

Aleksandra Rochowiak

***Analiza ekspresji receptora CR1
na komórkach krwi chorych na pierwotne
i wtórne kłębuszkowe zapalenia nerek
(KZN)***

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 402 203 439

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
w pomocy 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 Czekałskiemu
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

ANOVA	-jednoczynnikowa analiza wariancji (ang. one way analysis of variance)
DEPC	-dietylopirowęglań (ang. diethyl pyrocarbonate)
detektor FSC	-detektor światła rozproszonego w cytometrze do przodu (forward scatter channel), wykonuje pomiar światła rozproszonego, mierzonego w przedłużeniu promienia lasera, światło pada prawie pod kątem 0 ⁰ , charakteryzuje wielkość komórek w cytometrii przepływowej
detektor SSC	-detektor światła rozproszonego w cytometrze do boku (ang. side scatter count); pomiar światła rozproszonego, wykonywany pod kątem 90 ⁰ , pozwala na analizę ziarnistości komórki w cytometrii przepływowej
DNA	-kwas deoksyrybonukleinowy (ang. deoxyribonucleic acid)
dNTP	-mieszanka trifosforanów deoksynukleotydów (ang. deoxyribonucleotide triphosphate)
EDTA	-kwas etylenodiaminotetraoctowy (ang. ethylenediaminetetraacetate)
eGFR	-szacowana filtracja kłębuszkowa (ang. estimated glomerular filtration rate)
ELISA	-metoda immunoenzymatyczna(ang. enzyme-linked immunosorbent assays)
FACS	-fluorescencyjny sorter komórek (ang. fluorescence-activated cell sorting)
HRP	-peroksydaza chrzanowa (ang. horseradish peroxidase)
IF	-immunofluorescencja
IS	-intensywność sygnału

kb	-kilo par zasad (ang. kilobase)
kDa, kD	-tysiąc Daltonów (ang. kilo Daltons)
MDRD	-Modification of Diet in Renal Disease
MFI	-średnia intensywność fluorescencji (ang. mean fluorescence intensity)
NBT/BCIP	-chlorek nitrobluetetrazolinum/5-bromo-4-chloro-3-indolyfosforanu
PCR	-reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. polymerase chain reaction)
Polimeraza Redtaq	-czerwona polimeraza pochodząca z bakterii <i>Thermus Aquaticus</i>
pz	-para zasad
RFLP	-polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (ang. restriction fragments length polymorphism)
RPM	-obroty na minutę (ang. rotations per minute)
SEM	-błąd standardowy średniej (ang. standard error of mean)
SD	-odchylenie standardowe (ang. Standard deviation)
TAE	-roztwór buforujący do elektroforezy (ang. Tris-acetate-EDTA electrophoresis buffer)
wpw	-w polu widzenia

Inne objaśnienia (w tym skróty dotyczące chorób nerek)

ACR	-American College of Rheumatology
ANA	-przeciwciała przeciwjądrowe (ang. Antinuclear antibodies)
AP-1	-activator protein-1; czynnik transkrypcyjny
ARDS	-zespół ostrej niewydolności oddechowej (ang. acute respiratory distress syndrome)

aTZN	-aktywne toczniowe zapalenie nerek
AZA	-azatiopryna
BILAG	-British Isles Lupus Assessment Group Scale
BCR	-receptor dla antygenu limfocytów B (ang. B-Cell Receptor)
B-CR1	-ekspresja CR1 na limfocytach B
BłokZN	-błoniaste kłębuszkowe zapalenie nerek (ang. idiopathic membranous glomerulonephritis)
BłorozKZN	-błoniasto-rozplemowe kłębuszkowe zapalenie nerek (ang. membranoproliferative glomerulonephritis)
C1-9	-składowe dopełniacza C1-9 (ang. complement components C1-9)
C1q	-składowa dopełniacza C1q (ang. complement component C1q)
C3bR	-receptor dla składnika C3b dopełniacza
CD	-kompleks różnicowania (ang. cluster of differentiation);
CD35	-cząsteczka CD35
CR	-receptor dopełniacza (ang. complement receptor)
CR1	-receptor dopełniacza typu 1 (ang. complement receptor type 1)
CR2	-receptor dopełniacza typu 2 (ang. complement receptor type 2)
CsA	-cyklosporyna A
CYC	-cyklofosfamid
dsDNA	-dwuniciowy DNA (double-stranded DNA)
E	-erytrocyturia (ang. erythrocyturia)
ECLAM	-European Consensus Lupus Activity Measure
E-CR1	-receptor CR1 na erytrocycie (ang. Erythrocyte CR1)
FMLP	-N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine

FSGS	-ogniskowe segmentalne stwardnienie kłębuszków nerkowych (ang. focal-segmental glomerulosclerosis)
GC	-grupa całkowita objęta badaniem
G-CR1	-ekspresja CR1 na granulocytach
GKS	-glikokortykosteroidy
IgA-KZN	-nefropatia IgA (ang. IgA-glomerulonephritis)
IgG	-immunoglobulina G
IgM	-immunoglobulina M
K	-grupa kontrolna
KI	-kompleksy immunologiczne
KZN	-kłębuszkowe zapalenie nerek
L	-leukocyturia (>5 WBC wpw po odwirowaniu próbki moczu)
LAI	-Lupus Activity Index
LHR	-długie powtórzenia sekwencji (ang. long homologous repeats)
MAC	-kompleks atakujący błonę (ang membrane attack complex)
MAF	-częstość allelu mniejszego (ang. minor allele frequency)
MASP 1-3	-proteaza serynowa wiążąca MBL 1-3 (ang. MBL Associated Serine Protease 1-3)
MBL	-lektyna wiążąca mannozę (ang. mannan binding lectin)
MCD	-submikroskopowe kłębuszkowe zapalenie nerek (ang. minimal change disease)
M-CR1	-ekspresja CR1 na monocytach
m. cz.	-masa cząsteczkowa
MesKZN	-mezangialne rozplemowe kłębuszkowe zapalenie nerek (ang. mesangial proliferative glomerulonephritis)

MP	-metylprednizolon
naTZN	-nieaktywne toczniowe zapalenie nerek
n-IgA-KZN	-wszystkie postacie MesKZN z wyjątkiem IgA-KZN
NT	-nadciśnienie tętnicze
p-dsDNA	-przeciwciało przeciw dwuniciowemu DNA
PKZN	-pierwotne kłębuszkowe zapalenie nerek
PKZN-NR	-pierwotne kłębuszkowe zapalenie nerek- nierozplemowe
PKZN-R	-pierwotne kłębuszkowe zapalenie nerek rozplemowe
PLT	-płytki krwi (ang. platelets)
PMSF	-fluorek fenylometylosulfonu (ang. phenylmethylsulfonil fluoride)
RBC	-erytrocyty (ang red blood cells)
RCA	-regulator aktywacji dopełniacza (ang. regulator of complement activation)
rCR1	-rekombinowany CR1
RIA	-metoda radioimmunologiczna (ang. radioimmunoassay)
RZS	-reumatoidalne zapalenie stawów
SCR	-krótkie powtórzenia sekwencji (ang. short consensus repeats)
Scr	-stężenie kreatyniny w surowicy
sCR1	-rozpuszczalna forma CR1 (ang. soluble CR1)
SLAM	-Systemic Lupus Activity Measure
SLEDAI-2K	-wskaźnik aktywności tocznia rumieniowatego układowego (ang. Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index)
TPUR	-białkomocz dobowy
TRU	-toczeń rumieniowaty układowy (ang. systemic lupus erythematosus)
TZN	-toczniowe zapalenie nerek

uCR1	-rozpuszczalny CR1 w moczu (ang. urine CR1)
UD	-układ dopełniacza
WBC	-leukocyty (ang. white blood cells)
WKZN	-wtórne kłębuszkowe zapalenie nerek
ZN	-zespół nerczycowy
ZUM	-zakażenie układu moczowego

SPIS TREŚCI

SPIS STOSOWANYCH SKRÓTÓW	3
SPIS TREŚCI.....	9
1. WSTĘP.....	12
1.1. Wprowadzenie	12
1.2. Budowa i aktywacja układu dopełniacza.....	12
1.3. Lokalizacja i budowa CR1 oraz struktura genu dla CR1	15
1.4. Polimorfizm CR1	18
1.4.1. Polimorfizm związany z masą cząsteczkową CR1	18
1.4.2. Polimorfizm związany z liczbą CR1 na powierzchni erytrocytów.....	19
1.5. Rozpuszczalna forma CR1 (sCR1).....	20
1.6. Funkcja CR1	20
1.7. sCR1 jako środek terapeutyczny	22
1.8. CR1 a toczeń rumieniowaty układowy.....	23
1.9. CR1 a pierwotne kłębuszkowe zapalenie nerek	26
1.10. Ocena aktywności toczenia rumieniowatego układowego	27
1.11. Uzasadnienie dla przeprowadzenia badania.....	29
2. CEL PRACY	31
3. MATERIAŁ I METODY	32
3.1. Chorzy.....	32
3.2. Opracowanie materiału do badań	40
3.3. Dodatkowe badania laboratoryjne	40
3.4. Parametry immunologiczne	41
3.5. Ocena funkcji nerek.....	43
3.6. Oznaczanie stężenia sCR1 w surowicy	43
3.7. Izolacja DNA	44
3.8. Amplifikacja DNA metodą PCR	45
3.9. Przygotowanie żelu agarozowego do elektroforezy	46
3.10. Elektroforeza	47
3.11. Przygotowywanie produktów PCR do dalszych analiz	47
3.12. Analiza restrykcyjna produktów amplifikacji.....	48
3.13. Cytometria przepływowa	48
3.14. Metody statystyczne.....	52

4. WYNIKI.....	54
4.1. Analiza produktu <i>HindIII</i> RFLP.....	54
4.1.1. Analiza produktu PCR.....	54
4.1.2. Analiza produktów reakcji restrykcji z użyciem enzymu <i>HindIII</i>	54
4.2. Ocena częstości występowania genotypów HH, HL i LL w badanej populacji	56
4.3. Ocena wpływu genotypów <i>HindIII</i> CR1 na wystąpienie choroby (PKZN,TZN)	59
4.4. Ocena i porównanie ekspresji CR1 na różnych komórkach w grupach osób z różnymi genotypami CR1	61
4.5. Ocena wpływu posiadanego genotypu <i>HindIII</i> CR1 na poziom jego ekspresji na komórkach krwi osób badanych	64
4.6. Ocena średniej ekspresji CR1 na komórkach krwi w badanych grupach niezależnie od genotypu	76
4.7. Porównanie ekspresji CR1 na komórkach krwi między grupami osób z różnym rozpoznaniem klinicznym z uwzględnieniem płci i wieku	77
4.8. Porównanie stężeń sCR1 w surowicy zdrowych i chorych na PKZN i TZN... 82	
4.9. Porównanie stężeń sCR1 w badanych podgrupach z uwzględnieniem płci i wieku	83
4.10. Porównanie stężeń sCR1 w surowicy zdrowych i chorych między grupami z różnymi genotypami <i>HindIII</i> CR1	85
4.11. Ocena wpływu genotypów <i>HindIII</i> CR1 na stężenie sCR1 w surowicy osób badanych.....	86
4.12. Ocena stężeń składników dopełniacza C3 i C4 w surowicy badanych.....	92
4.12.1. Ocena stężeń C3 w surowicy badanych w grupie K, PKZN i TZN	92
4.12.2. Ocena stężeń C4 w surowicy badanych w grupie K, PKZN i TZN	93
4.13. Badanie korelacji pomiędzy wybranymi parametrami w grupie K i u chorych na TZN oraz PKZN	95
4.14. Ocena wpływu wybranych czynników klinicznych, biochemicznych i genetycznych na wysokość ekspresji CR1 na komórkach krwi oraz stężenie sCR1 w surowicy w grupie K i u chorych na PKZN oraz TZN z zastosowaniem modeli regresji wielorakiej.....	97

