i nie występuje w dojrzałej cząsteczce C1q. Sekwencja aminokwasów w C-końcowym fragmencie ludzkiego C1q jest w 25% zbieżna z mysim regionem ghC1q. Każdy z łańcuchów zawiera 4 konserwatywne reszty cystynowe mające udział w utrzymaniu integralności cząsteczki [50].

Istnieją 2 typy ekspresji mRNA C1q: podstawowa i indukowana przez czynniki stymulujące. Faust i wsp. stwierdzili, że interleukina 6 (IL-6) zwiększa ekspresję C1q, natomiast IL-1 i interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) wykazują działanie przeciwne [51]. Chen i wsp. wykazali, że INF- $\gamma$  hamował wprawdzie działanie promotorów dla genów C1qA i C1qC, jednak zwiększał aktywność regionu promotorowego genu

C1qB, który wydaje się mieć kluczowe znaczenie dla zsynchronizowanej transkrypcji wszystkich 3 łańcuchów C1q [52]. Nie ma jednak dowodów na to, że podstawowa synteza C1q przebiega w takim samym mechanizmie, jak po zadziałaniu czynnika stymulującego. Poza tym, stwierdzono także różnice w produkcji C1q przez makrofagi i komórki dendrytyczne w odpowiedzi na różne czynniki stymulujące oraz leki (niesteroidowe leki przeciwzapalne- NLZP i glikokortykosteroidy) w zależności od obecności stanu zapalnego, lub choroby autoimmunologicznej np. TRU [53,54].

### **1.3.2. Mutacje w genie C1q**

Wrodzony niedobór składowych UD predysponuje do występowania ciężkich infekcji bakteryjnych oraz chorób autoimmunologicznych, w tym pierwotnych i wtórnych glomerulopatii [2,3,55,56]. W szczególności wykazano związek między rozwojem TRU a niedoborem wczesnych składowych dopełniacza, biorących udział w klasycznej drodze aktywacji UD. Chociaż defekt genetyczny dotyczy nie więcej niż 1% chorych na TRU, to największe prawdopodobieństwo zachorowania wiąże się z istnieniem mutacji w obrębie genów kodujących C1q (około 93% przypadków). Ryzyko to jest znacznie większe niż w przypadku niedoboru C4 (74%), C1r/C1s (57%), lub C2 (10%) [2]. Stwierdzono także przypadek zachorowania na nefropatię IgA (ang. IgA-glomerulonephritis- IgA-GN) związany z wrodzonym niedoborem C1q [57].

Zachorowanie na genetycznie uwarunkowany TRU związane jest zwykle z wcześniejszym rozwojem choroby, w >90% przypadków przebiega z zajęciem skóry, u około 39% chorych dochodzi do zajęcia nerek, które przebiega w bardziej agresywny sposób, podobnie jak zajęcie ośrodkowego układu nerwowego. Chorzy mają zwykle dodatnie pc przeciwjądrowe (ang. antinuclear antibodies- ANA; około 75%), natomiast rzadziej pojawiają się u nich pc przeciw dsDNA (pc p-dsDNA) w porównaniu z chorymi na TRU bez wrodzonego niedoboru C1q. Wielu chorych umiera w młodym wieku z powodu ciężkich uogólnionych infekcji bakteryjnych lub niewydolności nerek [2,58].

Obecność mutacji wykazano w każdym z genów kodujących łańcuchy A, B lub C białka C1q. Mutacje te mają charakter mutacji punktowych, związanych z delecją lub zamianą pojedynczych nukleotydów, czego konsekwencją jest powstanie kodonu stop, zmiana tzw. ramki odczytu, lub zmiana aminokwasów. Na poziomie

produktu białkowego skutki tych mutacji widoczne są w postaci całkowitego braku białka w surowicy, bądź obecności нефункционалnej cząsteczki C1q (low molecular weight C1q- LMW-C1q). Objawy niedoboru C1q dotyczą wyłącznie homozygot, natomiast heterozygotyczni nosiciele nie wykazują żadnych objawów chorobowych i aktywność hemolityczna dopełniacza (CH50) mieści się u nich w granicach normy, chociaż funkcja C1q może być nieco osłabiona [59]. Znane dotychczas mutacje w genach kodujących łańcuchy A, B i C składowej dopełniacza C1q przedstawiono w tabeli 1.

**Tabela 1.** Mutacje w genach kodujących łańcuchy A, B i C składowej dopełniacza C1q

Gen	Mutacja	Efekt mutacji	C1q w surowicy	Pochodzenie pobanta
C1qA	C → T pozycja 186 ekson 2	kodon stop	nieobecny	Słowacja [60] Turcja [57,61] Cypr [61]
	C → T pozycja 150 ekson 2	kodon stop	nieobecny	Meksyk [62]
C1qB	G → A pozycja 15 ekson 1	Gly → Asp	LMW-C1q	Maroko [63]
	G → A pozycja 217 ekson 2	Gly → Arg	nieobecny	Grenlandia [64]
C1qC	G → A pozycja 6 ekson 1	Gly → Arg	LMW-C1q	Niemcy [60] Indie [65] Arabia Saudyjska [66]
	C → T pozycja 41 ekson 1	kodon stop	nieobecny	Jugosławia [65]
	del C pozycja 43 ekson 1	kodon stop	nieobecny	Wielka Brytania [65]
	G → A pozycja 48 ekson 1	Gly → Arg	nieobecny	Turcja [67]

Wrodzony niedobór C1q stwierdzono dotąd u ponad 40 osób z 20 rodzin, w tym 11 probantów pochodziło z Turcji. Dlatego badano częstość występowania najczęstszej mutacji dotyczącej eksonu 2 w obrębie genu C1qA w grupie chorych na TRU bez udowodnionego podłoża genetycznego oraz zdrowej populacji tureckiej. Jednak nie stwierdzono występowania homozygot i wykryto tylko jedną heterozygotyczną zdrową osobę w całej badanej grupie. Wyniki te potwierdziły, że chociaż wrodzony niedobór C1q jest związany z bardzo wysokim ryzykiem rozwoju TRU, to mutacje w genach C1q są bardzo rzadkie zarówno w obrębie zdrowej populacji, jak i wśród chorych na TRU [68,69].

Obecność LMW-C1q stwierdzono po raz pierwszy w surowicy chorych z genetycznie uwarunkowanym TRU. C1q o masie cząsteczkowej 155 kD nie wykazuje aktywności hemolitycznej, nie łączy się z KI oraz nie jest rozpoznawany przez receptor dla C1q na monocytach [70,71]. Hoekzema i wsp. wykazali obecność LMW-C1q także w surowicy chorych na TRU bez wrodzonego defektu w obrębie genu C1q, jak również w populacji zdrowych ochotników i dzieci z obniżonym stężeniem C3 w surowicy w przebiegu ostrego KZN. Występował on w znacznie wyższych stężeniach u chorych na TRU (zwłaszcza w okresie zaostrzenia choroby) niż w pozostałych grupach. Nie zaobserwowano korelacji między stężeniem prawidłowego C1q i LMW-C1q w surowicy chorych na TRU. Natomiast zależność taką stwierdzono w zdrowej populacji. Wykazano, iż źródłem LMW-C1q w surowicy, podobnie jak funkcjonalnego C1q, są monocyty i makrofagi. Wydaje się, że jest on raczej produktem syntezy przez te komórki, a nie produktem rozpadu lub modyfikacji prawidłowej cząsteczki C1q [72,73]. Jednakże, rola jaką pełni LMW-C1q w surowicy chorych na TRU oraz w zdrowej populacji nie została dotąd wyjaśniona.

Ponieważ stwierdzono pojedyncze przypadki osób, które mimo obecności mutacji w obu allelach genu kodującego C1q nie rozwinęły żadnych objawów chorobowych, zasugerowano możliwość istnienia dodatkowych zmian genetycznych warunkujących rozwój TRU. Zwłaszcza, że tylko w <1% przypadków choroba związana jest z obecnością mutacji, a u pozostałych czynniki predysponujące do rozwoju TRU pozostają nadal nieznanne. Wykazano obecność tzw. cichych mutacji (zmiana pojedynczego nukleotydu nie wywołująca zmiany w kodowanej reszcie aminokwasowej) wśród chorych z wrodzonym niedoborem C1q i członków ich rodzin. W przypadku obecności niektórych z nich stwierdzono podwyższone ryzyko

rozwoju podostrej skórnej postaci TRU (PSTRU) lub TRU, związek z cięższym przebiegiem choroby, wpływ na stężenie C1q, C3, C4 w surowicy i wystąpienie TZN [74-78].

W badaniach na mysich modelach TRU stwierdzono, że istnieje związek między rozwojem TZN i stężeniem C1q w surowicy a SNP nie tylko w genach kodujących łańcuchy białka C1q, ale także w genie regulatorowym w obrębie chromosomu 4 [79]. Otrzymane wyniki wskazują na złożoną patogenezę i udział wielu genów w rozwoju TRU.

## **1.4. Przeciwciała przeciw C1q**

### **1.4.1. Historia wykrywania pc p-C1q w surowicy**

W latach 70-tych XX wieku Agnello i wsp. odkryli w surowicy chorych na TRU z towarzyszącą hipokomplementemią precypityny, które wykazywały cechy monomerycznych IgG [80]. Wykryto je także w surowicy chorych na przewlekłą pokrzywkę z zapaleniem naczyń i hipokomplementemią (ang. hypocomplementemia urticarial vasculitis syndrome- HUVS) [81]. W latach 80-tych wykazano, iż są to przeciwciała skierowane przeciw składowej dopełniacza C1q, a dokładnie przeciw regionowi CRL-C1q [82]. Wyniki kolejnych badań przyniosły nowe informacje o właściwościach tych przeciwciał, a ich obecność wykazano nie tylko w chorobach autoimmunologicznych, ale także infekcyjnych i w populacji zdrowych osób [83-87]. W szczególności badano udział tych pc w rozwoju TRU, podkreślając rolę pc p-C1q w diagnostyce, ocenie aktywności i przewidywaniu zaostrzeń TZN [88-90].

Na początku badań nad pc p-C1q wykrywano je za pomocą metod radioimmunologicznych [82]. Następnie wprowadzono metody immunoenzymatyczne, w których jako antygeny używano całej cząsteczki C1q lub tylko regionu CRL-C1q. Obecnie w powszechnym użyciu stosowane są komercyjne testy ELISA takich firm, jak: ORGENTEC DIAGNOSTIKA GmbH (Meinz, Niemcy), IMTEC IMMUNODIAGNOSTIKA GmbH (Berlin, Niemcy), EUROIMMUN MEDIZINISCHE LABORDIAGNOSTIKA AG (Lübeck, Niemcy), ALPO DIAGNOSTICS (Salem NH, Stany Zjednoczone), DIAGENICS (Milton Keynes, Wileka Brytania) i BÜHLMANN LABORATORIES (Schönenbuch, Szwajcaria).

### **1.4.2. Charakterystyka przeciwciał przeciw C1q**

Przeciwciała przeciw C1q należą do immunoglobulin klasy IgG i IgA. Stwierdzono, że w zależności od choroby dominuje jedna z klas, a nawet podklas Ig [83,91,92]. W odróżnieniu od innych ligandów rozpoznawanych przez fragment ghC1q, pc p-C1q wiążą się z regionem CRL-C1q, w którym doszło do zmian konformacyjnych i ujawnienia się nowych epitopów na skutek wcześniejszego wiązania C1q do KI [93]. Stwierdzono, że pc p-C1q mogą wykazywać specyficzność wobec różnych epitopów w zależności od choroby [85]. Wykrywano także pc p-C1q skierowane przeciw regionowi ghC1q (utworzonemu przez fragmenty ghA, ghB i ghC), tak w surowicy chorych na TZN, jak i u osób zdrowych [94]. W zdrowej populacji dominowały jednak pc skierowane przeciw ghB, które występowały najrzadziej wśród chorych na TZN (64% vs. 27%) [95]. Tan i wsp. stwierdzili, że częstość ich wykrywania wśród chorych na TRU (zarówno z zajęciem nerek, jaki i bez TZN) nie przekraczała 7%, a więc była porównywalna do grupy zdrowych ochotników (ZO) [96].

Przeciwciała przeciw C1q wykryto w wielu chorobach autoimmunologicznych (część z nich przebiega z zajęciem nerek) i infekcyjnych. Stwierdzono ich występowanie także w zdrowej populacji z częstością od 4% (w piątej dekadzie życia) do 18% (w ósmej dekadzie życia) [84,97,98]. Rzadziej wykrywano je u dzieci, zarówno chorych na TRU, jak i zdrowych, a w niektórych badaniach były one nawet nieobecne w grupie kontrolnej [99].

### **1.4.3. Występowanie pc p-C1q w chorobach autoimmunologicznych**

Przeciwciała przeciw C1q wykrywano w surowicy chorych na różne choroby autoimmunologiczne, z których część ma charakter układowy, inne dotyczą pojedynczego narządu. W **tabeli 2** przedstawiono choroby i częstość wykrywania pc p-C1q w surowicy chorych.



**Tabela 2.** Choroby autoimmunologiczne, w których wykrywano pc p-C1q w surowicy chorych

<b>Choroba</b>	<b>Częstość wykrywania pc p-C1q w surowicy</b>	<b>Źródło</b>
<b>TRU</b>		
TRU	21%-62%	[85,100-104]
TRU z TZN	56%-100%	[94,105,106]
TRU bez TNZ	28%-45%	[105,107]
aTZN	74%-100%	[102,108,109]
naTZN	24%-74%	[102,108,110]
<b>PKZN</b>		
MPGN	54%-88%	[ 92,111]
IgA-GN	0%-3% (IgG)/ <b>31% (IgA)</b>	[83,112]
Popaciorkowcowe KZN	33%-38%	[99,113]
IMGN	14%-33%	[83,112]
FSGS	50%	[83]
MCD	0%-50%	[83,112]
ExGN z pc p-GBM w surowicy	36% (IgG)/ <b>45% (IgA)</b>	[83, 114]
<b>Inne choroby układuwe</b>		
HUVS	100%	[115]
SVV	32% (IgG)/ <b>68% (IgA)</b>	[91]
Zespół Felthy'ego	76% (IgG)/29% (IgA)	[83]
MCTD	94% (IgG)/ 65% (IgA)	[83]
Zespół Sjögrena	13%	[116]
Mieszana krieglobulinemia	50% (IgG)/25% (IgA)	[83]
<b>Inne choroby autoimmunologiczne</b>		
Choroba Gravesa-Basadowa	30%	[87]
Zapalenie tarczycy typu Hashimoto	21%	[87]
Miastenia gravis	nie określono	[117]

Poza wymienionymi w tabeli chorobami autoimmunologicznymi, pc p-C1q wykrywano u niewielkiej liczby chorych na zeszywniające zapalenie kręgosłupa, zespół Raynaud, mieszaną krieglobulinemię, niezróżnicowaną chorobę tkanki łącznej. W przypadku reumatoidalnego zapalenia stawów i twardziny układowej wyniki badań są rozbieżne, a częstość wykrywania tych pc wynosi od 0 do maksymalnie 10% [83,85,116,118]. Jak dotąd, pc tych nie wykrywano w surowicy

chorych na zapalenie wielomięśniowe/skórnomięśniowe, zapalenie olbrzymiokomórkowe tętnicy skroniowej oraz w chorobie ziarniniakowatej Wegenera [83,85].

Należy podkreślić, że w przypadku chorych na układowe zapalenie małych naczyń (ang. small vessel vasculitis - SVV), KZN z przeciwciałami przeciw błonie podstawnej (ang. anti-glomerular basement membrane - pc p-GBM) i IgA-GN przeważają pc p-C1q w klasie IgA. Przeciwciała przeciw C1q w podklasie IgG3 są natomiast bardziej charakterystyczne dla pierwotnego MPGN [92]. Natomiast wśród chorych na TRU i HUVS wykrywane pc należały do klasy IgG2 [101,115], chociaż sugeruje się, że pc podklasy IgG3 wydają się bardziej przydatne do monitorowania aktywności i oceny skuteczności leczenia TZN [119].

W przypadku TRU, częstość wykrywania pc p-C1q w surowicy jest bardzo różna w zależności od zajęcia nerek i aktywności choroby. Podkreśla się ich wysoką negatywną wartość predykcyjną (87-100%) w diagnozowaniu i przewidywaniu zaostrzeń TZN [88,104,105,108]. W przypadku PKZN, Kozyro i wsp. stwierdzili, że wykrywanie pc p-C1q w surowicy chorych na popraciorkowcowe KZN wiązało się z cięższym przebiegiem i gorszą odpowiedzią na leczenie, przy czym badania przeprowadzone zostały na populacji dzieci, a nie dorosłych [99,113].

Przeciwciała przeciw C1q wykrywano także w autoimmunologicznych chorobach tarczycy, takich jak choroba Gravesa-Basedowa i zapalenie tarczycy typu Hashimoto. W obu przypadkach stwierdzono korelację między stężeniem pc p-C1q a funkcją tarczycy ocenianą za pomocą TSH, czego nie wykazano w przypadku swoistych pc przeciw tarczycowym. Wykazano dodatnią korelację między pc p-C1q i pc przeciw tyreoglobulinie w surowicy chorych na zapalenie tarczycy typu Hashimoto, lecz nie zaobserwowano takich zależności między pc p-C1q i przeciw peroksydazie tarczycowej. Potlukova i wsp. sugerują udział pc p-C1q w patogenezie autoimmunologicznych chorób tarczycy w mechanizmie niezależnym od pc przeciw tarczycowym [87].

Sugerowany jest też udział pc p-C1q w patogenezie miastonii gravis. Wykrywano je w surowicy chorych oraz u myszy z eksperymentalnie wywołaną chorobą autoimmunologiczną dotyczącą połączeń nerwowo-mięśniowych. W przypadku myszy, stężenie pc p-C1q korelowało z ciężkością objawów klinicznych, czego nie wykazano u ludzi. Należy jednak podkreślić, iż u wszystkich chorych zastosowano uprzednio leczenie i stwierdzono sterydozależność. Mechanizm, w

jakim pc p-C1q miałyby doprowadzać do choroby lub przyspieszać jej rozwój nadal nie został poznany [117].

#### **1.4.5. Występowanie pc p-C1q w chorobach infekcyjnych**

Jak dotąd, pc p-C1q wykazano w surowicy chorych zakażonych wirusami HIV i HCV [86,120]. Sugeruje się, że mogą one brać udział w patogenezie tych chorób, bądź są tylko efektem reakcji układu odpornościowego na zakażenie wirusem. Wśród chorych HIV pozytywnych pc p-C1q stwierdzano istotnie częściej niż w grupie ZO (13% vs. 5%). Również średnie stężenia tych pc były znacznie wyższe w grupie HIV dodatniej niż wśród ZO. Nie wykazano korelacji między stężeniami pc p-C1q a stopniem zaawansowania choroby, chociaż zaobserwowano tendencję do częstszego ich wykrywania w surowicy chorych bezobjawowych niż w stadiach zaawansowanych. Ich stężenia obniżały się wraz z czasem trwania choroby. Nie stwierdzono również różnic w tempie obniżania się liczby limfocytów CD4+ i stężeń HIV RNA między chorymi z wykrywanymi pc p-C1q w surowicy, a grupą chorych bez tych pc. Jednak chorzy z pc p-C1q wykazywali większą zdolność do neutralizacji wirusa, dzięki czemu sugeruje się ich wpływ na przebieg choroby. Dodatkowo u chorych HIV pozytywnych wykazano korelację między pc p-C1q a pc skierowanymi przeciw białkom szoku cieplnego z rodziny hsp60/65 [120]. Natomiast nie stwierdzono takiej zależności w przypadku chorych na TRU [85].

W przypadku infekcji wirusem HCV, pc p-C1q wykrywano u 26% zakażonych, chociaż nie wykazano związku między występowaniem tych pc a genotypem wirusa, wiremią, ciężkością uszkodzenia wątroby, ryzykiem rozwoju mieszanej krioglobulinemii, czy wtórnego SVV. W przypadku pojawienia się mieszanej krioglobulinemii najczęściej wykrywano je w surowicy chorych HCV dodatnich z wykrywanymi krioglobulinami typu III. Obserwowano korelację między stężeniem pc p-C1q i C4 w surowicy chorych na WZW typu C [86]. Rola pc p-C1q w rozwoju i progresji zakażenia wirusem HCV pozostaje jednak nadal niewyjaśniona.

#### **1.4.6. Udział pc p-C1q w patogenezie KZN**

Złogi zawierające składowe dopełniacza C1q, C3, C4 oraz immunoglobulin klasy IgA, IgM i IgG stwierdza się w kłębuszkach nerkowych chorych z różnymi typami KZN. Stanowią one użyteczny marker w diagnozowaniu i różnicowaniu

poszczególnych form morfologicznych KZN [121]. Przy nadmiernej produkcji, lub zaburzonym mechanizmie usuwania, KKI składające się z antygeny i specyficznego pc osadzają się w obrębie kłębuszka nerkowego. Przykładem choroby, w której stwierdza się depozyty KI zawierające różnego typu antygeny (dsDNA, nukleosomy, C1q) w wielu tkankach, w szczególności w nerkach, jest TRU. Kompleksy immunologiczne mogą także powstawać in situ, gdy pc rozpoznają antygeny własne kłębuszka nerkowego, czego przykładem jest rozwój ExGN z pc p-GBM w surowicy. Wskutek aktywacji UD mogą one inicjować miejscowy stan zapalny wywołując uszkodzenie struktury, a tym samym zaburzając prawidłową funkcję kłębuszka nerkowego.

Depozyty zawierające pc p-C1q stwierdzono w obrębie kłębuszków nerkowych pochodzących od chorych na TZN, w szczególności ze zmianami proliferacyjnymi [122]. Wykazano istotnie wyższe stężenia tych pc w surowicy chorych z depozytami C1q wykrywanymi w nerkach [107]. Stwierdzono ujemną korelację między intensywnością złogów w kłębuszku nerkowym i stężeniem pc w surowicy [123].

Zaobserwowano, że po podaniu myszom pc p-C1q, odkładają się one wraz z C1q wzdłuż błony podstawnej kłębuszka nerkowego i w mezangium. Jednocześnie stwierdzono obniżenie stężenia C1q w surowicy, a w kłębuszku nerkowym złogi C3 i niewielki naciek z leukocytów, co wskazywało na aktywację UD. Jednak, z wyjątkiem pojedynczych przypadków łagodnej albuminurii, nie obserwowano jawnej klinicznie choroby nerek [124]. W przypadku myszy pozbawionych możliwości wytwarzania immunoglobulin klasy IgG, po podaniu pc p-C1q wykrywano wprawdzie KKI-C1q w surowicy, lecz nie stwierdzano złogów C1q i pc p-C1q w kłębuszkach nerkowych [125]. Dopiero wstrzyknięcie pc p-C1q myszom z pierwotnie istniejącą nefropatią wywołaną pc p-GBM wywołało pojawienie się w kłębuszku nerkowym znacznego nacieku z komórek zapalnych, zmian martwiczych, fragmentów jąder komórkowych, zmian zakrzepowych we włóscinkach i wystąpienie znacznej albuminurii u większości osobników. Stąd wniosek, że pc p-C1q mogą doprowadzać do rozwoju nefropatii tylko na podłożu istniejących już wcześniej zaburzeń immunologicznych, na skutek których doszło do odkładania się KI w obrębie kłębuszka nerkowego, z którymi związał się C1q [6,126-128].

Jak dotąd nie jest jasny mechanizm, w jakim pc p-C1q mogą brać udział w patogenezie innych KZN, chociaż podobnie jak w przypadku TZN wydaje się

wysoce prawdopodobnym, że ich obecność nie jest wystarczająca do pojawienia się jawnej klinicznie nefropatii, na co wskazuje wykrywanie tych pc także w chorobach przebiegających bez zajęcia nerek.

## **1.5. Inne markery immunologiczne**

### **1.5.1. Przeciwciała przeciw dsDNA**

Jak dotąd, w surowicy chorych na TRU stwierdzono występowanie ponad 100 autoprzeciwciał skierowanych przeciw różnym antygenom jądrowym, cytoplazmatycznym i powierzchniowym, lecz rola większości z nich nie jest jak dotąd dobrze poznana [128,129]. Ze względu na zróżnicowany przebieg TRU z okresami zaostrzeń i remisji, w praktyce klinicznej decydującą rolę w ocenie aktywności choroby odgrywa obraz kliniczny pacjenta, a spośród markerów immunologicznych szczególne znaczenie przypisuje się oznaczaniu stężenia pc p-dsDNA w surowicy.

Przeciwciała przeciw dsDNA wykrywane są u 40-80% chorych na TRU, chociaż ujemny wynik ich oznaczenia nie wyklucza choroby. Wykazują one wysoką swoistość dla TRU. Nie wykrywano ich w surowicy chorych na PKZN oraz w zdrowej populacji. Wskazuje to na wysoką wartość diagnostyczną pc p-dsDNA. Zaobserwowano także zależność między stężeniem pc p-dsDNA i aktywnością TRU. Istnieją przypadki chorych ze stale podwyższonym stężeniem pc p-dsDNA w surowicy pomimo braku aktywnej choroby [6,130-132]. Wzrost stężenia tych pc zwykle wyprzedza zaostrzenie TRU, chociaż opisywano także przypadki obniżania się stężeń pc p-dsDNA tuż przed zwiększeniem aktywności choroby [133,134].

Istnieją sprzeczne opinie co do istnienia korelacji między stężeniem tych pc p-dsDNA w surowicy a aktywnością TZN. Część badaczy sugeruje bezpośredni udział pc p-dsDNA w patogenezie TZN, w szczególności w powstaniu aktywnych zmian proliferacyjnych w kłębuszku nerkowym [103,135,136]. Wyniki innych badań potwierdzają wprawdzie ich rolę w ocenie ogólnej aktywności TRU, jednak zaprzeczają wartości pc p-dsDNA jako markera różnicującego zaostrzenie z zajęciem nerek od tego bez objawów nerkowych [88,104,137]. Ze względu na gorsze rokowanie i wyniki leczenia chorych na TRU, u których doszło do zajęcia nerek, nadal poszukuje się markerów o większej swoistości narządowej niż pc p-dsDNA, a jednym z proponowanych kandydatów w ocenie aktywności TZN są pc p-C1q.

### 1.5.2. Składowe dopełniacza C3 i C4

W codziennej praktyce w celu oceny aktywności TRU, oprócz badania stężenia pc p-dsDNA, zastosowanie znalazło oznaczanie stężeń składowych dopełniacza C3 i C4 w surowicy. Obniżenie stężenia tych białek nie jest jednak swoiste dla TRU i może towarzyszyć innym chorobom przebiegającym z nadmierną i często niekontrolowaną aktywacją UD przez KI, bądź specyficzne pc. W PKZN hipokomplementemia zwykle towarzyszy ostremu poinfekcyjnemu KZN oraz MPGN. W pierwszym przypadku jest ona związana z aktywacją UD przez KKI zawierające antygen bakteryjny i skierowane przeciw niemu pc. Podobna sytuacja dotyczy MPGN typu I, gdzie dochodzi do aktywacji UD drogą klasyczną z udziałem KI, często w związku z zakażeniem wirusem HCV. Natomiast w przypadku MPGN typu II dochodzi do nadmiernej aktywacji dopełniacza droga alternatywną, zwykle na skutek pojawienia się w surowicy chorych czynnika nefrytycznego, czyli pc klasy IgG stabilizujących konwertazę C3 alternatywnej drogi aktywacji UD. W tym przypadku obniżeniu ulega poziom C3 w surowicy, natomiast stężenie C4 mieści się w granicach normy [54,138].

Większość badaczy jest zdania, że pomimo częstego występowania hipokomplementemii u chorych na TRU, zwłaszcza w aktywnej fazie choroby, samodzielne oznaczenie C3 i C4 nie jest wystarczającym markerem aktywności choroby, a tym bardziej nie wykazuje swoistości narządowej [1]. Dopiero połączenie obniżonych stężeń C3 i/lub C4 z oznaczeniem pc p-dsDNA, lub p-C1q w surowicy wydaje się w bardziej wiarygodny sposób świadczyć o aktywności TRU [88,105,132]. Wprawdzie możliwy jest pomiar stężeń innych produktów aktywacji UD w surowicy (C1q-C1q inh complex, C3a, C4a, C5a, C3d, C4d), lecz są to substancje niestabilne, o krótkim czasie półtrwania i ich stężenia nie zawsze korelują ze stężeniami ich prekursorów w surowicy [139]. Ostatnio podkreśla się przydatność oznaczania przyłączonego do erytrocytów/retikulocytów C4d, bądź ekspresji receptora dla UD typu 1 (CR1) metodą cytometrii przepływowej. Stwierdzono wyższą ekspresję C4d oraz niższą CR1 na erytrocytach chorych na TRU w porównaniu do populacji zdrowej. Zmiany w ich ekspresji wydają się korelować z aktywnością TRU [139,140]. Jednak wyniki te wymagają potwierdzenia na większej grupie badanych. Poza tym, ze względu na mniejszą dostępność cytometrii przepływowej, nie wydaje się aby w codziennej praktyce lekarskiej badania te mogły zastąpić oznaczenie stężenia C3 i C4 w surowicy.

## **1.6. Uzasadnienie dla przeprowadzenia analizy występowania przeciwciał przeciw C1q w surowicy chorych na PKZN i WKZN**

Z przeprowadzonych dotychczas badań wynika, iż pc p-C1q wydają się odgrywać szczególną rolę w patogenezie chorób autoimmunologicznych, do których zalicza się KZN. Przeciwciała przeciw C1q są jednymi z najczęściej badanych w ostatnich latach kandydatów w poszukiwaniu nieinwazyjnych metod diagnozowania, oceny aktywności i monitorowania skuteczności leczenia TRU. W szczególności podkreśla się ich związek z rozwojem i aktywnością TZN. Ponieważ wyniki dotychczasowych badań są często sprzeczne, interesującym wydawało się podjęcie badań dotyczących częstości wykrywania, różnicy w stężeniach i korelacji pc p-C1q z innymi markerami serologicznymi (KKI-C1q, pc p-dsDNA, składowych dopełniacza C1q, C3 i C4) w grupie chorych na TZN, zarówno w aktywnej fazie choroby, jak i w okresie remisji. Poza tym, wobec stosunkowo niewielu danych dotyczących wykrywania pc p-C1q w PKZN, celowym wydawało się także przeanalizowanie występowania tych pc oraz ich potencjalny związek z obrazem klinicznym, wynikami badań biochemicznych i serologicznych w poszczególnych typach morfologicznych PKZN.

Ponadto, pomimo stwierdzanej przez niektórych badaczy ujemnej korelacji między pc p-C1q a stężeniem składowej dopełniacza C1q w surowicy, nie analizowano jak dotąd ekspresji mRNA C1q w leukocytach chorych na TZN w zależności od aktywności procesu zapalnego w kłębuszku nerkowym. Interesującym wydawało się także porównanie tej ekspresji z chorymi na inne formy WKZN i PKZN oraz u ZO. W dotychczasowym piśmiennictwie nie znaleziono ponadto badań oceniających ekspresję mRNA C1q w nerkach chorych na KZN, chociaż złogi zawierające C1q można uwidocznić metodami immunohistochemicznymi zarówno w przypadku pierwotnych, jak i wtórnych KZN.

Podjęte badania miały na celu lepsze zrozumienie roli pc p-C1q w patogenezie KZN oraz ocenę przydatności ich oznaczania w diagnostyce i monitorowaniu aktywności choroby.

## **2. CEL PRACY:**

- 1.** Ocena częstości występowania i stężeń przeciwciał przeciw składowej C1q dopełniacza w surowicy chorych na PKZN i WKZN oraz osób zdrowych.
- 2.** Porównanie częstości występowania i stężeń przeciwciał przeciw C1q z innymi markerami immunologicznymi specyficznymi dla układowych chorób tkanki łącznej.
- 3.** Próba wyjaśnienia zależności między wykrywaniem przeciwciał przeciw C1q i pozostałych markerów serologicznych a występowaniem i obrazem klinicznym PKZN i WKZN (szczególnie TZN).
- 4.** Poszukiwanie wybranej mutacji w genie łańcucha A C1q w leukocytach krwi u chorych na KZN.
- 5.** Ocena ekspresji mRNA łańcucha A C1q w leukocytach krwi osób zdrowych i chorych na KZN.
- 6.** Ocena ekspresji mRNA łańcucha A C1q i produktu białkowego C1q w nerkach osób zdrowych i chorych na KZN.



### 3. MATERIAŁ I METODY

#### 3.1. Chorzy

Badaniem objęto 208 chorych, u których rozpoznano KZN oraz 86 zdrowych ochotników (K). Wśród chorych na KZN, u 139 rozpoznano PKZN, a pozostali stanowili grupę chorych na WKZN. W grupie PKZN, rozplemowe KZN (KZN-R) zdiagnozowano u 107 osób, w tym u 100 chorych MesPGN (w tym u 36 IgA-GN) i u 7 MPGN. Nierozplemowe KZN (KZN-NR) stwierdzono u 32 chorych, w tym u 26 IMGN oraz u 6 FSGS. Wśród chorych na WKZN, u 63 rozpoznano TZN (51 rozpoznań było potwierdzonych biopsyjnie), a u 6 ExGN w przebiegu SVV, w 3 przypadkach związane z wykrywaniem pc pANCA i w 3 z pozytywnymi pc cANCA w surowicy. U 12 osób rozpoznanie TZN było oparte wyłącznie o objawy kliniczne i wyniki badań dodatkowych. Biopsja nerki nie mogła być wykonana ze względu na istniejące zaburzenia krzepnięcia krwi lub/i stwierdzenie zbyt małych rozmiarów nerek w badaniu USG, będących skutkiem długotrwałego procesu chorobowego. Wśród chorych na TZN, klasę II rozpoznano u 6, klasę III u 13, klasę IV u 29 oraz klasę V u 3 osób. Ocena morfologiczna materiału uzyskanego podczas przyżyciowej przeszkrónej biopsji nerki dokonana została w Katedrze Patomorfologii Klinicznej UM w Poznaniu zgodnie z klasyfikacją ustaloną przez The International Society of Nephrology/Renal Pathology Society z 2004 roku. Oceny immunopatologicznej dokonano w Katedrze Immunologii Klinicznej UM w Poznaniu w ramach rutynowej diagnostyki KZN. Spośród całej badanej grupy chorych na KZN, u 28 z rozpoznanym TZN, u 5 z ExGN oraz u 69 z PKZN, próbki krwi do badania pobrano w tym samym dniu, w którym została wykonana biopsja nerki. Dane kliniczne i biochemiczne chorych na PKZN i WKZN przedstawia **tabela 3 A i B**.

Oznaczenia pc p-C1q, p-dsDNA, KKI-C1q oraz ocenę stężeń C1q w surowicy wykonano u 208 chorych i 86 zdrowych ochotników. U wszystkich chorych na KZN i w grupie K oceniono także ekspresję mRNA C1q w leukocytach krwi. Ekspresję mRNA C1q w nerkach analizowano u 59 chorych, w tym u 36 na PKZN, u 17 na TZN i u 6 na SVV. Wybrane dane kliniczne i biochemiczne chorych u których badano ekspresję mRNA C1q w nerkach przedstawiono w **tabeli 4**. Materiał kontrolny stanowiło 5 chorobowo niezmiennych fragmentów nerek pochodzących z otoczenia usuniętych guzów nerek (ang. normal kidney- NK). Ekspresję produktu białkowego C1q w nerkach oznaczono metodą

immunoenzymatyczną za pomocą badania IF (dzięki uprzejmości Kierownika Katedry Immunologii Klinicznej – Prof. UM. dr hab. n. med. Grzegorza Dworackiego).

Chorych na TZN podzielono na dwie grupy w zależności od aktywności procesu chorobowego ocenianego wg skali SLEDAI-2K [141]. Zakres punktów, które chorzy mogli uzyskać mieścił się w granicach od 0 do 105. Ponieważ w badaniu uwzględniono wyłącznie chorych na TRU z zajęciem nerek w przebiegu choroby, spośród kryteriów aktywności w skali SLEDAI-2K na użytek tego badania wyodrębniono dodatkowo tylko te bezpośrednio świadczące o TZN (SLEDAI-N). Należały do nich: białkomocz powyżej 0,5 g/dobę, erytrocyturia (E; powyżej 5 RBC wpw w ocenie osadu moczu po odwirowaniu), leukocyturia (powyżej 5 WBC wpw w ocenie osadu moczu po odwirowaniu) bez objawów zakażenia układu moczowego lub kamicy nerkowej oraz obecność wałeczków czerwonych lub ziarnistych w badaniu ogólnym moczu. W skali SLEDAI-N chorzy otrzymywali maksymalnie 16 punktów (po 4 pkt za każde spełnione kryterium). Do grupy aTZN zaliczono chorych, którzy otrzymali  $\geq 10$  punktów w skali SLEDAI-2K, z czego min. 4 pkt. za występowanie objawów nerkowych. Charakterystykę chorych na aTZN i naTZN przedstawiono w **tabeli 5**.

W grupie z aTZN, chorzy otrzymali od 10 do 38 punktów w skali SLEDAI-2K (mediana 20), a w skali SLEDAI-N od 4 do 16 pkt. (mediana 12). Natomiast w grupie z naTZN, punktacja w skali SLEDAI-2K mieściła się w zakresie od 0 do 8 (mediana 5), a wg SLEDAI-N od 0 do 4 (mediana 0). Spośród 38 chorych na aTZN zajęcie nerek po raz pierwszy rozpoznano u 30%. Pozostali byli leczeni w przeszłości pulsami MP (34% vs. 68% chorych na naTZN;  $p < 0,05$ ), pulsami cyklofosfamidu (CYC) (18% vs. 40% chorych na naTZN;  $p = 0,08$ ), dożylnymi wlewami immunoglobulin (3% vs. 0%; ns), chlorochiną doustnie (8% vs. 20% chorych na naTZN; ns), azatiopryną (AZA) doustnie (11% vs. 8% chorych na naTZN; ns). Przed wystąpieniem zaostrzenia 61% chorych na aTZN przyjmowało przewlekłe metylprednizolon (MP) doustnie w średniej dawce  $22 \text{ mg} \pm 14 \text{ mg}$ . W związku z aktywnością choroby 23 z nich wymagało podania MP iv, 2 osoby otrzymały CYC iv, a u pozostałych zwiększono dawkę sterydów doustnych. W momencie pobierania próbki krwi do badań wszyscy chorzy z grupy naTZN otrzymywali MP doustnie w średniej dawce  $13 \text{ mg} \pm 8 \text{ mg}$ , 1 chora dodatkowo

przyjmowała chlorochinę, 2 AZA i 1 CsA. U wszystkich chorych z naTZN utrzymano dotychczasowe leczenie.

W grupie chorych z ExGN w przebiegu SVV: 1 mężczyzna był w trakcie sterydoterapii doustnej (MP w dawce 48 mg), jako kontynuacji po pulsach MP iv, które otrzymał miesiąc wcześniej. U pozostałych, pobranie próbek krwi odbyło się równocześnie z wykonaniem biopsji nerki i postawieniem rozpoznania SVV. Wszyscy otrzymali MP iv, a 3 chorych dodatkowo CYC iv (u pozostałych ze względu na towarzyszące infekcje nie podano tego leku).

Wśród chorych na PKZN, MP doustnie otrzymywało 18% z MesPGN (średnia dawka  $22 \pm 13$  mg), 14% z MPGN (średnia dawka  $28 \pm 17$  mg), 4% z IMGN (średnia dawka  $30 \pm 6$  mg) i 67 % z FSGS (średnia dawka  $46 \pm 23$  mg). Równocześnie ze sterydoterapią 2% chorych na MesPGN przyjmowało CsA, 4% AZA i 4% chlorambucyl. Jeden chory na MPGN i 2 na FSGS otrzymywało dodatkowo CsA. MP iv otrzymało 8% chorych na MesPGN i 8% na IMGN. Równocześnie z pobraniem próbki krwi do naszych badań rozpoznanie KZN postawiono u 50% chorych na MesPGN, 57% na MPGN, 50% na IMGN i 33% na FSGS.

Dodatkowo chorych na PKZN i TZN podzielono na podgrupy:

- wg kryterium występowania pc p-C1q w surowicy: PKZN p-C1q(+)/ PKZN p-C1q(-); TZN p-C1q(+)/TZN p-C1q(-);
- w zależności od wykrywania pc pc-dsDNA w surowicy: TZN p-dsDNA(+)/TZN p-dsDNA(-);
- ze stwierdzonym białkomoczem rzędu ZN i bez ZN;
- ze stwierdzoną erytrocyturią (E) i bez E.

W wymienionych podgrupach analizowano różnice zarówno dotyczące cech klinicznych, biochemicznych, a w szczególności immunologicznych (rozd. 4.11, 4.12, 4.13 i 4.14).