4.15. Wieloczynnikowa wsteczna analiza logistyczna dotycząca wpływu polimorfizmu rs11118133 genu CR1 na komórkach krwi oraz stężenie sCR1 w surowicy badanych osób.....	103
4.16. Analiza wpływu leczenia glikokortykoidami na ekspresję CR1 na komórkach krwi i stężenie sCR1 w surowicy chorych na PKZN i TZN.....	108
4.17. Analiza wpływu aktywności TRU mierzonej w skali SLEDAI-2K na ekspresję CR1 na komórkach krwi i stężenie sCR1 w surowicy chorych na TZN	111
5. OMÓWIENIE I DYSKUSJA.....	113
5.1. Analiza częstości występowania genotypu HH, HL i LL u zdrowych i chorych na PKZN i TZN oraz wpływu genotypów <i>HindIII</i> na rozwój PKZN i TZN oraz ekspresję CR1 na komórkach krwi.....	113
5.2. Analiza ekspresji CR1 na komórkach krwi u chorych na PKZN i TZN	115
5.2.1. Analiza ekspresji E-CR1	115
5.2.2. Analiza ekspresji CR1 na leukocytach krwi	117
5.2.3. Wpływ glikokortykosteroidów i czynnika płci na ekspresję CR1 na leukocytach krwi.....	121
5.3. Analiza stężenia sCR1 w surowicy zdrowych i chorych na PKZN i TZN....	122
6. PODSUMOWANIE.....	125
7. WNIOSKI	126
8. PIŚMIENNICTWO.....	127
9. SPIS RYCIN	144
10. SPIS TABEL.....	147
11. STRESZCZENIE	151
12. SUMMARY	156

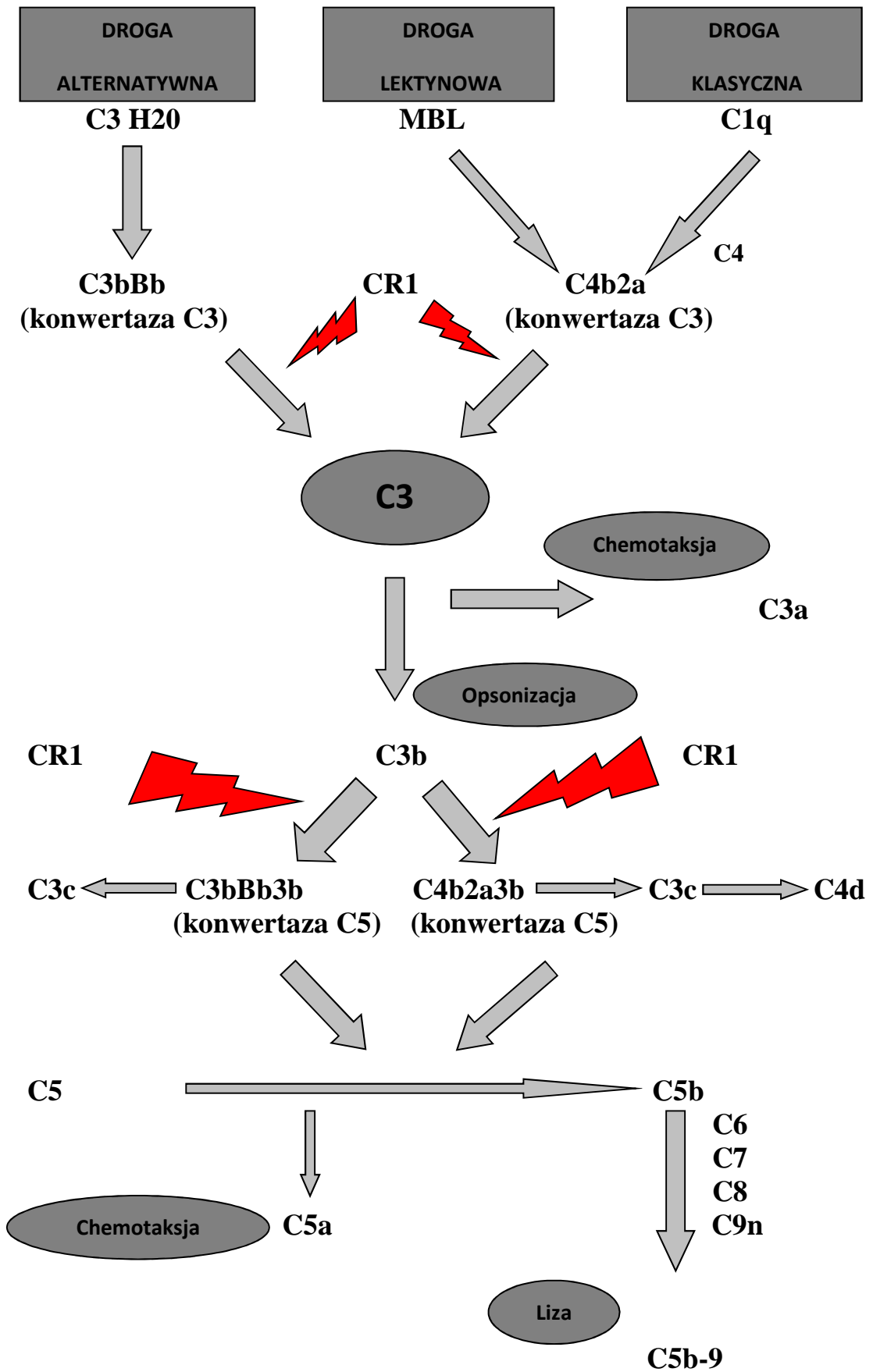
1. WSTĘP

1.1. Wprowadzenie

Układ dopełniacza (UD) jest częścią wrodzonej odporności, która dzięki współpracy z przeciwciałami uczestniczy w swoistej odpowiedzi immunologicznej [1,2]. UD bierze udział w skutecznej obronie przeciwko patogenom i komórkom nowotworowym, a także przyczynia się do usuwania z organizmu kompleksów immunologicznych (KI) oraz martwych i apoptotycznych komórek [3]. Szereg receptorów dla składników dopełniacza (Complement Receptor, CR), zlokalizowanych na różnych komórkach, umożliwia interakcje składnik dopełniacza-receptor wpływając tym samym na wiele procesów immunologicznych, m. in. mechanizm przylegania i fagocytozy, aktywację limfocytów, absorpcję, przetwarzanie i prezentację antygenów [4,5]. Obok wielu niewątpliwie korzystnych efektów, jakie spełnia UD dla układu odpornościowego, istnieje szereg zagrożeń, które mogą wynikać z jego nieprawidłowej kontroli. Nadmierna, lub niewłaściwa aktywacja UD może doprowadzić do uszkodzenia tkanek gospodarza, prezentacji własnych antygenów, aktywacji i śmierci własnych komórek, a tym samym wywołania stanu zapalnego i rozwoju chorób autoimmunologicznych [5]. W toku ewolucji organizm ludzki wytworzył szereg zabezpieczeń w postaci białek regulacyjnych, które mają chronić własne komórki przed skutkami niewłaściwej aktywacji dopełniacza [5]. Należy do nich receptor UD typu 1 (Complement Receptor 1, CR1, C3bR, CD35), któremu poświęcona jest niniejsza praca.

1.2. Budowa i aktywacja układu dopełniacza

UD jest to system ponad 60 białek błonowych i osoczowych, występujących najczęściej w formie proenzymatycznej, których aktywacja następuje w określonej kolejności i może przebiegać trzema różnymi drogami: klasyczną, alternatywną i lektynową. Wszystkie trzy drogi spotykają się na poziomie białka C3 i mogą kończyć utworzeniem kompleksu ataku błonowego (MAC) [1], co w 90% doprowadza do lizy komórki (Ryc. 1).



Ryc. 1. Schemat aktywacji układu dopełniacza. Zazębiające się strzałki oznaczają miejsca działania CR1 jako regulatora aktywacji UD

Klasyczna droga aktywacji UD wiąże się z nabytą odpowiedzią odpornościową. Wymaga udziału przeciwciał (klasy IgM, IgG1 lub IgG3), co wiąże się z koniecznością wcześniejszego kontaktu gospodarza ze specyficznym antygenem związanym z docelowym drobnoustrojem. Aktywacja drogi klasycznej następuje poprzez połączenie się C1q z kompleksem antygen-przeciwciało [6,7]. Wywołuje to aktywację proteaz serynowych drogi klasycznej (C1r i C1s) i powstanie kompleksu C4b2a (konwertazy C3) [5]. Konwertaza C3 rozszczepia składnik C3, oddzielając od niego fragment C3a (czynnik chemotaktyczny). Kompleks C4b2a łącząc się z nowo powstałym elementem C3b tworzy nowy enzym drogi klasycznej, konwertazę C5. Efektem proteolitycznego działania kompleksu C4b2a3b jest powstanie C5b, do którego przyłączają się już w sposób nieenzymatyczny kolejno C6, C7, C8 i C9. Kompleks C5b-9 stanowi wspomniany wcześniej MAC [1].

Alternatywna droga aktywacji UD została opisana już w latach pięćdziesiątych. Stanowi część wrodzonej odporności i umożliwia aktywację UD niezależnie od obecności przeciwciał na powierzchni drobnoustrojów. Wiaże się ze spontaniczną hydrolizą C3 i pozostaje w ciągłym stanie aktywacji. Zapewnia znacznie szybszą odpowiedź immunologiczną, dając czas na rozwój precyzyjniejszej, ale wolniejszej aktywacji UD drogą klasyczną. Przy pomocy czynnika B i czynnika D, droga alternatywna prowadzi do powstania kompleksu C3bBb, który stanowi konwertazę C3 drogi alternatywnej [3]. Następnie dąży do utworzenia konwertazy C5 (C3bBb3b). W momencie rozszczepienia C5 na C5a i C5b, obie drogi (klasyczna i alternatywna) łączą się prowadząc do utworzenia C5b-9 [1].

Wrodzona lektynowa droga aktywacji UD, opisana najpóźniej, różni się od klasycznej wstępnym rozpoznaniem. Jej aktywacja następuje poprzez bezpośrednie połączenie się MBL (lektyny strukturalnie podobnej do C1q) z sacharydami bakteryjnymi [8,9]. Z MBL związane są proteazy serynowe (MASP 1-3). Za aktywację kaskady komplementu odpowiedzialna jest głównie MASP-2 [9,10]. Rozszczepia ona C4 i C2 prowadząc do powstania konwertazy C3, tj. aktywnego kompleksu C4b2a [1,10].

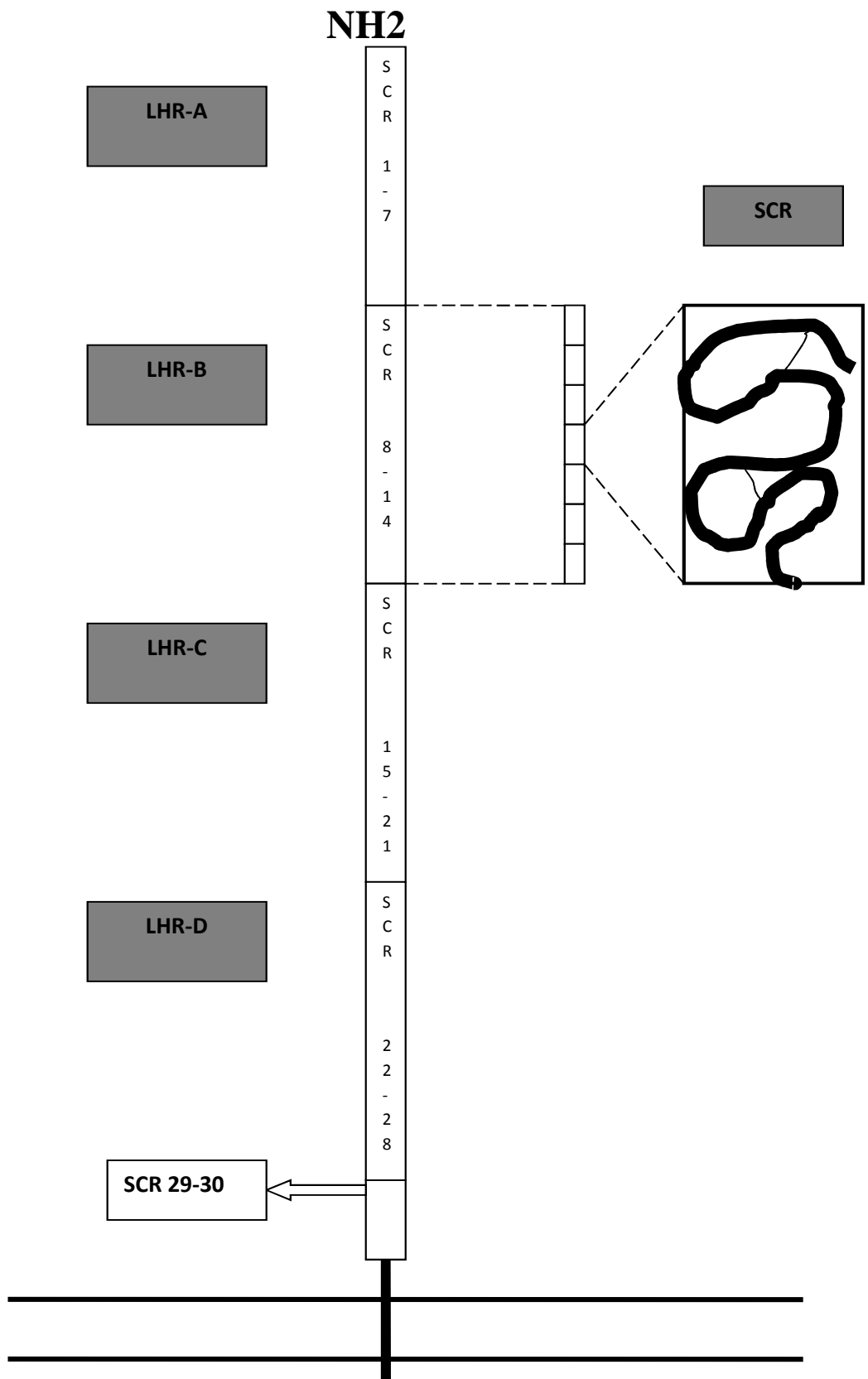
1.3. Lokalizacja i budowa CR1 oraz struktura genu dla CR1

CR1 jest receptorem błonowym znajdującym się na powierzchni wielu komórek, m.in. erytrocytów, neutrofilów, monocytów, makrofagów, eozynofiliów, limfocytów B i T, podocytów, komórek dendrytycznych i komórek Langerhansa w skórze [2,11-15]. Liczba receptorów CR1 na erytrocycie (E-CR1) wynosi 10-1000/komórkę (średnio około 500-600/komórkę) i zmniejsza się fizjologicznie wraz z procesem starzenia się czerwonych krwinek, za co prawdopodobnie odpowiedzialna jest proteoliza powierzchniowa [16,]. W przypadku leukocytów ekspresja ta jest znacznie większa (około 20000/komórkę). Jednak biorąc pod uwagę liczbę erytrocytów w stosunku do innych komórek krwi, liczba CR1 na erytrocytach stanowi około 85-90% wszystkich CR1 na komórkach krwi [17].

CR1 zbudowany jest z pojedynczego łańcucha glikoproteinowego, składającego się z części zewnątrzkomórkowej, przezbłonowej i cytoplazmatycznej (hydrofobowej) [18]. CR1 należy do tzw. genowej superrodziny RCA, której gen zlokalizowany jest na ramieniu długim chromosomu 1, w pozycji 32 (1q32) [19]. Gen składa się z sekwencji promotorowej, nie podlegającej translacji części 5', części zewnątrzkomórkowej, części przezbłonowej, części cytoplazmatycznej i nie podlegającego translacji rejonu 3' [20]. Cechą charakterystyczną rodziny RCA jest występowanie krótkich powtórzeń sekwencji nukleotydów SCR [3]. Jeden odcinek SCR to około 60 aminokwasów, wśród których znajdują się cztery cysteiny tworzące dwa mostki dwusiarczkowe. Mostki dwusiarczkowe nadają peptydowi podwójnie zakręcony kształt [21]. Każde kolejne 7 SCR można dalej pogrupować w długie powtórzenia sekwencji (LHR). Sekwencja zbudowana z SCR dotyczy części zewnątrzkomórkowej. Najczęstsza forma CR1 zawiera 30 SCR i składa się z czterech LHR, oznaczanych kolejno literami alfabetu: A, B, C, D [14], obejmujących SCR od 1 do 28 [22]. Dwa ostatnie SCR 29-30 dołączone są do końca 3' LHR-D (Ryc. 2). Cząsteczka polipeptydowa CR1 ulega potranslacyjnej glikozylacji. Dojrzała cząsteczka zawiera kompleks oligosacharydów (głównie tri- i tetra-) przyłączonych do N-końca łańcucha polipeptydowego [23].

Receptor CR1 ma powinowactwo głównie do składników C3b i C4b dopełniacza [2,14,21,24]. W obrębie LHR-A znajduje się rejon łączący się z C4b, natomiast LHR-B i LHR-C zawierają miejsce przyłączania C3b/C4b i miejsce o aktywności kofaktora czynnika I [22,24,25]. LHR-D zawiera elementy grupowe

układu Knops, specyficzne miejsce wiązania z MBL i miejsce wiązania C1q [22,26-28].



Ryc. 2. Schemat budowy receptora CR1 (allel A) [22]

1.4. Polimorfizm CR1

Ze względu na złożoną rolę CR1 (patrz→ funkcja CR1) od kilkadziesiąt lat trwają intensywne badania nad możliwymi polimorfizmami ludzkiego E-CR1, które mogą wpływać na funkcję tej molekuly. Do tej pory najbardziej poznane są trzy z nich. Pierwszy dotyczy struktury cząsteczki i masy cząsteczkowej, czyli w istocie długości łańcucha polipeptydowego. Drugi polimorfizm związany jest z liczbą receptorów na erytrocytach. Trzeci polimorfizm natomiast obejmuje układ grupowy czerwonych krwinek Knops i wynika z pojedynczych mutacji antygenowych w obrębie eksonu 29 (SCR-25) [11,29-32]. Poniżej znajduje się szczegółowy opis dwóch pierwszych polimorfizmów.

1.4.1. Polimorfizm związany z masą cząsteczkową CR1

Receptor CR1 występuje w formie czterech różnych alleli różniących się masą cząsteczkową (m.cz.). Allele oznaczane są czterema kolejnymi literami alfabetu: allel A (=allel F, o m.cz. 190 kD), allel B (=allel S, o m.cz. 220 kD), allel C (allel F'; najmniejszy, o m.cz. 160 kD) i allel D (o m.cz. 250 kD) [11]. Dziedziczenie następuje w sposób autosomalny kodominujący [33]. Różnice w wielkości cząsteczki wynikają z różnicy w długości mRNA, a nie obróbki potranslacyjnej, co wskazuje na różną długość części polipeptydowej receptora [11,34]. Wong i wsp. zaproponowali, że polimorfizm CR1 związany z różną masą cząsteczek wynika z duplikacji, lub delecji odcinka obejmującego LHR w obrębie pierwotnej formy transkryptu CR1 [35]. Sugestie te potwierdzałyby różnice w m. cz. pomiędzy poszczególnymi allelami, wynoszącej 30 kD, co jest w przybliżeniu równe m.cz. LHR. Allel A zawiera cztery LHR, allel B pięć LHR, natomiast allel C trzy LHR [36]. Predysponuje to do różnej ilości miejsc wiążących C3b/C4b. Allel B, zawierający dodatkowy LHR, posiada dodatkowe miejsce wiążące C3b/C4b w stosunku do allelu A [21]. Natomiast allel C ma najmniejszą zdolność wiązania się z C3b [35]. Częstsze występowanie dużych form CR1 (o m. cz. 220 kD i 250kD) w populacji afrykańskiej może być związane z koniecznością pojawienia się form z większą liczbą miejsc wiązania C3b w populacji bardziej narażonej na choroby infekcyjne (bakteryjne, wirusowe i pasożytnicze) [11].

1.4.2. Polimorfizm związany z liczbą CR1 na powierzchni erytrocytów

Liczba E-CR różni się znacznie u różnych osobników i waha w przedziale od 100-1000 cząsteczek/komórkę. Wydaje się, że liczba E-CR1 jest genetycznie uwarunkowana i dziedziczona w sposób autosomalny kodominujący [34]. Zmiana pojedynczego nukleotydu w obrębie intronu 27 (w obrębie odcinka LHR-D, Ryc. 2), prowadząca do wymiany pojedynczego nukleotydu (adeniny na tyminę), jest odpowiedzialna za polimorfizm rs11118133 [37]. Przy wykorzystaniu enzymu restrykcyjnego *HindIII* i metody RFLP (restriction fragment length polymorphism) oraz techniki Southern blot, wyróżniono dwa allele: allel H (high expression; 7,4kb) i allel L (low expression; 6,9kb). W związku z kodominującym sposobem dziedziczenia, możliwe jest powstanie trzech kombinacji: homozygoty HH, związanej z wysoką ekspresją, homozygoty LL z niską ekspresją oraz jednej heterozygoty HL odpowiadającej za średnią ekspresję E-CR1 [11,13,38,39]. W latach 90-tych została opracowana ocena polimorfizmu rs11118133 techniką PCR [37]. Metoda ta umożliwiła sprawdzenie polimorfizmu na większą skalę w badaniach klinicznych. Polimorfizm jednego nukleotydu w obrębie intronu 27 genu CR1, czyli części niekodującej genu, nie wpływa bezpośrednio na zmiany kodonów w obrębie ramki odczytu CR1, ale wydaje się być sprzężona z mutacjami w obrębie części kodującej. Różnice w sekwencji pojedynczych nukleotydów zostały potwierdzone w wielu pozycjach, z czego co najmniej sześć może powodować zmiany w pojedynczych aminokwasach [20]. Mutacje pojedynczych nukleotydów, które zostały zidentyfikowane przy wykorzystaniu techniki PCR i enzymów restrykcyjnych *BstNI*, *RsaI* i *MnII* są specyficzne dla allelu L i obejmują m. in. wymianę guaniny na tyminę w pozycji 3093 (G3093T), adeniny na guaninę w pozycji 3650 (A3650G) i cytozyny na guaninę w pozycji 5507 (C5507G-ekson 33) [20]. Zmiana w sekwencji aminokwasów może wpływać na stabilność cząsteczki CR1 i zwiększać wrażliwość receptora na proteolizę [20]. Mutacja w pozycji 5507 prowadzi do zamiany proliny na argininę, co skutkuje stworzeniem nowego miejsca dla działania proteaz [40,41].

Powyżej opisany trójmodalny schemat dystrybucji E-CR1 obserwowany jest w populacji kaukaskiej [20], indyjskiej [42], ale nie w afrykańskiej [40]. Jednakże wyższą ekspresję E-CR1 wykazano u rodzimych mieszkańców Zachodniej Afryki i Afroamerykanów w porównaniu do grupy Amerykanów pochodzenia europejskiego [11].

Dziedziczny charakter zmiennej ekspresji E-CR1 nie jest do końca pewny. Receptor ten podatny jest na proteolizę *in vitro* i może równie dobrze ulegać rozkładowi enzymatycznemu *in vivo*. Być może zwiększona wewnątrznaczyniowa aktywność proteaz u chorych ze stanami zapalnymi w organizmie, chorobami nowotworowymi lub autoimmunologicznymi, wpływa na zmiany ekspresji E-CR1 obserwowane u tych chorych [11,43]. Obniżona ekspresja E-CR1 może mieć tym samym charakter nabyty.

1.5. Rozpuszczalna forma CR1 (sCR1)

Pozbawiony części przezłonowej i cytoplazmatycznej łańcuch polipeptydowy CR1 jest wykrywany w surowicy w formie rozpuszczalnej (soluble CR1, sCR1) [18,44,45]. Yoon i wsp. wykazali, że u osób zdrowych stężenie sCR1 waha się między 13-81 ng/ml i koreluje z liczbą E-CR1 u tych samych osób [46,47]. Stężenie sCR1 stanowi około 7% liczby E-CR1. Strukturalnie, sCR1 zachowuje taki sam fenotyp jak CR1 na komórkach i po oczyszczeniu z surowicy zachowuje taką samą aktywność, m. in. zdolność wiązania C3b [47]. Wykazano jednak, że głównym źródłem sCR1 są prawdopodobnie leukocyty. Do surowicy sCR1 dostaje się poprzez enzymatyczną proteolizę na powierzchni komórki, bądź tworzenie pęcherzyków błonowych [46,48]. Okres biologicznego półtrwania sCR1 wynosi prawdopodobnie około 2-3 dni, podobnie, jak innych białek UD [46,49-51].