**Tabela 3A.** Dane morfologiczne, kliniczne i biochemiczne chorych na PKZN

Postać morfologiczna KZN	Liczba chorych	Płeć K/M	Wiek (lata) $\bar{x} \pm SD$	Czas między pobraniem krwi a biopsją nerki (miesiące) $\bar{x} \pm SD$	Czas trwania choroby (miesiące) $\bar{x} \pm SD$	Scr ( $\mu\text{mol/L}$ ) $\bar{x} \pm SD$	eGFR wg MDRD ( $\text{mL/min/1.73m}^2$ ) $\bar{x} \pm SD$	$U_{\text{prot}}$ (g/24h) $\bar{x} \pm SD$	ZN (liczba chorych)	E (liczba chorych)	NT (liczba chorych)
<b>PKZN-R (n=107)</b>											
<b>MesPGN</b>	100	77/23	37 $\pm$ 13	18 $\pm$ 5	30 $\pm$ 5	81,8 $\pm$ 24,8	82,4 $\pm$ 28,7	2,8 $\pm$ 0,5	17	47	65
IgA -GN	36	26/10	33 $\pm$ 10	16 $\pm$ 9	26 $\pm$ 9	83,0 $\pm$ 26,5	84,6 $\pm$ 29,6	3,2 $\pm$ 1,0	5	23	21
Non-IgA-GN	64	51/13	39 $\pm$ 13	19 $\pm$ 6	32 $\pm$ 7	81,1 $\pm$ 23,9	81,1 $\pm$ 28,2	2,6 $\pm$ 0,5	12	24	44
<b>MPGN</b>	7	5/2	35 $\pm$ 13	2 $\pm$ 1	19 $\pm$ 14	92,7 $\pm$ 31,0	75,6 $\pm$ 32,0	4,6 $\pm$ 1,1	5	5	6
<b>PKZN-NR (n=32)</b>											
<b>IMGN</b>	26	16/10	52 $\pm$ 14	22 $\pm$ 13	21 $\pm$ 8	80,8 $\pm$ 36,2	90,2 $\pm$ 47,0	4,8 $\pm$ 3,0	12	13	18
<b>FSGS</b>	6	4/2	44 $\pm$ 18	46 $\pm$ 23	143 $\pm$ 120	170,6 $\pm$ 70,7	81,3 $\pm$ 55,2	1,8 $\pm$ 0,8	2	2	5

Objaśnienia: E- erytrocyturia (>5 RBC w polu widzenia), FSGS- ogniskowe segmentalne stwardnienie kłębuszków nerkowych (ang. focal-segmental glomerulosclerosis), IgA-GN- nefropatia IgA (ang. IgA glomerulonephritis), GFR wg MDRD- szacowana filtracja kłębuszkowa (ang. estimated glomerular filtration rate) wg Modification of Diet in Renal Disease, IMGN- błoniaste kłębuszkowe zapalenie nerek (ang. idiopathic membranous glomerulonephritis), KZN- kłębuszkowe zapalenie nerek, MesPGN- mezangialne rozplemowe kłębuszkowe zapalenie nerek (ang. mesangial proliferative glomerulonephritis), MPGN- błoniasto-rozplemowe kłębuszkowe zapalenie nerek (ang. membranoproliferative glomerulonephritis), Non-IgA-GN- wszystkie postaci MesPGN z wyjątkiem nefropatii IgA, NT- nadciśnienie tętnicze,  $S_{\text{cr}}$ - stężenie kreatyniny w surowicy, PKZN-R- rozplemowe pierwotne kłębuszkowe zapalenie nerek, PKZN-NR- nierozplemowe pierwotne kłębuszkowe zapalenie nerek,  $U_{\text{prot}}$ - białkomocz, ZN- zespół nercycowy

**Tabela 3B.** Dane morfologiczne, kliniczne i biochemiczne chorych na WKZN

Postać morfologiczna KZN	Liczba chorych	Płeć K/M	Wiek (lata) $\bar{x}\pm SD$	Czas między pobraniem krwi a biopsją nerki (miesiące) $\bar{x}\pm SD$	Czas trwania choroby (miesiące) $\bar{x}\pm SD$	SLEDAI-2K mediana (zakres)	SLEDAI-N mediana (zakres)	Scr ( $\mu\text{mol/L}$ ) $\bar{x}\pm SD$	GFR wg MDRD ( $\text{mL/min/1,73m}^2$ ) $\bar{x}\pm SD$	$U_{\text{prot}}$ ( $\text{g/24h}$ ) $\bar{x}\pm SD$	ZN (liczba chorych)	E (liczba chorych)
<b><i>aTZN (n=38)</i></b>												
klasa II	3	2/1	35 $\pm$ 11	0	14 $\pm$ 10	18 (10-22)	8 (8-16)	63,6 $\pm$ 26,5	117,3 $\pm$ 54,9	0,5 $\pm$ 0,3	1	3
klasa III	8	8/0	29 $\pm$ 8	3 $\pm$ 2	69 $\pm$ 34	16 (13-26)	12 (4-16)	79,6 $\pm$ 44,2	86,8 $\pm$ 35,6	2,2 $\pm$ 2,0	3	7
klasa IV	21	19/2	35 $\pm$ 12	26 $\pm$ 15	51 $\pm$ 16	20 (12-38)	16 (8-16)	152,0 $\pm$ 129,8	54,7 $\pm$ 30,4	4,1 $\pm$ 3,1	10	17
klasa V	2	2/0	37 $\pm$ 8	30 $\pm$ 2	3 $\pm$ 1	20 (20-20)	16 (16-16)	105,2 $\pm$ 55,0	62,0 $\pm$ 39,6	4,0 $\pm$ 0,1	2	2
bez biopsji	4	4/0	29 $\pm$ 5	-	112 $\pm$ 76	14 (10-22)	8 (4-12)	121,6 $\pm$ 54,2	56,0 $\pm$ 28,4	1,0 $\pm$ 1,1	1	3
<b><i>naTZN (n=25)</i></b>												
klasa II	3	2/1	24 $\pm$ 5	2 $\pm$ 1	36 $\pm$ 17	6 (4-6)	0 (0-4)	60,1 $\pm$ 12,4	122,0 $\pm$ 31,8	0,4 $\pm$ 0,6	0	0
klasa III	5	5/0	40 $\pm$ 11	13 $\pm$ 10	18 $\pm$ 9	4 (4-8)	4 (0-4)	85,9 $\pm$ 34,2	73,2 $\pm$ 30,6	1,2 $\pm$ 0,6	0	1
klasa IV	8	8/0	30 $\pm$ 9	39 $\pm$ 23	110 $\pm$ 57	4 (0-8)	2 (0-4)	73,0 $\pm$ 23,3	91,6 $\pm$ 36,9	0,9 $\pm$ 1,2	1	0
klasa V	1	1/0	24	0	9	2	4	70,7	88	0,20	0	0
bez biopsji	8	8/0	37 $\pm$ 10	-	88 $\pm$ 32	5 (2-6)	0 (0-4)	104,6 $\pm$ 81,9	72,3 $\pm$ 30,3	0,3 $\pm$ 0,2	0	0
<b><i>ExGN w przebiegu SVV (n=6)</i></b>												
pANCA dodatnie	3	2/1	59 $\pm$ 2	0	3 $\pm$ 3	-	-	704,3 $\pm$ 197,6	6,0 $\pm$ 2,0	0,4 $\pm$ 0,04	0	1
cANCA dodatnie	3	1/2	46 $\pm$ 17	0	1	-	-	450,3 $\pm$ 253,3	12,0 $\pm$ 5,0	1,0 $\pm$ 0,2	0	2

Objaśnienia: aTZN- aktywne toczniowe zapalenie nerek, cANCA- przeciwciała przeciw neutrofilom typ cytoplazmatyczny (ang. cytoplasmic anti- neutrophil antibodies), E- erytrocyturia (>5 RBC w polu widzenia), ExGN- zewnątrzwołniczkowe kłębuszkowe zapalenie nerek (ang. extracapillary glomerulonephritis), GFR wg MDRD- szacowana filtracja kłębuszkowa (ang. estimated glomerular filtration rate) wg Modification of Diet in Renal Disease, KZN- kłębuszkowe zapalenie nerek,  $S_{cr}$ - stężenie kreatyniny w surowicy, naTZN- nieaktywne toczniowe zapalenie nerek, NT- nadciśnienie tętnicze, pANCA- przeciwciała przeciw neutrofilom typ okołojądrowy (ang. perinuclear anti-neutrophil antibodies), SLEDAI-2K- wskaźnik aktywności toczenia rumieniowatego układowego (ang. Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index), SLEDAI-N- wskaźnik aktywności toczenia rumieniowatego układowego z uwzględnieniem tylko kryteriów dotyczących zajęcia nerek, SVV- układowe zapalenie naczyń (ang. small vessel vasculitis),  $U_{prot}$ - białkomocz, ZN- zespół nerczycowy

**Tabela 4.** Dane morfologiczne, kliniczne i biochemiczne chorych, u których badano ekspresję mRNA C1q w nerkach

Postać morfologiczna KZN	Liczba chorych	Płeć K/M	Wiek (lata) $\bar{x}\pm SD$	Czas między pobraniem krwi a biopsją nerki (miesiące) $\bar{x}\pm SD$	Czas trwania choroby (miesiące) $\bar{x}\pm SD$	$S_{cr}$ ( $\mu\text{mol/L}$ ) $\bar{x}\pm SD$	GFR wg MDRD ( $\text{mL/min/1.73m}^2$ ) $\bar{x}\pm SD$	$U_{\text{prot}}$ ( $\text{g/24h}$ ) $\bar{x}\pm SD$	ZN (liczba chorych)	E (liczba chorych)	NT (liczba chorych)
<b>PKZN (n=36)</b>											
MesPGN	26	13/13	36 $\pm$ 12	12 $\pm$ 6	36 $\pm$ 20	76,0 $\pm$ 23,9	97,5 $\pm$ 33,1	3,3 $\pm$ 0,7	7	12	12
MPGN	2	1/1	38 $\pm$ 22	2	33 $\pm$ 2	71,6 $\pm$ 15,0	95,5 $\pm$ 14,8	3,5 $\pm$ 0,8	2	1	1
IMGN	6	3/3	51 $\pm$ 12	0	27 $\pm$ 19	56,1 $\pm$ 6,2	123,0 $\pm$ 32,5	3,9 $\pm$ 2,4	3	4	4
FSGS	2	1/1	39 $\pm$ 29	0	3	90,6 $\pm$ 26,7	142,0 $\pm$ 85,0	2,1 $\pm$ 1,1	1	1	1
<b>TZN (n=17)</b>											
aTZN	12	10/2	34 $\pm$ 15	3 $\pm$ 2	59 $\pm$ 19	114,9 $\pm$ 17,7	72,4 $\pm$ 12,3	3,7 $\pm$ 1,1	4	10	8
naTZN	5	4/1	32 $\pm$ 9	5 $\pm$ 2	33 $\pm$ 11	53,0 $\pm$ 8,8	117,8 $\pm$ 17,1	1,2 $\pm$ 0,7	1	1	0
<b>ExGN w przebiegu SVV (n=6)</b>											
pANCA dodatnie	3	2/1	59 $\pm$ 2	0	3 $\pm$ 3	704,3 $\pm$ 197,6	6,0 $\pm$ 2,0	0,4 $\pm$ 0,04	0	1	3
cANCA dodatnie	3	1/2	46 $\pm$ 17	0	1	450,3 $\pm$ 253,3	12,0 $\pm$ 5,0	1,0 $\pm$ 0,2	0	2	3

Objaśnienia: cANCA- przeciwciała przeciw neutrofilom typ cytoplazmatyczny (ang. cytoplasmic anti- neutrophil antibodies), E- erytrocyturia (>5 RBC w polu widzenia), ExGN- zewnątrzłośniczkowe kłębuszkowe zapalenie nerek (ang. extracapillary glomerulonephritis), FSGS- ogniskowe segmentalne stwardnienie kłębuszków nerkowych (ang. focal-segmental glomerulosclerosis), GFR wg MDRD- szacowana filtracja kłębuszkowa (ang. estimated glomerular filtration rate) wg Modification of Diet in Renal Disease, IMGN- błoniaste kłębuszkowe zapalenie nerek (ang. idiopathic membranous glomerulonephritis), KZN- kłębuszkowe zapalenie nerek, MesPGN- mezangialne rozplemowe kłębuszkowe zapalenie nerek (ang. mesangial proliferative glomerulonephritis), MPGN- błoniasto-rozplemowe kłębuszkowe zapalenie nerek (ang. membranoproliferative glomerulonephritis), NT- nadciśnienie tętnicze,  $S_{cr}$ - stężenie kreatyniny w surowicy, pANCA- przeciwciała przeciw neutrofilom typ okołojądrowy (ang. perinuclear anti-neutrophil antibodies), PKZN- pierwotne kłębuszkowe zapalenie nerek, SVV- układowe zapalenie naczyń (ang. small vessel vasculitis),  $U_{\text{prot}}$ - białkomocz, ZN- zespół nerczycowy

**Tabela 5.** Charakterystyka kliniczna i immunologiczna chorych na aTZN i naTZN

	aTZN (n=38)	naTZN (n=25)	P
<b>Objawy pozanerkowe</b>			
Zaburzenia neurologiczne	9 (23,7%)	0	<b>0,0087</b>
Zapalenie naczyń	1 (2,6%)	0	1,0000
Zapalenie stawów	1 (2,6%)	1 (4,0%)	1,0000
Zmiany skórne	6 (15,8%)	4 (16,0%)	1,0000
Owrzodzenia błon śluzowych	0	1 (4,0%)	0,3968
Zapalenie błon surowiczych	4 (10,5%)	0	0,1452
Gorączka	6 (15,8%)	0	0,0730
Zaburzenia hematologiczne (PLT <100 000/ $\mu$ L lub/i WBC<3 000/ $\mu$ L lub/i Hb<12,0 mg/dL)	30 (78,9%)	5 (20,0%)	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Objawy zajęcia nerek</b>			
Wąleczkomocz (erytrocytarne, ziarniste)	20 (52,6%)	0	<b>&lt;0,0001</b>
E (bez ZUM lub kamicy)	32 (84,2%)	1 (4,0%)	<b>&lt;0,0001</b>
Białkomocz (>0.5 g/24h)	33 (86,8%)	9 (36,0%)	<b>&lt;0,0001</b>
ZN	17 (44,7%)	1 (4,0%)	<b>0,0004</b>
L (bez ZUM lub kamicy)	26 (68,4%)	2 (8,0%)	<b>&lt;0,0001</b>
Obniżenie GFR <60 mL/min/1,73m <sup>2</sup> w ciągu ostatniego miesiąca	7 (18,4%)	0	<b>0,0358</b>
<b>Parametry immunologiczne</b>			
Dodatnie ANA	37 (94,7%)	20 (80,0%)	<b>0,0323</b>
Dodatnie pc p-Ns	11 (28,9%)	6 (24,0%)	0,7757
Dodatnie pc p-Ro (SS-A)	9 (23,7%)	10 (40,0%)	0,2615
Dodatnie pc p-La (SS-B)	3 (7,9%)	4 (16,0%)	0,4210
Dodatnie pc p-Sm	2 (5,3%)	2 (12,0%)	0,3774
Dodatnie pc p-RNP	4 (10,5%)	3 (12,0%)	1,0000
Dodatnie pc p-rybosomalnemu białku P	1 (2,6%)	2 (8,0%)	0,5574
Dodatnie pc p-histonom	8 (21,1%)	6 (24,0%)	1,0000
Dodatnie pc p-PCNA	4 (10,5%)	0	0,1452
Dodatnie pc p-CENP B	1 (2,6%)	0	1,0000
Dodatnie pc p-AMA M2	3 (7,9%)	1 (4,0%)	1,0000
Dodatnie pc p-kardiolipinie	6 (15,8%)	1 (4,0%)	0,2281
Dodatnie pc p- $\beta$ 2 glikoproteinie 1	4 (10,5%)	3 (12,0%)	1,0000

### 3.1.1. Opracowanie materiału do badań

Materiał do badań stanowiły próbki krwi pobrane od chorych na KZN i ZO. Jedną próbkę pobierano na EDTA celem izolacji DNA i RNA, a drugą na skrzep (z niej po odwirowaniu uzyskano surowicę do badań immunoenzymatycznych).

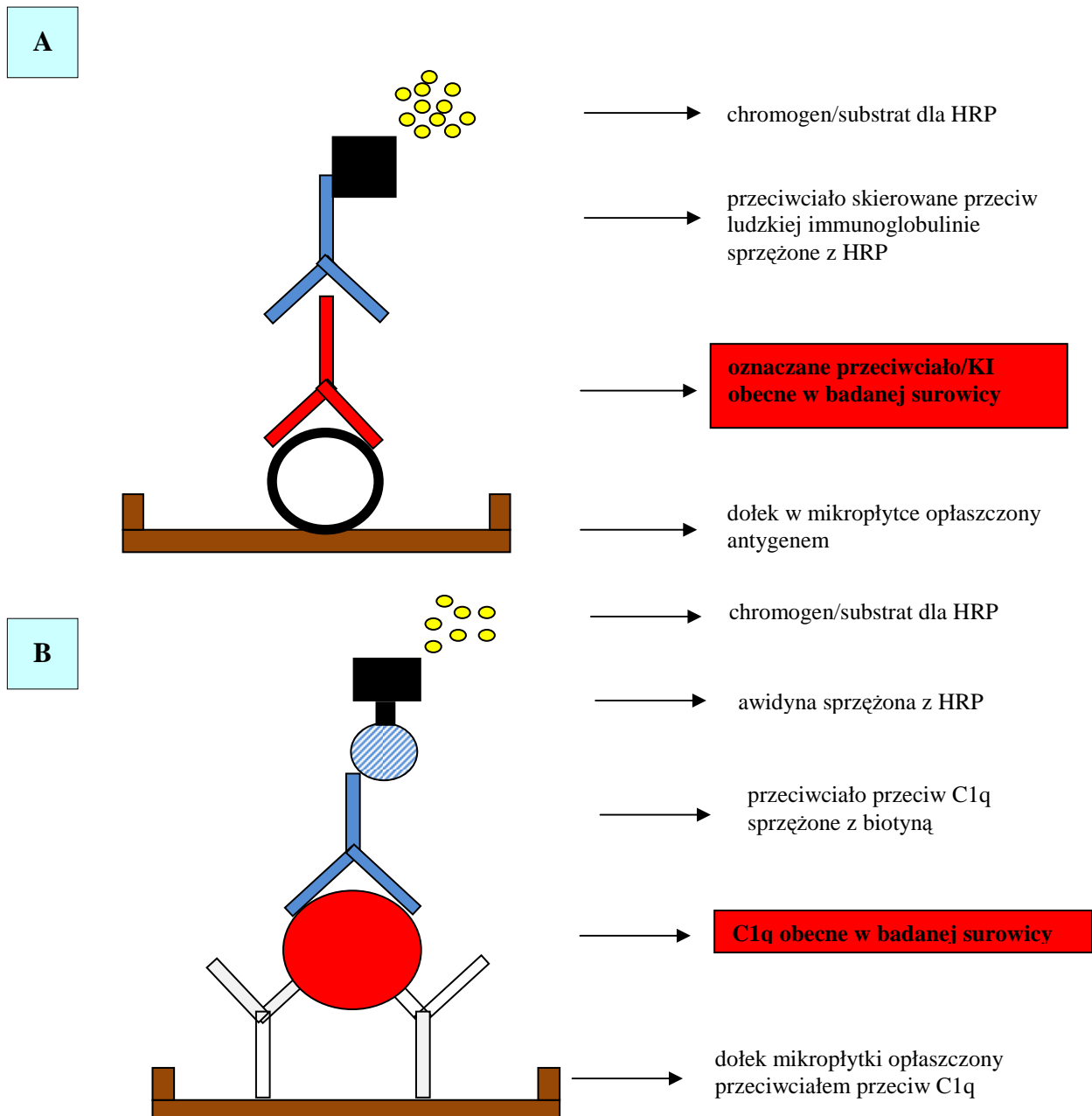
Do badania ekspresji C1q-N oraz badań immunohistochemicznych wykorzystano 59 fragmentów biopłatów nerek pozostałych po zakończeniu diagnostyki immunopatologicznej KZN. Materiał tkankowy przeznaczony do badań molekularnych zamrażano tuż po pobraniu, natomiast fragmenty nerek do badań immunohistochemicznych najpierw cięto przy pomocy



kriostat na skrawki o grubości 4  $\mu\text{m}$ . Po umieszczeniu na szkiełkach podstawowych, skrawki utrwalano w acetonie przez 10 min, a następnie suszono w temperaturze pokojowej. Utrwalone preparaty przechowywano do czasu badania w temperaturze - 70°C.

### 3.2. Badania immunoenzymatyczne

Schemat testów użytych do oznaczenia badanych pc i KKI przedstawiono na **Ryc. 1A**, natomiast metodę badania stężenia C1q w surowicy- na **Ryc. 1B**.



**Ryc. 1.** Schemat metody oznaczania badanych pc i KKI (A) oraz C1q (B) w surowicy.

### **3.2.1. Wykrywanie przeciwciał przeciw C1q**

Przeciwciała przeciw C1q (klasy IgG) wykrywano metodą ELISA posługując się testem firmy BÜHLMANN LABORATORIES (Schönenbuch, Szwajcaria).

Badanie wykonano na płycie zawierającej 96 dołków opłaszczonych oczyszczonym ludzkim białkiem C1q. Odczynniki oraz płytki przechowywano w temperaturze + 4°C. Przed wykonaniem badania doprowadzono je do temperatury 18°-28°C i w tych warunkach przeprowadzono wszystkie reakcje. Badane surowice rozcieńczano w stosunku 1:50 za pomocą dołączonego do zestawu rozpuszczalnika. Następnie do odpowiednich dołków nakładano po 100 µL próbek surowic, a do dołków służących oznaczeniom kalibracyjnym po 100 µL kalibratorów. Obecne w badanej surowicy pc p-C1q wiązały się z C1q opłaszczającym dołki. W kolejnym etapie dodawano pc przeciw ludzkim IgG sprzężone z HRP. Reakcja enzymu z chromogenem/substratem (w tym przypadku TMB zawierającym: tetrametylbenzydinę, nadtlenek wodoru i dimetyloformamid) spowodowała zmianę zabarwienia próbki na kolor niebieski. Dodanie roztworu hamującego spowodowało, iż badana próbka przybierała następnie barwę żółtą, której intensywność była proporcjonalna do stężenia pc p-C1q w badanej surowicy. Absorbancję próbek zmierzono spektrofotometrem (ELX808 BIOTEK Instruments, INC, Stany Zjednoczone) przy długości fali 450 nm w ciągu 30 min od zakończenia badania. Uzyskane wyniki porównywano do krzywej wzorcowej i wyrażano w jednostkach U/mL.

Według instrukcji firmy punkt odcięcia dla tego testu wynosi 15 U/mL. Sugerowano jednak ustalenie wartości referencyjnych indywidualnie w każdym laboratorium wykorzystującym ten test do oznaczania pc p-C1q.

W badanej przez nas populacji składającej się z 86 ZO, aż u 34% z nich stwierdzono stężenia pc  $\geq 15$  U/mL. Konieczność podwyższenia punktu odcięcia celem eliminacji fałszywie dodatnich wyników sugerowali inni badacze, którzy zastosowali test firmy BÜHLMANN LABORATORIES [105,118,142,143]. W badaniach własnych oparto się na wynikach Meyera i wsp., zgodnie z którymi wartości powyżej 32 U/mL traktowano jako wynik dodatni.

### **3.2.2. Wykrywanie przeciwciał przeciw dwuniciowemu DNA**

Do oznaczenia przeciwciał p-dsDNA (w klasie IgG, IgA, IgM) wykorzystano metodę ELISA z użyciem testu firmy EUROIMMUN (Lübeck, Niemcy).

Zestaw zawierał mikropłytkę z 96 dołkami opłaszczonymi oczyszczonym, dwuniciowym dsDNA (wyizolowanym z jąder łosia) tworzącym kompleks z nukleosomami. Warunki przechowywania, jak i wykonania samego testu w ogólnym zarysie przypominały opisane powyżej w rozdz. 3.2.1. i przedstawione na **Ryc. 1A**. Badane surowice rozcieńczono w stosunku 1:200 z użyciem dołączonego do zestawu rozpuszczalnika. Obecne w próbkach pc p-dsDNA ulegały związaniu z kompleksem dsDNA-Ns znajdującym się w dołku. Koniugatem enzymatycznym użytym w tym teście były królicze pc przeciw ludzkiej immunoglobulinie IgG znakowane HRP. Po dodaniu chromogenu/substratu (TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) i uzyskaniu reakcji barwnej, pomiaru spektrofotometrycznego dokonywano z użyciem fal o długości 450 nm oraz fal referencyjnych o długości 620 nm i 650 nm. Pomiarów wykonywano w ciągu 30 min. od zastopowania reakcji.

Wyniki wyrażano w jednostkach IU/mL. Za dodatnie przyjmowano wartości  $\geq 100$  IU/mL.

### 3.2.3. Wykrywanie krążących kompleksów immunologicznych wiążących C1q

Do oznaczenia KKI-C1q użyto metody ELISA z użyciem testu CIC-C1q EIA Kit (QULIDEL CORPORATION, San Diego, Stany Zjednoczone).

Mikropłytkę zawierała 96 dołków opłaszczonych oczyszczonym ludzkim białkiem C1q. Przed dodaniem badanych surowic do dołków rozpuszczono je w dołączonym do zestawu rozpuszczalniku zawierającym 1,2 M NaCl. Kolejne etapy badania przypominały opisane w rozdz. 3.2.1. i przedstawione na **Ryc. 1A**. Surowice rozpuszczono w dołączonym przez firmę rozpuszczalniku w stosunku 1:50. Krążące kompleksy immunologiczne połączone z C1q opłaszczającym dołek wykrywano dodając kozie pc przeciw ludzkiej immunoglobulinie IgG sprzężone z enzymem- HRP. Po dodaniu substratu dla tego enzymu następowała reakcja barwna, a natężenie barwy otrzymanego produktu mierzono spektrofotometrycznie z użyciem fal o długości 405 nm. Wyniki porównano do krzywej wzorcowej, a w przypadku otrzymania wartości wyższych w badanej próbce w porównaniu z kontrolą, powtarzano test po rozcieńczeniu danej próby w stosunku 1:200.

Wyniki wyrażano w jednostkach  $\mu\text{g Eq/mL}$ , przyjmując za dodatnie wartości powyżej 12  $\mu\text{g Eq/mL}$ , czyli wartość średniej w grupie  $K \pm 2SD$ .

### **3.2.4. Oznaczanie stężenia C1q w surowicy**

U wszystkich chorych i zdrowych ochotników stężenie C1q w surowicy oznaczono metodą ELISA za pomocą testu firmy USCN LIFE SCIENCE AND TECHNOLOGY COMPANY (Missouri City, Stany Zjednoczone). Zasadę testu przedstawiono na **Ryc. 1B**.

Badane surowice rozpuszczano w dołączonym do zestawu rozpuszczalniku w stosunku 1:200. Mikropłytką z 96 dołkami pokryta została przez specyficzne pc p-C1q. Po dodaniu badanych surowic oraz próbek wzorcowych, C1q zawarte w surowicy ulegało wiązaniu z pc p-C1q na płytce. W kolejnym etapie dodawano kompleks zawierający pc p-C1q oraz biotyłę, a następnie HRP sprzężoną z awidyną. Substrat dla enzymu stanowił TMB (3,3',5,5' tetrametylbenzydyna), po dodaniu którego obserwowano wystąpienie reakcji barwnej. Po zahamowaniu tejże reakcji za pomocą roztworu kwasu siarkowego, intensywność zabarwienia próbki mierzono spektrofotometrem z użyciem fal o długości 450 nm porównując otrzymane wyniki w krzywą wzorcową. Test pozwalał na wykrycie C1q w surowicy w stężeniu co najmniej 12,5 ng/mL.

## **3.3. Dodatkowe badania laboratoryjne**

### **3.3.1. Parametry immunologiczne**

W grupie chorych na TZN w ramach diagnostyki i oceny aktywności choroby oceniono następujące parametry immunologiczne: ANA, ANA profil, stężenie całkowitych IgG oraz C3 i C4 w surowicy. W grupie chorych na PKZN i SVV oraz w grupie K na potrzeby tego badania oznaczono stężenie całkowitych IgG, C3 i C4.

Oznaczenie miana ANA i ANA profil zostało wykonane w Pracowni Immunologii Dermatologicznej przy Katedrze i Klinice Dermatologii UM im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. ANA oznaczano metodą immunofluorescencji pośredniej z użyciem testu Mosaic Hep-2/Liver (Monkey) firmy EUROIMMUN. Miano wyższe, bądź równe 1:320 stanowiło wynik dodatni. Jakościowej oceny typu przeciwciał ANA dokonywano z użyciem testu ANA Profil 3 EUROLINE, także firmy EUROIMMUN. Test ten pozwala na identyfikację pc skierowanych przeciw 14 antygenom jądrowym: nRNP/Sm, Sm, SS-A (SS-A natywne i Ro-52), SS-B, Scl-70, PM-Scl, Jo-1, CENP B, PCNA, dsDNA, Ns, histonom, rybosomalnemu białku P i AMA-M2. Jest to test paskowy z naniesionymi wysoko oczyszczonymi antygenami pochodzącymi z: grasicy cielęcej i króliczej (nRNP/Sm, SS-B, SCL-70, Jo-1, Ns, histony, rybosmalne białko P), śledziony i grasicy wołowej (Sm, SS-A), serca świni (AMA-M2), jąder łosia (dsDNA). Pozostałe antygeny otrzymano z użyciem bakulowirusów jako wektora w

komórkach owadzych. Po rozcieńczeniu badanych surowic w dołączonym do zestawu rozpuszczalniku w stosunku 1:100 inkubowano je z paskami membrany, a następnie dodawano kozie pc przeciw ludzkiej IgG sprzężone z fosfatazą alkaliczną. W kolejnym etapie, w przypadku obecności swoistych pc przeciwwądrowych, po dodaniu substratu dla enzymu (chlorek nitrobluetetrazolinum/6-bromo-4-chloro-3-indolyfosforanu) obserwowano reakcję barwną. Intensywność koloru, a tym samym ilościową ocenę stężenia swoistych pc oceniano elektronicznie z wykorzystaniem programu EUROLiScan. Na podstawie intensywności zabarwienia wyniki kwalifikowano jako: negatywny [o], graniczny [(+)] i pozytywny od (+) do (+++).

Oznaczenie stężenia IgG oraz składowych dopełniacza C3 i C4 wykonano w Centralnym Laboratorium Analityczno-Biochemicznym Szpitala Klinicznego im. H. Święickiego UM w Poznaniu metodą immunoturbidymetryczną z użyciem aparatu COBAS INTEGRA 800 (ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim, Niemcy). Do badanych surowic rozcieńczonych w 0,9% NaCl w stosunku 1:20 dodawano swoiste królicze pc wywołując wytrącanie się badanych białek, których stężenie mierzono turbidymetrycznie przy długości fali 340 nm. Wartości referencyjne u dorosłych wynosiły odpowiednio: dla IgG: 7-16 g/L, dla C3: 0,9-1,8 g/L i dla C4: 0,1-0,4 g/L.

### 3.3.2. Badania biochemiczne

Spośród badań biochemicznym wykonywanych w ramach diagnostyki KZN w Centralnym Laboratorium Analityczno-Biochemicznym Szpitala Klinicznego im. H. Święickiego UM w Poznaniu analizowano:

1. *surowica/krew pełna*:  $S_{cr}$ , TP, albuminy, WBC, RBC, Hb, PLT,
2. *mocz*: badanie ogólne moczu z oceną osadu moczu (E, L, wałeczkomocz) i  $U_{prot}$

Oznaczenia wykonano na analizatorze biochemicznym firmy Synchron CX 7 Delta firmy Beckman (Fullerton, Stany Zjednoczone) przy użyciu standardowych testów stosowanych w diagnostyce laboratoryjnej.

Oceny funkcji nerek dokonano z pomocą oceny filtracji kłębuszkowej (eGFR) wg wzoru skróconego wzoru MDRD:

$$GFR (mL/min/1,73 m^2) = 186 \times (\text{stężenie kreatyniny w surowicy})^{-1,154} \times (\text{wiek})^{-0,203}$$

*x 0,742 (dla kobiet)*  
*x 1,21 (dla Afro-Amerykanów)*

Wartości referencyjne dla oznaczonych parametrów biochemicznych przedstawiono w **tabeli 6.**

**Tabela 6.** Zakres wartości referencyjnych dla określonych parametrów biochemicznych

<b>SUROWICA/KREW PEŁNA</b>	
<b>S<sub>cr</sub></b>	61,9-106,1 $\mu\text{mol/L}$
<b>stężenie TP</b>	6,40-8,30 g/dL
<b>stężenie ALB</b>	3,50-5,20 g/dL
<b>WBC</b>	3,90-11,00x10 <sup>3</sup> / $\mu\text{L}$
<b>RBC</b>	4,20-5,80x10 <sup>6</sup> / $\mu\text{L}$
<b>stężenie Hb</b>	13,5-17,2 g/dL
<b>PLT</b>	130-400x10 <sup>3</sup> / $\mu\text{L}$
<b>MOCZ</b>	
<b>U<sub>prot</sub></b>	<0,15 g/24h
<b>E</b>	<5 RBC wpw po odwirowaniu próbki
<b>L</b>	<5 WBC wpw po odwirowaniu próbki

### 3.4. Izolacja DNA

Izolację DNA z krwi pełnej przeprowadzono z użyciem zestawu Master Pure™ DNA Purification Kit firmy EPICENTRE (Madison, Stany Zjednoczone). Od wszystkich chorych oraz zdrowych ochotników pobrano próbkę krwi na EDTA, a następnie przeniesiono z niej po 325  $\mu\text{L}$  krwi do probówki typu Eppendorf. W kolejnym etapie do każdej probówki dodano 1 mL buforu lizującego (Lysis Buffer 1), potem wymieszano na wortexie firmy SARSTEDT (Numbrecht, Niemcy) i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 min. Wortexowanie powtórzono jeszcze 2-krotnie. Następnie próbkę wirowano przez 25 sekund z użyciem wirówki firmy EPPENDORF (Hamburg, Niemcy), po czym większość supernatantu zlewano pozostawiając na dnie probówki osad zawieszony w niewielkiej ilości nadsącza. Po kolejnym wortexowaniu dodawano 500  $\mu\text{L}$  drugiego buforu lizującego (Lysis Buffer 2). Po dodaniu 200  $\mu\text{L}$  roztworu precypitującego (Precipitation Solution) i wortexowaniu, powstałą mieszaninę wirowano przez 10 min przy 14 000 RPM. Powstały supernatant przenoszono do nowej probówki i dodawano do niego 500  $\mu\text{L}$  izopropanolu. Mieszając roztwór poprzez wielokrotne obracanie probówki obserwowano wytrącanie się wyizolowanego DNA. Osad wirowano, a powstały supernatant usuwano. Osad DNA przepłukiwano jeszcze 2-krotnie z użyciem 300  $\mu\text{L}$  75% etanolu i ponownie wirowano. Po

delikatnym usunięciu supernatantu na ściankach probówki pozostawał osad DNA, który po osuszeniu w temperaturze pokojowej przez ok. 10 minut, zawieszano w 100  $\mu$ L TE (10 mM Tris-HCl pH=8,0, 1 mM EDTA). Próbkę następnie worteksowano i zamrażano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Stężenie wyizolowanego DNA oznaczano za pomocą spektrofotometru Lambda EZ201 (PERKIN ELMER, Boston, Stany Zjednoczone). Potem dodawano bufor TE firmy PROMEGA (Madison, Stany Zjednoczone) celem uzyskania stężenia DNA 100 ng/ $\mu$ L. Próbkę rozdzielano na kilka mniejszych „porcji” DNA, które przechowywano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.5. Amplifikacja DNA metodą PCR

W celu potwierdzenia obecności DNA C1q w badanych próbkach wykonano amplifikację materiału genetycznego, zlokalizowanego w obrębie eksonu 2 genu kodującego łańcuch A białka C1q metodą PCR. Do przeprowadzenia reakcji użyto pary starterów:

- *forward (F)*: 5'-TCC CCA CAG GGG CCC CTG GC-3'
- *revers (R)*: 5'-TTC CCT GGC TCA GGC AGA TGG-3'

zsyntezowanych w METABION INTERNATIONAL AG (Martinsried, Niemcy) otrzymując produkt długości 601 pz [59].

Reakcji amplifikacji metodą PCR poddawano 2  $\mu$ L wyizolowanego wcześniej dsDNA rozcieńczonego w mieszaninie reakcyjnej o łącznej objętości 20  $\mu$ L. W skład mieszaniny poza matrycą wchodziły: 2  $\mu$ L buforu do PCR (10 $\times$ stężony bufor o składzie: 100 mM Tris-HCl pH 8,3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01% żelatyny) (SIGMA ALDRICH, Saint Louis, Stany Zjednoczone), 2 mM każdego dNTP (PROMEGA), 2 pM odpowiednich starterów oraz woda DEPC (FERMENTAS, Wilno, Litwa). W próbce stanowiącej kontrolę ujemną 2  $\mu$ L matrycy zastąpiono równoważną ilością wody DEPC. Do całości dodawano 1U polimerazy *Taq* o stężeniu 5 U/ $\mu$ L (SIGMA ALDRICH). Temperaturę przylegania dla par starterów dobierano doświadczalnie wykonując gradient temperaturowy na termocyklerze firmy BIOMETRA GmbH (Goettingen, Niemcy). Kolejne etapy reakcji PCR przedstawiono w **tabeli 7**. Po zakończonej reakcji probówki inkubowano w temp.  $4^{\circ}\text{C}$  przez ok.15 min.

**Tabela 7.** Etapy amplifikacji DNA C1qA metodą PCR

<b>ETAP</b>		<b>TEMPERATURA</b>	<b>CZAS TRWANIA</b>
WSTĘPNA DENATURACJA		95°C	3 min.
AMPLIFIKACJA (39 cykli)	<i>denaturacja</i>	95°C	30 sek.
	<i>przyłączanie starterów</i>	64°C	45 sek.
	<i>wydłużanie</i>	72°C	1 min. 30 sek.
KOŃCOWE WYDŁUŻANIE		72°C	7 min.

### 3.6. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR na żelu agarozowym

Do przygotowania żelu agarozowego użyto następujących składników: agarozę (SERVA, Heidelberg, Niemcy), bufor TAE (skład: 40 mM Tris-CH<sub>3</sub>COOH pH 8,0, 2 mM EDTA pH 8,0), bromek etydyny (SIGMA ALDRICH). W pierwszym etapie do naczynia wsypano 1,5 g agarozy, a następnie dodano bufor TAE do objętości 100 mL. Zawiesinę ogrzewano w temp. 60°C przez 5-6 minut. Po uzyskaniu klarownego roztworu dodawano 1 µL bromku etydyny o stężeniu 5 mg/mL i pozostawiano roztwór do ostygnięcia. W kolejnym etapie wylewano go do wanienki, wkładano grzebień, który po zastygnięciu żelu wyjmowano. Tak powstały żel umieszczano w aparacie do elektroforezy, zalewano buforem TAE, a do uformowanych kieszonek wprowadzano badane produkty PCR wraz z barwnikiem (30% glicerol, 0,5% błękit bromofenolowy, 0,25% ksylencjanol (SIGMA ALDRICH) w stosunku 1/10. W pierwszej kieszonce zawsze umieszczano marker DNA Ladder, czyli wzorzec mas cząsteczkowych (EURx Ltd., Gdańsk, Polska).

Rozdziału elektroforetycznego dokonywano na aparacie do elektroforezy GNA 200 (AMERSHAM BIOSCIENCES, Buckinghamshire, Wielka Brytania) w następujących warunkach: napięcie- 70-100 V, natężenie- 80-100 mA, temperatura- 18-25 °C, czas- 30-60 minut. Wizualizacji produktów PCR po rozdziale elektroforetycznym na żelu agarozowym dokonywano za pomocą kamery video emitującej promienie UV (VILBERT LOUMART, Marnes la Valle, Francja), a zdjęcia zapisywano w formie elektronicznej.

### 3.7. Przygotowywanie produktów PCR do dalszych analiz

Oczyszczanie powstałego DNA ze składników mieszanin reakcyjnych przeprowadzano przy pomocy zestawu DNA Clean-up (A&A BIOTECHNOLOGY, Gdańsk, Polska). W pierwszym etapie do próbki dodawano 400 µL roztworu „G”, który zawierał sól chalotropową. Następnie po wymieszaniu próbki na wortexie mieszaninę nanoszono na



minikolumnę umieszczoną w probówce o objętości 1,5 µL. Po wirowaniu przez 30 sekund w wirówce przy 14000 RPM, powstały supernatant usuwano. W kolejnym etapie na minikolumnę nanoszono 600 µL roztworu płuczającego „A1”, następnie całość wirowano przez 30 sekund przy 14000 RPM. Otrzymany nadsącz usuwano i ponownie nanoszono na minikolumnę 300 µL roztworu „A1”. Całość wirowano przez 2 minuty przy 14000 RPM, supernatant usuwano, a minikolumnę osuszano. Umieszczano ją następnie w nowej probówce i dodawano 30 µL buforu TE (o składzie: 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA), a po 3 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej próbkę ponownie wirowano. Otrzymany supernatant zawierający oczyszczone DNA zamrażano i przechowywano w temperaturze 20°C celem dalszych badań.

### **3.8. Analiza restrykcyjna produktów amplifikacji DNA**

Analizę restrykcyjną otrzymanych produktów reakcji PCR przeprowadzono z użyciem enzymu restrykcyjnego *PvuII* firmy AMERSHAM BIOSCIENCES (Piscataway, Szwecja). Sekwencją rozpoznawaną przez tę endonukleazę jest: 5'-CAG<sup>^</sup>CTG-3', 3'-GTC<sup>^</sup>GAC-5'. W skład buforu wymaganego do reakcji restrykcji wchodziło: 10 mM Tris-HCl (pH 7,5 w 37°C), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, 0,1 mg/dL BSA. W skład mieszaniny, w której przeprowadzano reakcję restrykcji wchodziło: 25 µL oczyszczonego DNA będącego produktem reakcji PCR, 1 µL enzymu restrykcyjnego *PvuII* o stężeniu 10 U/µL, 3 µL buforu o składzie opisanym powyżej oraz 1 µL wody DEPC (FERMENTAS). Probówkę z 30 µL mieszaniny inkubowano przez 12 godzin w temperaturze 37°C w bloku grzejnym. Następnie dokonywano rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji restrykcji na żelu agarozowym w warunkach opisanych w rozdz. 3.6.

### **3.9. Izolacja RNA**

Do izolacji RNA z leukocytów krwi, do próbki zawierającej 500 µL krwi pobranej na EDTA dodawano 800 µL Trizolu (INVITROGEN, Carlsbad, Stany Zjednoczone), a następnie inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej. W kolejnym etapie dodawano 200 µL chloroformu i mieszano ok. 30 sekund na wortexie. Po 2-3 minutach inkubacji probówkę wirowano przez 15 minut przy 14000 RPM. Powstały supernatant zlewano do nowej próbki i dodawano 500 µL izopropanolu. Po inkubacji trwającej 10 minut, probówkę ponownie wirowano przez 10 minut przy 14000 RPM, a powstały supernatant usuwano. Do pozostałego w probówce osadu dodawano 1 mL 75% etanolu schłodzonego do -20°C etanolu i ponownie wirowano przez 5 minut przy 9500 RPM.

Supernatant usuwano, a osad po osuszeniu zalewano 20  $\mu$ L wody DEPC (FERMENTAS), wortexowano, rozdzielano na kilka mniejszych porcji i zamrażano w temp.  $-20^{\circ}\text{C}$  celem dalszych badań.

W przypadku izolacji RNA z fragmentów nerek, w pierwszej kolejności materiał tkankowy wkładano do probówki i zalewano 600  $\mu$ L Trizolu. Następnie rozdrabniano tkankę za pomocą homogenizatora elektrycznego Ultra Turax T8 firmy IKA LABORTECHNIK (Staufen, Niemcy). Dodawano 400  $\mu$ L Trizolu i inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Kolejne etapy począwszy od dodania chloroformu były identyczne jak przy izolacji RNA z krwi.

### 3.10. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Przepisaniu na cDNA poddawano 1  $\mu$ g wyizolowanego RNA zawieszonego w mieszaninie zawierającej: 5  $\mu$ L dNTP, 10  $\mu$ L, 0,1 M DTT (INVITROGEN), 5  $\mu$ L mieszaniny heksametrów o stężeniu 100 pg/ $\mu$ L (PROMEGA), 40 U inhibitora rybonukleaz RNAsin® (PROMEGA), 2  $\mu$ L 200 U odwrotnej transkryptazy SuperScript™ II (INVITROGEN) i 20  $\mu$ L 5x stężonego buforu o składzie: 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT (INVITROGEN). Mieszaninę dopełniano wodą DEPC (FERMENTAS) do łącznej objętości 100  $\mu$ L. Po zwortexowaniu mieszaninę umieszczano na 2,5 godziny w bloku grzejnym w temperaturze  $42^{\circ}\text{C}$ . Po schłodzeniu do  $4^{\circ}\text{C}$  dodawano 300  $\mu$ L izopropanolu, wortexowano i umieszczano na 1 godzinę w zamrażarce. Po upływie tego czasu probówkę rozmrażano, wirowano przez 15 minut przy 14000 RPM, a powstały supernatant usuwano. Do pozostałego osadu dodawano 200  $\mu$ L TE i po zwortexowaniu rozdzielono otrzymane cDNA na kilka mniejszych porcji, które następnie przechowywano w temp.  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Stężenie cDNA oceniano spektrofotometrycznie przy długościach fali 260 nm, 280 nm, 320 nm.

### 3.11. Amplifikacja cDNA metodą RT-PCR

Ocenę ekspresji mRNA C1qA określano względem genu referencyjnego GAPDH. Do amplifikacji metodą RT-PCR użyto następujących starterów:

*C1qA-F*: 5' CAG GAA ACA TCA AGG ACC-3'

*C1qA-R*: 5'-TCA GGC AGA TGG GAA GAT-3' [144]

*GAPDH-F*: 5'-CTG CAC CAC CAA CTG CTT AG-3'

*GAPDH-R*: 5'-TTC TGG GTG GCA GTG ATG-3' [145]

Do amplifikacji cDNA metodą RT-PCR użyto systemu LightCycler® 2,0 (ROCHE DIAGNOSTICS) z użyciem zestawu do RT-PCR- LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I i oprogramowania LightCycler® Software Version 4.05.