CR1 wykrywany jest również w moczu (uCR1). U zdrowych osób ilość wydalanego uCR1 wynosi około $3,12 \pm 1,15$ $\mu\text{g}/\text{dobę}$. Wydalany uCR1 zachowuje zdolność wiązania KI opłaszczonych C3b. Pascual i wsp. wykazali niezgodność alleli uCR1 i alleli CR1 występujących na erytrocytach własnych (patrz polimorfizm CR1) u pacjentów po przeszczepie nerki, co wskazuje na nerki jako miejsce produkcji uCR1. Źródłem uCR1 są prawdopodobnie podocyty [46,52].

1.6. Funkcja CR1

CR1, jako członek rodziny RCA, ma za zadanie regulować aktywację UD i przede wszystkim zapobiegać jego nadmiernej aktywacji. Dokonuje tego poprzez hamowanie działania konwertazy C3 i C5. CR1, oddzielając fragmenty C3b i C4b,

do których wykazuje powinowactwo, hamuje jednocześnie wszystkie trzy drogi aktywacji UD [1]. Miejsce działania CR1 w systemie aktywacji UD zobrazowano na Ryc. 1. CR1 działa dodatkowo jako kofaktor czynnika I, który inaktywuje składniki C3b i ułatwia rozszczepienie C3b na iC3b, C3c i C3dg. Fragment iC3b nie tworzy już konwertaz C3/C5 [14,16,24]. Poprzez wspomniane dwa mechanizmy CR1 zapobiega spontanicznemu formowaniu się MAC na własnych komórkach (m.in. na limfocytach B) i tym samym umożliwia przetrwanie komórek w krążeniu [7].

Dzięki powinowactwu do fragmentów C3b i C4b, CR1 bierze udział w usuwaniu z krążenia KI opłaszczonych składnikami dopełniacza [11]. W przypadku erytrocytów, wiązane przez E-CR1 KI usuwane są z ich powierzchni w trakcie przechodzenia przez śledzionę i wątrobę, po czym krwinki czerwone wracają do krążenia [4,5,53-55]. Natomiast CR1 na powierzchni komórek żernych, m. in. granulocytów i monocytów, współpracuje z receptorem Fc-gamma i ułatwia wychwyt i fagocytozę KI i patogenów opłaszczonych składnikami dopełniacza (C3b) [4,56,57].

Dzięki ekspresji CR1 i CR2 (receptor dla iC3b, C3d i C3dg) na powierzchni limfocytów B UD ukierunkowuje i moduluje odpowiedź limfocytów B na bodźce antygenowe [2,7]. W wielu procesach oba receptory ściśle ze sobą współdziałają.

Składnik C3 UD odgrywa znaczącą rolę w regulacji odpowiedzi limfocytów B na antygen [2,58]. CR1, poprzez stabilizację i obniżenie progu aktywności konwertazy C3, ułatwia odkładanie się składnika C3 dopełniacza na powierzchni limfocytów B, a przez to promuje wychwyt i przetrzymywanie iC3b, a dalej prezentację iC3b receptorowi CR2 [7]. Dodatkowo, działając jako kofaktor czynnika I, CR1 ułatwia rozszczepienie iC3b na C3c i C3dg i powstanie liganda dla CR2 [7]. CR2 natomiast, dzięki obecności KI opłaszczonych C3d łączy się krzyżowo z receptorem antygenowym limfocytów B (BCR; B-Cell Receptor), obniżając tym samym próg aktywacji limfocytów B i zwiększając ponad 1000-krotnie reakcję limfocytów B na antygen [2]. Z drugiej strony istnieją dowody na to, że krzyżowe połączenie CR1 i KI zopsonizowanych C3b hamuje proliferację limfocytów B [2,58,59].

Współdziałanie CR1 i CR2 na powierzchni limfocytów B ułatwia aktywację UD wszystkimi trzema drogami i może prowadzić do powstania kompleksu MAC [7,60]. Aktywacja drogi klasycznej UD jest możliwa dzięki obecności miejsca

wiążące C1q w obrębie cząsteczki CR1 [7,28]. Mimo utworzenia MAC, szereg zabezpieczeń na powierzchni limfocyta B nie dopuszcza do rozpadu komórki. Inkorporacja C5b-9 w błonę komórkową limfocytów prowadzi do zmian w polarności błony, co umożliwia wolny napływ Ca^{2+} do komórki i aktywację wielu szlaków sygnałowych [7,61-64]. Z powyższych danych wynika, że rola CR1 na powierzchni limfocytów B nie jest do końca wyjaśniona i wymaga dalszych badań.

1.7. sCR1 jako środek terapeutyczny

Rozpuszczalna forma CR1, w związku z wykazywaną wielofunkcyjnością oraz hamowaniem UD, od dawna wzbudzała zainteresowanie jako możliwy środek terapeutyczny. Zahamowanie dopełniacza na etapie C3 prowadzi do szerokiej blokady UD [65]. Ze względu na zachowane miejsce wiązania z C3b/C4b oraz aktywność jako kofaktora czynnika I, oceniana była przydatność terapeutyczna sCR1 w szeregu procesów, w których rozwoju udział UD został potwierdzony. Badania te, w większości wykonane na zwierzętach, dotyczyły m.in.: niedokrwienia jelit [66], modelu ARDS [67], eksperymentalnego zapalenia stawów [68], autoimmunologicznego zapalenia tarczycy [69] i kłębuszkowych zapaleń nerek (KZN) [44]. Zastosowanie sCR1 u szczurów z niedokrwieniem mięśnia sercowego w 44% zmniejszało obszar martwicy mięśnia sercowego, co wiązano z mniejszym naciekiem leukocytarnym w obszarze niedokrwienia, prawdopodobnie wskutek obniżonej produkcji C5a [45,70].

Głównym ograniczeniem uniemożliwiającym wykonywanie przeszczepów między niespokrewnionymi gatunkami jest aktywacja UD, która prowadzi do nadostrego odrzucania przeszczepionych narządów. Zahamowanie tego procesu nie jest możliwe przy pomocy ogólnie dostępnych środków immunosupresyjnych. Zainspirowało to szereg badań nad wykorzystaniem sCR1 jako czynnika, który regulując aktywację UD mógłby zapobiegać nadostremu odrzucaniu przeszczepu ksenogenicznego. Wyniki badań eksperymentalnych są obiecujące. Podanie sCR1 w sposób istotny wydłużało przeżycie przeszczepów ksenogenicznych i allogenicznych [71,72].

Na rynku dostępny jest preparat rekombinowanej formy CR1 (rCR1) o nazwie TP-10 (AVANT Immunotherapeutics, Needham, Mass), który podawany jest parenteralnie [44]. Był on testowany klinicznie u pacjentów z ARDS, ostrym

niedokrwieniem mięśnia sercowego oraz u chorych po transplantacji płuc [65,73,74]. Badania przeprowadzone na 15 niemowlętach, zakwalifikowanych do wykonania płucno-sercowych połączeń omijających przed upływem pierwszego roku życia, potwierdziły bezpieczeństwo TP-10, podawanego w dawce 10 mg/kg masy ciała. Po podaniu TP-10 obserwowano obniżenie aktywności UD wywołanej zabiegiem operacyjnym i ochronne działanie preparatu na naczynia [75]. W randomizowanych wieloośrodkowych badaniach, obejmujących ponad 560 pacjentów wysokiego ryzyka, dożylne podanie TP-10 tuż przed zabiegiem operacyjnym pomostowania sercowo-płucnego zmniejszyło śmiertelność i liczbę zawałów serca u mężczyzn [76].

Pojawiły się też próby modyfikacji cząsteczki sCR1 mające na celu usprawnienie farmakokinetyki i funkcji CR1. Połączenie sCR1 z receptorem wiążącym albuminy wydłużyło okres półtrwania sCR1, który w poprzedniej wersji wynosił kilka godzin [77]. Natomiast usunięcie odcinka LHR-A z łańcucha polipeptydowego sCR1 (sCR1[desLHR-A]), pozbawiające cząsteczkę specyficznego miejsca wiązania C4b, ograniczyło działanie tylko do hamowania alternatywnej drogi aktywacji UD [78]. Połączenie sCR1 z pojedynczym łańcuchem Fv przeciwciała skierowanego przeciwko antygenowi D (CR1-Fv anti-Rh(D) complex) na krwinkach czerwonych umożliwiło, poprzez przyłączenie tego kompleksu do błony komórkowej, wzrost gęstości receptora na powierzchni erytrocytów. Oudin i wsp. sugerują, że zwiększa to zdolność erytrocytów do usuwania KI i może być w przyszłości wykorzystane jako strategia terapeutyczna w chorobach, w których niska ekspresja E-CR1 odgrywa istotną rolę w ich patogenezie (np. w TRU) [79]. Połączenie mini CR1 (powtórzenia SCR 8-11 cząsteczki CR1, obejmujące miejsce wiązania C3b/C4b) z fosfatydyloinozytolem hamowało aktywność UD o 50-70% w zwierzęcym modelu nadostrego odrzucania przeszczepu [80].

1.8. CR1 a toczeń rumieniowaty układowy

Toczeń rumieniowaty układowy (TRU) jest przewlekłą wielonarządową chorobą atakującą wszystkie narządy, a przede wszystkim skórę, stawy, nerki, płuca, serce oraz ośrodkowy układ nerwowy. Aktywność choroby nie jest stała i przebiega w postaci zaostrzeń i remisji. Szczególnie źle rokuje zajęcie nerek w przebiegu choroby [81]. Zmusza to naukowców i klinicystów do intensywnych badań nad patogenezą TRU i poszukiwania mechanizmów patogenetycznych, jak

i terapeutycznych rozwiązań. TRU należy do grupy chorób autoimmunologicznych i jest przede wszystkim związany z produkcją przeciwciał przeciwko własnym antygenom (głównie przeciwciał przeciwjądrowych - ANA). U podłoża powstawania ANA leży prawdopodobnie upośledzone usuwanie ciał apoptotycznych [82,83]. Produkcja autoprzeciwciał wpływa na tworzenie nadmiernej ilości KI, ich nieprawidłowe usuwanie oraz wtórną aktywację UD [30,84,85]. Za usuwanie KI odpowiedzialna jest głównie klasyczna droga aktywacji UD. Niedobór składników drogi klasycznej, np. C4, predysponuje do rozwoju TRU [86]. O zwiększonej aktywności drogi klasycznej UD może świadczyć też zwiększony poziom C4d na erytrocytach, limfocytach B i płytkach w tej grupie chorych [87]. Złogi KI w nerce prowadzą do uszkodzenia kłębuszka nerkowego i pojawiają się we wszystkich postaciach nefropatii toczniowej [88].

Wydaje się, że zmniejszona ekspresja E-CR1, w związku z upośledzeniem usuwania opłaszczonych C3b i C4b KI, może sprzyjać rozwojowi TRU. Wiele badań wskazuje na obniżoną liczbę E-CR1 u pacjentów chorych na TRU [38,89-95]. Wilson i wsp. zaobserwowali, że niższej ekspresji E-CR1 u chorych na TRU towarzyszy obniżona liczba E-CR1 u ich krewnych. Autorzy ci zauważyli też wzrost częstości występowania allelu L u tych pacjentów. Pojawiła się sugestia, że niska ekspresja E-CR1 ma u chorych na TRU charakter dziedziczny i wykazuje związek z polimorfizmem rs11118133. Niska ekspresją E-CR1 ma według autorów badania predysponować do rozwoju TRU [13]. Jednak, w świetle innych badań, dziedziczenie predyspozycji do niskiej ekspresji E-CR1 u tych chorych jest wątpliwe. Badania wykonane na 13 zdrowych rodzinach i 17 rodzinach pacjentów z rozpoznaniem TRU potwierdziły dziedziczność czynników kontrolujących liczbę E-CR1, ale dotyczyło to tylko osób zdrowych, u których wykazano dodatnią korelację pomiędzy średnią liczbą E-CR1 u rodziców i u ich dzieci. Ekspresja E-CR1 była obniżona u pacjentów chorych na TRU, jednak prawidłowa u ich bliskich krewnych. Ponadto, u czterech pacjentów chorych na TRU, mimo niskiej ekspresji receptora, genotypowo wykazano wersję allelu H. Wyniki te sugerują, że obniżona ekspresja E-CR1 u pacjentów na TRU może mieć charakter nabyty, a nie genetycznie uwarunkowany [96]. Za tym, że obniżona liczba E-CR1 ma u chorych na TRU charakter nabyty może przemawiać różna ekspresja tego receptora u bliźniąt jednojajowych [17]. W tym kontekście, wykazano ujemną korelację między ekspresją E-CR1 a aktywnością TRU. Obserwowano mianowicie wzrastającą liczbę

E-CR1 u pacjentów wchodzących w okres remisji choroby i niższą liczbę E-CR1 u pacjentów z aktywnym TRU, w porównaniu do chorych z nieaktywnym TRU [17,89,92,97].

Birmingham i wsp. zauważyli, że obniżona liczba E-CR1 u chorych z aktywnym TRU może wynikać również ze zużycia receptora w przebiegu nadmiernej ekspozycji na aktywujące dopełniacz KI [89]. U pacjentów z rozpoznaniem toczniowym zapaleniem nerek (TZN) spadek ekspresji receptora pojawiał się w momencie, gdy następował rzut tocznia (wzrost ogólnej aktywności choroby), ale nie obserwowano zaostrzenia choroby nerek. Sugeruje to związek pomiędzy zużyciem receptora a ochroną przeciwko nasileniu TZN [89]. Przy takim ujęciu zagadnienia, niska ekspresja E-CR1 mogłaby stanowić czynnik protekcyjny chroniącym nerki przed rzutem nefropatii toczniowej, ale nie ogólnym zaostrzeniem choroby.

Istnieją również rozbieżności, co do częstości występowania allelu S u chorych na TRU. Badania wykonane na populacji francuskiej wykazały wzrost ekspresji allelu S u pacjentów z rozpoznaniem TRU w porównaniu do grupy kontrolnej [36]. Van Dyne i wsp. sugerują, że występowanie małej formy CR1 (allel 3) ma podłoże genetyczne i stanowi genetyczny czynnik ryzyka wystąpienia TRU [98]. Wyników tych nie potwierdzili Moulds i wsp. Badania przeprowadzone na osobach zdrowych i chorych z rozpoznaniem TRU nie wykazały istotnych różnic w częstości występowania allelu 3 w obu populacjach. Zaobserwowano również, że procesy obróbki enzymatycznej, jakiej są poddawane KI, mogą dawać wyniki fałszywie dodatnie w postaci dodatkowego prążka o wielkości 160 kD [30], co może być mylnie odczytywane jako allel 3.

Również badania wykonane na leukocytach chorych z potwierdzonym TRU wykazały obniżoną ekspresję CR1 na limfocytach B i neutrofilach [99,100]. Ekspresja CR1 na leukocytach zależy w dużej mierze od aktywności choroby podstawowej i jest obniżona w okresie aktywnym i wzrasta w okresie remisji [91]. Do zmniejszenia liczby receptorów na powierzchni komórek jądrzastych może dochodzić wskutek obniżenia transkrypcji genowej, nasilonej enzymatycznej proteolizy i upośledzonego ruchu cytoplazmatycznego CR1 na powierzchni błony komórkowej [22,101,102]. Obniżenie ekspresji CR1 na powierzchni leukocytów może upośledzać fagocytozę KI u chorych na TRU [101]. Z drugiej strony, krążące KI hamują ekspresję CR1 na powierzchni neutrofilów poprzez zjawisko 'down-

regulation'. Podobnie działa interleukina (IL)-4, co zaobserwowano u osób zdrowych. Wzrost ekspresji CR1 na neutrofilach u osób zdrowych i chorych na TRU wywołuje natomiast interferon (INF)- γ [102].

Zmniejszona ekspresja CR1 na podocytach kłębuszków nerkowych sprzyjać może występowaniu TZN. Obniżona liczba C3bR na podocytach została potwierdzona u chorych z nefropatią toczniową [15,103,104]. Zaobserwowano również obniżone wydzielanie uCR1 z moczem u pacjentów z nasilonym rozplemowym KZN i ogniskową sklerotyzacją kłębuszków nerkowych w przebiegu TRU. Zakładając, że to podocyty są źródłem uCR1, autorzy badania sugerują możliwość wykorzystania zjawiska zmniejszonego wydzielania uCR1 z moczem jako markera uszkodzenia kłębuszków nerkowych [15,52]. Uzasadnionym jednak wydaje się stwierdzenie, że rola CR1 w patogenezie i rozwoju TRU nie jest do końca jasna i wymaga dalszych badań.

1.9. CR1 a pierwotne kłębuszkowe zapalenie nerek

Zagadnienie roli CR1 w rozwoju pierwotnego kłębuszkowego zapalenia nerek (PKZN) jest zdecydowanie mniej poznane. Arora i wsp. odnotowali obniżoną ekspresję E-CR1 u pacjentów z ogniskowym-segmentalnym stwardnieniem kłębuszków nerkowych [105]. Podobne wyniki uzyskano u chorych z ostrym KZN, jakkolwiek autorzy badania sugerują, że niska ekspresja E-CR1 nie jest u tych chorych dziedziczna. Wskazywałoby na to podobny rozkład częstości występowania poszczególnych alleli CR1 u osób z KZN i w zdrowej populacji [106]. Z kolei, Katyal i wsp. zaobserwowali, że u pacjentów z KZN, obniżonej ekspresji E-CR1 towarzyszył wzrost częstości występowania genotypu HH. Homozygoty HH wykazywały większą podatność na wystąpienie choroby, jednak mechanizm tej zależności nie jest jasny [107].

Na uwagę zasługują pozytywne efekty terapii przy pomocy sCR1, jakie uzyskano w eksperymentalnych modelach KZN u szczurów: 1) w KZN wywołanym konkawaliną A (przypominającym rozlaną rozplemową nefropatię toczniową u człowieka); 2) w 'anti-Thy1' KZN (wywołanym podaniem przeciwciał przeciwko tymocytom szczura), przypominającym nefropatię IgA bądź mezangialne rozplemowe TZN; 3) w nefropatii Heymanna odpowiadającej nefropatii błoniastej u ludzi. We wszystkich tych postaciach uszkodzenia kłębuszków nerkowych

u szczurów, dożylne podanie sCR1 i utrzymywanie jego stężenia we krwi na poziomie 100-200 µg/mL zmniejszało aktywność hemolityczną UD do 15% (bez znaczących zmian w stężeniu C3 w surowicy) i spowodowało znaczący spadek nasilenia zmian morfologicznych i czynnościowych kłębuszków nerkowych z wtórną redukcją białkomoczu [44].

Wyniki ostatnich badań sugerują, że CR1 może być wykorzystywany jako marker ubytku podocytów w kłębuszku nerkowym. Kubiak-wlekly i wsp., wykorzystując metody immunohistochemiczne, wykazali, że w zdrowym kłębuszku nerkowym ekspresja CR1 jest znaczna i dotyczy podocytów. Natomiast ekspresja CR1 w kłębuszkach osób chorych na KZN jest zróżnicowana i zależy od stopnia uszkodzenia podocytów. U chorych z minimalnym rozplemem komórek kłębuszka ekspresja CR1 jest zbliżona do obserwowanej w nerce zdrowej. Brak ekspresji odnotowano w kłębuszkach sklerotycznych i z uformowanymi półksiężycami [15].

1.10. Ocena aktywności tocznia rumieniowatego układuowego

TRU jest złożoną chorobą o zróżnicowanym obrazie klinicznym, przebiegu i rokowaniu, charakteryzującą się okresami zaostrzeń i remisji. Dla potrzeb praktycznych ważne jest wiarygodne opracowanie wskaźników aktywności choroby, które pozwoliłyby w sposób obiektywny ocenić konieczność włączenia leczenia, monitorować odpowiedź na leczenie i ochronić chorego przed zbyt intensywną immunosupresją. Do tej pory zostało opracowanych kilka skal aktywności TRU, m.in. BILAG (British Isles Lupus Assessment Group Scale), ECLAM (European Consensus Lupus Activity Measure), SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index), SLAM (Systemic Lupus Activity Measure), LAI (Lupus Activity Index) [108]. Stanowią one dobre predyktory uszkodzeń narządowych i zgonu chorych na TRU. Charakteryzują się powtarzalnością, słuszością, elastycznością i czułością na zmiany aktywności choroby [109]. Służą określeniu obiektywnej aktywności choroby podstawowej i wykluczeniu np. infekcji, innych chorób współistniejących, zmian przewlekłych, czy też ubocznych efektów leczenia. Mogą mieć wartość w monitorowaniu choroby i wpływać na postępowanie z chorym, m. in. na podjęcie decyzji terapeutycznych. Cały czas ważną jednak pozostaje indywidualna ocena kliniczna chorego przez lekarza praktyka, która nadal jest złotym standardem w ocenie aktywności choroby [108].

Wskaźnik aktywności SLEDAI-2K, opublikowany po raz pierwszy w 1992 roku, ocenia całkowitą aktywność choroby, a nie aktywność w poszczególnych narządach. Skala obejmuje objawy pochodzące z 9 narządów systemowych do 10 dni poprzedzających datę badania. Punktacja obejmuje 24 zmienne, w tym stężenie przeciwciał przeciw ds-DNA (p-dsDNA) i składowych UD w surowicy chorego. Chory może otrzymać od 0-105 punktów [110]. Skala jest używana zarówno w celach klinicznych, jak i naukowych [111].

Została ona nieco zmodyfikowana w roku 2000 przez zespół ekspertów, który utworzył nową skalę SLEDAI 2000 (lub SLEDAI-2K). Nowa skala ma odzwierciedlać również uporczywą, przetrwałą aktywność choroby. W jej uprzedniej wersji, takie zmiany jak białkomocz, wysypka, łysienie, nadżerki błony śluzowej brane były pod uwagę także w przypadku pojawienia się ich po raz pierwszy lub w sposób nawracający. Miało to na celu odróżnić zmiany aktywne od przewlekłych. Autorzy nowej skali wyszli z założenia, że utrzymywanie się wyżej wymienionych zmian odzwierciedla przetrwałą aktywność choroby [111].

Zasady przyznawania punktacji przedstawione zostały w Tab. 3. Aktywność choroby w skali SLEDAI-2K została podzielona na 5 grup: 1) brak aktywności (punktacja 0); 2) łagodna aktywność (1-5 punktów); 3) umiarkowana aktywność (6-10punktów); 4) wysoka aktywność (11-19 punktów); 5) bardzo wysoka aktywność (≥ 20 punktów) [112]. Wzrost o co najmniej 3 punkty w skali SLEDAI oznacza rzut tocznia, poprawa zdefiniowana została jako spadek o co najmniej 3 punkty, przetrwała aktywność choroby to zmiany $\pm 1-3$ punkty, natomiast remisja definiowana jest jako 0 punktów w skali SLEDAI [113].

TRU charakteryzuje się występowaniem przeciwciał przeciwko różnym antygenom jądrowym, cytoplazmatycznym i powierzchniowym. Do tej pory stwierdzono ponad 100 takich przeciwciał, m. in. p-dsDNA, przeciw C1q, fosfolipidom, RNP, Ro/SSa, La/SSb, nukleosomom, Sm i rybosomalnemu białku P [83,114]. W codziennej praktyce lekarskiej korzysta się tylko kilku z nich. Najczęściej do rozpoznania tocznia wykorzystuje się obecność przeciwciał przeciwjądrowych (ANA) i p- dsDNA [115]. Przeciwciała p-dsDNA charakteryzują się niewielką czułością (30-70%), ale wysoką swoistością, natomiast ANA wykazują się 89-95% czułością, ale są mniej specyficzne [87,116].