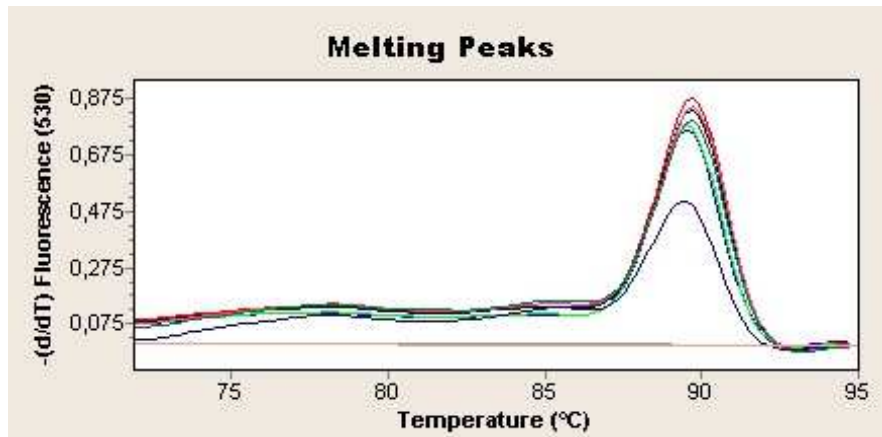
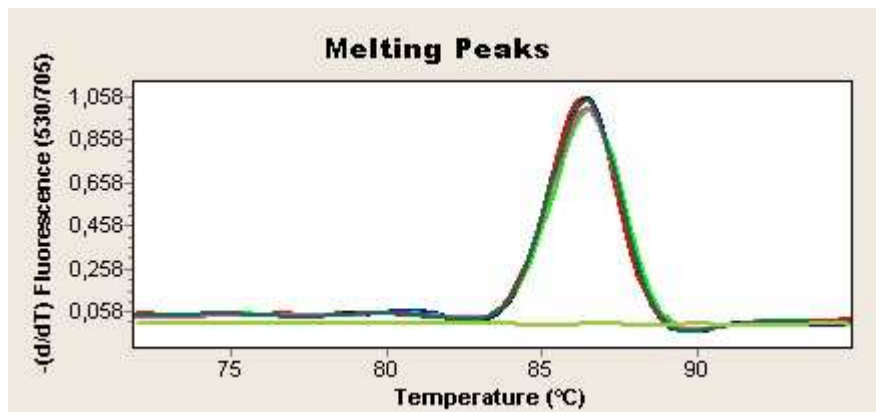
Mieszanka reakcyjna (zarówno dla C1q jak i GAPDH), oprócz 2 µL badanego cDNA, zawierała: 1,6 µL MgCl<sub>2</sub> o stężeniu 25 mM (będącego elementem zestawu), 2 µL odczynnika LightCycler® FastStart Reaction Mix SYBR Green I (10x stężony roztwór o składzie: DNA polimeraza FastStart Taq, bufor reakcyjny, mieszaninę dNTP, barwnik fluorescencyjny SYBR Green, 10 mM MgCl<sub>2</sub>), po 2 µL odpowiednich starterów i wodę (dopełnienie do łącznej objętości 20 µL).

Kolejne etapy amplifikacji cDNA C1qA i GAPDH przedstawia **tabela 8**.

**Tabela 8.** Etapy amplifikacji cDNA C1qA i GAPDH metodą RT-PCR

<i>ETAP</i>		<i>TEMPERATURA</i>	<i>CZAS TRWANIA</i>
WSTĘPNA DENATURACJA		95°C	10 min.
AMPLIFIKACJA (50 cykli)	<i>denaturacja</i>	95°C	10 sek.
	<i>przyłączanie startera</i>	59°C	8 sek.
	<i>wydłużanie</i>	72°C	22 sek. dla C1qA 5 sek. dla GAPDH
TOPNIENIE PRODUKTU		72°C ↑ o 0,1°C/1sek. 72°C → 95°C	15 sek. 3 min. 50 sek.

Temperatura topnienia dla produktów amplifikacji cDNA C1qA wynosiła ok. 90°C, a dla cDNA GAPDH ok. 85°C (**Ryc. 2 A,B**).

**A****B**

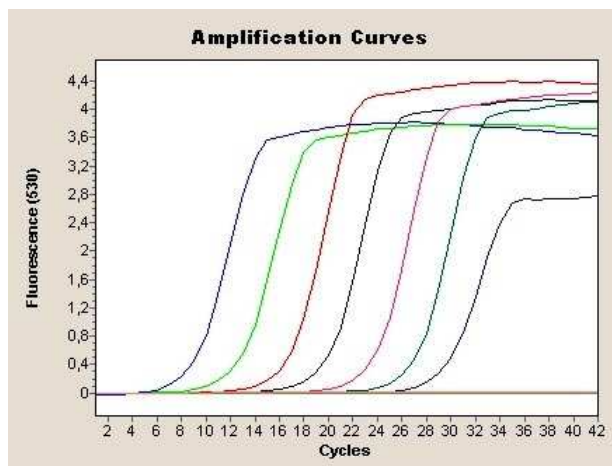
**Ryc. 2.** Wykres przedstawiający temperatury topnienia swoiste dla produktu amplifikacji cDNA C1qA (A) i GAPDH (B) metodą RT-PCR.

Po ustaleniu odpowiednich warunków reakcji wyznaczono krzywe wzorcowe dla cDNA C1q i GAPDH. Z 20  $\mu\text{L}$  mieszaniny zawierającej produkty amplifikacji cDNA, 10  $\mu\text{L}$  użyto do rozdziłu elektroforetycznego w warunkach opisanych w rozdz. 3.6. na żelu agarozowym celem wizualizacji otrzymanego produktu. Do każdej uformowanej kieszonki w tym żelu wprowadzano 10  $\mu\text{L}$  cDNA C1q i równocześnie taką samą ilość cDNA GAPDH.

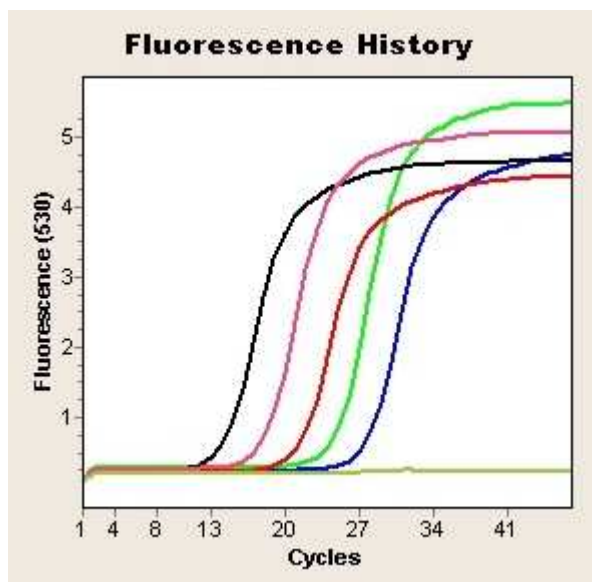
Pozostałe 10  $\mu\text{L}$  cDNA oczyszczono z mieszaniny składników reakcji RT-PCR za pomocą zestawu innuPREP PCRpure PCR Cleanup Kit (AnalyticJena AG, Jena, Niemcy). Następnie wykonano kolejne 10-krotne rozcieńczenia próbki, które następnie poddano amplifikacji metodą RT-PCR. W każdej z rozcieńczonych próbek ustalono stężenie cDNA C1qA na podstawie natężenia fluorescencji barwnika SYBR Green I, na tej podstawie wyznaczając krzywą wzorcową (**Ryc. 3A**). W taki sam sposób wyznaczono krzywą wzorcową dla GAPDH (**Ryc. 3B**).

W każdej wykonanej reakcji RT-PCR kontrolę wewnętrzną stanowiła próbka wzorcowa o znanym stężeniu transkryptów C1qA, wobec której obliczano ilość kopii cDNA C1qA w pozostałych próbkach.

**A**



**B**



**Ryc.3.** Krzywa wzorcowa dla oceny ilościowej ekspresji mRNA C1qA (A) i GAPDH (B) w leukocytach krwi.

### 3.12. Analiza restrykcyjna produktów amplifikacji

Specyficzność produktów amplifikacji C1qA cDNA powstałych z użyciem metody RT-PCR potwierdzono za pomocą reakcji restrykcji. Zestawienie wykorzystanych w badaniach enzymów restrykcyjnych przedstawiono w **tabeli 9**.

**Tabela 9.** Charakterystyka enzymów restrykcyjnych użytych do badania specyficzności transkryptów C1qA

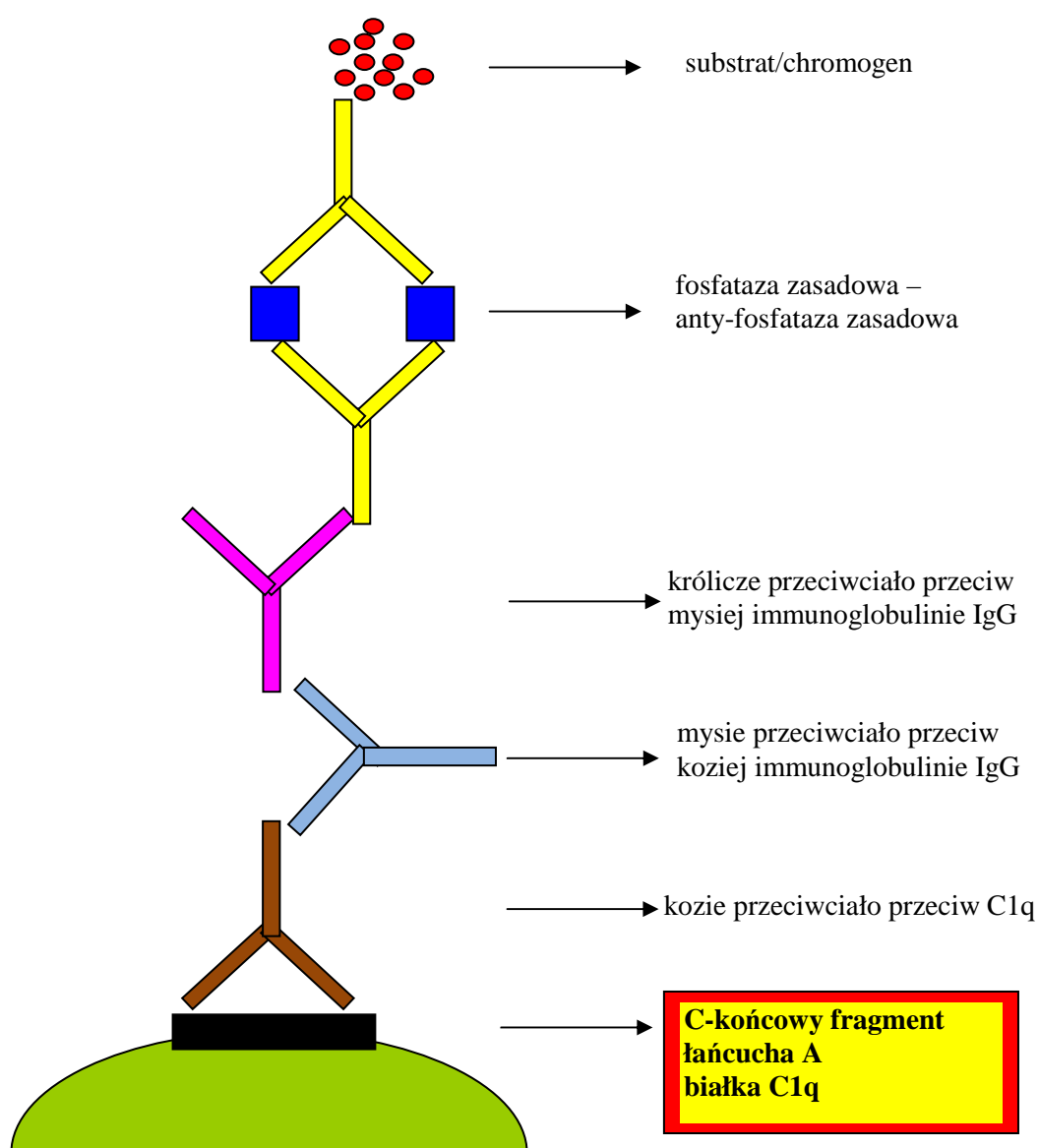
NAZWA ENZYMU	ROZPOZNAWANA SEKWENCJA	SKŁAD BUFORU (10x stężony)	WIELKOŚĆ FRAGMENTÓW PO RESTRYKCYJI	FIRMA
<i>Taq I</i>	5'...T <sup>^</sup> CG A...-3' 3'...A GC <sup>^</sup> T...-5'	10 mM Tris-HCl (pH 7,5 w 25°C), 300 mM KCl, amM DTT, 0,1 mM EDTA, 0,5 mg/mL BSA, 50% glicerol	82 pz + 339 pz	FERMENTAS
<i>BsuRI</i> ( <i>Hae III</i> )	5'...G G <sup>^</sup> C C...-3' 3'...C C <sup>^</sup> G G...-5'	10 mM Tris-HCl (pH 7,5 w 25°C), 50 mM KCl, 1mM DTT, 0,1 mM EDTA, 0,2mg/mL, BSA, 50% glicerol	25 pz + 96 pz + 101 pz + 199 pz	FERMENTAS

### 3.13. Immunohistochemia

Ekspresję białka C1q w nerkach chorych na KZN oraz 5 NK badano z użyciem trójstopniowej metody APAAP (**Ryc. 4**) [146]. Skrawki tkanek utrwalono w acetonie. Pierwszorzędowymi przeciwciałami użytymi w reakcji były wysoko oczyszczone poliklonalne kozie pc skierowane przeciw C-końcowemu regionowi łańcucha A składowej dopełniacza C1q (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC., Santa Cruz, Stany Zjednoczone). Rozcieńczano je w roztworze Tris-NaCl (0,05 M Tris HCl, 0,15 M NaCl pH 7,6) z dodatkiem 0,05% Tween-20 oraz 5% albuminy wołu (SIGMA ALDRICH) w stosunku 1:500. Po wymieszaniu składników na worteksie, na każdy skrawek nerki nakładano po 100  $\mu$ L mieszaniny, a następnie preparaty inkubowano w temperaturze 4°C przez 14 godzin. Po tym czasie preparaty pozostawiono przez ok. 40 minut w temperaturze pokojowej, a w tym czasie przygotowywano mieszaninę zawierającą przeciwciała drugorzędowe. Użyto mysie pc skierowane przeciw kozim Ig klasy IgG (JACKSON ImmunoResearch LABORATORIES, INC., West Grove, Stany Zjednoczone) rozcieńczone w stosunku 1:40 w tym samym buforze Tris-NaCl z dodatkiem 1% ludzkich  $\gamma$ -globulin (SANDOZ PHARMA LTD., Berno, Szwajcaria). Przed nałożeniem drugorzędowych pc, preparaty ze skrawkami nerek płukano 2-krotnie w buforze Tris-NaCl. Po nałożeniu po 100  $\mu$ L roztworu zawierającego pc drugorzędowe, preparaty inkubowano przez 1,5 godziny w temperaturze pokojowej. Ponownie płukano je 2-krotnie w buforze Tris-NaCl, a następnie inkubowano przez kolejne 1,5 godziny z króliczymi pc przeciw mysim Ig klasy IgG (DAKO, Aachen, Niemcy) rozpuszczonymi w Tris-NaCl z dodatkiem 1% ludzkich  $\gamma$ -globulin (SANDOZ PHARMA LTD) w stosunku 1:40. W kolejnym etapie, po 2-krotnym płukaniu w buforze Tris-NaCl, preparaty inkubowano przez 1,5 godziny z kompleksem APAAP. Po zakończeniu inkubacji i ponownym płukaniu, skrawki inkubowano z substratem zawierającym 0,1% FastRed (SIGMA ALDRICH) rozpuszczonym w 0,02% fosforanie naftolu (SIGMA ALDRICH), DMF, 0,1 M Tris-HCl (pH 8,2) i 0,001 M lewomizolu. Po uzyskaniu reakcji barwnej (stopień jej natężenia analizowano z użyciem mikroskopu świetlnego firmy OLYMPUS (Hamburg, Niemcy) preparaty płukano z użyciem wody wodociągowej, a następnie umieszczano w wodnym roztworze hematoksyliny (AQUA-Med., Łódź, Polska) na okres ok. 40 minut. Po ponownym płukaniu w wodzie wodociągowej, preparaty pozostawiano do

wyschnięcia, a następnie zatapiano w niewielkiej ilości Keiserglycerine (MERC, Darmstadt, Niemcy) i nakładano szkiełko nakrywkowe.

Kontrolę negatywną stanowiły skrawki nerek, których nie inkubowano z użyciem pierwszorzędowych lub drugorzędowych przeciwciał (pozostałe etapy reakcji pozostawały bez zmian). Ekspresję białka C1q w nerkach oceniano za pomocą mikroskopu świetlnego (OLYMPUS) rejestrując obraz i zapisując go za pomocą programu komputerowego AVerTVStudio wersja 1.10.0.9 (AVerMedia TECHNOLOGIES, Fremont, Kanada) w formie elektronicznej.



**Ryc. 4.** Schemat metody APAAP użytej celem oceny ekspresji białka C1q w nerkach chorych na KZN i NK.



### **3.14. Immunofluorescencja**

Oceny immunopatologicznej skrawków nerek uzyskanych w trakcie rutynowej diagnostyki KZN dokonano w Katedrze Immunologii Klinicznej UM w Poznaniu. Ekspresję C1q badano z użyciem odczynników pc p-C1q znakowanych fluoresceiną (SEROTEC, Oxford, Anglia). Wynik reakcji odczytywano z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego firmy OLYMPUS.

### **3.15. Metody statystyczne**

Wyniki zostały przedstawione w postaci średnich  $\pm$  SD, średnich  $\pm$  SEM lub jako wartości procentowe. Wartości SLEDAI-2K i SLEDAI-N zaprezentowano z użyciem mediany podając wartości minimalne i maksymalne. W pierwszej kolejności dokonano weryfikacji zgodności wyników z rozkładem Gaussa korzystając z testu normalności Shapiro-Wilk. Do analizy danych wyrażonych w skali interwałowej wykorzystano jednoczynnikowo analizę wariancji dla zmiennych niepowiązanych (ANOVA), a dla danych w skali porządkowej zastosowano test Kruskala-Wallisa z testem wielokrotnych porównań Dunn'a. Do analizy korelacji między badanymi parametrami wykorzystano współczynnik korelacji liniowej r Pearsona (w skali interwałowej) lub korelacji rangowej  $r_s$  Spearmana (w skali porządkowej). Test Fischera użyto przy porównywaniu częstości występowania danej cechy pomiędzy badanymi grupami. W przypadku chorych na TRU wykonano też wieloczynnikową analizę logistyczną uwzględniającą aktywność TRU mierzoną skalą SLEDAI-2K, występowanie ZN i E w powiązaniu z wykrywaniem pc p-C1q i p-dsDNA oraz obniżonych stężeń składowych C3 i C4 dopełniacza. Jako istotne statystycznie przyjęto wartości  $p < 0,05$ .

## 4. WYNIKI

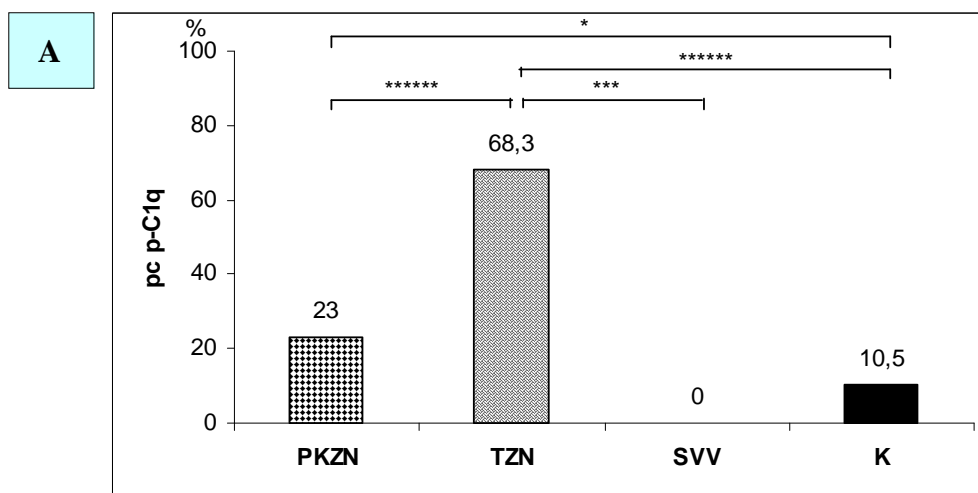
### 4.1. Wykrywanie przeciwciał przeciw C1q w surowicy

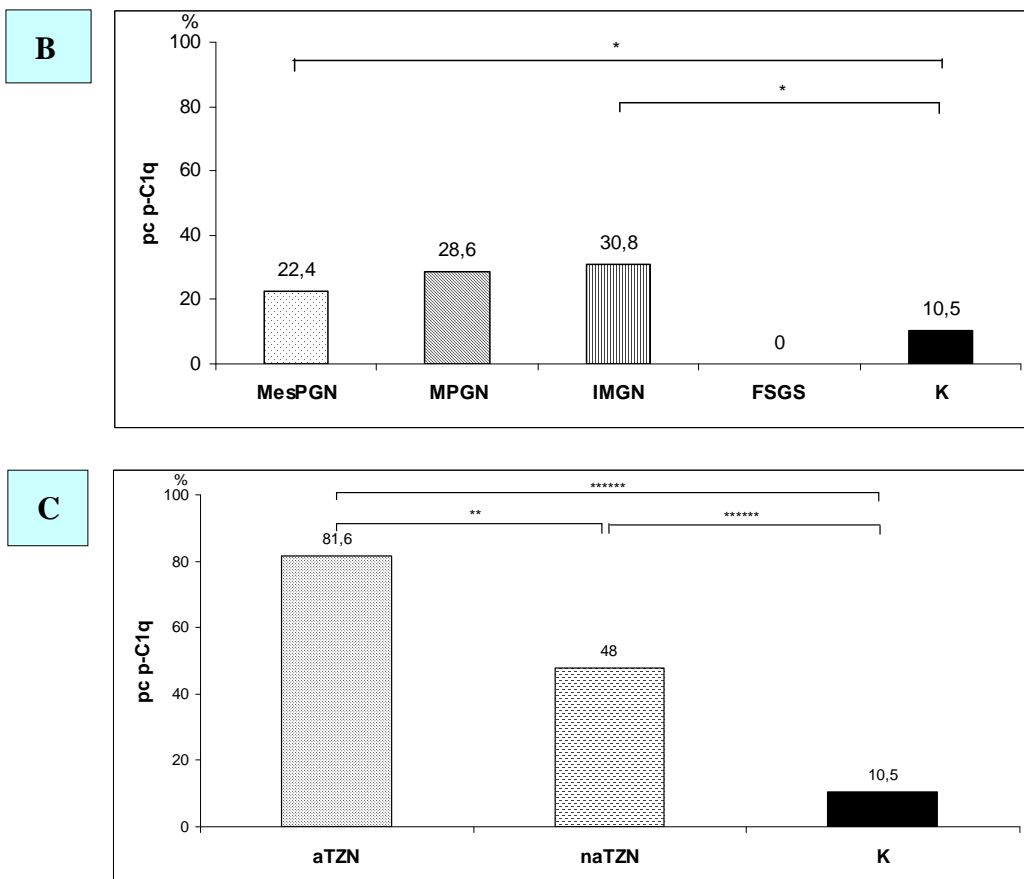
#### 4.1.1. Częstość występowania pc p-C1q w surowicy

Przeciwciała przeciw C1q wykrywano w surowicy chorych na PKZN, TZN i grupie K. Natomiast nie stwierdzono ich wśród chorych na SVV. Częstość występowania badanych pc w surowicy chorych na TZN była znacznie wyższa niż w grupie PKZN i K. Istotną statystycznie różnicę wykazano również między chorymi na PKZN i ZO (**Ryc. 5A**).

Wśród chorych na PKZN, pc p-C1q wykrywano u 22,4% chorych na MesPGN (w tym u 27,8% chorych z rozpoznaniem IgA-GN), u 28,6% chorych na MPGN i u 30,8% chorych na IMGN. Wyjątkiem byli chorzy z rozpoznaniem FSGS, u których nie stwierdzono tych pc w żadnej z badanych surowic. Chociaż częstość występowania pc p-C1q w grupie MesPGN i IMGN była istotnie statystycznie wyższa niż w kontroli, to nie obserwowano takich różnic między poszczególnymi typami PKZN (**Ryc. 5B**).

Wśród chorych na TZN, pc p-C1q wykrywano znacznie częściej (zarówno w aTZN, jak i naTZN) niż u ZO. Przeciwciała te wykrywano istotnie częściej w grupie chorych z aktywnym zapaleniem w obrębie nerek niż z nieaktywnym procesem chorobowym (**Ryc. 5C**). Nie wykazano natomiast istotnych różnic między poszczególnymi klasami TZN.





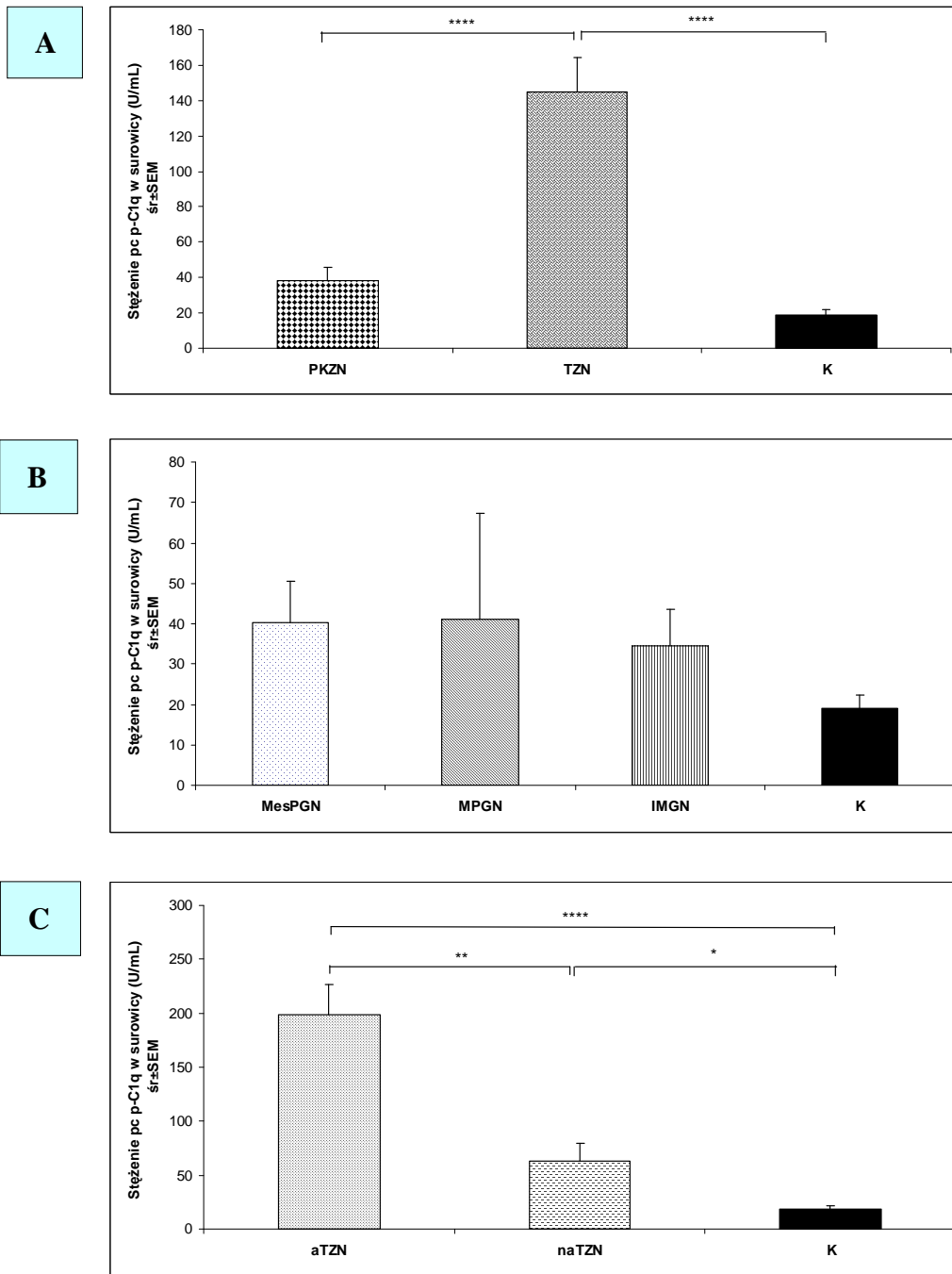
**Ryc. 5.** Częstość wykrywania pc p-C1q w surowicy chorych na PKZN, TZN, SVV i grupie K (A), chorych na poszczególne typy morfologiczne PKZN (B) oraz chorych na aTZN i naTZN (C).

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,005$ , \*\*\*\*\*  $p < 0,0001$

#### 4.1.2. Średnie stężenia pc p-C1q w surowicy

Zaobserwowano znacznie wyższe stężenia pc p-C1q w surowicy chorych na TZN niż PKZN i wśród ZO (**Ryc. 6A**). Nie stwierdzono istotnych różnic w stężeniu tych pc pomiędzy poszczególnymi typami morfologicznymi PKZN (**Ryc. 6B**).

Natomiast wśród chorych na WKZN, stężenia pc p-C1q w grupie aTZN były znacznie wyższe w porównaniu z grupą K. Istotną różnicę stwierdzono także między aTZN i naTZN (**Ryc. 6C**). Natomiast nie wykazano znaczących różnic pomiędzy poszczególnymi klasami TZN.



**Ryc. 6.** Porównanie średnich stężeń pc p-C1q w surowicy chorych na PKZN, TZN i grupie K (A), chorych na poszczególne typy morfologiczne PKZN (B) oraz chorych na aTZN i naTZN (C).

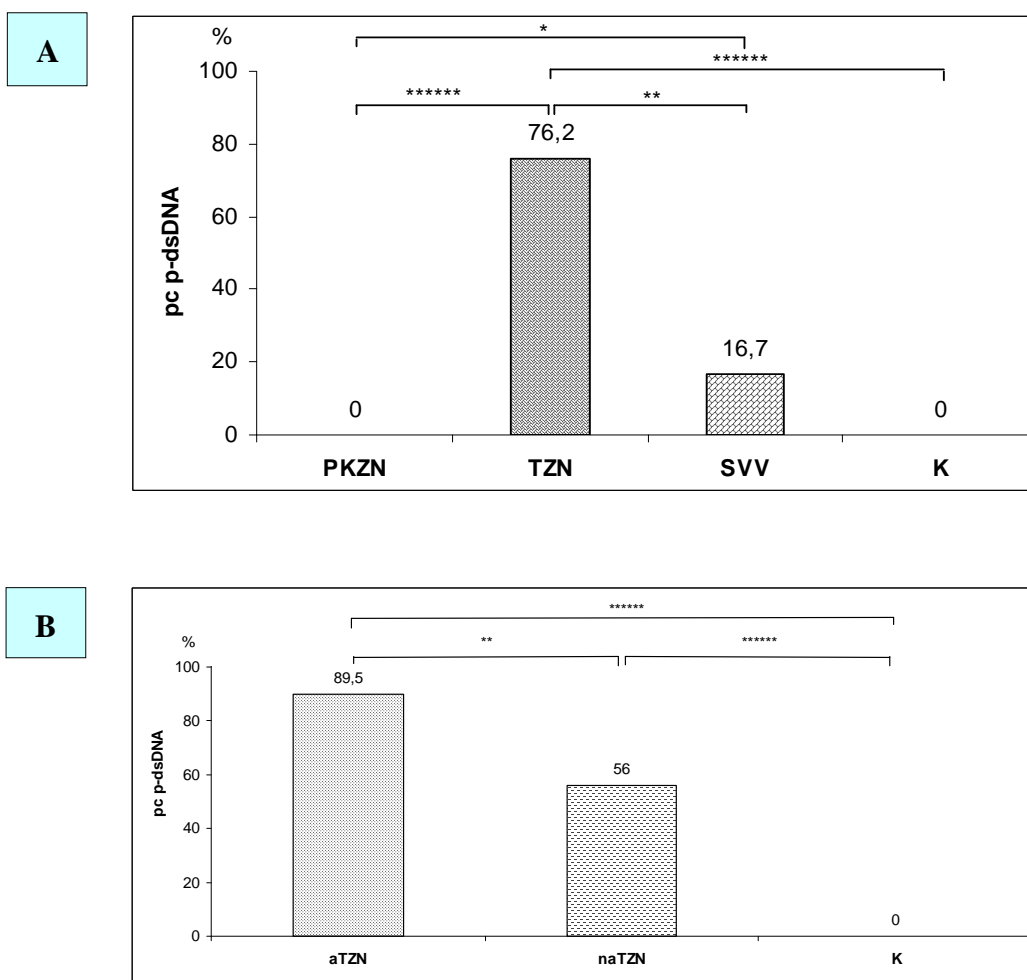
\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,001$

## 4.2. Wykrywanie pc p-dsDNA w surowicy

### 4.2.1. Częstość występowania pc p-dsDNA w surowicy

Przeciwciała przeciw dsDNA wykrywano wyłącznie w surowicy chorych na WKZN. U chorych z rozpoznaniem PKZN i ZO wynik testu w kierunku obecności tych pc w surowicy był w każdym przypadku negatywny. Liczba wyników dodatnich w grupie TZN istotnie przewyższała stwierdzaną w grupie SVV (**Ryc. 7A**).

Przeciwciała przeciw dsDNA wykrywano najczęściej wśród chorych na aTZN, obserwując istotną statystycznie różnicę w porównaniu z grupą K i chorymi na naTZN (**Ryc. 7B**). Nie stwierdzono jednak istotnych różnic między poszczególnymi klasami TZN.

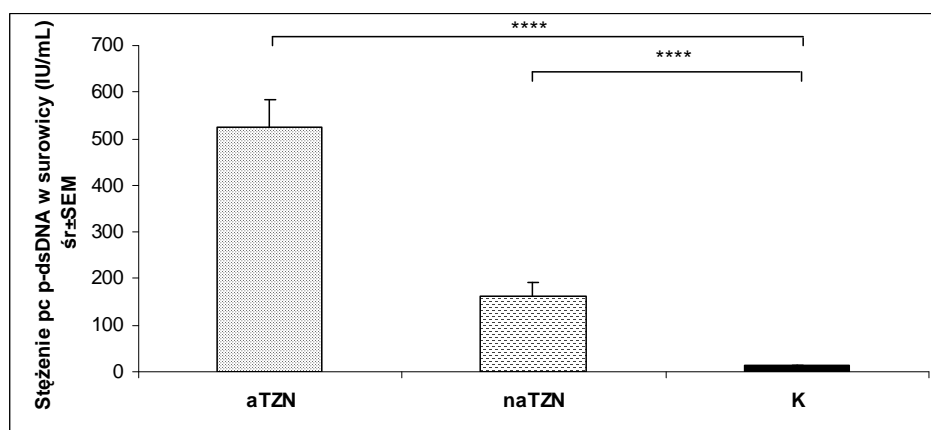


**Ryc. 7.** Częstość wykrywania pc p-dsDNA w surowicy chorych na PKZN, TZN, SVV i grupie K (A) oraz chorych na aTZN i naTZN (B).

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*\*  $p < 0,0001$

#### 4.2.2. Średnie stężenia pc p-dsDNA w surowicy

Podobnie jak w przypadku częstości wykrywania pc p-dsDNA w surowicy, średnie stężenia tych pc były znacząco wyższe u chorych na TZN niż SVV ( $p < 0,05$ ). Najwyższe stężenia stwierdzano w grupie z aTZN. Mimo, iż obserwowano tendencję do wyższych stężeń pc p-dsDNA w surowicy chorych na aTZN w porównaniu do chorych na naTZN, to różnica nie była istotna statystycznie (**Ryc. 8**). Nie stwierdzono istotnych różnic w średnim stężeniu pc p-dsDNA między poszczególnymi klasami TZN.



**Ryc. 8.** Porównanie średnich stężeń pc p-dsDNA w surowicy chorych na aTZN i naTZN.

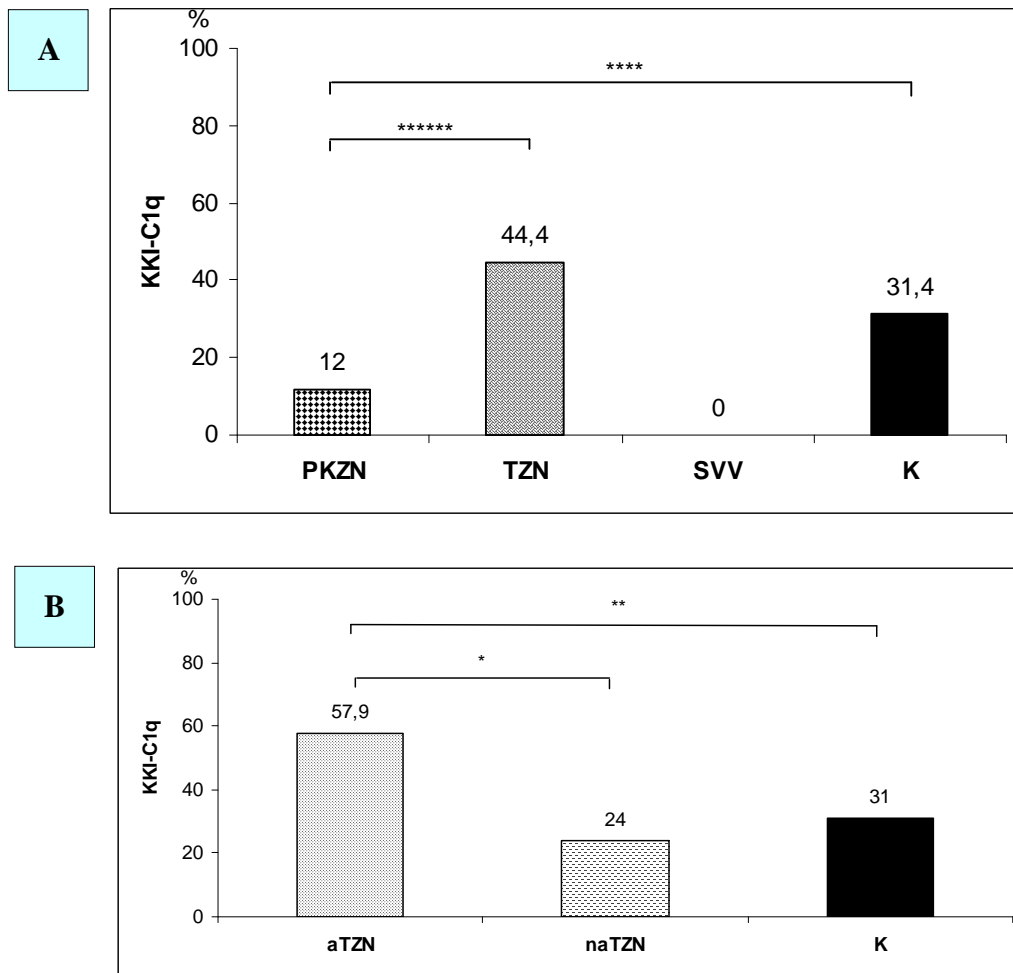
\*  $p < 0,05$ , \*\*\*\*  $p < 0,001$

#### 4.3. Wykrywanie KKI-C1q w surowicy

##### 4.3.1. Częstość występowania KKI-C1q w surowicy

Krażące kompleksy immunologiczne wykrywano w grupie chorych na PKZN, TZN oraz w grupie K. Natomiast nie stwierdzono ich obecności w surowicy chorych na SVV. Częstość występowania KKI-C1q wśród chorych na PKZN była znacznie niższa w porównaniu do grupy TZN i K. Pomimo, iż KKI-C1q były wykrywane najczęściej w surowicy chorych na TZN, to różnica między grupą TZN i K nie była istotna statystycznie (**Ryc. 9A**).

W grupie WKZN, KKI-C1q wykrywano wyłącznie w surowicy chorych na TZN, w szczególności dotyczyło to chorych z aktywnym procesem chorobowym (**Ryc. 9B**). Nie obserwowano natomiast różnic między poszczególnymi klasami TZN.



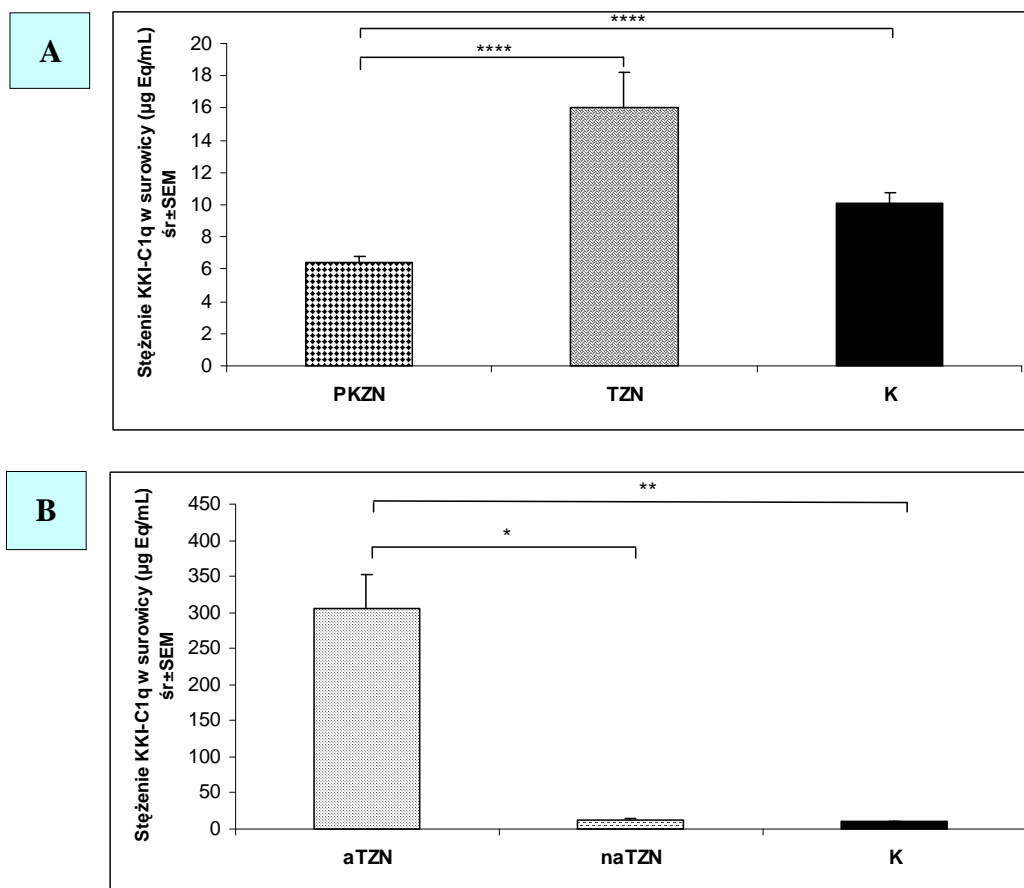
**Ryc. 9.** Częstość wykrywania KKI-C1q w surowicy chorych na PKZN, TZN, SVV i grupie K (A) oraz chorych na aTZN i naTZN (B).