Zaobserwowano zależność między stężeniem p-dsDNA i aktywnością TRU [117]. Istnieją jednak przypadki chorych ze stale podwyższonym stężeniem tych

przeciwciał w surowicy mimo braku klinicznie aktywnej choroby [116]. Część badań potwierdza rolę p-dsDNA w ocenie aktywności TZN [117,118]. Sugeruje się również bezpośredni udział p-dsDNA w patogenezie TZN, w szczególności w powstaniu aktywnych zmian proliferacyjnych w kłębuszku nerkowym [88].

W codziennej praktyce, w ocenie aktywności TRU znalazło również miejsce oznaczanie stężeń składowych C3 i C4 UD w surowicy. Uszkodzenie tkanek w przebiegu aktywacji UD ma istotne znaczenie w TRU. Obniżenie składowych C3 i C4 pośrednio świadczy o aktywności UD, zwłaszcza o zaangażowaniu jego drogi klasycznej. Obniżenie stężenia składowych C3 i C4 nie jest jednak swoiste dla TRU. Towarzyszy innym chorobom przebiegającym z nadmierną i często niekontrolowaną aktywacją UD przez KI, bądź specyficzne przeciwciała. Dlatego izolowane oznaczenie C3 i C4 nie jest wystarczającym markerem aktywności choroby i nie wykazuje swoistości narządowej. Dopiero w połączeniu z obrazem klinicznym oraz oznaczeniem p-dsDNA w surowicy wydaje się w bardziej wiarygodny sposób świadczyć o aktywności TRU [119]. Możliwy jest także pomiar stężenia innych składników i produktów aktywacji UD w surowicy, m. in. C1q, C3a, C4a, C5a, C3d, C4d, lecz ze względu na niestabilność ich cząsteczek i krótki okres półtrwania pomiar ten nie jest wykonywany rutynowo. Stężenie produktów aktywacji UD nie zawsze koreluje ze stężeniem ich prekursorów w surowicy [120]. Podkreśla się przydatność oznaczania przyłączonego do erytrocytów/retikulocytów C4d, bądź ekspresji receptora CR1 metodą cytometrii przepływowej. U pacjentów z TRU wykazywano kilka razy wyższą ekspresję depozytów C4d na erytrocytach, limfocytach B i płytkach oraz niższą ekspresję E-CR1 w porównaniu do grupy kontrolnej i grupy chorych z innymi niż TRU chorobami reumatycznymi. Zmiany w ich ekspresji wydają się korelować z aktywnością choroby [87].

1.11. Uzasadnienie dla przeprowadzenia badania

TRU jest chorobą o wielu postaciach klinicznych, złożonym patomechanizmie, przewlekłą i potencjalnie śmiertelną. Prowadzone są intensywne badania, które mają pomóc poznać i zrozumieć przyczyny powstania tej choroby oraz rozwikłać zagadkę skutecznego jej leczenia. Rola CR1 w rozwoju TRU jak do tej pory nie jest jasna. Jak dotąd nie pojawiło się badanie, które oceniałoby łącznie ekspresję CR1 na powierzchni erytrocytów i leukocytów u tych chorych. Nie znaleziono też badania, które oceniałoby wpływ polimorfizmu rs11118133 genu

CR1 na poziom ekspresji CR1 na leukocytach u pacjentów z TRU. Celowym zatem wydawało się porównanie tych parametrów u chorych na TRU z towarzyszącym zajęciem nerek z grupą osób zdrowych i chorych na różne postaci PKZN oraz skorelowanie otrzymanych wyników ze stężeniem sCR1 w surowicy osób badanych.

2. CELE PRACY:

1. Ocena częstości występowania polimorfizmu rs11118133 w genie CR1 u osób zdrowych i chorych na pierwotne i toczniowe KZN.
2. Ilościowa ocena i porównanie ekspresji CR1 na komórkach krwi osób zdrowych i chorych na pierwotne i toczniowe KZN.
3. Ocena i porównanie stężenia sCR1 w surowicy osób zdrowych i chorych na pierwotne i toczniowe KZN.
4. Próba znalezienia zależności między częstością występowania genotypów *HindIII* CR1, ekspresją produktu białkowego genu CR1 na komórkach krwi oraz stężeniem sCR1 u osób zdrowych i chorych na pierwotne i toczniowe KZN.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Chorzy

Badaniem objęto 291 osób (174 kobiety), w tym: 150 chorych (68 kobiet) z rozpoznaniem PKZN w wieku 35 (18-74) lat, 66 chorych (57 kobiet) na TZN w wieku 32 (18-73) lat, 75 zdrowych ochotników (49 kobiet) w wieku 38 (21-58) lat, służących jako grupa kontrolna (K).

Pacjenci byli rekrutowani z grupy chorych hospitalizowanych w Katedrze i Klinice Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu w latach 2008-2012. Z badania wykluczano chorych z aktywnymi infekcjami lub przetoczeniem preparatów krwi w ciągu ostatnich 3 miesięcy. Grupa K składała się ze studentów i personelu medycznego Katedry. Stan zdrowotny grupy K określany był na podstawie krótkiej ankiety. Z badania wykluczane były osoby z rozpoznaną chorobą przewlekłą, przyjmujący leki lub wykazujące cechy jakichkolwiek infekcji. Wszystkie osoby objęte badaniem wyraziły ustną i pisemną zgodę na wzięcie udziału w eksperymencie medycznym i zostały szczegółowo poinformowane o celu i formie badania. Komisja Badań Bioetycznych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu wyraziła zgodę na wykonanie eksperymentu medycznego i zatwierdziła protokół podpisywany przez uczestnika.

Rozpoznanie pierwotnego KZN i TZN postawione zostało na podstawie badania klinicznego, badań laboratoryjnych oraz badania histopatologicznego i immunopatologicznego bioptatu nerki. Ocena patomorfologiczna materiału uzyskanego w czasie przezskórnej biopsji nerki została wykonana w ramach rutynowej diagnostyki KZN w Katedrze Patomorfologii Klinicznej UM w Poznaniu, natomiast ocena immunopatologiczna w Katedrze Immunologii Klinicznej UM w Poznaniu. Chorych na PKZN podzielono według rozpoznania histopatologicznego na grupę rozplemowych form KZN (PKZN-R), obejmujących mezangialne KZN (w tym nefropatię IgA) i błoniasto-rozplemowe KZN oraz grupę postaci nierozplemowych KZN (PKZN-NR), do których należały: błoniaste KZN, ogniskowe segmentalne stwardnienie kłębuszków nerkowych i submikroskopowe KZN. Dane kliniczne i morfologiczne badanych chorych przedstawiono w Tab. 1. Pacjenci z TZN pogrupowani zostali zgodnie z klasyfikacją opracowaną przez International Society of Nephrology/Renal Pathology Society (ISN/RPS) z 2004 roku, obejmującą 6 klas zmian [121]. Wśród rozpoznań histopatologicznych

u chorych objętych badaniem wyróżniono klasę II (mezangialne rozplamowe TZN), klasę III (ogniskowe TZN), klasę IV (rozlane rozplamowe KZN) i klasę V (błoniaste TZN). Dane kliniczne i morfologiczne tej grupy chorych przedstawiono w Tab. 2.

Pacjenci biorący udział w badaniu prezentowali różne wartości białkomoczu i/lub erytrocyturii oraz prawidłową lub upośledzoną funkcję nerek (Tab. 1 i 2). U 16 chorych zakwalifikowanych do grupy TZN nie wykonano biopsji nerki. Jednak spełniali oni kryteria kliniczne i biochemiczne wykładników uszkodzenia nerek w czasie pobierania materiału do badań lub w przeszłości. Przeciwwskazaniami do wykonania biopsji nerki były zaburzenia układu krzepnięcia (w tym małopłytkowość), zbyt mała wielkość nerek w przebiegu wieloletniego procesu chorobowego, lub brak zgody pacjenta na biopsję nerki.

Każdy pacjent z rozpoznaniem TRU spełniał co najmniej 4 kryteria klasyfikacyjne tocznia rumieniowatego układowego wg ACR (American College of Rheumatology). Do określenia aktywności TRU w momencie pobierania krwi użyto skali SLEDAI-2K (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000) [111]. Zakres punktów, które chorzy mogli uzyskać, mieścił się w granicach od 0 do 105. Sposób obliczania skali SLEDAI przedstawiono w Tab. 3. Po szczegółowym zebraniu wywiadu medycznego, badaniu przedmiotowym i uzyskaniu wyników badań dodatkowych, chorych z punktacją ≥ 10 punktów w skali SLEDAI-2K zakwalifikowano do grupy z aktywnym TZN (aTZN; mediana 16), natomiast chorych, którzy otrzymali punktację < 10 w skali SLEDAI-2K, do grupy nieaktywnego TZN (naTZN; mediana 4) (Tab. 2). Charakterystyka kliniczna i immunologiczna chorych na aTZN i naTZN została przedstawiona w Tab. 4.

Leczenie pacjentów na PKZ i TZN w ciągu ostatniego miesiąca poprzedzającego pobranie krwi przedstawiono w Tab. 5. Dziewięćdziesięciu dziewięciu pacjentów z PKZN, 4 z aTZN i 1 z naTZN miało pobraną krew w chwili postawienia rozpoznania choroby i przed włączeniem leczenia immunosupresyjnego.

Tab. 1. Dane morfologiczne, kliniczne i biochemiczne chorych na PKZN

Postać morfologiczna KZN	Liczba chorych	Płeć K/M	Wiek (lata) mediana [zakres]	Czas trwania choroby (miesiące) mediana [zakres]	Scr w surowicy ($\mu\text{mol/L}$) $\bar{x}\pm\text{SD}$	eGFR wg MDRD (mL/min/1.73m^2) $\bar{x}\pm\text{SD}$	TPUR (g/24h) $\bar{x}\pm\text{SEM}$	ZN (liczba chorych)	E (liczba chorych)	NT (liczba chorych)
PKZN-R (n= 100)										
MesKZN	89	47/42	36[20-70]	13,5[1-612]	79,5 \pm 32,7	94,2 \pm 33,3	2,6[0,4]	18	51	67
IgA-KZN	35	19/16	33[20-59]	10,5[2-286]	88,4 \pm 34,5	87,1 \pm 31,0	2,3[0,4]	5	28	26
n-IgA-KZN	54	28/26	42[20-70]	16,0[1-612]	79,5 \pm 31,0	98,7 \pm 34,2	2,8[0,6]	13	25	42
Bło-rozKZN	11	7/4	35[19-60]	7,5[3-336]	168,0 \pm 141,4	68,7 \pm 48,9	3,4[0,8]	5	9	9
PKZN-NR (n=50)										
BłoKZN	22	5/17	57,5[31-74]	16,0[1-138]	97,2 \pm 35,4	83,6 \pm 34,4	6,0[1,0]	15	7	20
FSGS	22	8/14	36,5[19-65]	28,5[1-296]	103,4 \pm 47,7	80,1 \pm 31,6	2,9[0,7]	5	10	18
MCD	6	1/5	24,0[22-40]	240[40-468]	65,4 \pm 8,8	130,8 \pm 25,2	3,9[1,7]	2	1	1

Objaśnienia: BłoKZN- błoniaste kłębuszkowe zapalenie nerek, Bło-rozKZN- błoniasto-rozplemowe kłębuszkowe zapalenie nerek, E- erytrocyturia (>5 RBC w polu widzenia), eGFR wg MDRD- szacowana filtracja kłębuszkowa wg Modification of Diet in Renal Disease, FSGS- ogniskowe segmentalne stwardnienie kłębuszków nerkowych, IgA-KZN- nefropatia IgA, KZN- kłębuszkowe zapalenie nerek, MCD-submikroskopowe kłębuszkowe zapalenie nerek, MesKZN- mezangialne rozplemowe kłębuszkowe zapalenie nerek, n-IgA-KZN- wszystkie postacie MesKZN z wyjątkiem nefropatii IgA, NT- nadciśnienie tętnicze, Scr- stężenie kreatyniny w surowicy, PKZN-R- rozplemowe pierwotne kłębuszkowe zapalenie nerek, PKZN-NR- nierozplemowe pierwotne kłębuszkowe zapalenie nerek, TPUR – dobowy białkomocz, ZN- zespół nerczycowy.

Tab. 2. Dane morfologiczne, kliniczne i biochemiczne chorych na TZN

Postać morfologiczna KZN	Liczba chorych	Płeć K/M	Wiek (lata) mediana [zakres]	Czas trwania choroby (miesiące) mediana [zakres]	SLEDAI-2K mediana [zakres]	Scr w surowicy ($\mu\text{mol/L}$) $\bar{x}\pm\text{SD}$	GFR wg MDRD (mL/min/1,73m^2) $\bar{x}\pm\text{SD}$	TPUR (g/24h) $\bar{x}\pm\text{SEM}$	ZN (liczba chorych)	E (liczba chorych)	NT (liczba chorych)
<i>aTZN (n=33); SLEDAI 16 [zakres 10-22]</i>											
klasa II	4	3/1	25 [20-32]	16 [15-114]	15 [13-18]	64,3 \pm 12,4	116,6 \pm 30,9	1,2[0,3]	0	2	4
klasa III	4	3/1	32 [22-73]	45 [3-170]	12 [10-18]	198,0 \pm 283,8	95,4 \pm 63,0	1,8[1,3]	1	3	3
klasa IV	22	17/5	28,5 [19-54]	52 [1-192]	16 [10-22]	127,0 \pm 75,6	66,5 \pm 34,0	4,1[0,8]	8	21	20
klasa V	1	1/0	51 [51]	165 [165]	20 [20]	63,7	90,8	6,23	1	1	1
bez biopsji	2	2/0	42 [22-62]	22,5 [10-35]	17 [13-21]	182,1 \pm 165,0	59,5 \pm 63,4	1,3[0,5]	0	1	2
<i>naTZN (n=33); SLEDAI 4 [zakres 0-8]</i>											
klasa II	4	4/0	32 [19-61]	71 [35-74]	2 [0-4]	86,2 \pm 53,8	95,0 \pm 53,4	0,4[0,2]	0	0	4
klasa III	4	4/0	30,5 [20-37]	67,5 [7-120]	6 [4-8]	50,8 \pm 5,3	133,3 \pm 14,0	1,0[0,5]	0	1	2
klasa IV	8	8/0	34 [18-44]	96 [58-216]	7 [0-8]	102,1 \pm 43,0	67,7 \pm 26,4	1,2[0,4]	1	2	8
klasa V	3	1/2	31 [31-55]	52 [49-192]	3 [2-6]	75,7 \pm 2,2	98,7 \pm 24,2	1,2[1,0]	0	0	1
bez biopsji	14	14/0	36 [21-56]	96 [24-372]	2,5 [1-8]	82,7 \pm 48,6	91,2 \pm 38,4	0,17[0,1]	0	0	7

Objaśnienia: aTZN- aktywne toczniowe zapalenie nerek, E- erytrocyturia (>5 RBC w polu widzenia), 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, SLEDAI-2K- wskaźnik aktywności tocznia rumieniowatego układowego (ang. Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index), TPUR- dobowy białkomocz, ZN- zespół nerczycowy

Tab. 3. Zasady przyznawania punktacji w skali SLEDAI-2K [Gladman 2002].
Czerwoną czcionką zostały zaznaczone parametry nerkowe

Kryterium	Punktacja
Drgawki (wykluczone przyczyny metaboliczne, infekcyjne, polekowe)	8
Psychoza (nie związana z mocznicą czy lekami)	8
Zespół psychoorganiczny (wykluczone przyczyny metaboliczne, infekcyjne, polekowe)	8
Zaburzenia widzenia (zmiany w siatkówce nie związane z nadciśnieniem tętniczym, zakażeniami, lekami)	8
Nieprawidłowości nerwów czaszkowych (zaburzenia czuciowe lub ruchowe)	8
Ból głowy (bardzo silny, bez odpowiedzi na leki narkotyczne)	8
Incydent naczyniowo-mózgowy (świeży, niezwiązany z miażdżycą)	8
Zapalenie naczyń (objawy kliniczne, biopsja)	8
Zapalenie stawów (minimum 2 + objawy stanu zapalnego)	4
Zapalenie mięśni (objawy kliniczne, enzymy mięśniowe, EMG, biopsja)	4
Walczkomocz (erytrocytarne, ziarniste)	4
Krwimocz (>5 erytrocytów wpw, bez zakażenia czy kamicy)	4
Białkomocz (0,5 g/d lub wzrost o 0,5 g/d)	4
Ropomocz (>5 leukocytów wpw, bez zakażenia)	4
Nowe zmiany skórne	2
Łysienie	2
Owrzodzenia błony śluzowej (jama ustna lub nosowa)	2
Ból opłucnowy (obecność tarcia, płynu, zgrubienie opłucnej)	2
Zapalenie osierdzia (tarcie, płyn, echo lub EKG)	2
Hipokomplementemia	2
Zwiększone wiązanie DNA (p-dsDNA)	2
Gorączka (>38°C, bez zakażenia)	1
Małopłytkowość (<100.000 PLT/mm ³)	1
Leukopenia (<3000 WBC/mm ³)	1

Tab. 4. Charakterystyka kliniczna i immunologiczna chorych na aTZN i naTZN w czasie pobierania krwi

	aTZN (n = 33)	naTZN (n = 33)	p
Objawy pozanerkowe:			
-Zaburzenia neurologiczne (drgawki, psychozy, ból głowy)	1 (3,0%)	0 (0,0%)	1,0000
-Zapalenie naczyń i/lub mięśni	2 (6,1%)	0 (0,0%)	0,4923
-Zapalenie stawów (>2 stawów)	5 (15,2%)	7 (21,2%)	0,7508
-Zmiany skórne (rumień w kształcie motyla, rumień krążkowy)	7 (21,2%)	2 (6,06)	0,1487
-Owrzodzenia błon śluzowych	1 (3,0%)	0 (0,0%)	1,0000
-Zapalenie błona śluzowych (osierdzia, opłucnej)	9 (27,3%)	1 (3,0%)	0,0129
-Gorączka (po wykluczeniu przyczyn infekcyjnych)	1 (3,0%)	0 (0,0%)	1,0000
-Łysienie	1 (3,0%)	0 (0,0%)	1,0000
-Zaburzenia hematologiczne			
-leukopenia < 4000/ μ l	4 (12,1%)	1 (3,0%)	0,3553
-trombocytopenia <100.000/ μ l	5 (15,2%)	2 (6,1%)	0,4266
-Obniżone składowe dopełniacza (C3 < 0,9g/l, C4 < 0,1g/l)	23 (69,7%)	6 (18,2%)	<0,0001
Objawy nerkowe:			
-Białkomocz (>0,5g/24h)	33 (100%)	9 (27,3%)	<0,0001
-Wąleczkomocz (wąleczki erytrocytarne, ziarniste)	7 (21,2%)	0 (0,0%)	0,0110
-Erytrocyturia (po wykluczeniu ZUM. >5 wpw)	28 (84,8%)	3 (9,1%)	<0,0001
-Leukocyturia (po wykluczeniu ZUM, >5 wpw)	16 (48,5%)	0 (0,0%)	<0,0001
Przeciwciała:			
ANA >1:320	33 (100%)	22 (66,7%)	0,0004
p-dsDNA	22 (66,7%)	9 (27,3%)	0,0028
p-SSA	7 (21,2%)	14 (42,4%)	0,1118
p-SSB	3 (9,1%)	2 (6,1%)	1,0000
p-Ro-52	5 (15,2%)	3 (9,1%)	0,7085
p-nukleosomom	8 (24,2%)	3 (9,1%)	0,1850
p-AMA-M2	0 (0,0%)	1 (3,0%)	1,0000
p-Anty-SM	2 (6,1%)	2 (6,1%)	1,3868
p-antykarđiolipinie	4 (12,1%)	3 (9,1%)	1,0000
p-anty- β_2 -glikoproteinie 1	4 (12,1%)	5 (15,2%)	1,0000
p-histonom	5 (15,2%)	3 (9,1%)	0,7085
p-RNP/SM	4 (12,1%)	1 (3,0%)	0,3553
p-PCNA	3 (9,1%)	1 (3,0%)	0,6132
p-centromery	1 (3,0%)	0 (0,0%)	1,0000
p-rybosomalne białko P	3 (9,1%)	0 (0,0%)	0,2385
p-PM-SCL	1 (3,0%)	0 (0,0%)	1,0000

ZUM-zakażenie układu moczowego

Tab. 5. Leczenie w grupach chorych na PKZN, aTZN, naTZN w ciągu ostatniego miesiąca poprzedzającego pobranie krwi

Leczenie (w ciągu ostatnich 4 tygodni przed pobraniem krwi)	PKZN (n = 150) [średnia dawki dobowej, mg ± SD]	aTZN (n = 33) [średnia dawki dobowej, mg ± SD]	naTZN (n = 33) [średnia dawki dobowej, mg ± SD]
Metylprednizolon dożylnie (SoluMedrol)	8 [3 x 500, lub 6 x 250]	13 [3 x 500, lub 6 x 250]	0
Metylprednizolon doustnie (Metypred)	40 [23,3±18,7]	24 [26,0±15,9]	28 [11,5±8,1]
Prednisolon doustnie (Encorton)	2 [15,0±7,1]	2 [15,0±14,1]	3 [11,7±2,9]
Deflacort (Calcort)	0	1 [30]	1 [12]
Azatiopryna (Imuran)	4 [100±0]	4 [100±0]	4 [100±0]
Chlorambucyl (Leukeran)	7 [4±0]	0	0
Chlorochina (Arechin)	0	0	2 [250±0]
Hydrochlorochina (Quensyl)	0	3 [400±0]	0
Mykofenolan Mofetilu (CellCept)	0	1 [2000]	0
Cyklosporyna (Neoral, Equoral)	10 [187,5±53,0]	0	0
Cyklofosfamid (Endoxan)	2 [100±0]	0	0
Bez leczenia	99	4	1

3.2. Opracowanie materiału do badań

Materiał do badań stanowiły próbki krwi żyłnej z żyły odłokciowej pobrane od chorych na PKZN i TZN oraz osób z grupy K. Pobierano trzy próbki, dwie na EDTA celem izolacji DNA i wykonania cytometrii przepływowej oraz trzecią na skrzep, z której po odwirowaniu pozyskiwano surowicę do badań immunoenzymatycznych (w sumie około 15 ml krwi obwodowej).

3.3. Dodatkowe badania laboratoryjne

W ramach standardowej diagnostyki pierwotnych i wtórnych kłębuszkowych zapaleń nerek u każdego chorego objętego badaniem wykonano:

- 1) badanie stężenia kreatyniny, białka całkowitego, albumin oraz składowych dopełniacza C3 i C4 w surowicy;
- 2) pełną morfologię krwi (z uwzględnieniem liczby WBC, RBC, PLT oraz stężenia HGB);
- 3) badanie ogólne moczu z oznaczeniem stężenia białka oraz oceną osadu moczu (erytrocyturia, leukocyturia, wałeczki).

Wszystkie badania zostały wykonane w Centralnym Laboratorium Analityczno-Biochemicznym Szpitala Klinicznego im. H. Świącickiego UM w Poznaniu. Oznaczenia wykonano na analizatorze biochemicznym firmy Synchron CX 7 Delta firmy Beckman (Fullerton, Stany Zjednoczone) przy użyciu standardowych testów stosowanych w diagnostyce laboratoryjnej.

Oznaczenia stężenia składowych dopełniacza C3 i C4 wykonano 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 przeciwciała wywołując wytrącanie się badanych białek, których stężenie mierzono turbidymetrycznie przy długości fali 340 nm. Wartości referencyjne dla oznaczonych parametrów biochemicznych, morfologicznych i immunologicznych przedstawiono w Tab. 6.