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,005$ , \*\*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*\*  $p < 0,0001$

#### 4.3.2. Średnie stężenia KKI-C1q w surowicy

Analiza stężeń KKI-C1q w badanych grupach wykazała, że podobnie jak częstość wykrywania ich w surowicy, średnie stężenia były najwyższe w grupie chorych na TZN, natomiast znacząco niższe w grupie PKZN w porównaniu do TZN i grupy K (**Ryc. 10A**).

Uwagę zwracają znacząco wyższe stężenia KKI-C1q w surowicy chorych na aTZN niż w pozostałych badanych grupach (**Ryc. 10B**). Nie zaobserwowano istotnych różnic między poszczególnymi klasami TZN.



**Ryc. 10.** Porównanie średnich stężeń KKI-C1q w surowicy chorych na PKZN, TZN i K (A) oraz chorych na aTZN i naTZN (B).

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,001$

#### 4.4. Oznaczenie składowych dopełniacza C1q, C3 i C4 w surowicy

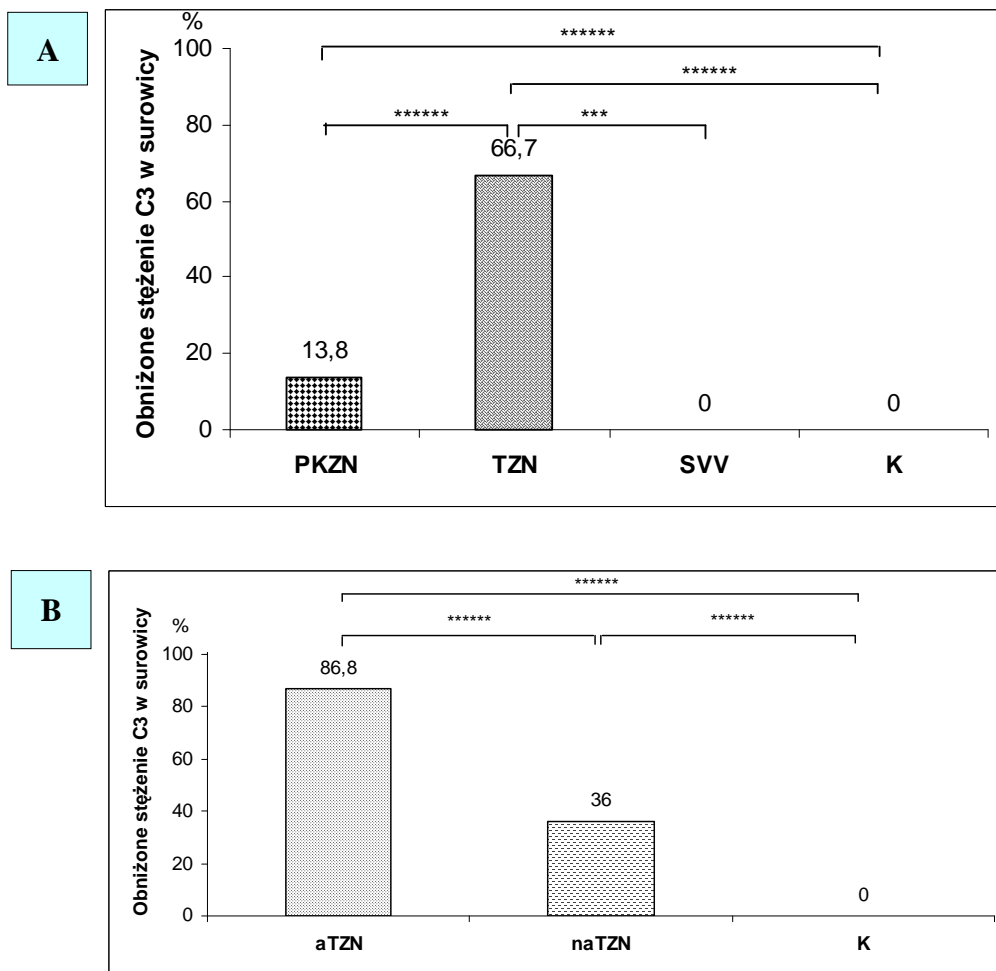
##### 4.4.1. Częstość występowania obniżonego stężenia składowych dopełniacza C1q, C3 i C4 w surowicy

Stężenie składowej dopełniacza C1q w surowicy nieznacznie poniżej dolnej granicy wykrywalności ustalonej dla testu stwierdzono wyłącznie u jednej chorej z rozpoznaniem aTZN (równocześnie w badanej surowicy wykryto dodatkowo pc p-C1q, p-dsDNA, KKI-C1q oraz obniżone stężenie C3) oraz u dwóch chorych na MesPGN (pozostałe parametry immunologiczne w surowicy mieściły się u nich w granicach normy).

Obniżone stężenie składowej dopełniacza C3 zaobserwowano głównie u chorych na TZN. U wszystkich chorych z grupy SVV i K stężenia C3 w surowicy mieściły się w granicach normy (**Ryc. 11A**). Stwierdzono przy tym istotną



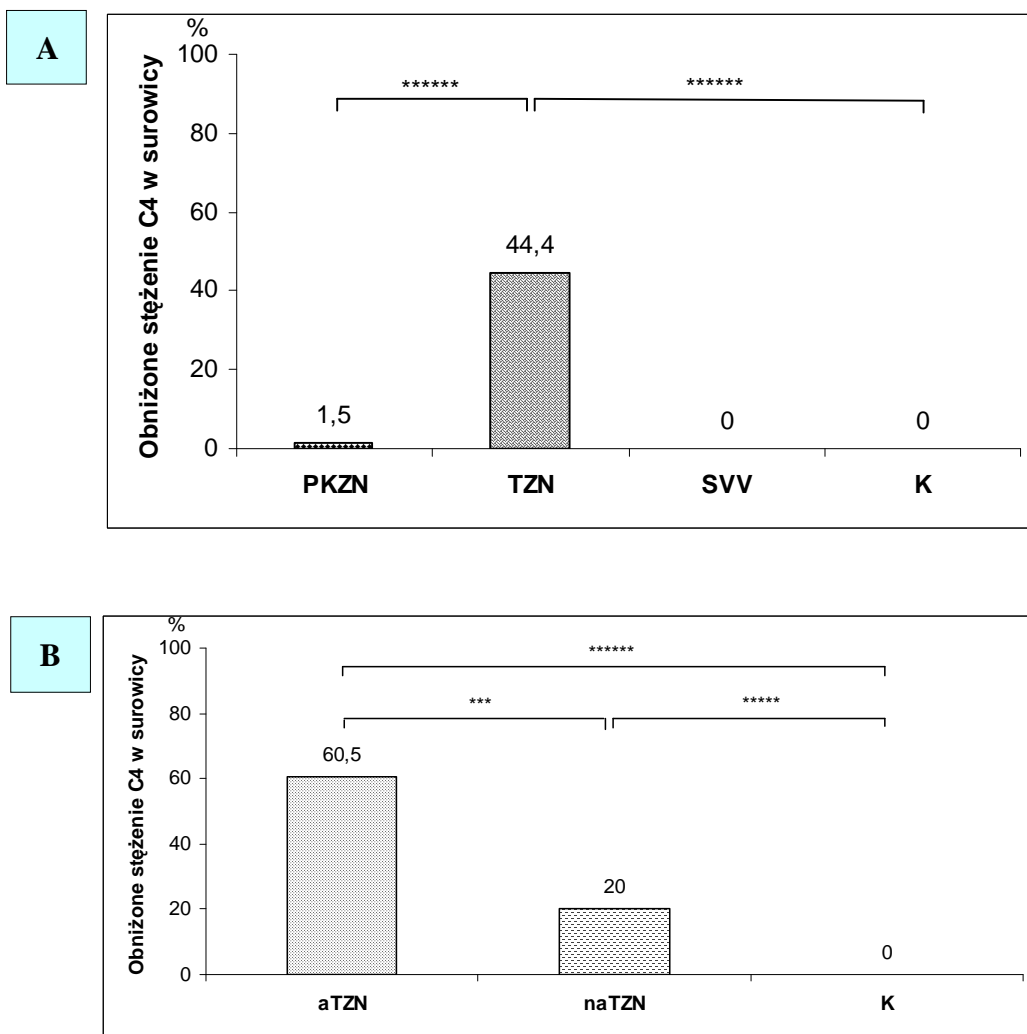
statystycznie różnicę w wykrywaniu obniżonego stężenia C3 w surowicy w grupie chorych na aTZN i naTZN, bez różnic między klasami TZN (**Ryc. 11B**). Wśród chorych na PKZN, niskie stężenie C3 stwierdzano najczęściej w przypadku MPGN (28,6%).



**Ryc. 11.** Częstość występowania obniżonego stężenia składowej dopełniacza C3 w surowicy chorych na PKZN, TZN, SVV i K (A) oraz chorych na aTZN i naTZN (B).

\*\*\*  $p < 0,005$ , \*\*\*\*\*  $p < 0,0001$

W przypadku składowej dopełniacza C4, jej obniżone stężenie stwierdzano niemal wyłącznie w grupie TZN. Tylko u 1,5% badanych chorych na PKZN, stężenie C4 w surowicy znajdowało się poniżej dolnej granicy normy. Dotyczyło to wyłącznie osób z potwierdzonym histopatologicznie MPGN (**Ryc. 12A**). Wśród chorych na TZN, niskie stężenie C4 stwierdzano znamienne częściej u chorych w aktywnej fazie choroby niż u tych w fazie remisji (**Ryc. 12B**). Również w tym przypadku nie obserwowano istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi klasami TZN.



**Ryc. 12.** Częstość występowania obniżonego stężenia składowych dopełniacza C4 w surowicy chorych na PKZN, TZN, SVV i K (A) oraz chorych na aTZN i naTZN (B).  
 \*\*\*  $p < 0,005$ , \*\*\*\*\*  $p < 0,0005$ , \*\*\*\*\*  $p < 0,0001$

#### 4.4.2. Średnie stężenia składowych dopełniacza C1q, C3 i C4 w surowicy

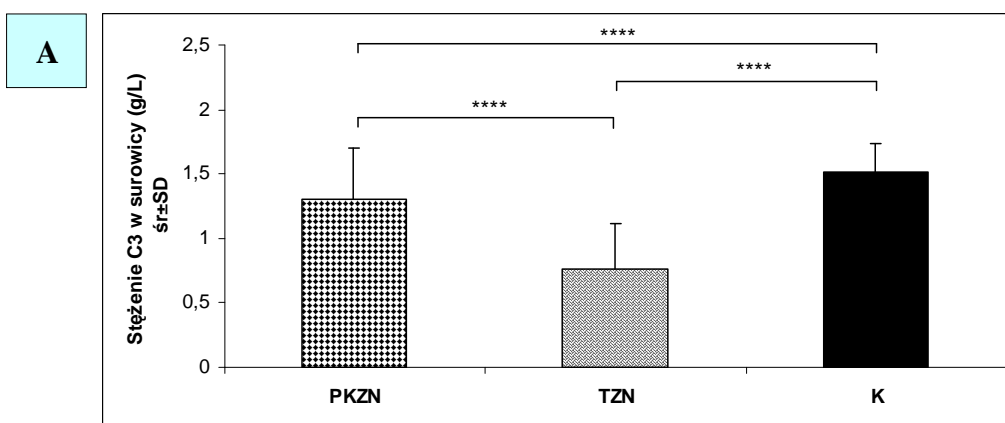
Stężenia składowej dopełniacza C1q w surowicy mieściły się w bardzo szerokim zakresie zarówno w grupie K, jak i u chorych na KZN. Średnie stężenia, mediany i zakres wartości C1q w badanych grupach przedstawiono w **tabeli 10**.

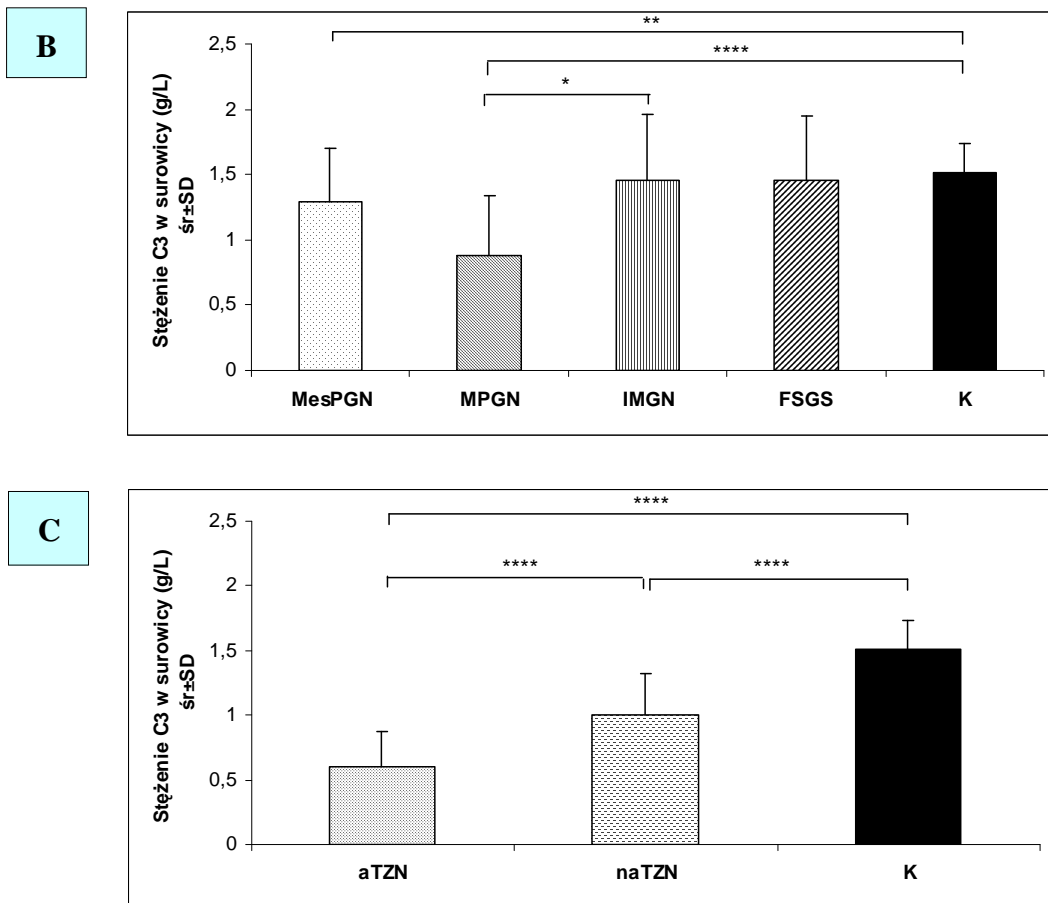
Średnie stężenia C1q w surowicy nie różniły się istotnie między chorymi na TZN, PKZN, SVV i grupą K. Podobnie, nie obserwowano różnic pomiędzy poszczególnymi typami PKZN, czy chorymi z aTZN i naTZN. Ponadto, nie wykazano różnic w średnich stężeniach C1q między poszczególnymi klasami TZN.

**Tabela 10.** Stężenia C1q w surowicy badanych chorych i grupie kontrolnej

Grupa badana	Średnia±SD (ng/mL)	Mediana (zakres)
<b>PKZN</b>	431,3±287,9	351,2 (11,4-1560,6)
MesPGN	425,4±294,9	357,3 (11,4-1560,0)
MPGN	373,1±146,0	351,2 (209,4-648,2)
IMGN	461,4±306,7	313,8 (102,1-1337,0)
FSGS	470,6±249,7	365,0 (322,4-913,7)
<b>TZN</b>	359,9±342,3	279,6 (11,3-1791,6)
aTZN	305,0±283,1	247,9 (11,3-1615,7)
naTZN	441,1±407,5	342,11 (28,7-1791,6)
<b>SVV</b>	426,3±229,5	343,4 (231,9-860,6)
<b>K</b>	417,4±380,5	270,9 (41,8-1845,2)

Najniższe średnie stężenia C3 w surowicy stwierdzano u chorych na TZN. Były one znacznie niższe w porównaniu z chorymi na PKZN i grupą K (**Ryc. 13A**). Istotnie statystycznie różnice stwierdzono także między grupą PKZN i K, a najniższe stężenia wśród chorych na PKZN zanotowano w grupie z rozpoznaniem MPGN (**Ryc. 13B**). W grupie chorych na TZN, stężenia C3 były niższe zarówno w aTZN, jak i naTZN w porównaniu z grupą K. Znaczącą różnicę wykazano między naTZN a aTZN (w tej drugiej grupie średnie stężenia C3 były najniższe spośród wszystkich badanych) (**Ryc. 13C**). Nie stwierdzono istotnych różnic w średnim stężeniu C3 w surowicy między poszczególnymi klasami TZN.

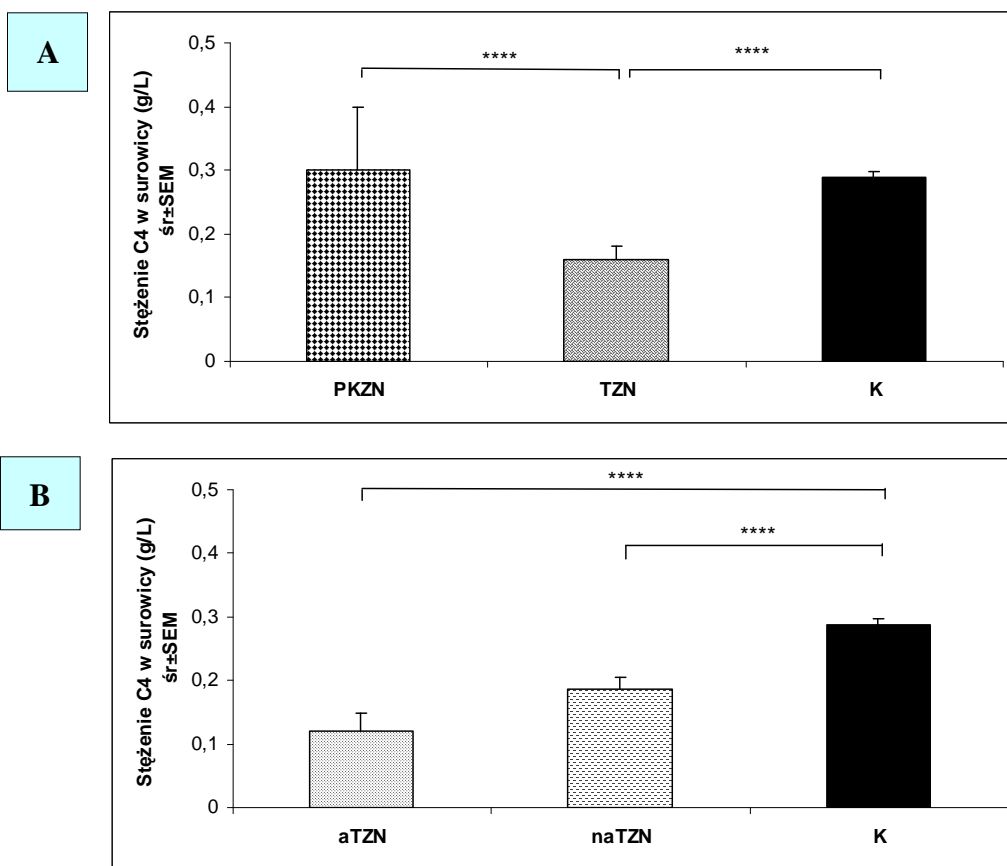




**Ryc. 13.** Porównanie średnich stężeń składowych dopełniacza C3 w surowicy chorych na PKZN, TZN i grupie K (A), chorych na poszczególne typy morfologiczne PKZN (B) oraz chorych na aTZN i naTZN (C).

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,001$

Analiza średnich stężeń C4 w badanych surowicach wykazała, podobnie jak w przypadku C3, że najniższe stężenia występowały u chorych na TZN. Natomiast stężenia w grupie chorych na PKZN (zarówno w ujęciu całościowym, jak i biorąc pod uwagę poszczególne typy KZN) nie różniły się istotnie od tych stwierdzanych wśród ZO (**Ryc. 14A**). W przypadku składowej dopełniacza C4 nie wykazano także istotnych statystycznie różnic w średnich stężeniach między chorymi z aTZN i naTZN, chociaż w obu grupach były one niższe niż wśród ZO (**Ryc. 14B**). Zaobserwowano tendencję do występowania niższych stężeń C4 głównie w klasie III i IV TZN w porównaniu z grupą K ( $p < 0,001$ ), jednak bez istotnych różnic między poszczególnymi klasami TZN.



**Ryc. 14.** Porównanie średnich stężeń składowych dopełniacza C4 w surowicy chorych na PKZN, TZN i grupie K (A) oraz chorych na aTZN i naTZN (B).

\*\*\*\*  $p < 0,001$

#### 4.5. Różnice w wykrywaniu badanych markerów immunologicznych w zależności od aktywności TRU i TZN.

Chorych na aTZN i naTZN porównano ze względu na występowanie i/lub brak w surowicy równocześnie dwóch z badanych pc i KI, bądź obniżonego stężenia C3 i C4. W surowicy chorych na aTZN istotnie częściej wykrywano równocześnie pc p-C1q i p-dsDNA i/lub KKI-C1q niż w naTZN. W przypadku aktywnego procesu chorobowego występowaniu pc p-C1q i p-dsDNA w surowicy znacznie częściej towarzyszyła hipokomplementemia. Natomiast równoczesne stwierdzenie ujemnych pc p-C1q i p-dsDNA oraz prawidłowego stężenia składowych dopełniacza w surowicy wskazywało na nieaktywny proces chorobowy w nerkach. Wyniki przedstawiono w **tabeli 11**.

**Tabela 11.** Różnice w częstości wykrywania badanych markerów immunologicznych między aTZN i naTZN

	<b>aTZN (n=38)</b>	<b>naTZN (n=25)</b>	<b>P</b>
<b>p-C1q(+) p-dsDNA(+)</b>	<b>27 (71,1%)</b>	<b>9 (36,0%)</b>	<b>0,0091</b>
p-C1q(+) p-dsDNA(-)	4 (10,5%)	3 (12,0%)	1,0000
p-C1q(-) p-dsDNA(+)	7 (18,4%)	5 (20,0%)	1,0000
<b>p-C1q(-) p-dsDNA(-)</b>	<b>0</b>	<b>8 (32,0%)</b>	<b>0,0003</b>
<b>p-C1q(+) KKI-C1q(+)</b>	<b>20 (52,6%)</b>	<b>1 (4,0%)</b>	<b>&lt;0,0001</b>
p-C1q(+) KKI-C1q(-)	11 (28,9%)	11 (44,0%)	0,2830
p-C1q(-) KKI-C1q(+)	2 (5,3%)	5 (20,0%)	0,1034
p-C1q(-) KKI-C1q(-)	5 (13,2%)	8 (32,0%)	0,1107
<b>p-C1q(+) C3 i/lub C4(↓)</b>	<b>27 (71,1%)</b>	<b>6 (24,0%)</b>	<b>0,0003</b>
p-C1q(+) C3 i/lub C4(N)	4 (10,5%)	6 (24,0%)	0,1762
p-C1q(-) C3 i/lub C4(↓)	5 (13,2%)	4 (16,0%)	1,0000
<b>p-C1q(-) C3 i/lub C4(N)</b>	<b>1 (2,6%)</b>	<b>9 (36,0%)</b>	<b>0,0006</b>
<b>p-dsDNA(+) C3 i/lub C4(↓)</b>	<b>27 (71,1%)</b>	<b>8 (32,0%)</b>	<b>0,0040</b>
p-dsDNA(+) C3 i/lub C4(N)	4 (10,5%)	6 (24,0%)	0,1762
p-dsDNA(-) C3 i/lub C4(↓)	3 (7,9%)	2 (8,0%)	1,0000
<b>p-dsDNA(-) C3 i/lub C4(N)</b>	<b>1 (2,6%)</b>	<b>9 (36,0%)</b>	<b>0,0006</b>
<b>KKI-C1q(+) C3 i/lub C4(↓)</b>	<b>21 (55,3%)</b>	<b>5 (20,0%)</b>	<b>0,0084</b>
KKI-C1q(+) C3 i/lub C4(N)	1 (2,6%)	1 (4,0%)	1,0000
KKI-C1q(-) C3 i/lub C4(↓)	11 (28,9%)	4 (16,0%)	0,3655
<b>KKI-C1q(-) C3 i/lub C4(N)</b>	<b>4 (10,5%)</b>	<b>14 (56,0%)</b>	<b>0,0002</b>

Wyniki wieloczynnikowej wstecznej analizy logistycznej wykazały związek między wykrywaniem pc p-C1q i występowaniem obniżonego stężenia C3 w surowicy a aktywnością TRU ocenianej w skali SLEDAI-2K oraz występowaniem E. Wykazano także związek między występowaniem pc p-C1q i obniżonego stężenia C3 w surowicy a pojawieniem się ZN, chociaż zależność ta nie osiągnęła pełnej istotności statystycznej. Nie stwierdzono takich zależności dla obniżonego stężenia C4 w surowicy, a w przypadku pc p-dsDNA zaobserwowano związek z pojawieniem się E, lecz zależność ta była tylko bliska istotności statystycznej. Wyniki przedstawiono w **tabeli 12**.

**Tabela 12.** Wyniki wieloczynnikowej wstecznej analizy logistycznej uwzględniającej aktywność TRU, występowanie ZN i E w powiązaniu z wykrywaniem pc p-C1q i p-dsDNA oraz obniżonych stężeń C3 i C4 w surowicy

	SLEDAI-2K = 10		ZN		E	
	IL (95% PU)	p	IL (95% PU)	p	IL (95% PU)	p
<b>p-dsDNA (+)</b> <b>(&gt; 100 IU/mL)</b>	-		-		3,76 (0,78 – 18,08)	0,097
<b>p-C1q (+)</b> <b>(&gt; 32 RU/mL)</b>	<b>4,03</b> (1,09 – 14,84)	<b>0,0364</b>	4,25 (0,83 – 21,67)	0,0816	<b>4,43</b> (1,19 – 16,44)	<b>0,026</b>
<b>C3 &lt; 0,9 g/L</b>	<b>10,54</b> (2,87 – 38,62)	<b>0,0004</b>	4,76 (0,94 – 24,04)	0,0591	<b>4,26</b> (1,15 – 15,83)	<b>0,030</b>
<b>C4 &lt; 0,1 g/L</b>	-		-		-	
<b>x2</b>	22		10		19	

#### 4.6. Oznaczenie immunoglobulin klasy IgG w surowicy

Obniżone stężenie całkowitych IgG stwierdzono u 44,7% chorych na PKZN i 33,3% na TZN. W grupie SVV, tylko jeden chory na cANCA dodatkowo SVV miał stężenie IgG w surowicy poniżej dolnej granicy normy, natomiast u wszystkich badanych osób z grupy K stężenie IgG mieściło się w zakresie normy ( $p < 0,0001$  dla PKZN vs. K i TZN vs. K). We wszystkich typach morfologicznych PKZN częstość występowania obniżonego stężenia IgG była wyższa niż w K ( $p < 0,0001$  dla wszystkich), lecz stwierdzono istotne statystycznie różnice także między IMGN i MesPGN (65,2% vs. 35,7%,  $p < 0,05$ ) oraz między FSGS i MesPGN (83,3% vs. 83,3%,  $p < 0,05$ ).

Stężenia IgG były podwyższone u 14,3% chorych na TZN i 50% na SVV. Tylko 1 chora z pierwotnym MesPGN miała podwyższone stężenia IgG w surowicy ( $p < 0,0005$  względem TZN i SVV), a w grupie K oznaczenia IgG u wszystkich ZO mieściły się w granicach normy ( $p < 0,0005$  w porównaniu do TZN i SVV). Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w wykrywaniu podwyższonego stężenia IgG między grupą chorych na aTZN i naTNZ. W grupie SVV, u połowy chorych stężenie IgG przewyższało górną granicę normy ( $p < 0,05$  w porównaniu do naTNZ i  $p < 0,0001$  w porównaniu do grupy K).

Istotne statystycznie różnice w średnich stężeniach całkowitych IgG wykazano między chorymi na PKZN i TZN ( $p < 0,01$ ), SVV ( $p < 0,01$ ) oraz K ( $p < 0,001$ ). Wśród chorych na TZN i PKZN były one istotnie statystycznie niższe niż w grupie K ( $p < 0,001$ ). Wśród chorych na PKZN, istotną różnicę wykazano między grupą MesPGN i IMGN ( $p < 0,01$ ). W grupie WKZN, najniższe stężenia zanotowano wśród chorych na naTZN ( $p < 0,05$  w porównaniu do grupy SVV i K). Natomiast nie różniły się one istotnie między aTZN i naTZN.

Średnie stężenia IgG w badanych grupach przedstawiono w **tabeli 13**.

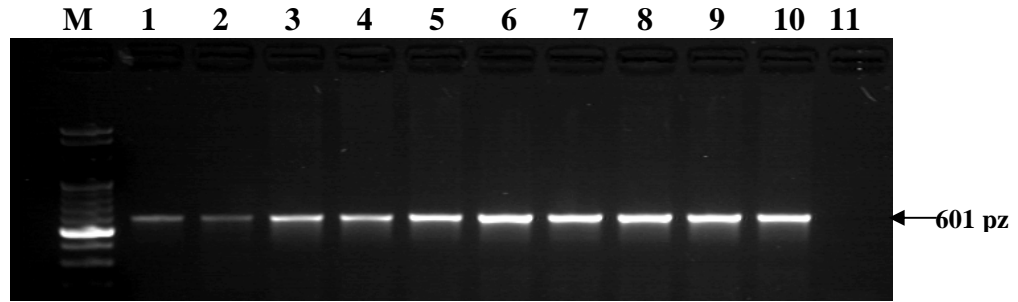
**Tabela 13.** Stężenia całkowitych IgG w surowicy badanych chorych i grupie kontrolnej

<b>Grupa badana</b>	<b>Stężenie IgG (g/L) (średnia±SD)</b>
<b>PKZN</b>	7,8±3,3
MesPGN	8,4±3,2
MPGN	5,7±3,9
IMGN	6,5±2,6
FSGS	5,6±3,2
<b>TZN</b>	11,1±8,0
aTZN	12,5±9,8
naTZN	9,1±4,1
<b>SVV</b>	16,6±7,6
<b>K</b>	13,4±2,2

#### 4.7. Wykrywanie DNA C1q i ocena występowania mutacji w genie C1q kodującym łańcuch A

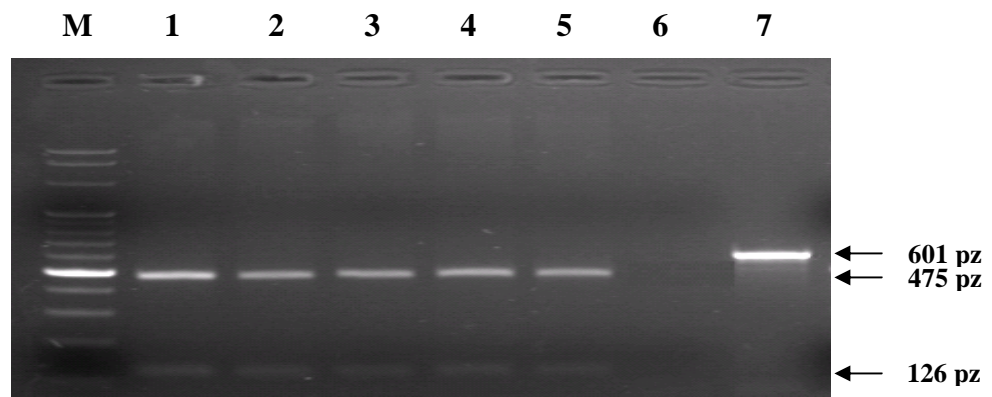
U wszystkich badanych chorych i osób z grupy K wykazano obecność DNA C1qA w leukocytach krwi (także w 3 wspomnianych wcześniej przypadkach, w których stężenie białka C1q w surowicy nie przekroczyło dolnej granicy wykrywalności dla testu) (**Ryc. 15**).





**Ryc. 15.** Przykładowy obraz rozdziału elektroforetycznego produktów amplifikacji DNA metodą PCR. M- wzorzec mas cząsteczkowych, 1-10 leukocyty osób badanych, 11- kontrola ujemna

U wszystkich badanych potwierdzono obecność miejsca rozpoznawanego przez enzym restrykcyjny *PvuII*. Długość fragmentów powstałych w reakcji restrykcji wynosiła 475 pz i 126 pz (**Ryc. 16**). W ten sposób, u wszystkich badanych wykluczono obecność jednej z odkrytych dotąd mutacji w eksonie 2 genu kodującego łańcuch A składowej dopełniacza C1q.

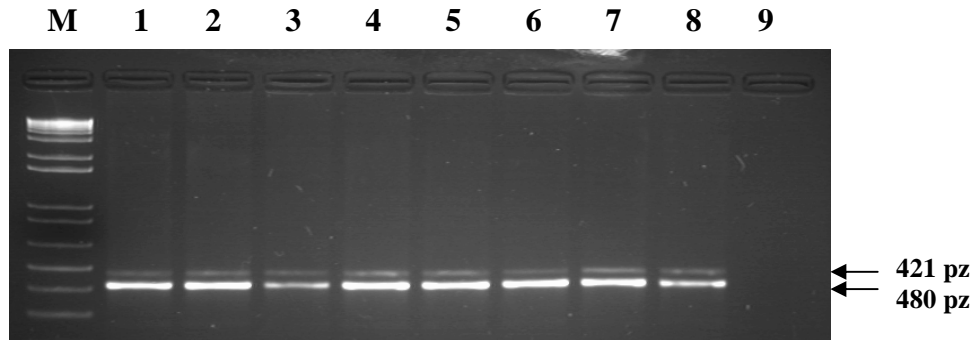


**Ryc. 16.** Przykładowy obraz rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji restrykcji z użyciem endonukleazy *PvuII*.

M- wzorzec mas cząsteczkowych, 1-5 leukocyty osób badanych, 6- kontrola ujemna, 7- DNA nie poddany reakcji restrykcji

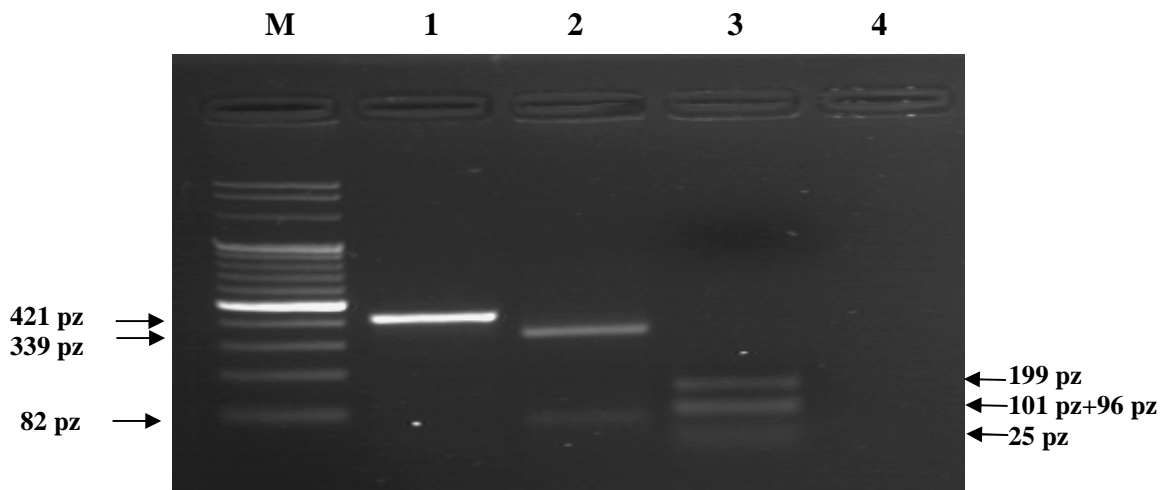
#### 4.8. Ekspresja mRNA C1q w leukocytach krwi

Ocenę ekspresji mRNA C1qA określano względem genu referencyjnego GAPDH, a długość produktów wynosiła: dla C1qA- 421 pz, dla GAPDH- 480 pz (**Ryc. 17**). Specyficzność produktów amplifikacji potwierdzono za pomocą reakcji restrykcji z użyciem enzymów restrykcyjnych *Taq I* i *BsuRI* (*Hae III*) (**Ryc. 18**).



**Ryc. 17.** Obraz rozdziału elektroforetycznego produktów amplifikacji cDNA C1qA i GAPDH w leukocytach krwi.

M- wzorzec mas cząsteczkowych, 1-8 leukocyty osób badanych, 9- kontrola ujemna



**Ryc. 18.** Obraz rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji restrykcji z użyciem endonukleaz *Taq I* i *BsuRI* (*Hae III*).

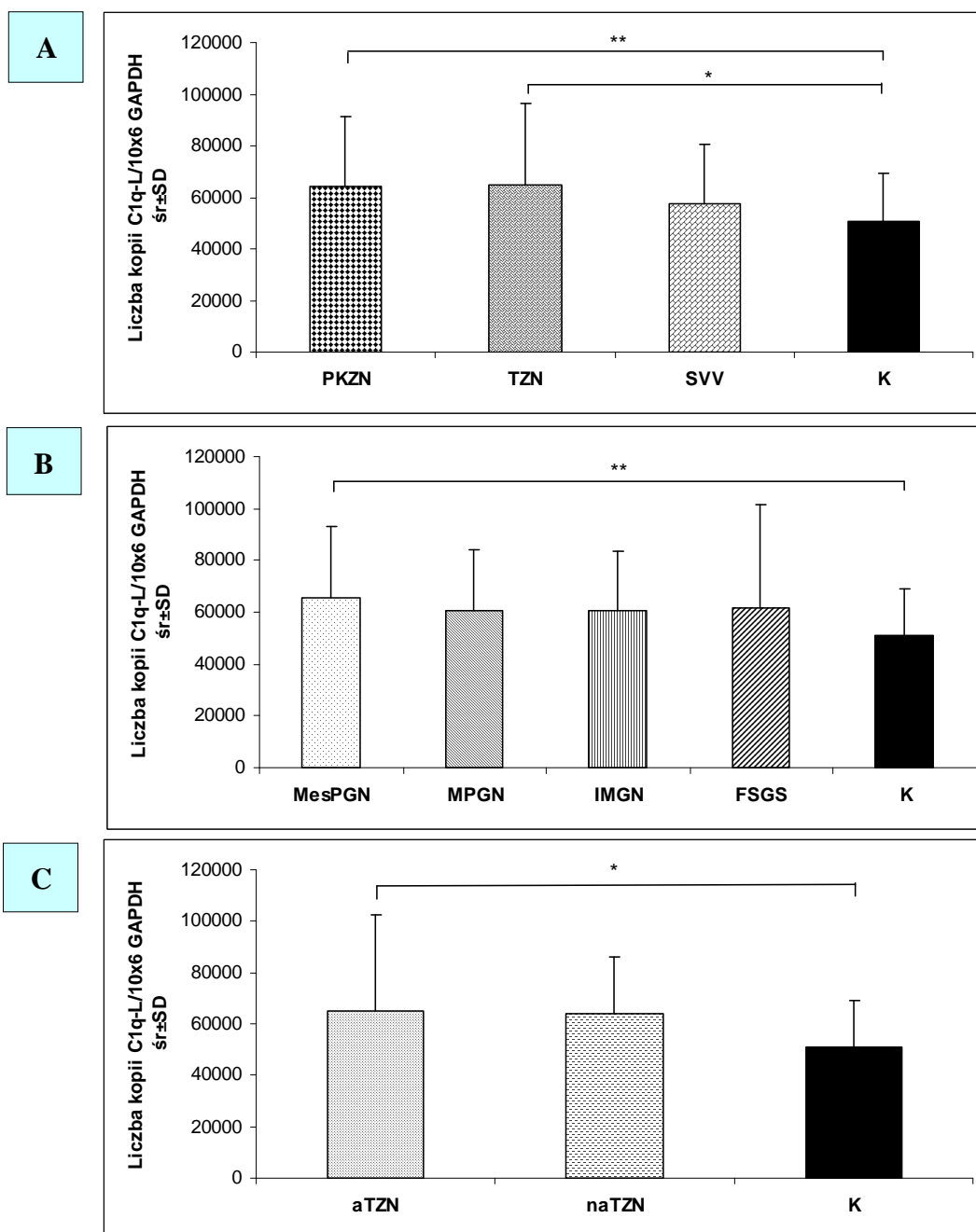
M- wzorzec mas cząsteczkowych, 1- cDNA nie poddane reakcji restrykcji, 2- produkty po reakcji restrykcji z użyciem *Taq I*, 3- produkty po reakcji restrykcji z użyciem *BsuRI*, 4- kontrola ujemna

Wykazano wyższą ekspresję mRNA C1q-L u wszystkich chorych na KZN w porównaniu z grupą K. Istotnie statystycznie były jednak tylko różnice między PKZN i K oraz TZN i K. Nie stwierdzono znaczącej różnicy w średniej liczbie transkryptów mRNA C1q pomiędzy chorymi na PKZN i TZN (**Ryc. 19A**).

W grupie PKZN, niezależnie od typu morfologicznego KZN liczba kopii mRNA w leukocytach była wyższa od stwierdzanej w grupie K, lecz istotną

statystycznie różnicę wykazano wyłącznie między chorymi z rozpoznaniem MesPGN a ZO (Ryc. 19B).

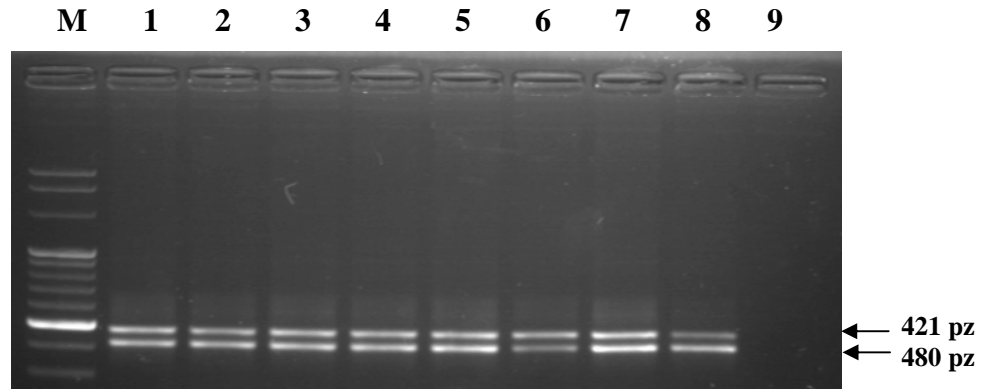
Wyższą ekspresję mRNA C1q stwierdzono także wśród chorych na TZN, chociaż nie obserwowano różnicy między aTZN i naTZN. Istotną statystycznie różnicę w liczbie kopii mRNA C1q w leukocytach wykazano między aTZN i grupą K (Ryc. 19C). Natomiast nie różniła się ona między poszczególnymi klasami TZN.



**Ryc. 19.** Porównanie średniej liczby transkryptów mRNA C1q w leukocytach chorych na PKZN, TZN, SVV i K (A), chorych na poszczególne typy morfologiczne PKZN (B) oraz chorych na aTZN i naTZN (C). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$

#### 4.9. Ekspresja mRNA C1q w nerkach

Ekspresję mRNA C1qA (421 pz) w nerkach, podobnie jak w przypadku leukocytów krwi, oceniano względem genu referencyjnego GAPDH (480 pz) (Ryc. 20).

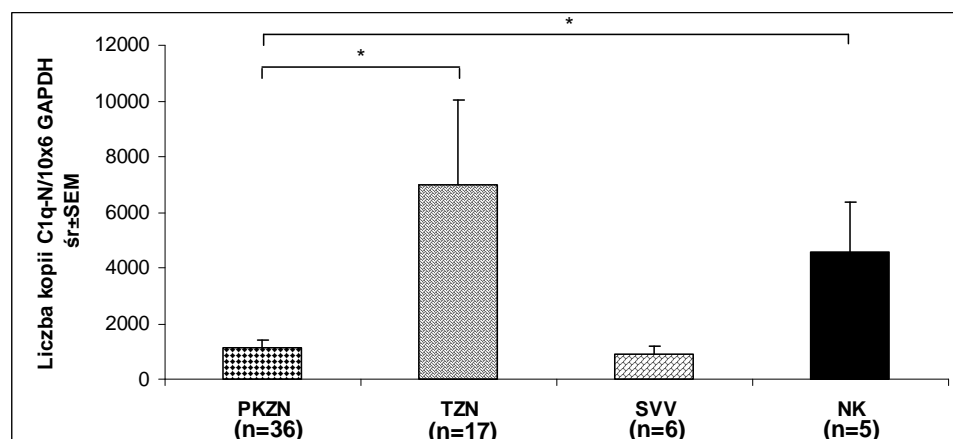


**Ryc. 20.** Obraz rozdziału elektroforetycznego produktów amplifikacji cDNA C1qA i GAPDH w nerkach.

M- wzorec mas cząsteczkowych, 1-8 nerki osób badanych, 9- kontrola ujemna

Najwyższą ekspresję mRNA C1q stwierdzono w nerkach chorych na TZN. Różniła się ona istotnie w porównaniu z grupą PKZN. Liczba transkryptów mRNA C1q w nerkach pochodzących od chorych na PKZN była jednocześnie znacznie niższa niż w NK. Natomiast nie różniła się istotnie od tej stwierdzanej w grupie SVV (Ryc. 21).

Nie stwierdzono różnic w średniej ekspresji mRNA C1q między chorymi z rozlewowymi i nierozlewowymi postaciami KZN oraz między aTZN i naTZN.

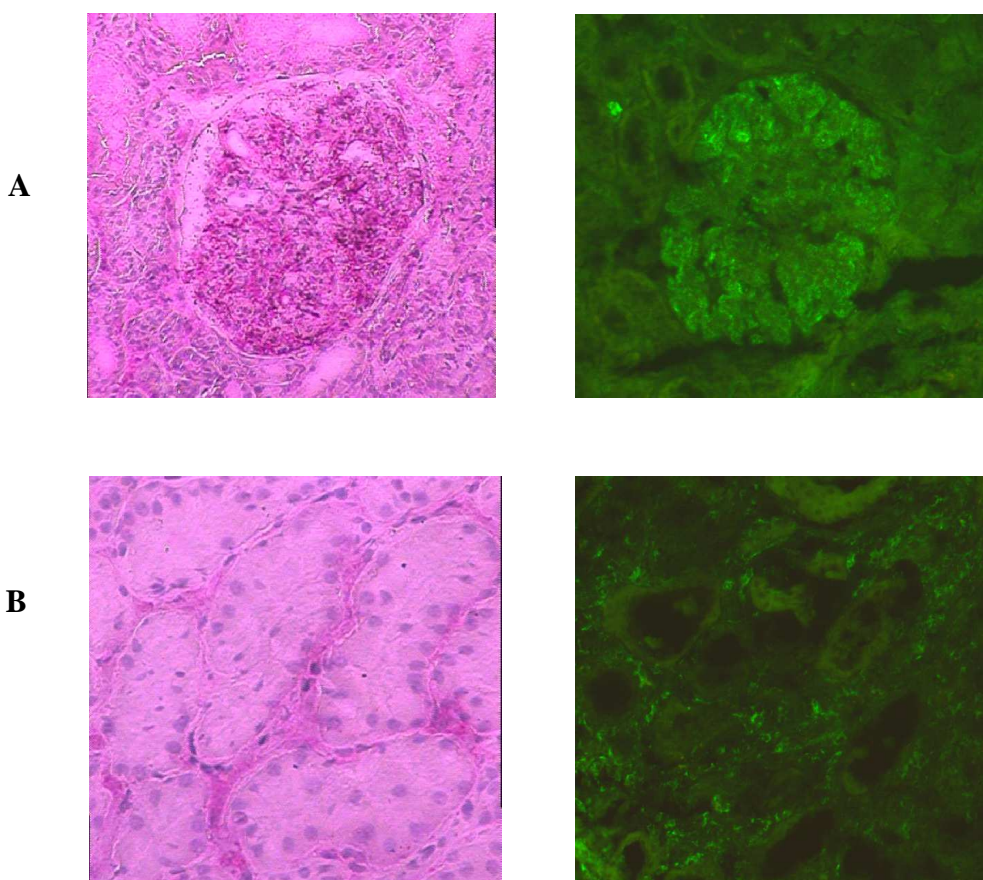


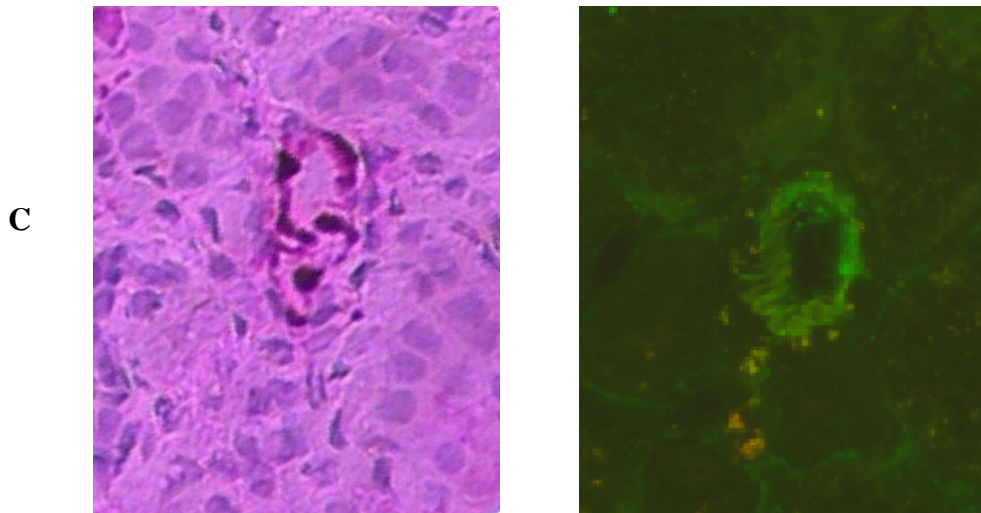
**Ryc. 21.** Porównanie średniej liczby transkryptów mRNA C1q w nerkach chorych na PKZN, TZN, SVV i K.\*  $p < 0,05$

#### 4.10. Ekspresja produktu białkowego w kłębuszku nerkowym

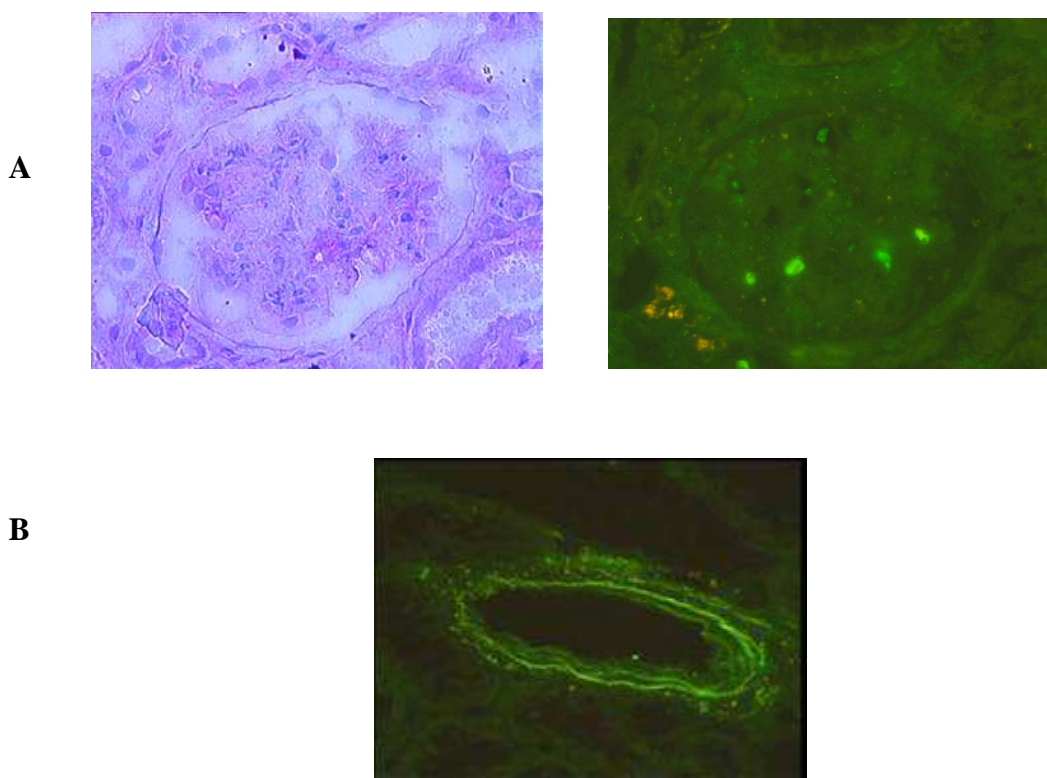
W grupie chorych na KZN, ekspresję C1q stwierdzono w obrębie kłębuszków nerkowych, w śródmiaższu oraz naczyniach (**Ryc. 22A,B,C**). Natomiast w NK produkt białkowy C1q wykrywano w naczyniach nerki (**Ryc. 23A,B**)

W badaniu immunofluorescencyjnym, depozy C1q w kłębuszkach nerkowych stwierdzono u 45,1% chorych na PKZN i aż 86,8% chorych na TZN ( $p < 0,005$ ). W grupie PKZN byli to głównie chorzy z rozpoznaniem MesPGN (82,6%), a wśród chorych na TZN ze złogami C1q u 75,6% stwierdzono aktywny proces chorobowy. Zarówno w PKZN, jak i TZN, nie stwierdzono istotnych różnic w częstości wykrywania, ani średnich stężeniach pc p-C1q i KKI oraz C1q w surowicy między chorymi z wykrywanymi depozytami C1q w kłębuszkach nerkowych i bez złogów C1q w nerce. Nie wykazano również związku między stężeniem całkowitych IgG i ekspresją C1q-L a obecnością złogów C1q w nerkach.





**Ryc. 22.** Ekspresja C1q w kłębuszku nerkowym (A), śródmiąszcu (B) oraz naczyniach (C) chorych na KZN.



**Ryc. 23.** Ekspresja C1q w kłębuszku nerkowym (A) i naczyniu (B) w NK.

#### **4.11. Porównanie wybranych danych klinicznych i laboratoryjnych pomiędzy chorymi z dodatnimi i ujemnymi pc p-C1q**

##### **4.11.1. Porównanie wybranych danych klinicznych i laboratoryjnych pomiędzy chorymi na TZN z dodatnimi i ujemnymi pc p-C1q**

Chorych na TZN podzielono na dwie podgrupy: z wykrywanymi w surowicy pc p-C1q (TZN p-C1q(+), 43 chorych) oraz z ujemnymi pc (TZN p-C1q(-), 20 chorych). Porównano obraz kliniczny, w tym objawy zajęcia nerek i wybrane parametry immunologiczne pomiędzy grupami.

Wykazano brak istotnych różnic w częstości występowania objawów pozanerkowych pomiędzy grupami. Natomiast wśród chorych z dodatnimi pc p-C1q w surowicy istotnie statystycznie częściej stwierdzano E oraz ZN i w mniejszym stopniu L i wałeczkomocz.

Spośród analizowanych parametrów immunologicznych znaczną różnicę wykazano wyłącznie w liczbie dodatnich wyników ANA. Mimo, że w grupie TZN p-C1q(+) stwierdzano częściej występowanie pc p-dsDNA oraz obniżonego stężenia C3 w surowicy, to różnice między badanymi grupami nie osiągnęły istotności statystycznej.

Należy podkreślić, że wśród chorych na TZN p-C1q(+) aż u 72,1%, w porównaniu do 35,0% w grupie TZN p-C1q(-), stwierdzono aktywną fazę choroby ( $p < 0,01$ ).

Porównanie objawów klinicznych i biochemicznych oraz wybranych parametrów immunologicznych między badanymi grupami przedstawiono w **tabeli 14**.

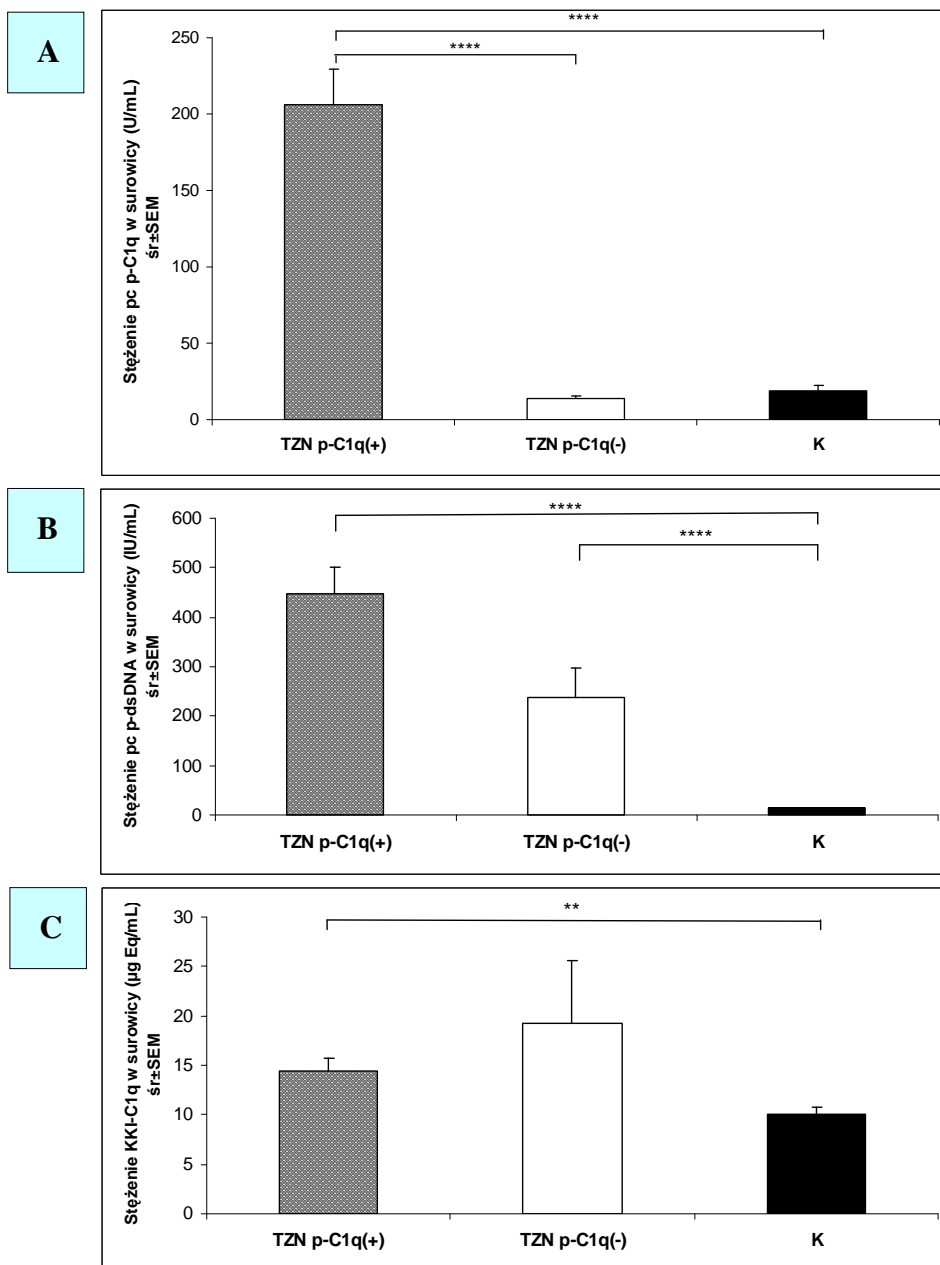


**Tabela 14.** Dane kliniczne, biochemiczne i immunologiczne chorych na TZN z wykrywanymi i ujemnymi pc p-C1q w surowicy

	TZN p-C1q(+) (n=43)	TZN p-C1q(-) (n=20)	P
<b>Objawy pozanerkowe</b>			
Zaburzenia neurologiczne	8 (18,6%)	1 (5,0%)	0,2506
Zapalenie naczyń	1 (2,3%)	0	1,0000
Zapalenie stawów	1 (2,3%)	1 (5,0%)	0,5376
Zmiany skórne	7 (16,3%)	3 (15,0%)	1,0000
Owrzodzenia błon śluzowych	1 (2,3%)	0	1,0000
Zapalenie błon surowiczych	3 (7,0%)	1 (5,0%)	1,0000
Gorączka	5 (11,6%)	1 (5,0%)	0,6549
NT	23 (53,5%)	14 (70,0%)	0,2765
Leukopenia (WBC<3 000/μl)	3 (7,0%)	0	0,5452
Małopłytkowość (PLT<100 000/μl)	6 (14,0%)	1 (5,0%)	0,4151
Niedokrwistość (Hb< 12.0 g/dl)	18 (41,9%)	7 (35,0%)	0,7829
<b>Objawy zajęcia nerek</b>			
Wąleczkomocz (erytrocytarne, ziarniste)	17 (39,5%)	3 (15,0%)	0,0803
E (bez ZUM lub kamicy)	27 (62,8%)	6 (30,0%)	<b>0,0289</b>
L (bez ZUM lub kamicy)	23 (53,5%)	5 (25,0%)	0,0556
Białkomocz (>0.5 g/24h)	29 (67,4%)	13 (65,0%)	1,0000
ZN	16 (37,2%)	2 (10,0%)	<b>0,0357</b>
Obniżenie GFR <60 ml/min/1,73m <sup>2</sup> w ciągu ostatniego miesiąca	6 (14,0%)	1 (5,0%)	0,4151
<b>Parametry immunologiczne</b>			
Dodatnie ANA	43 (100%)	14 (70,0%)	<b>0,0006</b>
Dodatnie pc p-dsDNA	36 (83,7%)	12 (60,0%)	0,0573
Dodatnie pc p-Ns	14 (32,6%)	3 (15,0%)	0,2235
Dodatnie pc p-Ro (SS-A)	13 (30,2%)	6 (30,0%)	1,0000
Dodatnie pc p-La (SS-B)	4 (9,3%)	3 (15,0%)	0,6694
Dodatnie pc p-Sm	4 (9,3%)	1 (5,0%)	1,0000
Dodatnie pc p-RNP	6 (14,0%)	1 (5,0%)	0,4151
Dodatnie pc p-rybosomalnemu białku P	3 (7,0%)	0	0,5452
Dodatnie pc p-histonom	12 (27,9%)	2 (10,0%)	0,1920
Dodatnie pc p-PCNA	4 (9,3%)	0	0,2976
Dodatnie pc p-CENP B	1 (2,3%)	0	1,0000
Dodatnie pc p-AMA M2	4 (9,3%)	0	0,2976
Dodatnie pc p-kardiolipinie	5 (11,5%)	2 (10,0%)	1,0000
Dodatnie pc p-β2 glikoproteinie 1	5 (11,5%)	2 (10,0%)	1,0000
Dodatnie KKI-C1q	21 (48,8%)	7 (35,0%)	0,4155
Obniżone stężenie C3 w surowicy	32 (74,4%)	10 (50,0%)	0,0845
Obniżone stężenie C4 w surowicy	22 (51,2%)	6 (30,0%)	0,1735

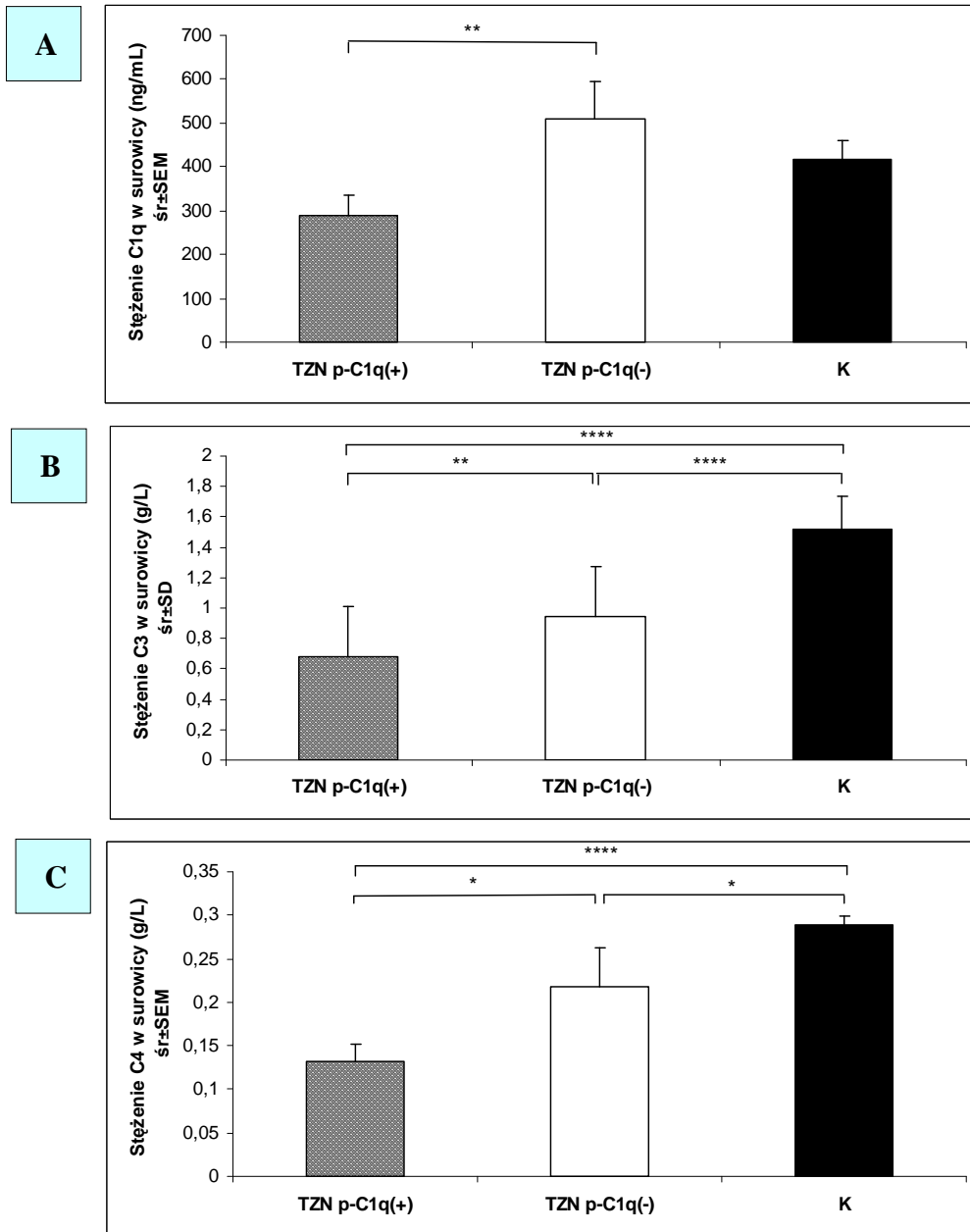


Porównanie średnich stężeń badanych markerów serologicznych u chorych z TZN p-C1q(+) i TZN p-C1q(-) wykazało znacznie wyższe stężenia pc p-C1q, a niższe składowych dopełniacza C1q, C3 i C4 w grupie chorych z dodatnimi pc p-C1q (Ryc. 24A i 25A,B,C). W grupie TZN p-C1q(+) stwierdzono także tendencję do wyższych stężeń pc p-dsDNA, lecz różnica nie była istotna statystycznie (Ryc. 24B). Chorzy z dodatnimi pc p-C1q wykazywali wyższe stężenia KKI-C1q niż grupa K, ale niższe niż w grupie TZN p-C1q(-) (Ryc. 24C).



**Ryc. 24.** Porównanie średnich stężeń pc p-C1q (A), p-dsDNA (B), KKI-C1q (C) w surowicy w grupach TZN p-C1q(+), TZN p-C1q(-) i K.

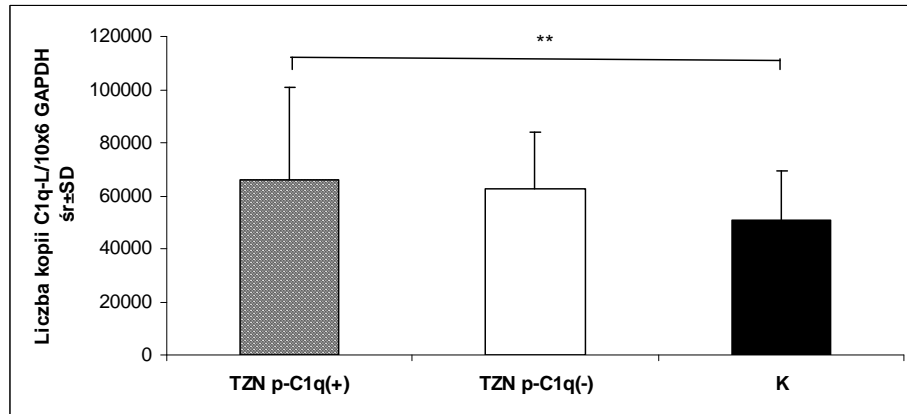
\*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,001$



**Ryc. 25.** Porównanie średnich stężeń C1q (A), C3 (B), C4 (C) w surowicy w grupach TZN p-C1q(+), TZN p-C1q(-) i K.

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,001$

Porównanie ekspresji mRNA C1q między grupami wykazało, że liczba kopii mRNA C1q w leukocytach chorych na TZN p-C1q(+) była istotnie wyższa niż w grupie K, ale nie wykazano istotnych statystycznie różnic między grupą TZN p-C1q(-) i K oraz chorymi z dodatnimi i ujemnymi pc w surowicy (**Ryc. 26**). Nie stwierdzono różnic w liczbie kopii mRNA C1q w nerkach pomiędzy grupami.



**Ryc. 26.** Ekspresja mRNA C1q-L w grupach TZN p-C1q(+), TZN p-C1q(-) i K. \*\* p<0,01

Chorzy z grupy TZN p-C1q(+) charakteryzowali się wyższą punktacją zarówno w skali SLEDAI-2K, jak i SLEDAI-N (p<0,01) oraz wyższym  $U_{\text{prot}}$  (p<0,05). Chorych z tej grupy cechował także krótszy czas od momentu wykonania biopsji nerki do pobrania krwi celem oznaczenia pc p-C1q (p<0,05). Z analizy dodatkowych badań biochemicznych wynikało, iż wykrywanie pc p-C1q w surowicy wiązało się z tendencją do niższego stężenia albumin (p=0,068), obniżonej liczby RBC (p=0,062) oraz wyższego stężenia całkowitych IgG (p=0,056) w surowicy.

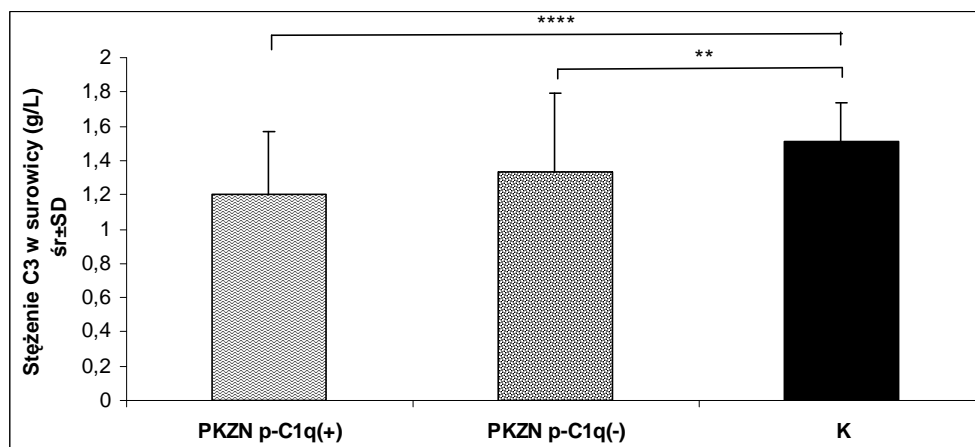
#### **4.11.2. Porównanie wybranych danych klinicznych i laboratoryjnych pomiędzy chorymi na PKZN z dodatnimi i ujemnymi pc p-C1q**

Chorych na PKZN podzielono na 2 podgrupy: PKZN p-C1q(+), która obejmowała 32 chorych oraz grupę PKZN p-C1q(-), którą stanowiło pozostałych 107 chorych z ujemnymi pc p-C1q w surowicy.

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w występowaniu NT, niedokrwistości, hipoalbuminemi, a także E,  $U_{\text{prot}}$ , czy pełnoobjawowego ZN między chorymi z dodatnimi i ujemnymi pc p-C1q. W obu grupach, z podobną częstością stwierdzano także obniżone stężenie składowych dopełniacza w surowicy. Natomiast w surowicy chorych na PKZN p-C1q(+) znacznie częściej wykrywano KKI-C1q niż w grupie PKZN p-C1q(-) (34,4% vs. 5,6%; p<0,0001).

Nie znaleziono istotnych różnic w stężeniu składowych dopełniacza C1q, C3 i C4 między grupami PKZN p-C1q(+) i PKZN p-C1q(-), chociaż stężenie C3 w

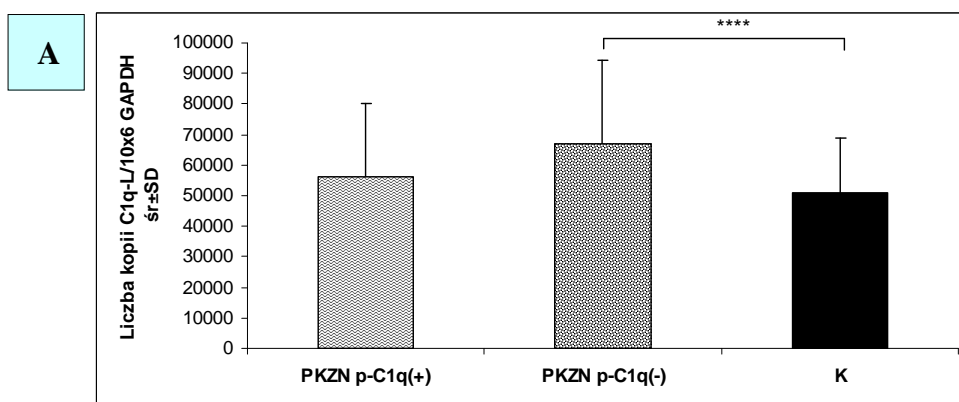
surowicy w obu grupach było istotnie statystycznie niższe niż u zdrowych ochotników (**Ryc. 27**).

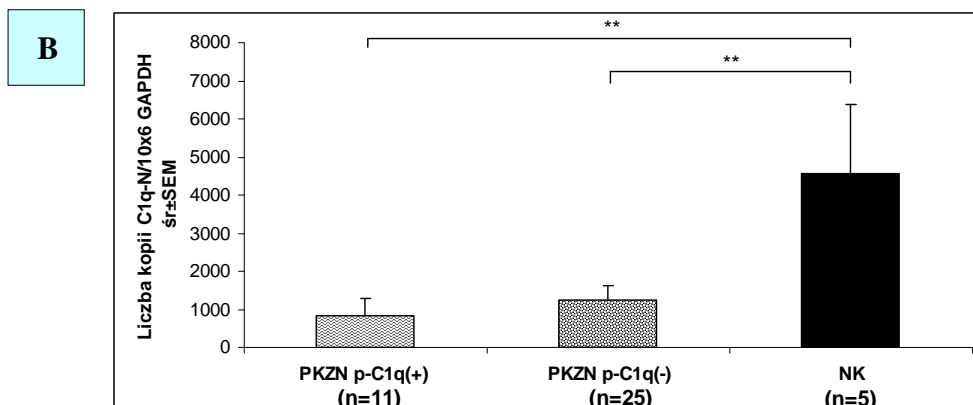


**Ryc. 27.** Porównanie średnich stężeń C3 w surowicy w grupach PKZN p-C1q(+), PKZN p-C1q(-) i K.

\*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,001$

Nie wykazano różnic w ekspresji mRNA C1q-L między chorymi na PKZN z pc p-C1q(+) i pc p-C1q(-). W grupie PKZN p-C1q(-) stwierdzono istotnie statystycznie wyższą liczbę kopii mRNA C1q w leukocytach krwi w porównaniu z grupą K (**Ryc. 28A**). Analiza ekspresji mRNA C1q w nerkach wykazała wyraźną tendencję do niższego poziomu transkrypcji w obu grupach chorych na PKZN w porównaniu z NK, niezależnie od wykrywania pc p-C1q w badanych surowicach (**Ryc. 28B**).





**Ryc. 28.** Ekspresja mRNA C1q-L (A) i C1q-N (B) w grupach PKZN p-C1q(+), PKZN p-C1q(-) i K/NK. \*\* p<0,01, \*\*\*\* p<0,001

#### 4.12. Porównanie wybranych danych klinicznych i laboratoryjnych pomiędzy chorymi z dodatnimi i ujemnymi pc p-dsDNA

W grupie TZN p-dsDNA(+), obejmującej 48 chorych, istotnie częściej stwierdzano NT i E w porównaniu do grupy TZN p-dsDNA(-), którą stanowiło pozostałych 15 chorych. Natomiast nie wykazano istotnych różnic w częstości występowania białkomoczu, w tym zespołu nerczycowego. Znamienne częściej (równocześnie z pc p-dsDNA) stwierdzano obecność KKI-C1q w surowicy, a stężenia składowych dopełniacza C3 i szczególności C4 były obniżone. U chorych z grupy TZN p-dsDNA(+) znacznie częściej stwierdzano aktywną postać TZN w porównaniu z chorymi bez wykrywanych pc p-dsDNA w surowicy (70,8% vs. 26,7%; p<0,01). Otrzymane wyniki przedstawiono w **tabeli 15**.

**Tabela 15.** Dane kliniczne, biochemiczne i immunologiczne chorych na TZN z wykrywanymi i ujemnymi pc p-dsDNA w surowicy

	TZN p-dsDNA(+) (n=48)	TZN p-dsDNA(-) (n=15)	P
<b>Objawy pozanerkowe</b>			
Zaburzenia neurologiczne	7 (14,6%)	2 (13,3%)	1,0000
Zapalenie naczyń	1 (2,1%)	0	1,0000
Zapalenie stawów	2 (4,2%)	0	1,0000
Zmiany skórne	9 (18,8%)	1 (6,7%)	0,4279
Owrzodzenia błon śluzowych	1 (2,1%)	0	1,0000
Zapalenie błon surowiczych	3 (6,2%)	1 (6,7%)	1,0000
Gorączka	5 (10,4%)	1 (6,7%)	1,0000
NT	28 (58,3%)	1 (6,7%)	<b>0,0007</b>
Leukopenia (WBC<3 000/ $\mu$ l)	2 (4,2%)	1 (6,7%)	0,5645
Małopłytkowość (PLT<100 000/ $\mu$ l)	5 (10,4%)	2 (13,3%)	0,6673
Niedokrwistość (Hb< 12.0 g/dl)	21 (43,8%)	4 (26,7%)	0,3655
<b>Objawy zajęcia nerek</b>			
Wąteczkomocz (erytrocytarne, ziarniste)	16 (33,3%)	4 (26,7%)	0,7566
E (bez ZUM lub kamicy)	30 (62,5%)	3 (20%)	<b>0,0067</b>
L (bez ZUM lub kamicy)	24 (50%)	4 (26,7%)	0,1434
Białkomocz (>0.5 g/24h)	32 (66,7%)	10 (66,7%)	1,0000
ZN	15 (34,3%)	3 (20%)	0,5219
Obniżenie GFR <60 ml/min/1,73m <sup>2</sup> w ciągu ostatniego miesiąca	4 (8,3%)	3 (20%)	0,3423
<b>Parametry immunologiczne</b>			
Dodatnie ANA	36 (75%)	7 (46,7%)	0,0573
Dodatnie pc p-dsDNA	44 (89,6%)	13 (86,7%)	0,6220
Dodatnie pc p-Ns	14 (29,2%)	3 (20,0%)	0,7400
Dodatnie pc p-C1q	36 (75,0%)	7 (46,7%)	0,0573
Dodatnie pc p-Ro (SS-A)	14 (29,2%)	5 (33,3%)	0,7566
Dodatnie pc p-La (SS-B)	5 (10,4%)	2 (13,3%)	0,6673
Dodatnie pc p-Sm	3 (6,3%)	2 (13,3%)	0,5848
Dodatnie pc p-RNP	6 (12,5%)	1 (6,7%)	1,0000
Dodatnie pc p-rybosomalnemu białku P	2 (4,2%)	1 (6,7%)	0,5645
Dodatnie pc p-histonom	12 (25%)	2 (13,3%)	0,4862
Dodatnie pc p-PCNA	4 (8,3%)	0	0,5645
Dodatnie pc p-CENP B	0	1 (6,7%)	0,2381
Dodatnie pc p-AMA M2	2 (4,2%)	1 (6,7%)	1,0000
Dodatnie pc p-kardiolipinie	7 (14,6%)	0	0,1823
Dodatnie pc p- $\beta$ 2 glikoproteinie 1	6 (12,5%)	1 (6,7%)	1,0000
Dodatnie KKI-C1q	25 (52,1%)	3 (20%)	<b>0,0385</b>
Obniżone stężenie C3 w surowicy	37 (77,1%)	5 (33,3%)	<b>0,0036</b>
Obniżone stężenie C4 w surowicy	27 (56,3%)	1 (6,7%)	<b>0,0008</b>

Porównanie średnich stężeń badanych parametrów immunologicznych wykazało znacznie wyższe stężenia pc p-C1q ( $p<0,01$ ), p-dsDNA ( $p<0,0001$ ), KKI-C1q ( $p<0,005$ ), a niższe składowych dopełniacza C3 ( $p<0,0005$ ) i C4 ( $p<0,005$ ) w grupie TZN p-dsDNA(+) niż TZN p-dsDNA(-). Obserwowano także wyższą

ekspresję mRNA C1q-L ( $p < 0,05$ ). W ocenie aktywności TZN wg skali SLEDAI-2K, chorzy z dodatnimi pc p-dsDNA otrzymali wyższą punktację ( $p < 0,05$ ), bez istotnych różnic w ocenie zajęcia nerek z użyciem skali SLEDAI-N. W grupie TZN p-dsDNA(+) wykazano tendencję do wyższych stężeń IgG ( $p < 0,05$ ), a niższych stężeń albumin i liczby WBC we krwi ( $p < 0,05$  dla obu parametrów).

#### **4.13. Porównanie wybranych danych klinicznych i laboratoryjnych pomiędzy chorymi ze stwierdzonym ZN i bez ZN**

Wśród chorych na TZN, u których rozpoznano ZN stwierdzono znacznie częściej także inne objawy zajęcia nerek w przebiegu choroby, do których należały: E, L i walczkomocz. Dlatego u  $>90\%$  chorych z ZN rozpoznano aTZN. W przypadku występowania ZN wykazano także tendencję do częstszego występowania małopłytkowości. Częściej też wykrywano pc p-C1q i p-Ns oraz stwierdzano obniżone stężenie C3 w surowicy. Jednak średnie stężenia pc p-C1q, p-dsDNA, KKI-C1q czy składowych dopełniacza C1q, C3 i C4 nie różniły się między grupami z i bez ZN. Występowanie ZN wiązało się w wyższą punktacją zarówno w skali SLEDAI-2K, jak i SLEDAI-N ( $p < 0,0001$ ). U chorych z ZN stwierdzono także wyższe stężenia kreatyniny ( $p < 0,01$ ), a niższe Hb ( $p < 0,05$ ). Porównując chorych z ZN i bez ZN nie zaobserwowano różnic w częstości wykrywania obniżonego stężenia całkowitych IgG w surowicy (38,9% vs. 31,1%). Równocześnie, podwyższone stężenia IgG wykryto u 22,2% chorych z ZN i 11,1% bez ZN (różnica nieistotna statystycznie). Występowanie ZN wiązało się częściej z obniżonym stężeniem albumin i TP ( $p < 0,0005$ ), a ich stężenia były niższe w porównaniu do grupy bez ZN ( $p < 0,0001$ ). Natomiast średnie stężenia całkowitych IgG nie różniły się między grupami.

Porównanie obrazu klinicznego oraz wybranych parametrów immunologicznych chorych na TZN ze stwierdzonym ZN i bez ZN przedstawiono w **tabeli 16**.

**Tabela 16.** Dane kliniczne, biochemiczne i immunologiczne chorych na TZN ze stwierdzonym zespołem nerczycowym i bez zespołu nerczycowego

	TZN z ZN (n=18)	TZN bez ZN (n=45)	P
<b>Objawy pozanerkowe</b>			
Zaburzenia neurologiczne	5 (27,8%)	4 (8,9%)	0,1039
Zapalenie naczyń	1 (5,6%)	0	0,6325
Zapalenie stawów	0	2 (4,4%)	1,0000
Zmiany skórne	2 (11,1%)	8 (17,8%)	0,7103
Owrzodzenia błon śluzowych	0	1 (2,2%)	1,0000
Zapalenie błon surowiczych	3 (16,7%)	1 (2,2%)	0,0668
Gorączka	3 (16,7%)	3 (6,7%)	0,3408
Leukopenia (WBC<3 000/μl)	0	3 (6,7%)	0,5513
Małopłytkowość (PLT<100 000/μl)	3 (16,7%)	0	<b>0,0205</b>
Niedokrwistość (Hb< 12.0 g/dl)	9 (50,0%)	16 (35,6%)	0,3938
<b>Objawy zajęcia nerek</b>			
Wąleczkomocz (erytrocytarne, ziarniste)	15 (83,3%)	5 (11,1%)	<b>&lt;0,0001</b>
E (bez ZUM lub kamicy)	14 (77,8%)	19 (42,2%)	<b>0,0132</b>
L (bez ZUM lub kamicy)	14 (77,8%)	14 (31,1%)	<b>0,0016</b>
Białkomocz (>0.5 g/24h)	18 (100,0%)	24 (53,3%)	<b>0,0002</b>
Obniżenie GFR <60 ml/min/1,73m <sup>2</sup> w ciągu ostatniego miesiąca	4 (22,2%)	3 (6,7%)	0,0954
<b>Parametry immunologiczne</b>			
Dodatnie ANA	18 (100,0%)	39 (86,7%)	0,1704
Dodatnie pc p-dsDNA	15 (83,3%)	33 (73,3%)	0,5219
Dodatnie pc p-Ns	11 (28,9%)	6 (13,3%)	<b>0,0003</b>
Dodatnie pc p-C1q	16 (88,9%)	27 (60,0%)	<b>0,0357</b>
Dodatnie pc p-Ro (SS-A)	5 (27,8%)	15 (33,3%)	0,7703
Dodatnie pc p-La (SS-B)	0	7 (15,6%)	0,1774
Dodatnie pc p-Sm	1 (5,6%)	4 (8,9%)	1,0000
Dodatnie pc p-RNP	3 (16,7%)	4 (8,9%)	0,3971
Dodatnie pc p-rybosomalnemu białku P	2 (11,1%)	1 (2,2%)	0,1939
Dodatnie pc p-histonom	6 (33,3%)	8 (17,8%)	0,1966
Dodatnie pc p-PCNA	3 (16,7%)	1 (2,2%)	0,0668
Dodatnie pc p-CENP B	1 (5,6%)	0	0,2857
Dodatnie pc p-AMA M2	2 (11,1%)	2 (4,4%)	0,5712
Dodatnie pc p-kardiolipinie	4 (22,2%)	3 (6,7%)	0,0954
Dodatnie pc p-β2 glikoproteinie 1	1 (5,6%)	6 (13,3%)	0,6621
Dodatnie KKI-C1q	5 (27,8%)	23 (51,1%)	0,1596
Obniżone stężenie C3 w surowicy	16 (88,9%)	26 (57,8%)	<b>0,0201</b>
Obniżone stężenie C4 w surowicy	10 (55,6%)	18 (40,0%)	0,2789

W grupie chorych na PKZN z ZN stwierdzono częstsze występowanie niedokrwistości ( $p<0,05$ ) oraz obniżonego stężenia całkowitych IgG (88,2% vs. 30%,  $p<0,001$ ), albumin i TP w surowicy ( $p<0,0001$  dla obu). Nie wykazano natomiast różnic w średnich stężeniach pc p-C1q i p-dsDNA między grupami. Jedynie stężenia



KKI-C1q były znacznie niższe w grupie chorych z ZN niż w surowicy chorych bez ZN ( $p < 0,0001$ ).

#### **4.14. Porównanie wybranych danych klinicznych i laboratoryjnych pomiędzy chorymi ze stwierdzoną E i bez E**

W grupie chorych na TZN, u których występowała E stwierdzono także znacznie częstsze występowanie pozostałych objawów zajęcia nerek, jak: wałeczkomoczu, L i ZN. Wszystkich chorych z E zaliczono do grupy aTZN. Z pozostałych objawów pozanerkowych, u chorych z E stwierdzono częstsze występowanie niedokrwistości niż u tych bez E. Występowanie E wiązało się z częstszym wykrywaniem pc ANA, p-C1q i p-dsDNA oraz obniżonym stężeniem C3 w surowicy.

W grupie chorych z E zaobserwowano znacznie wyższe stężenia pc p-C1q ( $p < 0,0005$ ), p-dsDNA ( $p < 0,0001$ ) oraz niższe C3 ( $p < 0,005$ ) i C4 ( $p < 0,05$ ) w surowicy. Występowanie E wiązało się w wyższą punktacją zarówno w skali SLEDAI-2K, jak i SLEDAI-N ( $p < 0,0001$ ). Wykazano też u nich niższe stężenia albumin ( $p < 0,001$ ), Hb ( $p < 0,01$ ) oraz wyższe miana ANA ( $p < 0,05$ ). Otrzymane wyniki przedstawiono w **tabeli 17**.

**Tabela 17.** Dane kliniczne, biochemiczne i immunologiczne chorych na TZN ze stwierdzoną erytrocyturią i bez erytrocyturii

	TZN z E (n=33)	TZN bez E (n=30)	P
<b>Objawy pozanerkowe</b>			
Zaburzenia neurologiczne	6 (18,2%)	3 (10,0%)	0,4788
Zapalenie naczyń	1 (3,0%)	0	1,0000
Zapalenie stawów	1 (3,0%)	1 (3,3%)	1,0000
Zmiany skórne	5 (15,2%)	5 (16,7%)	1,0000
Owrzodzenia błon śluzowych	0	1 (3,3%)	0,4762
Zapalenie błon surowiczych	4 (12,1%)	0	0,1147
Gorączka	4 (12,1%)	2 (6,7%)	0,6740
Leukopenia (WBC<3 000/μl)	2 (6,1%)	1 (3,3%)	1,0000
Małopłytkowość (PLT<100 000/μl)	5 (15,2%)	2 (6,7%)	0,4295
Niedokrwistość (Hb< 12.0 g/dl)	19 (57,6%)	6 (20,0%)	<b>0,0042</b>
<b>Objawy zajęcia nerek</b>			
Wąleczkomocz (erytrocytarne, ziarniste)	19 (57,6%)	1 (3,3%)	<b>&lt;0,0001</b>
L (bez ZUM lub kamicy)	24 (72,7%)	4 (13,3%)	<b>&lt;0,0001</b>
Białkomocz (>0.5 g/24h)	29 (87,9%)	13 (43,3%)	<b>0,0004</b>
ZN	16 (48,5%)	2 (6,7%)	<b>0,0002</b>
Obniżenie GFR <60 ml/min/1,73m <sup>2</sup> w ciągu ostatniego miesiąca	5 (15,2%)	2 (6,7%)	0,4295
<b>Parametry immunologiczne</b>			
Dodatnie ANA	33 (100,0%)	24 (80,0%)	<b>0,0087</b>
Dodatnie pc p-dsDNA	30 (90,9%)	18 (60,0%)	<b>0,0067</b>
Dodatnie pc p-Ns	10 (30,3%)	7 (23,3%)	0,5811
Dodatnie pc p-C1q	28 (84,8%)	15 (50,0%)	<b>0,0060</b>
Dodatnie pc p-Ro (SS-A)	9 (27,3%)	10 (33,3%)	0,7840
Dodatnie pc p-La (SS-B)	3 (9,1%)	4 (13,3%)	0,6997
Dodatnie pc p-Sm	1 (3,0%)	4 (13,3%)	0,1827
Dodatnie pc p-RNP	4 (12,1%)	3 (10,0%)	1,0000
Dodatnie pc p-rybosomalnemu białku P	1 (3,0%)	2 (6,7%)	0,6011
Dodatnie pc p-histonom	9 (27,3%)	5 (16,7%)	0,3735
Dodatnie pc p-PCNA	4 (12,1%)	0	0,1147
Dodatnie pc p-CENP B	1 (3,0%)	0	1,0000
Dodatnie pc p-AMA M2	3 (9,1%)	1 (3,3%)	0,6144
Dodatnie pc p-kardiolipinie	6 (18,2%)	1 (3,3%)	0,1069
Dodatnie pc p-β2 glikoproteinie 1	3 (9,1%)	4 (13,3%)	0,6997
Dodatnie KKI-C1q	16 (48,5%)	12 (40,0%)	0,6134
Obniżone stężenie C3 w surowicy	27 (81,8%)	15 (50,0%)	<b>0,0150</b>
Obniżone stężenie C4 w surowicy	10 (30,3%)	10 (33,3%)	1,0000

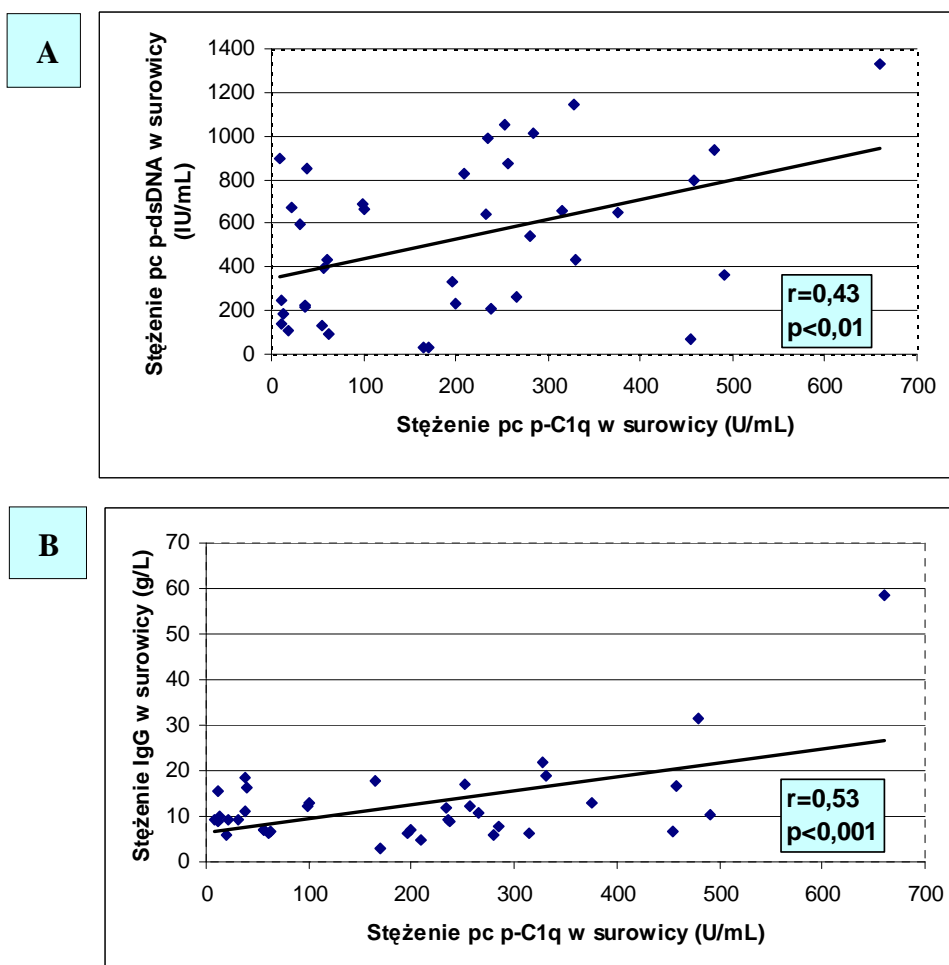
W grupie chorych na PKZN występowanie E wiązało się z częstszym wykrywaniem obniżonego stężenia całkowitych IgG ( $p<0,05$ ) i istotnie statystycznie wyższymi stężeniami KKI-C1q ( $p<0,05$ ).

#### 4.15. Badanie wzajemnych korelacji między wybranymi parametrami immunologicznymi, klinicznymi i biochemicznymi

##### 4.15.1. Badanie wzajemnych korelacji między wybranymi parametrami immunologicznymi, klinicznymi i biochemicznymi u chorych na TZN

##### 4.15.1.1. Badanie wzajemnych korelacji między wybranymi parametrami immunologicznymi, klinicznymi i biochemicznymi u chorych na aTZN i naTZN

W grupie chorych na aTZN wykazano istotne statystycznie dodatnie korelacje między stężeniem pc p-C1q i p-dsDNA oraz pc p-C1q i całkowitych IgG w surowicy (**Ryc. 29A,B**). U chorych z wysokimi stężeniami pc p-C1q wykazano również tendencję do niższych stężeń albumin w surowicy, chociaż stwierdzona korelacja była jedynie bliska istotności statystycznej ( $r=-0,31$ ;  $p=0,057$ ).



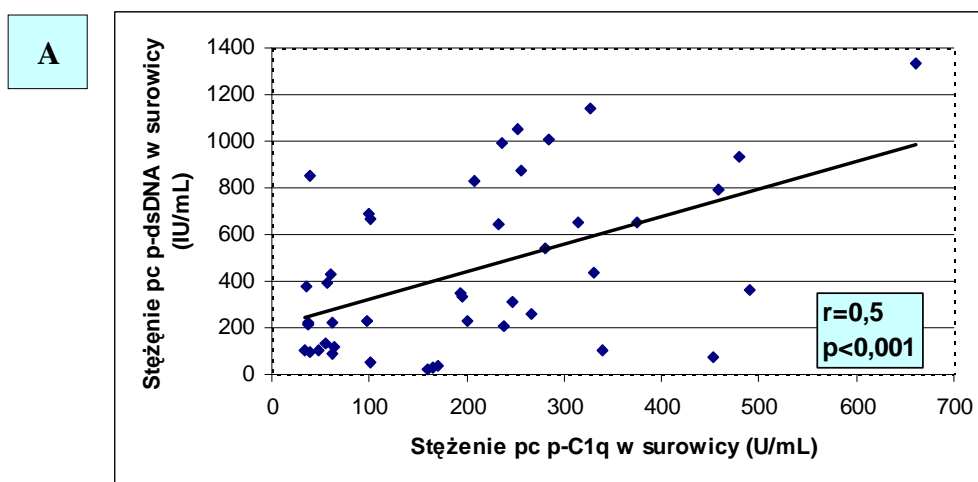
**Ryc. 29.** Korelacje między stężeniami pc p-C1q i p-dsDNA (A) oraz pc p-C1q i całkowitych IgG (B) w surowicy chorych na aTZN.

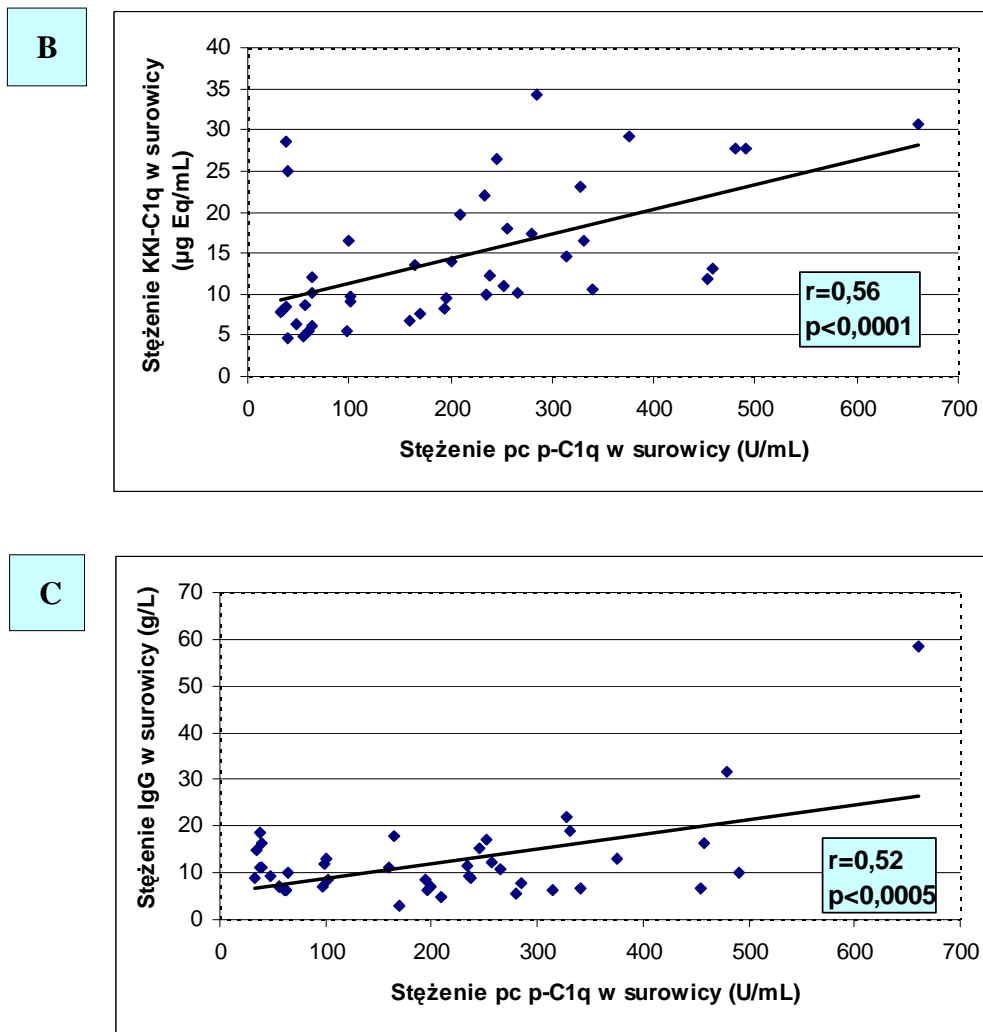
Stężenie pc p-dsDNA korelowało dodatnio ze stężeniem całkowitych IgG ( $r=0,51$ ;  $p=0,001$ ) i ujemnie ze stężeniem składowych dopełniacza C3 ( $r=-0,4$ ;  $p<0,05$ ) i C4 ( $r=-0,36$ ;  $p<0,05$ ) w surowicy, czego nie wykazano w przypadku pc p-C1q. Stężenia pc p-dsDNA korelowały ujemnie z liczbą WBC we krwi chorych na aTZN ( $r=-0,33$ ;  $p<0,05$ ). Ujemną korelację zaobserwowano również między stężeniem C3 i IgG w surowicy ( $r=-0,36$ ;  $p<0,05$ ), a dodatnią między stężeniem C3 i C4 ( $r=0,48$ ;  $p<0,005$ ). Nie stwierdzono korelacji między stężeniem żadnych z badanych pc, KKI-C1q czy składowych dopełniacza a aktywnością choroby ocenianej zarówno w skali SLEDAI-2K, jak i SLEDAI-N.

Wśród chorych na naTZN, nie obserwowano istotnych korelacji między stężeniem pc p-C1q i pozostałymi badanymi parametrami immunologicznymi. Natomiast podobnie jak w grupie aTZN, dodatnią korelację stwierdzono między stężeniami C3 i C4 w surowicy ( $r=0,76$ ;  $p<0,0001$ ).

#### 4.15.1.2. Badanie wzajemnych korelacji między wybranymi parametrami immunologicznymi, klinicznymi i biochemicznymi u chorych na TZN p-C1q(+) i TZN p-C1q(-)

Analiza chorych na TZN p-C1q(+) wykazała dodatnie korelacje między stężeniem pc p-C1q i p-dsDNA, KKI-C1q oraz IgG w surowicy (**Ryc. 30A,B,C**). Poza tym zaobserwowano ujemne korelacje między stężeniami pc p-C1q i hemoglobiny ( $r=-0,35$ ;  $p<0,05$ ) i albumin ( $r=-0,39$ ;  $p<0,05$ ) w surowicy.





**Ryc. 30.** Korelacje między stężeniami pc p-C1q i p-dsDNA (A), pc p-C1q i KKI-C1q (B) oraz pc p-C1q i całkowitych IgG (C) w surowicy chorych na TZN p-C1q(+).

W grupie TZN p-C1q(+) wykazano dodatnie korelacje między aktywnością choroby ocenianej wg skali SLEDAI-2K a stężeniem pc p-dsDNA ( $r=0,32$ ;  $p<0,05$ ), KKI-C1q ( $r=0,4$ ;  $p<0,01$ ) i ujemną w stosunku do C3 ( $r=-0,5$ ;  $p<0,001$ ). Poza tym, wykazano dodatnie korelacje między stężeniem pc p-dsDNA i KKI-C1q ( $r=0,59$ ;  $p<0,0001$ ), IgG ( $r=0,54$ ;  $p<0,0005$ ), a ujemną z C3 ( $r=-0,54$ ;  $p<0,0005$ ). Stężenie C3 korelowało ujemnie ze stężeniem KKI-C1q ( $r=-0,5$ ;  $p<0,001$ ) i IgG ( $r=-0,39$ ;  $p<0,05$ ) oraz dodatnio z C4 ( $r=0,42$ ;  $p<0,005$ ) w surowicy. Wysokie stężenia pc p-dsDNA były związane z obniżoną liczbą WBC ( $r=-0,33$ ;  $p<0,05$ ) i niskim poziomem albumin ( $r=-0,43$ ;  $p<0,005$ ) w surowicy chorych. Ujemną korelację zaobserwowano między stężeniem KKI-C1q a liczbą WBC ( $r=-0,52$ ;  $p<0,0005$ ) i RBC ( $r=-0,31$ ;

$p < 0,05$ ) we krwi badanych. Wykazano także korelacje między stężeniami C3 a albumin ( $r = 0,49$ ;  $p < 0,001$ ) i liczbą RBC ( $r = 0,49$ ,  $p = 0,001$ ).

#### **4.15.2. Badanie wzajemnych korelacji między wybranymi parametrami immunologicznymi, klinicznymi i biochemicznymi u chorych na PKZN**

##### **4.15.2.1. Badanie wzajemnych korelacji między wybranymi parametrami immunologicznymi, klinicznymi i biochemicznymi u chorych na PKZN-R i PKZN-NR**

W grupie PKZN-R wykazano dodatnie korelacje między stężeniami pc p-C1q i KKI-C1q ( $r = 0,49$ ;  $p < 0,0001$ ), pc p-C1q i całkowitych IgG ( $r = 0,28$ ;  $p < 0,005$ ) oraz ujemne między pc p-C1q i C3 ( $r = -0,23$ ;  $p < 0,05$ ) oraz pc p-C1q i C4 ( $r = -0,25$ ;  $p < 0,05$ ). Stwierdzono tendencję do występowania wyższych stężeń pc p-C1q w surowicy badanych, u których czas jaki upłynął między wykonaniem badania a biopsją nerki był krótszy ( $r = -0,49$ ;  $p < 0,05$ ). Poza tym wykazano ujemne korelacje między stężeniem KKI-C1q i C3 ( $r = -0,39$ ;  $p < 0,0001$ ) oraz KKI-C1q i liczbą RBC we krwi ( $r = -0,27$ ;  $p < 0,05$ ). Chorzy z niskim C3 w surowicy charakteryzowali się niższym GFR ( $r = 0,27$ ;  $p < 0,01$ ). Stwierdzono także korelację między stężeniami C1q i całkowitych IgG ( $r = -0,26$ ;  $p < 0,01$ ) w surowicy. Poza tym wykazano ujemną znamioną korelację między stężeniem całkowitych IgG w surowicy a  $U_{\text{prot}}$  ( $r = -0,53$ ,  $p < 0,0001$ ).

W MesPGN, stężenie pc p-C1q korelowało ze stężeniem KKI-C1q ( $r = 0,5$ ;  $p < 0,0001$ ), całkowitych IgG ( $r = 0,28$ ;  $p < 0,01$ ), C3 ( $r = -0,26$ ;  $p < 0,05$ ) i C4 ( $r = -0,28$ ,  $p < 0,01$ ), a w grupie z MPGN stwierdzono zależność między pc p-C1q i KKI-C1q ( $r = 0,94$ ;  $p < 0,005$ ). W obu grupach stwierdzono ujemną korelację między stężeniem całkowitych IgG w surowicy a  $U_{\text{prot}}$  ( $r = -0,49$ ,  $p < 0,0001$  w MesPGN i  $r = -0,54$ ,  $p < 0,005$  w MPGN).

W PKZN-NR, stężenie KKI-C1q korelowało z ekspresją mRNA C1q-L ( $r = 0,47$ ;  $p < 0,05$ ).

W grupie chorych na IMGN stwierdzono ujemną korelację między stężeniami KKI-C1q i C3 w surowicy ( $r = -0,47$ ;  $p < 0,05$ ).

#### **4.15.2.2. Badanie wzajemnych korelacji między wybranymi parametrami immunologicznymi, klinicznymi i biochemicznymi u chorych na PKZN p-C1q(+) i PKZN p-C1q(-)**

U chorych na PKZN p-C1q(+) stwierdzono, że stężenie pc p-C1q koreluje tylko ze stężeniem całkowitych IgG w surowicy ( $r=0,56$ ;  $p<0,001$ ). Zaobserwowano także ujemną korelację między stężeniami KKI-C1q i C3 ( $r=-0,53$ ;  $p<0,005$ ) w surowicy.

W grupie PKZN p-C1q(-) nie wykazano istotnych statystycznie korelacji między badanymi markerami immunologicznymi.

## 5. OMÓWIENIE I DYSKUSJA

### 5.1. Analiza występowania pc p-C1q i innych markerów immunologicznych w surowicy

Wyniki badań własnych wykazały znacznie częstsze występowanie pc p-C1q w surowicy chorych na TZN (68,1%) niż na PKZN (23%) i u ZO (10,5%). Również stężenia tych pc były znacznie wyższe w grupie TZN niż PKZN i K. Uzyskane wyniki są zgodne z dotychczas przeprowadzonymi badaniami, w których pc p-C1q stwierdzano u 21-62% chorych na TRU, a nawet do 100% w przypadkach TRU przebiegającego z zajęciem nerek [85,89,94,100-110,118,119,123,147,148]. Jedynie Julkunen i wsp. porównując 2 testy ELISA wykrywające pc p-C1q w surowicy, zaobserwował rzadsze występowanie tych pc zarówno w ogólnej populacji chorych na TRU (17% i 18%), jak i w przypadku TZN (40% i 44%). Warto jednak podkreślić, że ze względu na wysoką częstość wykrywania pc p-C1q wśród ZO (23,5%-37,8%) w przypadku zastosowania zakresu norm sugerowanych przez firmę, powyżsi badacze przyjęli znacznie wyższe punkty odcięcia dla obu testów. Mogło to stanowić główną przyczynę uzyskania przez nich odmiennych wyników [143]. Zgodnie z dotychczasowymi doniesieniami częstość wykrywania pc p-C1q w surowicy osób zdrowych mieści się w zakresie od 0% (głównie u dzieci) do 18% (w ósmej dekadzie życia), co potwierdzono także w obecnej pracy [84,96-99,107,108,118,149].

W badaniach własnych nie wykrywano pc p-C1q w grupie SVV, zarówno p-ANCA (+), jak i p-cANCA (+). Mogło to być spowodowane niewielką liczbą chorych objętych badaniem i/lub występowaniem u tych chorych głównie pc p-C1q klasy IgA na co wskazywał Siegert i wsp. [91]. W grupie PKZN, pc p-C1q występowały wprawdzie statystycznie częściej niż wśród ZO, lecz nie wykazano istotnych różnic między poszczególnymi typami morfologicznymi PKZN. Takie same obserwacje poczyniono analizując średnie stężenia tych pc w surowicy. Przeciwciała przeciw C1q wykrywano dotychczas z różną częstością wśród chorych na PKZN. Jednak, tylko w pojedynczych badaniach porównywano ich wykrywanie w poszczególnych typach PKZN. Siegert i wsp. badał chorych na MPGN, IMGN, MCD, FSGS, IgA-GN oraz ExGN z pc p-GBM, jednak liczebność poszczególnych grup była bardzo mała (od 3 do 8 chorych) [83]. W obecnej pracy badaniem objęto 107 chorych na PKZN-R i 32 na PKZN-NR, co zwiększa wiarygodność



otrzymanych wyników. Przy porównaniu wyników badań własnych z dostępnymi w literaturze można stwierdzić, że wyniki badań własnych wykazały rzadszą wykrywalność pc p-C1q w MPGN, natomiast w IMGN częstość ta była zbliżona do stwierdzanej przez innych badaczy [83,92,111,112]. Strife i wsp. wykrywali pc p-C1q u 54% chorych na MPGN, zwłaszcza typu I (73%) [111]. W tej grupie chorych dominującymi były pc w klasie IgG3 [92]. W odróżnieniu od innych autorów, w obecnym badaniu pc p-C1q nie wykrywano u chorych na FSGS [83]. Należy jednak podkreślić, że grupa obejmowała tylko 6 chorych, dlatego niezbędne jest zwiększenie liczebności grupy celem weryfikacji otrzymanych wyników. W przypadku MesPGN, pc p-C1q wykrywano u 22,4%, a uwzględniając wyłącznie chorych z IgA-GN, u 27,8%. Jednak w przypadku ostatniego rozpoznania wyniki dotychczasowych badań wskazują, że podobnie jak w SVV, w surowicy chorych dominują pc klasy IgA, a częstość występowania pc w klasie IgG określano na 3% [83,112]. Z tego powodu otrzymane wyniki mogą się różnić od uzyskanych przez Siegerta i wsp.

W odróżnieniu od PKZN, w których związek między wykrywaniem pc p-C1q w surowicy a uszkodzeniem kłębuszków nerkowych wydaje się nadal mało poznany, znacznie więcej dotychczasowych badań dotyczyło roli tych pc w patogenezie TRU. Wyniki ostatnich badań sugerują użyteczność oznaczania pc p-C1q w surowicy zwłaszcza w ocenie ryzyka rozwoju TZN w przebiegu TRU. Marto i wsp. zaobserwowali rozwój TZN (we wszystkich przypadkach ze zmianami proliferacyjnymi) w ciągu 2 do 12 miesięcy (średnio 9 miesięcy) u 27,3% chorych na TRU, u których podczas pierwszego badania wykryto pc p-C1q w surowicy pomimo braku objawów zajęcia nerek. Należy podkreślić, że u żadnego chorego z ujemnymi pc w surowicy w momencie rozpoczęcia badania nie zaobserwowawano objawów TZN podczas kolejnych miesięcy obserwacji [110]. Wśród chorych na TRU przebiegającego z zajęciem nerek wykazano częstsze występowanie pc p-C1q w surowicy, a ich stężenia były znacznie wyższe niż w grupie chorych bez objawów TZN [105,107,119,123,153]. Czulość pc p-C1q w diagnozowaniu TZN (zwłaszcza aTZN ze zmianami proliferacyjnymi) określana jest na 44-100%, a specyficzność na 70-92%. Podkreśla się wysoką NPV sięgającą 81-100% i dużo słabszą PPV (19-68%) [89,102,105,108-110,142]. Moura i wsp. sugerują, że ze względu na niewielkie prawdopodobieństwo występowania TZN w przypadku ujemnych pc p-C1q w surowicy, ich rutynowe oznaczanie mogłoby zmniejszyć ilość wykonywanych biopsji u

chorych na TRU [106]. Coremans i wsp. sugerują nawet, że pc p-C1q, w odróżnieniu od powszechnie stosowanych pc p-dsDNA, pozwalają zróżnicować zbliżające się zaostrzenie z zajęciem nerek od nawrotu przebiegającego wyłącznie z objawami pozanerkowymi [137]. Nieco odmienne wyniki otrzymali Zhang i wsp. oraz Oelzner i wsp. Obydwe grupy badaczy nie zaobserwowały istotnych zależności między wykrywaniem pc p-C1q w surowicy chorych na TRU a wystąpieniem TZN w przebiegu choroby [102,147]. Według Zhanga i wsp., w diagnostyce TZN istotną rolę odgrywa nie tyle stwierdzenie dodatnich pc p-C1q w surowicy, ale określenie ich stężeń. Dopiero znacznie podwyższone wartości pc p-C1q sugerują rozwój TZN [147]. W obecnej pracy, ze względu na brak grupy kontrolnej w postaci chorych na TRU bez zajęcia nerek, nie było możliwe ustosunkowanie się do omówionych powyżej poglądów dotyczących roli pc p-C1q w różnicowaniu chorych na TRU z TZN i bez TZN. Jednak wykrycie tych pc w surowicy u 68,3% chorych z potwierdzonym TZN sugeruje, że ich pojawienie się wydaje się być istotnym dla wystąpienia TZN w przebiegu TRU.

W powyższym kontekście, wyniki badań własnych wykazały największą częstość wykrywania (81,6%) oraz najwyższe stężenia pc p-C1q wśród chorych na aTZN. Istotnie statystycznie różnice stwierdzono zwłaszcza między aTZN i K, ale także między aTZN i naTZN. Podobnie jak wielu innych badaczy, do oceny aktywności TZN użyto skali SLEDAI-2K uwzględniającej kryteria immunologiczne oraz objawy zajęcia nerek i objawy pozanerkowe [88,102,105,118,119]. Dodatkowym kryterium stworzonym na potrzeby obecnego badania była punktacja uzyskana w skali SLEDAI-N, w której oceniano wyłącznie aktywność procesu chorobowego w nerkach, a nie w innych narządach zajętych w przebiegu TRU. W ocenie aktywności TRU używanych jest kilka skal (SLEDAI, SLAM, ECLAM), które oceniają jednak głównie aktywność ogólną TRU, natomiast nie określają nasilenia zmian chorobowych w poszczególnych narządach. Brak jednoznacznej definicji aTZN stanowi istotny problemem w przypadku porównywania wyników dotychczas przeprowadzonych badań i może być przyczyną istnienia rozbieżności między nimi [151]. Niektórzy badacze w ocenie aktywności TZN uwzględniają dodatkowo zmiany histopatologiczne, inni opierają się wyłącznie na wynikach badań biochemicznych [104,107,110,119,151,152,154]. Przyjęte w badaniach własnych kryteria oceny aktywności TZN wydają się być właściwe, ponieważ niemal wszyscy chorzy z E i ZN zostali zakwalifikowani do grupy z aTZN. Istotnie statystycznie

częściej stwierdzano także w tej grupie występowanie walczkomoczu oraz leukocyturii oraz pogorszenia funkcji nerek w okresie ostatniego miesiąca obserwacji. Spośród objawów pozanerkowych aTZN towarzyszyły także objawy neurologiczne i hematologiczne. Częściej też stwierdzano w tej podgrupie podwyższone miano ANA. Warto podkreślić, że z wyników badań własnych wynika, że autoprzeciwciała oznaczane standardowo w tzw. panelu ANA wydają się mieć mniejsze znaczenie w różnicowaniu chorych z aTZN i naTZN [108].

Pomimo, że w aTZN nie stwierdzono korelacji między stężeniem pc p-C1q w surowicy a punktacją w skali SLEDAI-2K i SLEDAI-N, to jednak wyniki wieloczynnikowej wstecznej analizy logistycznej wykazały największe znaczenie występowania pc p-C1q oraz obniżonego stężenia C3 w surowicy w ocenie aktywności TRU, jak i TZN, czego kliniczną prezentacją było występowanie E. Rolę pc p-C1q w ocenie aktywności TZN podkreślają także inni badacze [102,109,110,142,154]. Akhter i wsp., porównując częstość wykrywania pc p-C1q i p-dsDNA oraz obniżonego C3, C4 w surowicy, wykazali przewagę oznaczania pc p-C1q nad innymi markerami serologicznymi, zarówno w ocenie aktywności TZN, jak i ogólnej aktywności TRU [15]. Natomiast Katsumata i wsp. wykazali związek między obecnością pc p-C1q w surowicy i ogólną aktywnością TRU, ale (przeciwie do innych badaczy) nie zaobserwowali korelacji z aktywnością TZN [118]. Jednak, spośród 126 chorych na TRU objętych tym badaniem, TZN rozpoznano tylko u 21 chorych, co mogło mieć wpływ na uzyskane wyniki.

Przy analizie badań porównujących wartość predykcyjną markerów serologicznych, takich jak wykrywane pc p-C1q, p-dsDNA oraz obniżonych stężeń składowych dopełniacza C1q, C3 i C4 w diagnozowaniu i ocenie aktywności TZN, należy zauważyć, że w przypadku żadnego z nich nie wykazano odpowiednio wysokiej swoistości dla TZN, a w szczególności bardzo niska była PPV tych parametrów oznaczanych samodzielnie [88,102-105,142,152,155,156]. Wyniki badań własnych wydają się to potwierdzać. Największą swoistość dla WKZN, zwłaszcza dla TRU wykazywały pc p-dsDNA. Warto tutaj podkreślić, że do badań użyto testu ELISA III generacji, w którym dwuniciowe DNA tworzyło kompleks z nukleosomami. Takie połączenie ma na celu eliminację niespecyficznych reakcji z surowicami chorych na sklerodermię, które stwierdzano w testach niższej generacji, gdy używano siarczanu protaminy jako łącznika między dsDNA a mikrocząstką. W obecnym badaniu pc p-dsDNA nie były wykrywane w grupie PKZN i wśród ZO, co

sugeruje użyteczność zastosowanego testu w różnicowaniu chorych na TZN i PKZN. Jednak pc p-dsDNA występowały zarówno w aTZN, jak i naTZN, a ich średnie stężenia nie różniły się między tymi grupami. Wykrywanie pc p-dsDNA w surowicy wiązało się wprawdzie z wyższą punktacją w skali SLEDAI-2K i wyższymi stężeniami badanych pc, KKI oraz niższymi stężeniami C3 i C4, lecz z objawów nerkowych częściej występowała tylko E. Jednak, w wieloczynnikowej wstecznej analizie logistycznej zależność między występowaniem pc p-dsDNA i pojawieniem się E nie osiągnęła poziomu istotności statystycznej. Ponadto nie stwierdzono związku między wykrywaniem pc p-dsDNA i występowaniem ZN, jak również aktywnością TRU ocenianą w skali SLEDAI-2K. Tą ostatnią korelację stwierdzono w przypadku pc p-C1q. Poza tym, zaobserwowano zarówno większą częstość wykrywania, jak i istotne statystycznie różnice w średnich stężeniach pc p-C1q między chorymi na aTZN i naTZN. Podobne obserwacje poczyniono w odniesieniu do KKI-C1q. Jednak obydwa parametry wykazywały mniejszą swoistość dla TRU w porównaniu z pc p-dsDNA. Wykrywano je także w surowicy chorych na PKZN i w grupie K.

Wyniki badań własnych wykazały bardzo szeroki zakres norm określających stężenie C1q zarówno w surowicy ZO, jak i chorych na PKZN i WKZN, a stężenia C1q poniżej dolnej granicy wykrywalności dla użytego testu stwierdzono wyłącznie u 3 chorych na KZN. Natomiast Trendelenburg i wsp. wykazali obniżone stężenia C1q aż u 42% chorych na TZN [154]. Stwierdzili oni także ujemną korelację między stężeniem C1q i pc p-C1q w surowicy, podobnie jak Horák i wsp. oraz Katsumata i wsp. [118,150,154]. Gunnarsson i wsp. wykazali wysoką wartość predykcyjną obniżonego stężenia C1q (zwłaszcza w połączeniu z albuminurią) w przewidywaniu wyniku histopatologicznego biopsji nerki wśród chorych na TZN. Utrzymujące się niskie stężenia C1q, zarówno w momencie wykonywania pierwszej diagnostycznej biopsji nerki, jak i kolejnej (po zakończeniu leczenia), wskazywało na obecność aktywnych zmian proliferacyjnych i brak odpowiedzi na zastosowane leczenie [157]. W badaniach własnych nie wykazano związku między stężeniem C1q w surowicy a aktywnością TZN. Co więcej, nie zaobserwowano różnic w średnich stężeniach między chorymi na PKZN, TZN, SVV oraz grupą K. Nie obserwowano także korelacji między stężeniami pc p-C1q, p-dsDNA, KKI-C1q, a także C3, C4 i stężeniem C1q w żadnej z badanych grup. Większą swoistość dla TZN wykazano w przypadku obniżonych stężeń składowych

C3 i C4 w surowicy. Dotyczyło to zwłaszcza wykrywania obniżonego stężenia C4 w surowicy, które stwierdzano niemal wyłącznie wśród chorych na TZN, zwłaszcza z aktywnym procesem chorobowym. Jednak średnie stężenia C4 nie różniły się istotnie między grupami aTZN i naTZN. Natomiast w odniesieniu do C3, istotne statystycznie różnice wykazano zarówno, co do częstości występowania jego obniżonego stężenia, jak i średnich stężeń między aTZN i naTZN. Jednak stężenie C3 poniżej dolnej granicy normy stwierdzano także u 13,8% chorych na PKZN, głównie z MPGN, co sugeruje zaangażowanie alternatywnej drogi aktywacji UD w rozwój tej postaci PKZN [13,55].

Wyniki badań własnych wskazują na dużą przydatność jednoczesnego oznaczania pc p-C1q i p-dsDNA w surowicy w ocenie aktywności TZN, co koresponduje z wynikami uzyskanymi także przez innych badaczy [102,104,156]. Uzyskane wyniki sugerują, że równoczesny brak obu pc w surowicy wyklucza obecność aTZN, natomiast wykrywanie obu pc w surowicy wskazuje na wysokie ryzyko rozwoju aTZN. Podobnie, stwierdzenie dodatnich pc p-C1q i KKI-C1q wskazuje na aktywny proces chorobowy. Julkunen i wsp. zaobserwowali natomiast, że pomimo stwierdzenia aTZN, aż u 15% chorych nie wykrywano pc p-C1q ani p-dsDNA w surowicy. Powyżsi badacze sugerują dużą wartość jednoczesnego oznaczania stężenia pc p-C1q i składowych C3 i C4 w monitorowaniu aktywności TZN [142]. Wyniki te są spójne z uzyskanymi w obecnej pracy, gdyż stwierdzenie ujemnych pc p-C1q i równocześnie prawidłowego stężenia obu składowych UD w surowicy praktycznie wykluczało obecność aTZN.

Poza przydatnością pc p-C1q w diagnostyce i ocenie aktywności TZN, dyskutowana jest ich rola w przewidywaniu zaostrzeń TZN. Dotyczy to głównie przypadków ze zmianami proliferacyjnymi i bez towarzyszącego wtórnego zespołu antyfosfolipidowego [155]. Fang i wsp. pc p-C1q wykrywali częściej w surowicy chorych ze zmianami proliferacyjnymi w kłębuszkach nerkowych niż w pozostałych klasach TZN. Występowanie pc p-C1q wiązało się z wyższym indeksem aktywności i niższym indeksem przewlekłości [119]. Jednocześnie, częściej stwierdzano w tej grupie chorych nasiloną proliferację komórek kłębuszka, występowanie produktów rozpadu jąder komórkowych, martwicy włókienkowej i nacieków leukocytarnych, co korespondowało ze zmianami stwierdzanymi w modelach zwierzęcych po podaniu myszom pc p-C1q [124,126]. Podobne zmiany w obrębie ludzkich kłębuszków nerkowych, związane z występowaniem pc p-C1q w surowicy,

stwierdził Cai i wsp. Najwyższe stężenia pc wykazano w surowicy chorych z IV klasą TZN [107]. Poza tym, pc p-C1q w klasie IgG1 i IgG3 stwierdzano znacznie częściej w przypadku klasy IV-G niż IV-S TZN [158]. Jednakże, istnieją również liczne doniesienia, w których nie wykazano różnic w częstości występowania pc p-C1q między proliferacyjnymi i nieproliferacyjnymi klasami TZN [102,110,123,153]. Również wyniki badań własnych wskazują na brak różnic w częstości występowania i średnich stężeniach pc p-C1q zarówno między proliferacyjnymi i nieproliferacyjnymi formami PKZN, jak i poszczególnymi klasami TZN.

Istotnym problemem w porównywaniu dotychczas przeprowadzonych badań dotyczących wykrywania pc p-C1q w surowicy jest stosowanie różnych metod ich oznaczania i punktów odcięcia wyznaczonych przez poszczególnych badaczy. Dlatego podkreśla się przewagę oceny stężenia pc p-C1q w surowicy nad określaniem ilości wyników dodatnich dla zastosowanego testu. Zhang i wsp. wykazali bardzo wysoką specyficzność (97,56%) oraz PPV (87,50%) pc p-C1q dla TZN, jednakże dopiero gdy jako punkt odcięcia zastosowano wartości 4-krotnie przekraczające oryginalnie proponowane przez producenta. Wysokie stężenia pc p-C1q w surowicy chorych wiązały się ze znaczną hipokomplementem, wyższą punktacją w skali SLEDAI, a przede wszystkim częstszym występowaniem białkomoczu i E [147].

Wyniki ostatnich badań wskazują na istotną przewagę monitorowania stężeń pc p-C1q nad pojedynczym ich oznaczeniem w surowicy. Wzrost stężenia pc p-C1q może wyprzedzać o 2-6 miesięcy zaostrzenie TZN [84,110,137,156]. Matrat i wsp. zaobserwowali stopniowy wzrost stężeń zarówno pc p-C1q, jak i p-dsDNA przed zaostrzeniem TZN, a następnie ich spadek po włączeniu leczenia. Jednak objawy kliniczne TZN były wcześniej zauważalne w przypadku monitorowania stężeń pc p-C1q niż p-dsDNA [15]. Coremans i wsp. stwierdzili, że zmiany w stężeniach pc p-C1q wyprzedzały zaostrzenie TRU przebiegające z zajęciem nerek, natomiast wzrost stężeń pc p-dsDNA zapowiadał zaostrzenie TRU niezależnie od tego czy towarzyszyły mu objawy ze strony nerek czy też nie [137]. Monitorowanie zmian w stężeniu pc p-C1q u poszczególnych chorych wydaje się też przydatne w ocenie skuteczności zastosowanego leczenia. Zaobserwowano obniżanie się stężeń pc p-C1q w surowicy po wdrożeniu leczenia immunosupresyjnego. Warto jednak podkreślić, że u większości chorych (od 47% do 67%) stężenia pc p-C1q nadal przekraczały górną granicę normy [105,106,119,154]. Poza tym, czas po którym

następowało istotne obniżenie się stężeń pc p-C1q w surowicy był różny (od 0,7 miesiąca do 15 miesięcy). Cai i wsp. sugerują, iż utrzymujące się stale podwyższone stężenia pc w surowicy, szczególnie 3 miesiące od wdrożenia terapii immunosupresyjnej, mogą sugerować oporność na leczenie i wskazują na gorsze rokowanie co do uzyskania remisji TZN [107]. Ciekawe spostrzeżenia poczynili także Fang i wsp., którzy obserwowali obniżanie się stężeń pc p-C1q po leczeniu, jednak tylko u 52,94% stwierdzono konwersję wyniku dodatniego na ujemny. Dotyczyło to 100% chorych, u których wykrywane pc należały do klasy IgG3, a tylko 53,85% w klasie IgG2 [119]. W obecnej pracy wykonywano jednorazowe oznaczenie stężeń pc p-C1q w surowicy chorych na PKZN i WKZN, poza tym obydwie grupy chorych nie były jednorodne. W ich skład wchodziłi chorzy zarówno z nowo postawioną diagnozą KZN, jak i znaczna część osób z wieloletnim wywiadem chorobowym, różnorodnym leczeniem w przeszłości i przyjmujący glikokortykosteroidy doustnie w trakcie wykonywanych badań. W związku z tym, niemożliwym było wyciągnięcie w obecnej pracy wniosków co do użyteczności pc p-C1q jako markera odpowiedzi na leczenie TZN.

Wyniki badań własnych wskazują na związek między wykrywaniem pc p-C1q w surowicy a występowaniem objawów klinicznych aTZN, do których należą E i ZN. U chorych z dodatnimi pc p-C1q stwierdzano wyższą aktywność choroby, zarówno ocenianej w skali SLEDAI-2K, jak i SLEDAI-N. Częściej wykrywano też u nich pc p-dsDNA oraz zaobserwowano niższe stężenia składowych dopełniacza C1q, C3 i C4. Moura i wsp. obserwowali częstsze występowanie białkomoczu oraz hipokomplementemii wśród chorych z wykrywanymi pc p-C1q w surowicy niż bez obecności tych pc [148]. Także Zhang i wsp. zaobserwowali związek między wykrywaniem pc p-C1q w surowicy i białkomoczem oraz hipokomplementemią i częstszym występowaniem pc p-Sm i p-Ns [147]. Tej ostatniej zależności nie stwierdzono w badaniach własnych. Wykazano wyłącznie różnice w występowaniu podwyższonego miana ANA, ale nie innych pc skierowanych przeciw poszczególnym antygenom jądrowym i cytoplazmatycznym. Jednak, w przypadku powyższych badań wyniki dotyczyły chorych z TRU niezależnie od występowania objawów zajęcia nerek w przebiegu choroby, a w badaniach własnych grupę badaną stanowili wyłącznie chorzy z TZN. Porównania 150 chorych z potwierdzonym biopsyjnie TZN, w zależności od wykrywania pc p-C1q w surowicy bądź braku tych pc, dokonał Fang i wsp. W grupie chorych na TZN p-C1q(+) stwierdzano niższe

stężenia C3, C4 oraz Hb i wyższą punktację w skali SLEDAI. Podobnie, jak w obecnej pracy, nie zaobserwowano różnic w częstości występowania objawów pozanerkowych [119].

Wyniki badań własnych wykazały, że wykrywanie pc p-C1q w surowicy jest związane z częstszym występowaniem oraz wyższymi stężeniami KKI-C1q w surowicy chorych na PKZN. Poza tym nie stwierdzono związku między występowaniem pc p-C1q i innymi objawami klinicznymi, czy parametrami serologicznymi w tej grupie chorych. W dostępnym piśmiennictwie brak badań porównujących chorych na PKZN z wykrywanymi pc p-C1q i bez tych pc w surowicy. Badanie własne stanowi także pierwsze, w którym badano korelację między stężeniem pc p-C1q i innymi parametrami immunologicznymi oraz biochemicznymi u chorych na PKZN. W PKZN-R stwierdzono dodatnią korelację między stężeniem pc p-C1q i KKI-C1q, całkowitych IgG oraz ujemną z C3, czego nie zaobserwowano w PKZN-NR. Może to wskazywać na udział pc p-C1q oraz KKI-C1q w aktywacji UD i rozwoju rozplamowych form KZN.

Wśród chorych na TZN, zaobserwowano dodatnią korelację między stężeniami pc p-C1q i p-dsDNA w grupach aTZN oraz TZN p-C1q(+). Zależność tą zaobserwowało także wielu innych badaczy [102,104,108,147,153], chociaż istnieją pojedyncze doniesienia, w których nie stwierdzano korelacji między stężeniami pc p-C1q i p-dsDNA w surowicy chorych na TRU [105]. W badaniach własnych wykazano także korelację między stężeniem pc p-C1q i całkowitych IgG w surowicy w grupie aTZN. Zaobserwowano też związek między wykrywaniem pc p-dsDNA w surowicy i występowaniem hipokomplementemii. Natomiast, w odróżnieniu od wyników dotychczasowych badań, nie stwierdzono zależności między stężeniami pc p-C1q i składowych dopełniacza C1q, C3 i C4 [100,103,118,150,154]. Sprzeczności w otrzymanych wynikach badań mogą wynikać z różnych metod oznaczania C1q w surowicy, braku standaryzacji testów, a także z tego, że badaniem objęto wyłącznie chorych na TZN, a nie jak w przypadku wielu publikacji populację chorych na TRU również bez objawów zajęcia nerek.

W kontekście cytowanych doniesień i uzyskanych wyników badań własnych, w których stwierdzono korelację między stężeniami pc p-C1q i p-dsDNA, prawdopodobną wydaje się hipoteza zaproponowana przez Fliermana i wsp., co do udziału pc p-C1q w patogenezie KZN [90]. Hipotezę tą mogą potwierdzać także omówione we wstępie wyniki uzyskane przez Trouw i wsp. na modelach



zwierzęcych [124-127]. Pojawienie się pc p-dsDNA w surowicy może sprzyjać formowaniu KKI, które są następnie odkładane w kłębuszkach nerkowych. W kolejnym etapie dochodzi do przyłączenia C1q do KI, a następnie wiązania przez pc p-C1q, które potęgują aktywację UD nasilając zapoczątkowany uprzednio przez KI stan zapalny. Efektem tego jest rozwój TZN i pojawienie się objawów, takich jak białkomocz i krwiomocz.

W badaniach własnych do wykrywania pc p-C1q użyto metody immunoenzymatycznej ELISA, istotą której jest ocena stężenia produktu białkowego w surowicy. Jednak nie umożliwia ona oceny rzeczywistej produkcji pc p-C1q, gdyż część z nich łączy się z C1q w surowicy tworząc KKI, lub odkłada w postaci depozytów w różnych tkankach, co zmniejsza ilość dostępnych wolnych pc p-C1q do oceny serologicznej. Gunnarson i wsp. porównali wykrywanie pc p-C1q za pomocą testu ELISA i tzw. techniki ELISPOT, która umożliwia ocenę produkcji tych pc przez obwodowe komórki jądrowe krążące we krwi. Wykrywalność pc p-C1q w surowicy chorych na TRU była znacznie wyższa w przypadku zastosowania techniki ELISPOT niż ELISA (71,4% vs. 47,6%). Pc wykrywane metodą ELISPOT korelowały wyraźniej z występowaniem proliferacyjnych klas TZN [159]. Podkreślić jednak należy, że wadą tej techniki jest to, iż uwzględnia ona wyłącznie komórki krążące, a nie obejmuje produkcji pc p-C1q przez komórki w obrębie tkanek, co wydaje się mieć istotne znaczenie w uszkodzeniu poszczególnych narządów.

Pewien problemem diagnostyczny przy wykrywaniu pc p-C1q w surowicy chorych na TRU stanowi możliwość występowania reakcji krzyżowych w związku z obecnością wspólnych epitopów w obrębie cząsteczki C1q i kolagenu typu II. Możliwość taką zasugerowali Heinz i wsp. na podstawie badań na modelach zwierzęcych [160]. Przeciwciała przeciw C1q i przeciw kolagenowi typu II mogą być obecne w surowicy chorych na TRU oraz na reumatoidalne zapalenie stawów. Przeciwciała przeciw kolagenowi typu II wydają się być przy tym znacznie bardziej specyficzne dla reumatoidalnego zapalenia stawów, natomiast pc p-C1q dominują w grupie chorych na TRU. Podobieństwo strukturalne związane jest z obecnością powtarzalnej sekwencji Gly-X-Y w regionie CRL-C1q i w cząsteczce kolagenu typu II. Kolejne badania z udziałem chorych na TRU i reumatoidalne zapalenie stawów nie potwierdziły jednak istnienia żadnych korelacji czy krzyżowych reakcji między pc p-C1q i przeciw kolagenowi typu II [161,162]. U niektórych chorych na TRU stwierdzono nawet tendencję do podwyższania się stężeń pc p-kolagenowi typu II z

równoczesnym obniżaniem się stężeń pc p-C1q po wdrożeniu terapii immunosupresyjnej [162]. Z dotychczas przeprowadzonych badań u chorych na TRU wynika, że oba typy pc wykazują odmienną immunogenność, a tym samym obecność w surowicy obu pc nie powinno wpływać na oznaczenie pc p-C1q w surowicy. Być może przeciwciała przeciw kolagenowi typu II odgrywają rolę w rozwoju zapalenia stawów w przebiegu TRU. W obecnej pracy, w badanej grupie chorych na TRU, zmiany stawowe stwierdzono wyłącznie u 2 osób.

## 5.2. Analiza występowania mutacji w genie C1qA

W badaniach własnych nie znaleziono mutacji w obrębie eksonu 2 genu kodującego łańcuch A składowej dopełniacza C1q wśród chorych na KZN i w grupie K. Jest to najczęściej stwierdzana mutacja w populacji chorych na TRU z wrodzonym niedoborem C1q. Stwierdzano ją wśród chorych pochodzących ze Słowacji, Cypru i Turcji [57,60,61]. Zamiana cytozyny na tyminę w pozycji 186 skutkuje usunięciem miejsca rozpoznawanego przez enzym restrykcyjny *PvuII*. Rezultatem tej zmiany byłoby uwidocznienie się po reakcji restrykcji prążka o długości 601 pz, bez podziału na 2 mniejsze fragmenty, czego nie wykazano w badanej grupie chorych. Nie wyklucza to jednak możliwości istnienia innego SNP w obrębie badanego w obecnej pracy genu C1qA.

Petry i wsp. odkryli obecność 2 tzw. cichych mutacji (zmiana pojedynczego nukleotydu nie wywołująca zmiany w kodowanej reszcie aminokwasowej) u wszystkich 11 badanych chorych z wrodzonym niedoborem C1q. Jedna dotyczyła zmiany G na A w obrębie tripletu kodującego Gly w pozycji 70 genu C1qA, druga natomiast miała związek z wymianą T na C w Pro w pozycji 14 w genie C1qC. W obu przypadkach osoby zdrowe z rodzin probantów były również często homo- lub częściej heterozygotami [74].

Racila i wsp. wykazali związek między występowaniem opisanego powyżej polimorfizmu w obrębie genu C1qA a rozwojem PSTRU. Stwierdzili ujemną korelację między obecnością tej mutacji i stężeniem białka C1q w surowicy zarówno w grupie chorych na PSTRU, jak i w zdrowej populacji [75]. Wyniki dotyczące chorych na TRU są jednak sprzeczne. Namjou i wsp. nie wykazali związku między badanymi 17 SNP w obrębie 3 genów C1q a rozwojem TRU wśród chorych pochodzenia Afro-Amerykańskiego i hiszpańskiego z obniżonym stężeniem C1q w surowicy. Niektóre z polimorfizmów były natomiast związane z niższym ryzykiem

rozwoju TZN [76]. Martens i wsp. stwierdzili zależność między pewnymi polimorfizmami w obrębie genu C1qB a rozwojem TRU, a także cięższym przebiegiem choroby. Zmiana pojedynczego nukleotydu w obrębie regionu paromotorowego genu C1qA miała niewielki wpływ na obniżone stężenie C1q i CH50 w surowicy chorych rasy kaukaskiej [77]. Rafiq i wsp. stwierdzili wprawdzie związek między jednym z polimorfizmów w genie C1qB i niższym stężeniem C1q, a wyższym C3 i C4 w surowicy, lecz nie wykazali oni zależności między polimorfizmami w genach C1q a predyspozycją do zachorowania na TRU [78].

### **5.3. Analiza ekspresji mRNA C1q w leukocytach krwi**

Wyniki badań własnych wykazały wyższą ekspresję mRNA C1q-L wśród chorych na KZN w porównaniu z grupą K. Mimo to, nie stwierdzono różnic w ekspresji mRNA C1q-L pomiędzy chorymi na PKZN i WKZN, ani też poszczególnymi typami PKZN oraz klasami TZN. Poziom ekspresji mRNA C1q nie różnił się także między chorymi z aktywnym i nieaktywnym procesem zapalnym w kłębuszkach nerkowych w przebiegu TRU. Należy podkreślić, że w obecnej pracy badano wyłącznie ekspresję mRNA dla łańcucha A składowej dopełniacza C1q. W skład genu C1qA wchodzi ekson 1 (175 bp) i ekson 2 (792 bp) oraz intron zawierający 1,1 kb. Udowodniono, że transkrypcja genów kodujących 3 łańcuchy C1q jest ściśle ze sobą zsynchronizowana. Jednak, w przypadku stymulacji makrofagów i komórek dendrytycznych za pomocą INF- $\gamma$  wykazano najwyższą ekspresję mRNA C1qB, a najniższą dla C1qA [52]. Dlatego nie można wykluczyć, że różnice w ekspresji mRNA dla poszczególnych typów łańcuchów C1q miały wpływ na uzyskane wyniki.

Warto podkreślić także wpływ niektórych leków na ekspresję mRNA C1q w leukocytach krwi, zwłaszcza glikokortykosteroidów, gdyż aż 76,2% chorych na TRU i 17% na PKZN w momencie wykonywania obecnego badania przyjmowała MP doustnie. Znaczna część chorych na TRU otrzymała w przeszłości również pulsy dożylnie MP, często łącznie z CYC. Trinder i wsp. badał wpływ NLPZ i glikokortykosteroidów na transkrypcję mRNA C1q, a następnie ekspresję produktu białkowego *in vitro*. Naukowcy zaobserwowali zwiększoną syntezę mRNA C1q przez makrofagi pod wpływem NLPZ, jednak nie miało to wpływu na stężenie produktu białkowego w surowicy. Przeciwny efekt obserwowano, gdy makrofagi poddano wcześniej działaniu czynników pozapalnych. W tym przypadku NLPZ

zmniejszały ekspresję C1q zarówno na poziomie mRNA, jak i produktu białkowego. Glikokortykosteroidy natomiast zwiększały ilość transkryptów C1q zarówno w warunkach podstawowych, jak i w przebiegu stanu zapalnego, lecz nie obserwowano zmian w stężeniu białka w surowicy [54]. Wydaje się to mieć potwierdzenie w uzyskanych wynikach badań własnych, w których zwiększoną ekspresję mRNA C1q-L zaobserwowano wśród chorych na KZN, bez istotnych różnic w średnich stężeniach C1q w surowicy w porównaniu do grupy kontrolnej. Wyższą ekspresję C1q-L stwierdzano wśród chorych na TRU z wykrywanymi pc p-C1q i p-dsDNA niż w grupach bez stwierdzanej obecności tych pc w surowicy. Być może zwiększona ekspresja C1q-L stanowi mechanizm kompensacyjny do zużycia produktu białkowego wiązanego przez krążące w surowicy pc i KI, a następnie odkładanego w postaci depozytów w nerkach i innych narządach.

W kontekście udziału C1q w patogenezie TRU, na uwagę zasługują wyniki otrzymane przez Moosig i wsp. Autorzy badali wpływ czynników stymulujących na syntezę C1q przez monocyty pochodzące od chorych na TRU bez stwierdzonego wrodzonego niedoboru C1q. Zaobserwowano, iż podstawowa ekspresja mRNA C1q w grupie chorych na TRU nie różniła się od tej stwierdzanej wśród chorych na reumatoidalne zapalenie stawów, czy w zdrowej populacji. Jednak odpowiedź monocytów pochodzących od chorych na TRU na działanie czynników stymulujących (szczególnie deksametazon i INF- $\gamma$ ) była znacznie mniejsza niż w pozostałych grupach [55]. Wyniki przeprowadzonych dotychczas badań wskazują na istotnie zmienioną ekspresję mRNA C1q w leukocytach pochodzących od chorych na TRU w porównaniu do zdrowej populacji. Wpływ na tą ekspresję wydają się mieć zarówno cytokiny modyfikujące syntezę C1q w monocytach, makrofagach i komórkach dendrytycznych, jak również zastosowane leczenie. Warto podkreślić, że w obecnej pracy po raz pierwszy zbadano ekspresję C1q w leukocytach chorych na PKZN oraz porównywano chorych z aTZN i naTZN.

#### **5.4. Analiza ekspresji mRNA C1q i produktu białkowego w nerkach**

Wyniki badań własnych wykazały znacznie wyższą ekspresję mRNA C1q-N w grupie chorych na TZN niż SVV, PKZN oraz NK. W PKZN ekspresja ta była nawet niższa niż w NK, jednak nie da się wykluczyć wpływu istniejącego nowotworu w okolicy fragmentów nerek stanowiących grupę kontrolną. Jednak ze względów etycznych nie było możliwe uzyskanie bioptatów od ZO. Równocześnie

ze znacznie podwyższoną ekspresją mRNA C1q-N wśród chorych na TZN, aż u 86,8% chorych stwierdzono obecność złogów C1q w badaniu IF. Mimo, że u 75,6% chorych z depozytami C1q w kłębuszkach nerkowych stwierdzono aTZN, to ekspresja mRNA C1q nie różniła się między aTZN i naTZN. Podobnie jak w przypadku ekspresji C1q-L i stężenia C1q w surowicy, ekspresja mRNA C1q-N wydaje się nie korelować z obecnością produktu białkowego w obrębie kłębuszków nerkowych.

Chen i wsp. zaobserwowali korelację między stężeniem pc p-C1q w surowicy a obecnością depozytów C1q w nerkach chorych na TZN [123]. Wyniki badań własnych nie wykazały natomiast zależności między występowaniem depozytów C1q w kłębuszkach nerkowych i częstością wykrywania oraz stężeniami pc p-C1q, KKI-C1q i C1q w surowicy.

Należy jednak podkreślić, że ze względu na małą liczebność badanej grupy, wyniki dotyczące ekspresji C1q w nerkach chorych na KZN mogą jedynie sugerować pewne zależności, lecz do wyciągnięcia ostatecznych wniosków niezbędne jest powiększenie populacji chorych oraz materiału stanowiącego grupę kontrolną. Nie znaleziono w dostępnym piśmiennictwie badań nad ekspresją mRNA C1q w nerkach chorych na KZN co uniemożliwia porównanie uzyskanych wyników z innymi uzyskanymi *in vivo*.

Wśród chorych na KZN, ekspresję C1q na poziomie produktu białkowego zaobserwowano w obrębie kłębuszków nerkowych, w śródmiąszcu i naczyniach. W kłębuszku nerkowym ekspresja C1q wydaje się być związana z obecnością złogów zawierających C1q, a nie z wytwarzaniem przez komórki własne kłębuszka nerkowego. Natomiast w śródmiąszcu może ona wynikać z występowania nacieków zapalnych. Mniej prawdopodobnym wydaje się, że C1q jest wytwarzane przez fibroblasty. Gulati i wsp. stwierdzili, że fibroblasty (w odróżnieniu od monocytów) nie są zdolne do syntezy C1q w warunkach *in vitro* [163]. Nie da się jednak wykluczyć, że może dochodzić do tego w warunkach *in vivo*. Bardzo interesującym wydaje się stwierdzenie ekspresji C1q w ścianie naczyń, zarówno wśród chorych na KZN, jak i w NK. Jednak w dostępnej literaturze brak badań, które umożliwiłyby porównanie uzyskanych wyników z innymi autorami.

## 6. PODSUMOWANIE

1. Przeciwciała przeciw C1q wykrywano w surowicy chorych na PKZN i TZN oraz wśród ZO, lecz nie występowały one w grupie chorych na SVV.
2. Wśród chorych na PKZN, pc p-C1q nie występowały w surowicy chorych na FSGS, a w pozostałych typach PKZN częstość ich wykrywania oraz średnie stężenia nie różniły się istotnie pomiędzy poszczególnymi typami morfologicznymi KZN.
3. Przeciwciała przeciw C1q występowały najczęściej i w najwyższych stężeniach w surowicy chorych na TZN, co w szczególności dotyczyło chorych z aktywnym procesem chorobowym. Nie stwierdzono różnic w częstości występowania i stężeniach pc między klasami TZN.
4. W TZN, wykrywanie pc p-C1q wiązało się z częstszym występowaniem zespołu nerczycowego, a w szczególności erocyturii oraz z wyższą aktywnością choroby ocenianej w skali SLEDAI-2K.
5. Krążące kompleksy immunologiczne wiążące C1q były wykrywane, podobnie jak pc p-C1q, w surowicy chorych na PKZN (z wyjątkiem FSGS), TZN i wśród ZO. Występowały najczęściej i w najwyższych stężeniach w surowicy chorych na aTZN.
6. Przeciwciała przeciw dsDNA występowały wyłącznie w grupie chorych na TZN, lecz stężenia tych pc w surowicy nie różniły się istotnie między chorymi na aTZN i naTZN.
7. Obniżone stężenia C3 w surowicy stwierdzano w surowicy chorych na PKZN (głównie z rozpoznaniem MPGN) oraz TZN (w szczególności z aTZN). Natomiast obniżone stężenia C4 występowały tylko wśród chorych na TZN.
8. Stężenia C1q w surowicy nie różniły się istotnie między ZO oraz chorymi na PKZN i WKZN, a także między poszczególnymi typami PKZN oraz aTZN i naTZN.
9. Ekspresja mRNA C1q w leukocytach krwi chorych na KZN była wyższa niż u ZO, jednak nie różniła się między chorymi na PKZN i WKZN oraz między aTZN i naTZN.
10. Ekspresja mRNA C1q w nerkach chorych na TZN była istotnie wyższa niż w grupie PKZN, choć nie wykazano różnic między aTZN i naTZN.
11. Nie stwierdzono korelacji między ekspresją mRNA C1q w leukocytach krwi i stężeniem C1q w surowicy wśród badanych chorych i ZO.

12. Nie wykryto wybranej mutacji w genie C1qA w leukocytach krwi badanych chorych na KZN i wśród ZO.
13. Wykazano dodatnie korelacje między stężeniami pc p-C1q i p-dsDNA oraz całkowitych IgG w surowicy chorych na aTZN i w grupie TZN p-C1q(+).
14. Depozyty C1q w nerkach występowały częściej u chorych na TZN niż PKZN lokalizując się w obrębie kłębuszka nerkowego, naczyń i śródmiąższu. W przypadku tej ostatniej lokalizacji ekspresja C1q wydaje się być związana z występowaniem komórek nacieku zapalnego. Natomiast pochodzenie ekspresji C1q w ścianach naczyń wymaga dalszych badań.

## 7. WNIOSKI

1. Wśród chorych na pierwotne i wtórne kłębuszkowe zapalenia nerek oraz zdrowych ochotników przeciwciała przeciw C1q występują najczęściej i w najwyższych stężeniach w surowicy chorych na toczniowe zapalenie nerek, zwłaszcza z aktywnym procesem chorobowym w kłębuszkach nerkowych.
2. Chociaż przeciwciała przeciw dsDNA są w porównaniu do przeciwciał przeciw C1q bardziej swoiste dla toczniowego zapalenia nerek, mają one mniejsze znaczenie w różnicowaniu chorych z aktywną i nieaktywną fazą tej choroby.
3. Równoczesne niewykrywanie przeciwciał przeciw C1q i przeciw dsDNA w surowicy wydaje się wykluczać rozpoznanie aktywnego toczniowego zapalenia nerek.
4. Skojarzone występowanie przeciwciał przeciw C1q i obniżonego stężenia C3 w surowicy wiąże się z większą aktywnością toczniowego zapalenia nerek, czego kliniczną prezentacją jest częstsze występowanie zespołu nerczycowego, a w szczególności erytrocyturii.
5. Podwyższona ekspresja mRNA C1q w leukocytach krwi przy niezmiennych stężeniach C1q w surowicy chorych na kłębuszkowe zapalenie nerek może wskazywać na zwiększone zużycie tej składowej układu dopełniacza w toku procesu chorobowego.
6. Niestwierdzenie mutacji w genie kodującym łańcuch A C1q wśród badanych chorych i zdrowych ochotników potwierdza wyniki dotychczasowych badań wskazujących na wrodzony niedobór C1q jako rzadką przyczynę rozwoju chorób autoimmunologicznych.



## 8. PIŚMIENNICTWO

1. Gołąb J., Jakóbisiak M., Lasek W.: Immunologia. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2004, 118-130.
2. Pettigrew H.D., Teubwer S.S., Gershwin E.: Clinical significance of complement deficiencies. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2009, 1173, 108-123.
3. Meyer O., Hauptmann G., Tappeiner G., Ochs H.D., Mascart-Lemone F.: Genetic deficiency of C4, C2 and C1q and lupus syndromes. Association with anti-Ro (SS-A) antibodies. *Clin. Exp. Immunol.* 1985, 62, 678-684
4. Mogan B.P., Marchbank K.J., Longhi M.P., Harris C.L., Gallimore A.M.: Complement: central to innate immunity and bridging to adaptive responses. *Immunol. Lett.* 2005, 97, 171-179.
5. Daha N.A., Banda N.K., Roos A., Beurskens F.J., Bakker J.M., Daha M.R., Trouw L.A.: Complement activation by (auto-) antibodies. *Mol. Immunol.* 2011, 48, 1656-1665.
6. Smykał-Jankowiak K., Niemir Z.I.: Budowa i funkcja C1q składowej dopełniacza oraz jej znaczenie w rozwoju chorób o podłożu autoimmunologicznym. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2009, 63, 134-141.
7. Nayak A., Ferluga J., Tsolaki A.G., Kishore U.: The non-classical functions of the classical complement pathway recognition subcomponent C1q. *Immunol. Lett.* 2010, 131, 139-150.
8. Mevorach D.: Clearance of dying cells and systemic lupus erythematosus: the role of C1q and the complement system. *Apoptosis* 2010, 15, 1114-1123.
9. Martin H., Heinz H.P., Reske K., Loos M.: Macrophage C1q: characterization of a membrane form of C1q and of multimers of C1q subunits. *J. Immunol.* 1987, 11, 3863-3867.
10. Kishore U., Reid K.B.M: C1q: structure, function and receptors. *Immunopharmacology* 2000, 49, 159-170.
11. Kishore U., Ghai R., Greenhough T.J., Shrive A.K., Bonifati D.M., Gadjeva M.G., Waters P., Kojouharova M.S., Chakraborty T., Agrawal A.: Structural and functional anatomy of the globular domain of complement protein C1q. *Immunol. Lett.* 2004, 95, 113-128.
12. Gaboriaud C., Juanhuix J., Gruez A., Lacroix M., Darnault C., Pignol D., Verger D., Fontecilla-Camps J.C., Arlaud G.J.: The crystal structure of the

- globular head of complement protein C1q provides a basis for its versatile recognition properties. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 6974–46982.
13. Kojouharova M.S., Tsacheva I.G., Tchorbadijeva M.I., Reid K.B.M., Kishore U.: Localization of ligand binding sites on human C1q globular head region using recombinant globular head fragments and single chain antibodies. *Biochim Biophys Acta* 2003, 1652, 64-74.
  14. Kishore U., Gaboriaud C., Waters P., Shrive A.K., Greenhough T.J., Reid K.B.M., Sim R.B., Arlaud G.J.: C1q and tumor necrosis factor superfamily: modularity and versatility. *Trend. in Immunol.* 2004, 10, 551-560.
  15. Kojouharova M.S., Gadjeva M.G., Tsacheva I.G., Zlatarova A., Roumenina L.T., Tchorbadijeva M.I., Atanasov B.P., Waters P., Urban B.C., Sim R.B., Reid K.B., Kishore U.: Mutational analyses of the recombinant globular regions of human C1q A, B and C chains suggest an essential role for arginine and histidine residues in the C1q-IgG interaction. *J. Immunol.* 2004, 172, 4351-4358.
  16. Collins C., Tsui F.W., Shulman M.J.: Differential activation of human and guinea pig complement by pentameric and hexameric IgM. *Eur. J.Immunol.* 2002, 32, 1802–1810.
  17. McGrath F.D.G., Brouwer M.C., Arlaud G.J., Daha M.R., Hack C.E., Roos A.: Evidence that complement protein C1q interacts with C-Reactive Protein through its globular head region. *J. Immunol.* 2006, 176, 2950-2957.
  18. Sorensen I.J., Nielsen E.H., Andersen O., Danielsen B., Svehag S.E.: Binding of complement proteins C1q and C4bp to serum amyloid P component (SAP) in solid centra liquid phase. *Scand. J. Immunol.* 1996, 44, 401–407.
  19. Nauta A.J., Bottazzi B., Mantovani A., Salvatori G., Kishore U., Schwaeble W.J., Gingras A.R., Tzima S., Vivanco J., Egido J., Tijsma O., Hack E.C., Daha M.R., Roos A.: Biochemical and functional characterization of the interaction between pentraxin 3 and C1q. *Eur. J. Immunol.* 2003, 33, 465-473.
  20. Webster S., Glabe C., Rogers J.: Multivalent binding of complement protein C1q to amyloid  $\beta$ -peptide (A $\beta$ ) promotes the nucleation phase of A $\beta$  aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995, 217, 869–875.
  21. Tan L.A., Yu B., Sim F.C.J., Kishore U., Sim R.B.: Complement activation by phospholipids: the interplay of factor H and C1q. *Protein. Cell.* 2010, 1, 1033-1049.

22. Bobak D.A., Washburn R.G., Frank M.M.: C1q enhances the phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* blastospores by human monocytes. *J. Immunol.* 1988, 141, 592–597.
23. Thielens N.M., Tacnet-Delorme P., Arlaud G.J.: Interaction of C1q and mannan-binding lectin with viruses. *Immunobiology* 2002, 205, 563–574.
24. Quinkal I. Hernandez J.F., Chevallier S., Arlaud G.J., Vernet T.: Mapping of the interaction between the immunodominant loop of the ectodomain of HIV-1 gp41 and human complement protein C1q. *Eur. J. Biochem.* 1999, 265, 656–663.
25. Ikeda F., Haraguchi Y., Jinno A., Iino Y., Morishita Y., Shiraki H., Hoshino H.: Human complement C1q inhibits the infectivity of cell-free HTLV-I. *J. Immunol.* 1998, 161, 5712–5719.
26. Korb L.C., Ahearn J.M.: C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. *J. Immunol.* 1997, 158, 4525–4528.
27. Nauta A.J., Trouw L.A., Daha M.R., Tijmsa O., Nieuwland R., Schwaeble W.J., Gingras A.R., Mantovani A., Hack E.C., Roos A.: Direct binding of C1q to apoptotic cells and cell blebs induces complement activation. *Eur. J. Immunol.* 2002, 32, 1726–1736.
28. Ghai R., Weters P., Roumenina L.T., Gadjeva M., Kojouharova M.S., Reid K.B.M., Sim R.B., Kishore U.: C1q and its growing family. *Immunol.* 2007, 212, 253-266.
29. Shapiro L., Scherer P.E.: The crystal structure of a C1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor. *Curr. Biol.*, 1998, 8, 335–338.
30. Bobak D.A., Gaither T.A., Frank M.M., Tenner A.J.: Modulation of FcR function by complement: subcomponent C1q enhances the phagocytosis of IgG-opsonized targets by human monocytes and culture-derived macrophages. *J. Immunol.* 1987, 138, 1150-1156.
31. Bordin S., Ghebrehwet B., Prage R.C.: Participation of C1q and its receptor in adherence of human diploid fibroblasts. *J. Immunol.* 1990, 145, 2520-2526.
32. Bordin S., Whitfield D.: Proliferating fibroblasts respond to collagenous C1q with phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase and apoptotic features. *J. Immunol.* 2003, 170, 667–671.

33. Skoglund C., Wetterö J., Skogh T., Sjöwall C., Tengvall P., Bengtsson T.: C-reactive protein and C1q regulate platelet adhesion and activation on absorbed immunoglobulin G and albumin. *Immunol. Cell. Biol.* 2008, 86, 466-474.
34. Ghebrehiwet B., Hosszu K.K., Valentino A., Peerschke E.I.B.: The C1q family of proteins: insight into the emerging non-traditional functions. *Front. Immunol.* 2012, 3, 1-9.
35. Cutler A.J., Botto M., van Essen D., Rivi R., Davies K.A., Gray D., Walport M.J.: T cell-dependent immune response in C1q-deficient mice: defective interferon gamma production by antigen-specific T cells. *J. Exp. Med.* 1998, 187, 1789-1797.
36. Smyth A., Garovic V.D.: Systemic lupus erythematosus and pregnancy. *Miner. Urol. Nefrol.* 2009, 61, 457-474.
37. Young J.K.R., Ambrus J.J.L, Malbran A., Fauci A.S., Tenner A.J.: Complement subcomponent C1q stimulates Ig production by human B lymphocytes. *J. Immunol.* 1991, 146, 3356-3364.
38. von den Berg R.H., Faber-Krol M. C., Sim R.B., Daha M.R.: The first subcomponent of complement, C1q, triggers the production of IL-8, IL-6, and monocyte chemoattractant peptide-1 by human umbilical vein endothelial cells. *J. Immunol.* 1998, 161, 6924-6930.
39. Lood C., Gullstrand B., Truedsson L., Olin A.I., Alm G.V., Rönnblom L., Sturfelt G., Eloranta M.L., Bengtsson A.A.: C1q inhibits immune complex-induced interferon  $\alpha$  production in plasmacytoid dendritic cells. *Arthritis Rheum.* 2009, 60, 3081-3090.
40. Fraser D.A., Bohlsón S.S., Jasinskiene N., Rawal N., Palmarini G., Ruiz S., Rochford R., Tenner A.J.: C1q and MBL, components of innate immune system, influence monocytes cytokine expression. *J. Leukoc. Biol.* 2006, 80, 107-116.
41. Sato T., van Dixhoorn M.G.A., Heemskerk E., van Es L.A., Daha M.R. : C1q, a subunit of the first component of complement, enhances antibody-mediated apoptosis of cultured rat glomerular mesangial cells. *Clin. Exp. Immunol.* 1997, 109, 510-517.
42. Korb L.C., Ahearn J.M.: C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revised. *J. Immunol.* 1997, 158, 4525-4528.

43. Navratil J.S., Watkins S.C., Wisnieski J.J., Ahearn J.M.: The globular heads of C1q specifically recognize surface blebs of apoptotic vascular endothelial cells. *J. Immunol.* 2001, 166, 3231-3239.
44. Päidassi H., Tacnet-Delorme P., Verneret M., Gadoriaud C., Houen G., Duus K., Ling W.L., Arlaud G.J., Frchet P.: Investigations on the C1q calreticulin phosphatidylserine interactions yield new insights into apoptotic cell recognition. *J. Mol. Biol.* 2011, 02, 29.
45. Ogden C.A., deCathelineau A., Hoffmann P.R., Bratton D., Ghebrehiwet B., Fadok V.A., Henson P.M.: C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J. Exp. Med.* 2001, 194, 781-795.
46. Ogden C.A., Kowalewski R., Peng Y., Montenegro V., Elkon K.B.: IgM is required for efficient complement mediated phagocytosis of apoptotic cells in vivo. *Autoimmunity* 2005, 38, 259-264.
47. Botto M., Dell'Agnola C., Bygrave A.E., Thompson E.M., Cook H.T., Petry F., Loos M., Pandolfi P.P., Walport M.J.: Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. *Nat. Genet.* 1998, 19, 56-59.
48. Fraser D.A., Pisalyaput K., Tenner A.J.: C1q enhances microglial clearance of apoptotic neurons and neuronal blebs, and modulates subsequent inflammatory cytokine production. *J. Neurochem.* 2010, 112, 733-744.
49. Tenner A.J., Volkin D.B.: Complement subcomponent C1q secreted by cultured human monocytes has subunit structure identical with that of serum C1q. *Biochem. J.* 1986, 233, 451-458.
50. Sellar G.C., Blake D.J., Reid K.B.: Characterization and organization of the genes encoding the A, B and C chains of human complement subcomponent C1q. The complete derived amino acid sequence of human C1q. *Biochem. J.* 1991, 274, 481-490.
51. Faust D., Loos M.: In vitro modulation of C1q mRNA expression and secretion by interleukin-1, interleukin-6, and interferon-gamma in resident and stimulated murine peritoneal macrophages. *Immunobiology* 2002, 206, 368-376.

52. Chen G., Tan C.S., Teh B.K., Lu J.: Molecular mechanisms for synchronized transcription of three complement C1q subunit genes in dendritic cells and macrophages. *J. Biol. Chem.* 2011, 286, 34941-34950.
53. Trinder P.K.E., Faust D., Petry F., Loos M.: Modulation of mRNA expression and secretion of C1q in mouse macrophages by anti-inflammatory drugs and cAMP: evidence for partial involvement of a pathway that includes cyclooxygenase, prostaglandin E<sub>2</sub> and adenylate cyclase. *Immunology* 1995, 84, 638-644.
54. Moosig F., Damm F., Knorr-Spahr A., Ritgen M., Zeuner R.A., Kneba M., Ernst M., Schroder J.O.: Reduced expression of C1q-mRNA in monocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 2006, 146, 409-416.
55. Licht C., Fremeaux-Bacchi V.: Hereditary and acquired komplement dysregulation in membranoproliferative glomerulonephritis. *Thromb. Haemost.* 2009, 101, 271-278.
56. Hirt-Minkowski P., Dickenmann M., Schifferli J.A.: Atypical hemolytic uremic syndrome: update on the complement system and what is new. *Nephron. Clin. Pract.* 2010, 114, 219-235.
57. Topaloglu R., Bakkaloglu A., Slingsby J.H., Mihatsch M.J., Pascual M., Norsworthy P., Morley B.J., Saatci U., Schiferli J.A., Walport M.J.: Molecular basis of hereditary C1q deficiency associated with SLE and IgA nephropathy in a Turkish family. *Kidney Int* 1996, 50, 635-642.
58. Bowness P., Davis K.A., Norsworthy P.J., Athanassiou P., Taylor-Wiedeman J., Borysiewicz L.K., Meyer P.A.R., Walport M.J.: Hereditary C1q deficiency and systemic lupus erythematosus. *Q. J. Med.* 1994, 87, 455-464.
59. Petry F.: Molecular basis of hereditary C1q deficiency. *Immunobiol.* 1998, 199, 286-294.
60. Petry F., Le D.T., Kirschfink M., Loos M.: Non-sense and missense mutations in the structural genes of complement component C1q A and C chains are linked with two different types of complete selective C1q deficiencies. *J. Immunol.* 1995, 155, 4734-4738.
61. Petry F., Berkel A.I., Loos M.: Multiple identification of a particular type of hereditary C1q deficiency in the Turkish population: review of the cases and additional genetic and functional analysis. *Hum. Genet.* 1997, 100, 51-56.

62. McAdam R.A., Goundis D., Reid K.B.: A homozygous point mutation results in a stop codon in the C1qB-chain of a C1q-deficient individual. *Immunogenetics* 1988, 27: 259–264.
63. Petry F., Hauptmann G., Goetz J., Grasshans E., Loss M.: Molecular basis of a new type of C1q-deficiency associated with a non-functional low molecular weight (LMW) C1q: parallels and differences to other known genetic C1q-defects. *Immunopharmacol.* 1997, 38, 189-201.
64. Marquart H. V., Schejbel L., Sjöholm A., Martensson A., Nielsen S., Koch A., Svejgaard A., Garred P.: C1q deficiency in an Inuit family: Identification of a new class of C1q disease-causing mutations. *Clin. Immunol.* 2007, 124, 33–40.
65. Slingsby J.H., Norsworthy P., Pearce G., Vaishnav A.K., Issler H., Morley B.J., Walport M.J.: Homozygous hereditary C1q deficiency and systemic lupus erythematosus. A new family and the molecular basis of C1q deficiency in three families. *Arthritis Rheum.* 1996, 39, 663-670.
66. Suwairi W., Bahabri S., Beving D., Wisniewski J., Warman M.: Dysfunctional and antigenetically abnormal C1q resulting from a point mutation in codon 6 of the C chain. *Arth. Rheum.* 1997, 40, 308-314.
67. Gulez N., Genel F., Atlihan F., Gullstrand B., Skattum L., Schejbel L., Garred P., Truedsson L.: Homozygosity for a novel mutation in the C1q C chain gene in a Turkish family with hereditary C1q deficiency. *Allergol. Clin. Immunol.* 2010, 20, 255-258.
68. Berkel A.L., Birben E., Oner C., Oner R., Loos M., Petry F.: Molecular , genetic and epidemiologic studies on selective complete C1q deficiency in Turkey. *Immunobiology* 2000, 201, 347-355.
69. Topaloglu R., Bakkaloglu A., Slingsby J.H., Aydintug O., Besbas N., Saatci U., Walport M.J.: Survey of Turkish systemic lupus erythematosus patients for a particular mutation of C1q deficiency. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2000, 18, 75-77.
70. Reid K.B., Thompson R.A.: Characterization of non-functional form of C1q found in patients with a genetically linked deficiency of C1q activity. *Mol. Immunol.* 1983, 20, 1117-1125.

71. Kirschfink M., Petry F., Khirwadkar K., Wigand R., Kaltwasser J.P., Loos M.: Complete functional C1q deficiency associated with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin. Exp. Immunol.* 1993, 94, 267–272.
72. Hoekzema R., Hannema A.J., Swaak T.J.G., Paardekooper J., Hack C.E.: Low molecular weight C1q in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol* 1985, 135, 265-271.
73. Hoekzema R., Brouwer M.C., de Greaff-Meeder E.R., H.P., van Helden H.P., Hack C.E.: Biosynthesis of normal and low molecular mass complement component C1q by cultured human monocytes and macrophages. *Biochem. J.* 1989, 257, 477-486.
74. Petry P., Loos M.: Common silent mutations in all types of hereditary complement C1q deficiencies. *Immunogenetics* 2005, 57, 566-571.
75. Racila D.M., Sontheimer C.J., Sheffield A., Wisnieski J.J., Racila E., Sontheimer R.D.: Homozygous single nucleotide polymorphism of the complement C1qA gene is associated with decreased levels of C1q in patients with subacute cutaneous lupus erythematosus. *Lupus* 2003, 12, 124-132.
76. Namuju B., Gray-McGuire C., Sestak A.L., Gilkeson G.S., Jacob C.O., Merrill J.T., James J.A., Wakeland E.K., Li Q.Z., Langfeld C.D., Divers J., Ziegler J., Moser K.L., Kelly J.A., Kaufman K.M., Harley J.B.: Evaluation of C1q genomic region in minority racial groups of lupus. *Genes Immun.* 2009, 10, 517-524.
77. Martens H.A., Zuurman M.W., de Lange A.H.M., Nolte I.M., van der Steege G., Navis G.J., Kallenberg C.G.M., Seelen M.A., Bijl M.L.: Analysis of C1q polymorphisms suggests association with systemic lupus erythematosus, serum C1q and CH50 levels and disease severity. *Ann. Rheum. Dis.* 2009, 68, 715-720.
78. Rafiq S., Frayling T.M., Vyse T.J., Cunninghame Graham D.S., Eggleton P.: Assessing association of common variation in the C1q gene cluster with systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 2010, 161, 284-289.
79. Miura-Shimura Y., Nakamura K., Ohtsuji M., Tomita H., Jiang Y., Abe M., Zhang D., Hamano Y., Tsuda H., Hashimoto H., Nishimura H., Taki S., Shirai T., Hirose S.: C1q regulatory region polymorphism down-regulating murine C1q protein levels with linkage to lupus nephritis. *J. Immunol.* 2002, 169, 1334-1339.



80. Agnello V., Koffler D., Eisenberg J.W., Winchester R.J., Kundel H.G.: C1q precipitins in the sera of patients with systemic lupus erythematosus and other hypocomplementemic states: characterization of high and low molecular weight types. *J.Exp. Med.* 1971, 134, 228-241.
81. Marder R.J., Burch F.X., Schmid F.R., Zeiss C.R., Gewurz H. Low molecular weight C1q precipitins in hypocomplementemic vasculitis-urticarial syndrome: partial purification and characterization as immunoglobulin. *J. Immunol.* 1978, 128, 613-618.
82. Uwatoko S., Aotsuka A., Okawa M., Egusa Y., Yokohari R., Aizawa C., Suzuki K. C1q solid-phase radioimmunoassay: Evidence for detecting of antibody directed against the collagen-like region of C1q in sera from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 1987, 69, 98-106.
83. Siegert C.E.H, Daha M.R., Halma C., van der Voort E.A.M., Breedveld F.C. : IgG and IgA autoantibodies to C1q in systemic and renal diseases. *Clin. Exp. Rheumatol.* 1992, 10, 19-23.
84. Siegert D.A., Daha M.R., Swaak A.J., van der Voort E.A., Breedveld F.C.: The relationship between serum titers of autoantibodies to C1q and age in the general population and in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1993, 67, 204-209.
85. Horváth L., Czirjak L., Fekete B., Jakab L., Prohaszka Z., Cervenak L., Romics L., Singh L., Daha M.R., Fust G.: Levels of antibodies against C1q and 60kDa family of heat shock proteins in the sera patients with various autoimmune diseases. *Immunol. Lett.* 2001, 75, 103-109.
86. Saadoun D., Sasallah S., Trendelenburg M., Limal N., Sene D., Piette J.C., Schifferli J.A., Cacoub P.: Anti-C1q antibodies in hepatitis C virus infection. *Clin. Exp. Immunol.* 2006, 145, 308-312.
87. Potlukova E., Jiskra I., Limanova Z., Kralikova P., Smutek D., Mareckova H., Antosova M., Trendelenburg M.: Autoantibodies against complement C1q correlate with the thyroid function in patients with autoimmune thyroid disease. *Clin. Exp. Immunol.* 2008, 153, 96-101.
88. Moroni G., Trendelenburg M., Del Papa N., Ouaglini S., Raschi E., Panzeri P., Testoni C., Tincani A., Banfi G., Balestrieri G., Schifferli J.A., Meroni P.L., Ponticeili C.: Anti-C1q antibodies may help in diagnosing a renal flare in lupus nephritis. *Am. J. Kidney. Dis.* 2001, 37, 490-498.

89. Frémeaux-Bacchi V., Noel L.H., Schifferli J.A: No lupus nephritis in the absence of antiC1q autoantibodies?. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2002, 17, 2041-2043.
90. Flierman R., Daha M.R.: Pathogenic role of anti-C1q autoantibodies in the development of lupus nephritis – a hypothesis. *Mol. Immunol.* 2006, 44, 133–138.
91. Siegert C.E., Daha M.R., van der Voort E.A., Breedveld F.C.: IgG and IgA antibodies to the collagen-like region of C1q in rheumatoid vasculitis. *Arthritis Rheum.* 1990, 33, 1646-1654.
92. Prada A.E., Strife C.F.: IgG subclass restriction of autoantibody to solid-phase C1q in membranoproliferative and lupus glomerulonephritis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1992, 63, 84-88.
93. Golan M.D., Burger R., Loos M.: Conformational changes in C1q after binding of immune complexes: detection of neoantigens with monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 1982, 129, 445-447.
94. Deliyska B., Tsacheva I., Radanova M., Stoianova V., Tchorbadijeva M., Dobрева N.: Lupus nephritis sera contain autoantibodies that recognize epitopes within the globular fragment of C1q. *Med. Pregl.* 2007, 60, 25-27.
95. Stoyanova V., Petrova S., Tchorbadjieva M., Deliyska B., Vasiliev V., Tsacheva I.: New insight into the autoimmunogenicity of the complement protein C1q. *Immunol* 2011, 48, 678-682.
96. Tan Y., Zhou W., Yu F., Fang Q., Yang H., Zhao M.: Detection of anti C1q antibodies and anti C1q globular head domain antibodies in sera from Chinese patients with lupus nephritis. *Mol. Immunol.* 2009, 46, 2178-2182.
97. Trendelenburg M.: Antibodies against C1q in patients with systemic lupus erythematosus. *Springer Semin. Immun.* 2005, 27, 276-285.
98. Potlukova E., Krilikova P.: Complement component C1q and anti-C1q antibodies in theory and in clinical practice. *J. Immunol.* 2008, 67, 423-430.
99. Kozyro I., Perahud I., Sadallah S., Sukalo A., Titov L., Schifferli J., Trendelenburg M.: Clinical value of autoantibodies against C1q in children with glomerulonephritis. *Pediatrics* 2006, 117, 1663-1668.
100. Siegert C.E.H., Daha M.R., Tseng C.M.E.S., Coremans I.E.M., van Es L.A., Breedveld F.C.: Predictive value of IgG autoantibodies against C1q for

- nephritis in systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheum. Dis.* 1993, 52, 851-856.
101. Monova D., Monov S., Posenova K., Argirova T.: Autoantibodies against C1q: view on association between systemic lupus erythematosus disease manifestation and C1q autoantibodies. *An. Rheum. Dis.* 2002, 61, 563-564.
  102. Oelzner P., Deliyska B., Fünfstück R., Hein G., Herrmann D., Stein G.: Anti-C1q antibodies and antiendothelial cell antibodies in systemic lupus erythematosus – relationship with disease activity and renal involvement. *Clin. Rheumatol.* 2003, 22, 271-278.
  103. Mosca M., Chimenti D., Pratesi F., Baldini C., Anzilotti C., Bombardieri S., Mmigliorini P.: Prevalence and clinico-serological correlations of anti-alpha-enolase, anti-C1q, and anti-dsDNA antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *The J. of Rheum.* 2006, 33, 695-700.
  104. Mok C.C., Ho L.Y., Leung H.W., Wong L.G.: Performance of anti-C1q, antinucleosome, and anti-dsDNA antibodies for detecting concurrent disease activity in systemic lupus erythematosus. *Translational Research* 2010, 156, 320-325.
  105. Meyer O.C., Nicaise-Roland P., Cadoudal N., Grootenboer-Mignot S., Palazzo E., Hayem G., Dieudé P., Chollet-Martin S.: Anti-C1q antibodies antedate patent active glomerulonephritis in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* 2009, 11, R87.
  106. Moura G.C.G., Manguiera C.L.P., Cruz L.A.S., Cruz C.M.S.: Negative anti-C1q antibody titers may influence therapeutic decisions and reduce the number of renal biopsies in systemic lupus erythematosus. *Nephron. Clin. Pract.* 2011, 118, 355-360.
  107. Cai X., Yang X., Lian F., Lin X., Liang M., Li J., Chen X., Liang L., Qin S., Fu J.: Correalation between serum anti-C1q antibody levels and renal pathological characteristics and prognostic significance of anti-C1q antibody in lupus nephritis. *J. Rheumatol.* 2010, 37, 759-765.
  108. Smykał-Jankowiak K., Niemir Z.I., Polcyn-Adamczak M: Do circulating antibodies against C1q reflect the activity of lupus nephritis? *Pol. Arch. Med. Wew.* 2011, 121, 287-294.

109. Trendelenburg M., Marfurt J., Gerber I., Tyndall A., Schifferli J.A.: Lack of occurrence of severe lupus nephritis among anti-C1q autoantibody- negative patients. *Arthritis. Rheum.* 1999, 42, 187–188.
110. Marto N., Bertolaccini M.L., Calabiug E., Hughes G.R.V., Khamashta M.A.: Anti-C1q antibodies in nephritis: correlation between titres and renal disease activity and positive predictive value insystemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 2005, 64, 444-448.
111. Strife C.F., Leahy A.E., West C.D.: Antibody to a cryptic, solid phase C1q antigen in membranoproliferative nephritis. *Kidney Int.* 1989, 35, 836-842.
112. Gunnarson I., Rönnelid J., Lundberg I., Jacobson S.H.: Occurrence of anti-C1q antibodies in IgA nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1997, 12, 2263-2268.
113. Kozyro I., Korosteleva L., Chernoshej D., Danner D., Sukalo A., Trendelenburg M.: Autoantibodies against complement C1q in acute post-streptococcal glomerulonephritis. *Clin. Immunol.* 2008, 128, 409-414.
114. Coremans I.E.M., Daha M.R., van der Voort E.A.M., Muizert Y., Halma C., Breedveld F.C.: Antibodies against C1q in antu-glomerular based membrane nephritis. *Cli. Exp. Immunol.* 1992, 87, 256-260.
115. Wisniewski J.J., Jones S.M.: Comparison of autoantibodies to the collagen-like region of C1q in hypocomplementic urticarial vasculitis syndrome and systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 1992, 148, 1396-1403.
116. Wener M.H., Uwatoko S., Mannik M.: Antibodies to collage-like region of C1q in sera of patients with autoimmune rheumatic disease. *Arthritis Rheum.* 1989, 32, 544-550.
117. Tüzün E., Shamsheer S.S., Ghosh S., Rowi J. n, Meriggioli M.N., Christanadoss P.: Predicive value of serum anti-C1q antibody levels in experimental autoimmune myasthenia gravis. *Neuromuscul. Disord.* 2006, 16, 137-143.
118. Katsumata Y., Miyake K., Kawaguchi Y., Okamoto Y., Kawamoto M., Gono T., Baba S., Hara M., Yamanaka H.: Anti-C1q antibodies are associated with systemie lupus erythematosus activity, but not specyficly with nephritis: a controlled study of 126 consecutive patients. *Arthritis Rheum.* 2011, 63, 2436-2444.

119. Fang Q.Y., Yu F., Tan Ying, Xu L., Wu L., Lu G., Shao F., Zhao M.: Anti-C1q antibodies and IgG subclass distribution in sera from Chinese patients with lupus nephritis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2009, 24, 172-178.
120. Prohászka Z., Daha M.R., Süsal C., Daniel V., Szlávik J., Bánhegyi D., Nagy K., Várkonyi V., Horváth A., Ujhelyi E., Tóth D.F., Uray K., Hudecz F., Füst G.: C1q autoantibodies in HIV infection: correlation to elevated levels of autoantibodies against 60-kDa heat-shock proteins. *Clin. Immunol.* 1999, 90, 247-255.
121. Wągrowaska-Danilewicz M.: Biopsja nerki. *Pol. J. Pathol.* 2011, 1, 8-12.
122. Mannik M., Wener M.H.: Deposition of antibodies to the collagen-like region of C1q in renal glomeruli of patients with proliferative lupus glomerulonephritis. *Arthritis Rheum.* 1997, 40, 1504–1511.
123. Chen P.C., Wang C.R., Liu M.F, Chen F.F., Liang C.C: Correlation between the renal C1q deposition and serum anti-C1q antibody: a potential role of anti-C1q antibody in lupus nephritis. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 2002, 20, 223-227.
124. Trouw L.A., Seelen M.A., Duijs J.M., Benediktsson H., van Kooten C., Daha M.R.: Glomerular deposition of C1q and anti-C1q antibodies in mice following injection of antimouse C1q antibodies. *Clin. Exp. Immunol.* 2003, 132, 32–39.
125. Trouw L.A., Duijs J.M.G.J., van Kooten C., Daha M.R.: Immune deposition of C1q and anti-C1q antibodies in the kidney is dependent on the presence of glomerular IgG. *Mol. Immunol.* 2003, 40, 595-602.
126. Trouw L.A., Seelen M.A., Visseren R., Duijs J.M.G.J., Benediktsson H., de Heer E., Roos A., van Kooten C., Daha M.R.: Anti-C1q autoantibodies in murine lupus nephritis. *Clin. Exp. Immunol.* 2004, 135, 41-48.
127. Trouw L.A., Groeneveld T.W., Seelen M.A., Duijs J. M., Bajema I.M., Prins F.A., Kishore U., Salant D.J., Verbeek J.S., van Kooten C., Daha M.R.: Anti-C1q autoantibodies deposit in glomeruli but are only pathogenic in combination with glomerular C1q-containing immune complexes. *J. Clin. Invest.* 2004, 114, 679–688.
128. Sherer Y., Gorstein A., Fritzler M.J., Shoenfeld Y.: Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus: more than 100 different antibodies found in SLE patients. *Semin. Arthritis Rheum.* 2004, 34, 501-537.

129. Marks S.D., Tullus K.: Autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Pediatr. Nephrol.* 2011, Dec 23, w druku.
130. Kavanaugh A.F., Solomon D.H., The American College of Rheumatology and Hoc Committee on Immunologic Testing Guidelines: Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: anti-dsDNA antibody test. *Arthritis Rheum.* 2002, 47, 546-555.
131. Isenberg D.A., Manson J.J., Ehrenstein M.R., Rahman A.: Fifty years of anti dsDNA antibodies: are we approaching journey`s end? *Rheumatology (Oxford)* 2007, 46, 1052-1056.
132. Nasiri S., Karimifar M., Bonakdar Z.S., Salehi M: Correlation of ESR, C3, C4, anti-DNA and lupus activity based on British Isles Lupus Assessment Group Index in patients of rheumatology clinic. *Rheumatol. Int.* 2010, 30, 1605-1609.
133. Swaak A.J.G., Groenwold J., Aarden L.A., Statius van Eps L.W., Feltkamp T.E.: Prognostic value of anti-dsDNA in SLE. *Annals of the Rheum. Dis.* 1982, 41, 388-395.
134. Ho A., Magden L.S., Barr S.G., Petri M.: Decreases in anti-dsDNA levels are associated with concurrent flares in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2001, 44, 2342-2349.
135. Toong C., Adelstein S., Phan T.G.: Clearing the complexity: immune complexes and their treatment in lupus nephritis. *Int. J. Nephrol. Renovasc. Dis.* 2011, 4, 17-28.
136. Ravirajan C.T., Rahman M.A., Papadaki L., Griffiths M.H., Kalsi J., Martin A.C., Ehrenstein M.R., Latchman D.S., isenberg D.A.: Genetic, structural and functional properties of an IgG DNA-binding monoclonal antibody from a lupus patients with nephritis. *Eur. J. Immunol.* 1998, 28, 339-350.
137. Coremans I.E., Spronk P.E., Bootsma H., Daha M.R., van der Voort E.A., Kater L., Breedveld F.C., Kallenberg C.G.: Changes in antibodies to C1q predict renal relapses in systemic. *Am. J. Kidney Dis.* 1995, 26, 595-601.
138. Myśliwiec M.: *Nefrologia. Wielka Interna. Medical Tribune Polska, Warszawa* 2009.
139. Liu C.C., Ahearn J.M., Manzi S.: Complement as a source of biomarkers in systemic lupus erythematosus: past, present and future. *Curr. Rheumatol Rep.* 2004, 6, 85-88.

140. Liu C.C., Manzi S., Kao A.H., Navratil J.S., Ahearn J.M.: Cell-bound complement biomarkers for systemic lupus erythematosus : from benchtop to bedside. *Rheum.Dis. Clin. North. Am.* 2010, 36, 161-172.
141. Gladman D.D., Ibanez D., Urowitz M.B.: Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J. Rheumatol.* 2002, 29, 299-291.
142. Julkunen H., Ekblom-Kullberg S., Miettinen A.: Nonrenal and renal activity of systemic lupus erythematosus: a comparison of two anti-C1q and five anti-dsDNA assays and complement C3 i C4. *Rheumatol. Int.* 2011, Jun 26, w druku.
143. Bradley K., North J., Saunders D., Schwaeble W., Jeziorska M., Woolley D.A., Whaley K.: Synthesis of classical pathway complement components by chondrocytes. *Immunol.* 1996, 88, 648-656.
144. Ercolani L., Florence B., Denaro M., Alexander M.: Isolation and complete sequence of a functional human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. *J. Biol. Chem.* 1988, 263, 15335-15341.
145. Namysł J., Osmola A., Prokop J.: Ekspresja sekwencji ludzkich endogennych retrowirusów u chorych z twardziną układową i różnymi odmianami klinicznymi łuszczycy. *PDiA* 2005, XXII, 99-104.
146. Niemir Z.I., Stein H., Dworacki G., Mundel P., Koehl N., Koch B., Autschbach F., Andrassy K., Ritz E., Waldherr R., Otto H.F.: Podocytes are the major source of IL-1 alpha and IL-1 beta in human glomerulonephritides. *Kidney Int.* 1997, 52, 393-403.
147. Zhang C.Q., Ren L., Gao F., Mu F.Y., You Y.Q., Liu Y.H.: Anti-C1q antibodies are associated with systemic lupus erythematosus disease activity and lupus nephritis in northeast of China. *Clin. Rheumatol.* 2011, 30, 967-973.
148. Moura C.G., Lima I., Barbosa L., Athanzio D., Reis E., Reis M., Burlingame R.W., Santiago M.B.: Anti-C1q antibodies: association with nephritis and disease activity in systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Lab. Analysis* 2009, 23, 19-23.
149. Jesus A.A., Silva C.A., Carneiro-Sampaio M., Sheinberg M., Manguiera C.L., Marie S.K., Liphaut B.L.: Anti-C1q antibodies in luvenile-onset systemic lupus erythematosus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1173, 235-238.

150. Horák P., Heřmanová Z., Zadražil J., Ciferská H., Ordeltová M., Kusá L., Žurek M., Tichý T.: C1q complement component and antibodies reflect SLE activity and kidney involvement. *Clin. Rheumatol.* 2006, 25, 532-536.
151. Griffiths B., Mosca M., Gordon C.: Assessment of patients with systemic lupus erythematosus and the use of lupus disease activity indices. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 2005, 19, 685-708.
152. Jaekel H.P., Trabandt A., Grobe N., Werle E.: Anti-dsDNA antibody subtypes and anti-C1q antibodies: toward a reliable diagnosis and monitoring of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Lupus* 2006, 15, 335-345.
153. Akhter E., Burlingame R.W., Seaman A.L., Magder L., Petri M.: Anti-C1q antibodies have higher correlation with flares of lupus nephritis than other serum markers. *Lupus* 2011, 20, 1267-1274.
154. Trendelenburg M., Lopez-Trascasa M., Potlukova E., Moll S., Regenass S., Frémeaux-Bacchi V., Martinez-Ara J., Jancova E., Picazo M.L., Honsova E., Tesar V., Sadallah S., Schifferli J.: High prevalence of anti-C1q antibodies in biopsy-proven active lupus nephritis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2006, 21, 3115-3121.
155. Moroni G., Radice A., Giammarresi G., Quaglini S., Gallelli B., Leoni A., Vecchi M.L., Messa P., Sinico R.A.: Are laboratory tests useful for monitoring the activity of lupus nephritis? A 6-year prospective study in a cohort of 228 patients with lupus nephritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2009, 68, 234-237.
156. Matrat A., Veyseyre-Balter A., Trolliet P., Villar E., Dijoud F., Bienvenu J., Fabien N.: Simultaneous detection of anti-C1q and anti-double stranded DNA autoantibodies in lupus nephritis: predictive value for renal flares. *Lupus* 2011, 20, 28-34.
157. Gunnarsson I., Sundelin B., Heimbürger M., Forslid J., van Vollenhoven R., Lundberg I., Jacobson S.H.: Repeated renal biopsy in proliferative lupus nephritis- predictive role of serum C1q and albuminuria. *J. Rheum.* 2002, 29, 693-699.
158. Yu F., Tan Y., Wu L.H., Zhu S.N., Liu G., Zhao M.H.: Class IV-G and IV-S lupus nephritis in Chinese patients: a large cohort study from a single center. *Lupus* 2009, 18, 1073-1081.
159. Gunnarsson I., Rönnelid J., Huang Y.H., Rogberg S., Nilsson B., Lundberg I., L Klareskog.: Association between ongoing anti-C1q antibody production in



peripheral blood and proliferative nephritis in patients with active systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 1997, 36, 32-37.

- 160.** Heinz H.P., Rubin K., Laurell A.B., Loos M.: Common epitopes in C1q and collagen type II. *Mol. Immunol.* 1989, 26, 163-169.
- 161.** Cook A.D., Rowley M.J., Wines B.D., Mackay I.R.: Antibodies to the collagen-like region of C1q and type II collagen are independent non-cross-reactive populations in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *J. Autoimmun.* 1994, 7, 369-378.
- 162.** Rönnelid J., Gunnarsson I., Nilsson-Ekdahl K., Nilsson B.: Correlation between anti-C1q and immune conglutinin levels, but not between levels of antibodies to the structurally related autoantigens C1q and type II collagen in SLE or RA. *J. Autoimmun.* 1997, 10, 415-423.
- 163.** Gulati P., Guc D., Lemercier C., Lappin D., Whaley K.: Expression of the components and regulatory proteins of the classical pathway of complement in normal and diseases synovium. *Rheumatol. Int.* 1994, 14, 13-19.

## **9. SPIS TABEL I RYCIN**

Tabela 1. Mutacje w genach kodujących łańcuchy A, B i C składowej dopełniacza C1q

Tabela 2. Choroby autoimmunologiczne, w których wykrywano pc p-C1q w surowicy chorych

Tabela 3A. Dane morfologiczne, kliniczne i biochemiczne chorych na PKZN

Tabela 3B. Dane morfologiczne, kliniczne i biochemiczne chorych na WKZN

Tabela 4. Dane morfologiczne, kliniczne i biochemiczne chorych, u których badano ekspresję mRNA C1q w nerkach

Tabela 5. Charakterystyka kliniczna i immunologiczna chorych na aTZN i naTZN

Tabela 6. Zakres wartości referencyjnych dla określonych parametrów biochemicznych

Tabela 7. Etapy amplifikacji DNA C1qA metodą PCR

Tabela 8. Etapy amplifikacji cDNA C1qA i GAPDH metodą RT-PCR

Tabela 9. Charakterystyka enzymów restrykcyjnych użytych do badania specyficzności transkryptów C1qA

Tabela 10. Stężenia C1q w surowicy badanych chorych i grupie kontrolnej

Tabela 11. Różnice w częstości wykrywania badanych markerów immunologicznych między aTZN i naTZN

Tabela 12. Wyniki wieloczynnikowej wstecznej analizy logistycznej uwzględniającej aktywność TRU, występowanie ZN i E w powiązaniu z wykrywaniem pc p-C1q i p-dsDNA oraz obniżonych stężeń C3 i C4 w surowicy

Tabela 13. Stężenia całkowitych IgG w surowicy badanych chorych i grupie kontrolnej

Tabela 14. Dane kliniczne, biochemiczne i immunologiczne chorych na TZN z wykrywanymi i ujemnymi pc p-C1q w surowicy

Tabela 15. Dane kliniczne, biochemiczne i immunologiczne chorych na TZN z wykrywanymi i ujemnymi pc p-dsDNA w surowicy

Tabela 16. Dane kliniczne, biochemiczne i immunologiczne chorych na TZN ze stwierdzonym zespołem nerczycowym i bez zespołu nerczycowego

Tabela 17. Dane kliniczne, biochemiczne i immunologiczne chorych na TZN ze stwierdzoną erytrocyturią i bez erytrocyturii

- Ryc. 1. Schemat metody oznaczania badanych pc i KKI oraz C1q w surowicy.
- Ryc. 2. Wykres przedstawiający temperatury topnienia swoiste dla produktu amplifikacji cDNA C1qA i GAPDH metodą RT-PCR.
- Ryc.3. Krzywa wzorcowa dla oceny ilościowej ekspresji mRNA C1qA i GAPDH w leukocytach krwi.
- Ryc. 4. Schemat metody APAAP użytej celem oceny ekspresji białka C1q w nerkach chorych na KZN i NK.
- Ryc. 5. Częstość wykrywania pc p-C1q w surowicy chorych na PKZN, TZN, SVV i grupie K, chorych na poszczególne typy morfologiczne PKZN oraz chorych na aTZN i naTZN.
- Ryc. 6. Porównanie średnich stężeń pc p-C1q w surowicy chorych na PKZN, TZN i grupie K, chorych na poszczególne typy morfologiczne PKZN oraz chorych na aTZN i naTZN.
- Ryc. 7. Częstość wykrywania pc p-dsDNA w surowicy chorych na PKZN, TZN, SVV i grupie K oraz chorych na aTZN i naTZN.
- Ryc. 8. Porównanie średnich stężeń pc p-dsDNA w surowicy chorych na aTZN i naTZN.
- Ryc. 9. Częstość wykrywania KKI-C1q w surowicy chorych na PKZN, TZN, SVV i grupie K oraz chorych na aTZN i naTZN.
- Ryc. 10. Porównanie średnich stężeń KKI-C1q w surowicy chorych na PKZN, TZN i K oraz chorych na aTZN i naTZN.
- Ryc. 11. Częstość występowania obniżonego stężenia składowej dopełniacza C3 w surowicy chorych na PKZN, TZN, SVV i K oraz chorych na aTZN i naTZN.
- Ryc. 12. Częstość występowania obniżonego stężenia składowych dopełniacza C4 w surowicy chorych na PKZN, TZN, SVV i K oraz chorych na aTZN i naTZN.
- Ryc. 13. Porównanie średnich stężeń składowych dopełniacza C3 w surowicy chorych na PKZN, TZN i grupie K, chorych na poszczególne typy morfologiczne PKZN oraz chorych na aTZN i naTZN.
- Ryc. 14. Porównanie średnich stężeń składowych dopełniacza C4 w surowicy chorych na PKZN, TZN i grupie K oraz chorych na aTZN i naTZN.
- Ryc. 15. Przykładowy obraz rozdziału elektroforetycznego produktów amplifikacji DNA metodą PCR.
- Ryc. 16. Przykładowy obraz rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji restrykcji z użyciem endonukleazy *PvuII*.

Ryc. 17. Obraz rozdziału elektroforetycznego produktów amplifikacji cDNA C1qA i GAPDH w leukocytach krwi.

Ryc. 18. Obraz rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji restrykcji z użyciem endonukleaz *Taq I* i *BsuRI* (*Hae III*).

Ryc. 19. Porównanie średniej liczby transkryptów mRNA C1q w leukocytach chorych na PKZN, TZN, SVV i K, chorych na poszczególne typy morfologiczne PKZN oraz chorych na aTZN i naTZN.

Ryc. 20. Obraz rozdziału elektroforetycznego produktów amplifikacji cDNA C1qA i GAPDH w nerkach.

Ryc. 21. Porównanie średniej liczby transkryptów mRNA C1q w nerkach chorych na PKZN, TZN, SVV i K.

Ryc. 22. Ekspresja C1q w kłębuszku nerkowym, śródmiąszcu oraz naczyniach chorych na KZN.

Ryc. 23. Ekspresja C1q w kłębuszku nerkowym i naczyniu w NK.

Ryc. 24. Porównanie średnich stężeń pc p-C1q, p-dsDNA, KKI-C1q w surowicy w grupach TZN p-C1q(+), TZN p-C1q(-) i K.

Ryc. 25. Porównanie średnich stężeń C1q, C3, C4 w surowicy w grupach TZN p-C1q(+), TZN p-C1q(-) i K.

Ryc. 26. Ekspresja mRNA C1q-L w grupach TZN p-C1q(+), TZN p-C1q(-) i K.

Ryc. 27. Porównanie średnich stężeń C3 w surowicy w grupach PKZN p-C1q(+), PKZN p-C1q(-) i K.

Ryc. 28. Ekspresja mRNA C1q-L i C1q-N w grupach PKZN p-C1q(+), PKZN p-C1q(-) i K/NK.

Ryc. 29. Korelacje między stężeniami pc p-C1q i p-dsDNA oraz pc p-C1q i całkowitych IgG w surowicy chorych na aTZN.

Ryc. 30. Korelacje między stężeniami pc p-C1q i p-dsDNA, pc p-C1q i KKI-C1q oraz pc p-C1q i całkowitych IgG w surowicy chorych na TZN p-C1q(+).

## 10. STRESZCZENIE

Układ dopełniacza (UD) należy do nieswoistych mechanizmów odpornościowych. Do funkcji UD zalicza się m.in.: bezpośrednią lizę zakażonych komórek, opsonizację, chemotaksję, modulację odpowiedzi swoistej, a także usuwanie kompleksów immunologicznych (KI) i komórek apoptotycznych, gdzie szczególną rolę odrywa składowa dopełniacza C1q. Wrodzony niedobór C1q, związany z obecnością mutacji w genach kodujących łańcuchy C1q, stanowi najsilniejszy czynnik predysponujący do rozwoju tocznia rumieniowatego układowego (TRU). Wyniki ostatnich badań dowiodły także, że C1q może stanowić cel nieprawidłowej odpowiedzi immunologicznej, czego wyrazem jest pojawienie się w surowicy przeciwciał przeciw C1q (pc p-C1q). Wykrywano je w różnych chorobach autoimmunologicznych, w tym wśród chorych na pierwotne i wtórne kłębuszkowe zapalenia nerek (PKZN, WKZN), infekcyjnych oraz w zdrowej populacji. Przeciwciałom tym przypisuje się szczególną rolę w patogenezie TRU, zwłaszcza w przypadku zajęcia nerek. Podkreśla się ich wysoką negatywną wartość predykcyjną (87-100%) w diagnozowaniu i przewidywaniu zaostrzeń oraz ocenie aktywności toczniowego zapalenia nerek (TZN). Podjęte badania miały na celu lepsze zrozumienie roli pc p-C1q w rozwoju KZN oraz ocenę przydatności ich oznaczania w diagnostyce i monitorowaniu aktywności choroby.

Analizie poddano częstość wykrywania i stężenia pc p-C1q w surowicy chorych na PKZN i WKZN oraz u zdrowych ochotników (ZO), które porównano z innymi markerami immunologicznymi. Próbowano także powiązać oceniane markery immunologiczne z występowaniem i obrazem klinicznym PKZN i WKZN (w szczególności TZN). Poszukiwano wybranej mutacji w genie kodującym łańcuch A C1q oraz oceniono ekspresję mRNA C1q w leukocytach krwi i nerkach chorych na KZN i ZO.

Badaniem objęto 208 chorych na KZN oraz 86 ZO. Wśród chorych na KZN, u 139 rozpoznano PKZN, a u pozostałych WKZN. W grupie PKZN, u 100 chorych stwierdzono mezangialne KZN (MesPGN), u 7 błoniasto-rozplemowe KZN (MPGN), u 26 błoniaste KZN (IMGN) oraz u 6 ogniskowe segmentalne stwardnienie kłębuszków nerkowych (FSGS). Wśród chorych na WKZN, u 63 rozpoznano TZN, a u 6 zewnątrzłośniczkowe KZN w przebiegu układowego zapalenia małych naczyń (SVV). Chorych na TZN podzielono na 2 grupy w zależności od aktywności procesu chorobowego ocenianego wg skali SLEDAI-2K (systemic lupus erythematosus

disease activity index). Do grupy aktywnego TZN (aTZN) zaliczono chorych, którzy otrzymali  $\geq 10$  punktów w skali SLEDAI-2K. U wszystkich chorych na KZN i u ZO oznaczono pc p-C1q, przeciw dwuniciowemu dsDNA (pc p-dsDNA), krążące kompleksy immunologiczne wiążące C1q (KKI-C1q) oraz stężenie C1q w surowicy metodami immunoenzymatycznymi (ELISA). Stężenia składowych dopełniacza C3 i C4 oraz całkowitych IgG w surowicy badano metodą turbidymetryczną. Z krwi pełnej wyizolowano DNA celem poszukiwania mutacji w egzonie 2 genu C1qA oraz RNA w celu oceny ekspresji mRNA C1q metodą polimerazowej reakcji łańcuchowej w czasie rzeczywistym (real-time polymerase chain reaction; RT-PCR) w leukocytach krwi badanych osób. Dodatkowo analizowano ekspresję mRNA C1q metodą RT-PCR w nerkach pochodzących od 59 chorych, w tym 36 z PKZN, 17 z TZN i 6 z SVV. Materiał kontrolny dla tej grupy chorych stanowiło 5 chorobowo niezmiennych fragmentów nerek (normal kidney; NK), pochodzących z otoczenia usuniętych guzów nerek. Oceniono również ekspresję produktu białkowego C1q w nerkach chorych na KZN i w NK przy pomocy trójstopniowej metody APAAP (alkaline phosphatase - anti-alkaline phosphatase) i porównano ją z wynikiem badania immunofluorescencyjnego.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na znacznie częstsze występowanie pc p-C1q w surowicy chorych na TZN (68,3%) niż na PKZN (23%,  $p < 0,0001$ ) i u ZO (10,5%,  $p < 0,0001$ ). Przeciwciał tych nie wykryto u chorych na SVV i FSGS. Nie wykazano różnic w częstości wykrywania i średnich stężeniach pc p-C1q między poszczególnymi postaciami morfologicznymi PKZN. Natomiast badane pc występowały znacznie częściej (81,6% vs. 48%,  $p < 0,01$ ) oraz w wyższych stężeniach ( $p < 0,01$ ) w surowicy chorych na aTZN niż naTZN. Pc p-dsDNA wykrywano wyłącznie w TZN (76,2%). Pomimo, że obserwowano je częściej w surowicy chorych na aTZN niż naTZN (89,5% vs. 56%,  $p < 0,01$ ), to stężenia tych pc nie różniły się istotnie między badanymi grupami. Aktywnego procesu chorobowego nie stwierdzano u żadnego chorego na TZN z równocześnie ujemnymi pc p-C1q i p-dsDNA w surowicy.

KKI-C1q, podobnie jak pc p-C1q, występowały w surowicy chorych na PKZN, TZN i wśród ZO. W aTZN, obserwowano je znacznie częściej (44,4% vs. 12%,  $p < 0,0001$ ) i w wyższych stężeniach ( $p < 0,05$ ) niż w naTZN. Obniżone stężenia składowych dopełniacza C3 i C4 stwierdzano najczęściej wśród chorych na TZN (odpowiednio 66,7% i 44,4%). W grupie PKZN, obniżone stężenie C3 w surowicy

obserwowano u 13,8% chorych (najczęściej z rozpoznaniem MPGN), a stężenia C4 w surowicy chorych na PKZN i ZO mieściły się w granicach normy. W aTZN wykazano istotnie niższe stężenia C3 w surowicy w porównaniu do grupy naTZN ( $p<0,001$ ). W przypadku C1q, nie obserwowano różnic w średnich stężeniach w surowicy między chorymi na PKZN, WKZN i ZO, jak również między aTZN i naTZN. Natomiast ekspresja mRNA C1q w leukocytach krwi chorych na KZN była istotnie wyższa niż u ZO ( $p<0,05$  dla TZN,  $p<0,01$  dla PKZN). Jednak nie różniła się między chorymi na PKZN i WKZN oraz aTZN i naTZN. Istotnie wyższą ekspresję mRNA stwierdzono w nerkach chorych na TZN niż PKZN ( $p<0,05$ ), bez różnic między aTZN i naTZN. Ekspresję produktu białkowego C1q w nerkach chorych na KZN wykazano w obrębie kłębuszków nerkowych, naczyń oraz śródmiąszu. W kłębuszkach była ona związana z obecnością depozytów zawierających C1q, a w śródmiąszu nerki z odkładaniem i/lub produkcją C1q przez komórki nacieków zapalnych. Nie znaleziono mutacji w eksonie 2 genu kodującego łańcuch A C1q w leukocytach krwi chorych na KZN i ZO.

Wyniki wieloczynnikowej wstecznej analizy logistycznej wykazały, że dla oceny ogólnej aktywności TRU (i TZN) największe znaczenie ma skojarzone występowanie pc p-C1q z obniżonym stężeniem C3 w surowicy. Żaden z badanych markerów serologicznych oznaczanych samodzielnie nie wykazywał 100% swoistości dla aTZN. Wykazano jednak, że równoczesne stwierdzenie braku pc p-C1q i p-dsDNA w surowicy wydaje się wykluczać aTZN. Uzyskane wyniki potwierdzają sugerowane przez innych autorów znaczenie oznaczania pc p-C1q w surowicy celem oceny aktywności TZN.

## 11. SUMMARY

### **Title: “Analysis of the occurrence of anti-C1q antibodies in the serum of patients with primary and secondary glomerulonephritis”**

The complement system (CS) belongs to non-specific immune mechanisms. Major CS functions include: direct lysis of infected cells, opsonization, chemotaxis, modulation of specific immune response as well as removal of immune complexes (IC) and apoptotic cells, in which the first component of the CS- C1q plays a crucial role. Hereditary C1q deficiency, associated with the presence of mutations in genes encoding C1q chains, is the strongest factor predisposing to the development of systemic lupus erythematosus (SLE).

Recent studies have also shown that C1q may be a target of inappropriate immune response, which is manifested by the production of serum antibodies (anti-C1q Abs). Anti-C1q Abs have been detected in a number of autoimmune diseases including primary and secondary glomerulonephritis (PGN, SGN), infectious diseases, and also in the healthy population. Anti-C1q antibodies are attributed a key role in the pathogenesis of SLE, particularly with lupus nephritis (LN). Attention is also given to their high negative predictive value (87-100%) for the diagnosis, prediction of exacerbations and for the assessment of the activity of LN. The present study was undertaken to elucidate the role of anti-C1q Abs in the development of GN and to assess the benefit of anti-C1q antibody assays for the diagnostics and monitoring of disease activity.

Both detection frequencies and concentrations of anti-C1q Abs were investigated, and a comparison was performed between anti-C1q Abs and other immune markers found in the serum of patients suffering from connective tissue diseases, and in healthy controls (C). Also, possible correlations were examined between the immune markers under analysis and the occurrence and clinical features of PGN and SGN (LN in particular). A specific mutation in the gene encoding C1q A-chain was sought and C1q mRNA expression was assessed in blood leukocytes and kidneys of GN patients and group C.

The study group consisted of 208 GN patients and 86 C. In the GN group, a total of 139 patients had a diagnosis of PGN and the remainder – SGN. In the PGN sub-group, a total of 100 patients were diagnosed with mesangial proliferative glomerulonephritis (MesPGN), 7 patients with membranoproliferative glomerulonephritis (MPGN), 26 patients with idiopathic membranous



glomerulonephritis (IMGN) and 6 patients with focal segmental glomerulosclerosis (FSGS). Among study participants with SGN, a total of 63 patients had a diagnosis of LN and 6 patients extracapillary glomerulonephritis due to small-vessel vasculitis (SVV). LN patients were divided into two sub-groups depending on the activity of the disease process assessed by SLEDAI-2K (systemic lupus erythematosus disease activity index). The group of active LN (aLN) comprised patients with SLEDAI-2K scores  $\geq 10$ . A number of parameters were assessed in all GN patients and C, including anti-C1q and anti-dsDNA Abs, circulating immune complexes binding C1q (CIC-C1q) and C1q concentration in blood serum (by ELISA immunoassays). Concentrations of complement components C3 and C4 as well as total serum IgG concentrations were determined using turbidimetric method. DNA was isolated from full blood to search for mutations in the exon 2 of the C1qA gene. RNA was isolated to assess the expression of C1q mRNA by the real-time PCR (RT-PCR) in the leukocytes of study participants. Additionally, a RT-PCR analysis of C1q mRNA expression in the kidneys of 59 patients (36 patients with PGN, 17 with LN and 6 with SVV) was performed. The control material for this group of patients consisted of 5 normal kidney (NK) fragments harvested from the vicinity of removed kidney tumours. C1q expression at the level of the protein product in the kidneys of GN patients and 5 NK was examined using the three-stage APAAP (alkaline phosphatase - anti-alkaline phosphatase) technique and compared with results of an immunofluorescent method.

Results obtained in the tests show that anti-C1q Abs were much more common in the serum of patients suffering from LN (68.3%) than PGN (23%,  $p < 0.0001$ ) and C (10.5%,  $p < 0.0001$ ). They were not detected in serum of patients with SVV and FSGS. No differences were found either in the frequency of detection or in the mean concentrations of anti-C1q Abs across various morphological PGN types. On the other hand, these Abs were much more common (81.6% vs. 48%,  $p < 0.01$ ) and had higher concentrations ( $p < 0.01$ ) in the serum of patients with aLN than inLN. Anti-dsDNA Abs were detected exclusively in LN patients (76.2%). Even though they were more common in the serum of patients with aLN than inLN (89.5% vs. 56%,  $p < 0.01$ ), differences between these groups were not statistically significant. No LN patient with negative anti-C1q and anti-dsDNA antibody titers was diagnosed with active disease process.

C1q, similarly to anti-C1q Abs, were identified in the serum of patients suffering from PGN, LN and also in C. They were considerably more common in aLN patients (44.4% vs. 12%,  $p < 0.0001$ ) and occurred at higher concentrations ( $p < 0.05$ ) than in inLN subjects. Lower concentrations of complement components C3 and C4 were most frequently identified among LN patients (66.7% and 44.4%, respectively). In the PGN group, low C3 concentration in serum was noted in 13.8% of patients (predominantly patients diagnosed with MPGN). Serum C4 concentrations, on the other hand, were within normal range in all PGN patients and C. Significantly lower C3 concentrations in the serum were identified in aLN patients than in inLN patients ( $p < 0.001$ ). No differences in mean blood serum concentrations of C1q were shown between PGN, SGN and C groups, and between aLN and inLN groups. On the other hand, however, C1q mRNA expression in the leukocytes of GN patients was significantly higher than in C ( $p < 0.05$  for LN,  $p < 0.01$  for PGN). No differences were noted between PGN and SGN patients, and between aLN and inLN patient groups, though. Significantly higher mRNA expression was demonstrated in the kidneys of patients suffering from LN than PGN ( $p < 0.05$ ), with no differences between aLN and inLN. C1q expression at the level of the protein product in GN patients was shown in the glomeruli, blood vessels and renal interstitium. It seems to be linked to the presence of glomerular deposits containing C1q and/or the cellular production by interstitial infiltrating cells. No mutations were found in exon 2 of the gene encoding C1q A-chain in the leukocytes of GN patients and group C.

According to multiple logistic regression analysis, the occurrence of anti-C1q Abs together with low serum concentrations of C3 play the most important parts for the assessment of both SLE and LN activity. None of the independently assayed serological markers proved to be 100% specific to aLN. At the same time, however, it was shown that a concomitantly confirmed absence of anti-C1q and anti-dsDNA Abs in blood serum seemed to rule out aLN. Results obtained in the present study are in agreement with those obtained by other authors that serum anti-C1q antibody assays are useful for the assessment of LN activity