Tab. 6. Zakres wartości referencyjnych dla określonych parametrów biochemicznych, morfologicznych i immunologicznych

SUROWICA/KREW PEŁNA	
KREATYNINA	61,9-106,1 $\mu\text{mol/l}$
BIAŁKO CAŁKOWITE	6,40-8,30 g/dl
ALBUMINY	3,50-5,20 g/dl
WBC	3,90-11,00x10 ³ / μl
RBC	4,20-5,80x10 ⁶ / μl
HGB	13,5-17,2 g/dl
PLT	130-400x10 ³ / μl
C3	0,9-1,8 g/l
C4	0,1-0,4 g/l

MOCZ	
TPUR	<0,15 g/24h
E	<5 RBC wpw po odwirowaniu próbki
L	<5 WBC wpw po odwirowaniu próbki

3.4. Parametry immunologiczne

W grupie chorych na TZN, w ramach diagnostyki i oceny aktywności choroby oznaczano ANA i ANA profil. Oznaczenia te zostały wykonane w Pracowni Histopatologii i Immunopatologii Skóry przy Katedrze i Klinice Dermatologii UM im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. ANA oznaczano metodą immunofluorescencji pośredniej z użyciem testu Mozaika HEp-2/wątroba (małpa) firmy EUROIMMUN (Luebeck, Niemcy). Kombinację dwóch substratów, ludzkich komórek nabłonkowych (HEp-2) i mrożonych skrawków wątroby małpy, inkubowano z rozcieńczonymi próbkami surowicy chorych. W przypadku wyniku dodatniego przeciwciała klasy IgA, IgG i IgM wiązały się z odpowiednimi antygenami. Następnie związane przeciwciała klasy IgG były wykrywane przez znakowane fluoresceiną przeciwciała przeciw ludzkim IgG (kozie). Reakcję oceniano pod mikroskopem fluorescencyjnym. W ocenie ilościowej mianem ANA określało się takie rozcieńczenie surowicy, przy którym można było jeszcze rozpoznać specyficzny typ fluorescencji w obrębie jądra komórkowego. Miano wyższe, bądź

równe 1:320 stanowiło wynik dodatni. Jako kontrola dodatnia służyła ludzka surowica kontrolna z oznaczonym mianem autoprzeciwciał przeciwjądrowych. Jako kontrolę negatywną wykorzystano ludzką surowicę kontrolną ujemną wobec autoprzeciwciał.

Jakościowej oceny typu przeciwciał ANA dokonywano z użyciem testu ANA Profil 3 EUROLINE firmy EUROIMMUN (Luebeck, Niemcy). Test ten pozwala na identyfikację ludzkich przeciwciał klasy IgG skierowanych przeciw 14 antygenom jądrowym: nRNP/Sm, Sm, SS-A (natywne), Ro-52, SS-B, Scl-70, PM-Scl, Jo-1, CENR B, PCNA, dsDNA, nukleosomom, histonom, rybosomalnemu białku P i AMA-M2 w surowicy. Jest to test paskowy z naniesionymi w postaci linii wysoko oczyszczonymi antygenami pochodzącymi z: grasicy cielęcej i króliczej (nRNP/Sm, SS-B, SCL-70, Jo-1, rybosmalne białko P), grasicy cielęcej (nukleosomy, histony), śledziony i grasicy wołowej (Sm, SS-A), serca świni (AMA-M2), jąder łosia (dsDNA), ekspresji odpowiedniego ludzkiego cDNA z użyciem bakulowirusów jako wektora w komórkach owadzych (rekombinowany Ro-52, PM-Scl, CENP B, PCNA).

Paski testowe inkubowano z rozcieńczoną w stosunku 1:100 surowicą pacjenta. W przypadku wyniku dodatniego specyficzne przeciwciała klasy IgG (również IgA i IgM) wiązały się z odpowiednimi antygenami na paskach membrany. W następnym etapie dodawano kozie przeciwciało przeciw ludzkiej IgG sprzężone z fosfatazą alkaliczną. Substrat dla enzymu stanowił chlorek nitrobluetetrazolinum/5-bromo-4-chloro-3-indolyfosforanu (NBT/BCIP), po dodaniu którego obserwowano reakcję barwną. Intensywność zabarwienia oceniano półilościowo z użyciem programu EUROLiNEscan. Na podstawie intensywności sygnału (IS) wyniki kwalifikowano jako:

-negatywny 0	- IS od 0 do 5;
-graniczny (+)	- IS od 6-10;
-pozytywny +	- IS od 11-25;
-pozytywny ++	- IS 26-50;
-wysoko pozytywny +++	- IS >50.

Za dodatnie uznawano wyniki +, ++, +++.

3.5. Ocena funkcji nerek

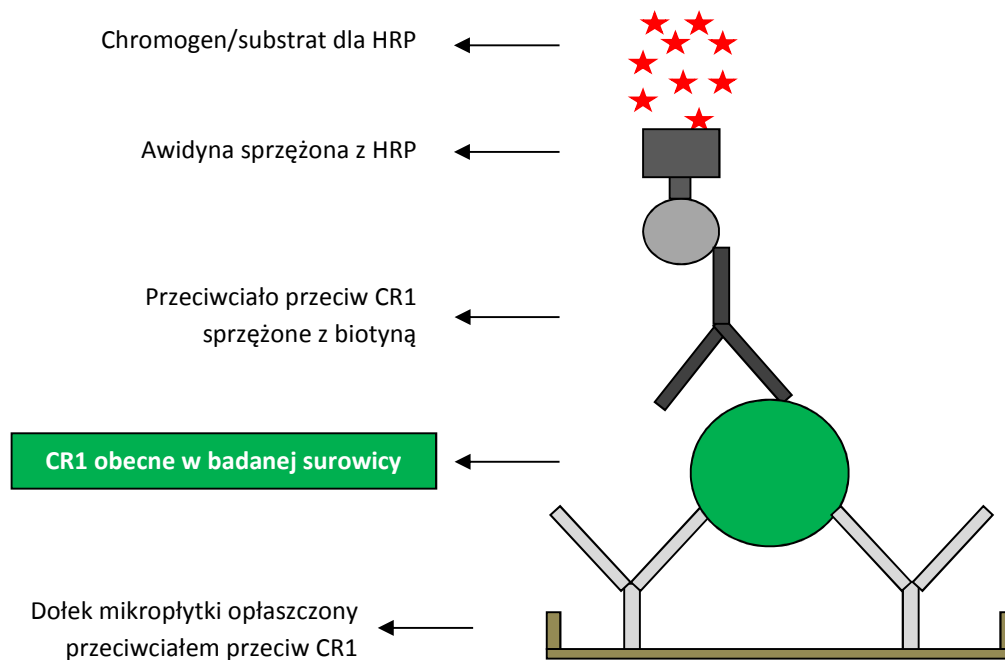
Oceny funkcji nerek dokonywano z pomocą oceny filtracji kłębuszkowej (eGFR) wg wzoru skróconego wzoru MDRD:

$$GFR (ml/min/1,73 m^2) = 186 \times (\text{stężenie kreatyniny w surowicy})^{-1,154} \times (\text{wiek})^{-0,203} \times 0,742 (\text{dla kobiet}) \times 1,21 (\text{dla Afro-Amerykanów}) [122]$$

3.6. Oznaczanie stężenia sCR1 w surowicy

Stężenie sCR1 w surowicy oznaczono metodą ELISA za pomocą testu C3bR ELISA kit firmy EIAab Science Co. Ltd (Stany Zjednoczone). Zasadę metody przedstawiono na Ryc. 3.

Surowice wszystkich chorych i zdrowych ochotników rozpuszczano w dołączonym do zestawu rozpuszczalniku w stosunku 1:200. Do odpowiednich dołków na przygotowanej wcześniej mikroplątce pokrytej przez specyficzne przeciwciała przeciwko C3bR dodawano po 100 µl badanych surowic oraz próbek wzorcowych. C3bR w surowicy ulegało wiązaniu z przeciwciałem przeciw C3bR na płytce. Po 2-godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C delikatnie usuwano płyn z dołków na mikroplątce i dodawano kompleks zawierający przeciwciała poliklonalne przeciw C3bR oraz biotynę (inkubacja 1-godzinna w temp. 37°C). Aspirowano treść z każdego dołka, a następnie przemywano z użyciem specjalnego buforu, powtarzając procedurę 3 razy. W kolejnym etapie dodawano HRP sprzężoną z awidyną (inkubacja 1-godzinna w temp. 37°C). Substrat dla enzymu stanowiła TMB (3,3',5,5' tetrametylbenzydyna), po dodaniu której następowała barwna reakcja. Po zahamowaniu tejże reakcji za pomocą roztworu kwasu siarkowego, intensywność zabarwienia próbki mierzono spektrofotometrem z użyciem fal o długości 450 nm i otrzymane wyniki porównywano z krzywą wzorcową. Test pozwalał na wykrycie C3bR w surowicy w stężeniu 0,78 ng/ml do 50 ng/ml.



Ryc. 3. Zasada metody oznaczania sCR1 w surowicy

3.7. Izolacja DNA

Izolację DNA z leukocytów krwi pełnej przeprowadzono przy użyciu zestawu Master Pure™ DNA Purification Kit firmy EPICENTRE (Madison, Stany Zjednoczone). Od wszystkich zdrowych ochotników i chorych objętych badaniem pobrano próbkę krwi na EDTA, a następnie przeniesiono z niej po 325 µl krwi do próbówki typu Eppendorf. W kolejnym etapie do każdej próbówki dodano 1 ml buforu lizującego (Lysis Buffer 1), wymieszano na wortexie firmy SARSTEDT (Numbrecht, Niemcy) i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 min. Zawartość próbówki ponownie wortexowano przez 10 s, inkubowano przez kolejne 5 min w temperaturze pokojowej i ponownie wymieszano z użyciem wortexu. Następnie próbkę wirowano przez 25 s z użyciem wirówki firmy EPPENDORF (Hamburg, Niemcy) przy 14000 RPM, po czym nadsącz zlewano, pozostawiając na dnie próbówki około 25 µl supernatantu, w którym przez wortexowanie zawieszono osad. W kolejnym etapie do próbówki dodawano 500 µl drugiego buforu lizującego (Lysis Buffer 2) i zawieszano osad przez 7-krotne pipetowanie. Po dodaniu 200 µl roztworu precypitującego (Precipitation Solution) i 30

sekundowym wortexowaniu, powstałą mieszaninę wirowano przez 10 min przy 14 000 RPM. Powstały supernatant przenoszono do nowej próbówki i dodawano do niego 500 μ l izopropanolu. Mieszając roztwór poprzez wielokrotne obracanie próbówki obserwowano wytrącanie się wyizolowanego DNA. Wytrącone DNA osadzono na dnie próbówki poprzez 10-minutowe wirowanie przy 14000 RPM. Powstały supernatant delikatnie usuwano, a osad DNA przepłukiwano jeszcze 2-krotnie z użyciem 300 μ l 75% etanolu i ponownie wirowano przez 2 min. Po delikatnym usunięciu supernatantu na ściankach próbówki pozostawał osad DNA, który po osuszeniu w temperaturze pokojowej przez ok. 10 minut, zawieszano w 100 μ l TE (10 mM Tris-HCl pH=8,0, 1 mM EDTA). Próbkę następnie wortexowano i zamrażano w temperaturze -20°C.

Stężenie wyizolowanego DNA oznaczano przy użyciu spektrofotometru Lambda EZ201 (PERKIN ELMER, Boston, Stany Zjednoczone). Do próbki dodano bufor TE firmy PROMEGA (Madison, Stany Zjednoczone) celem uzyskania stężenia DNA 100 ng/ μ l. DNA przechowywano w temperaturze -20°C.

3.8. Amplifikacja DNA metodą PCR

Celem oceny polimorfizmu rs11118133 genu CR1 w obrębie intronu 27 amplifikowano wyizolowany wcześniej materiał genetyczny metodą PCR [Cornillet 1991]. Do przeprowadzenia reakcji użyto pary starterów: forward -5'-CAG CAG AGC CAA CTT CTG ACC C-3' i revers: 5'-CCC TTG TAA GGC AAG TCT GG-3'(Metabion International AG; Martinsried, Niemcy). Amplifikację DNA metodą PCR wykonano na termocyklerze firmy BIOMETRA, *T GRADIENT* (Goettingen, Niemcy).

2 μ l wyizolowanego wcześniej dsDNA (matryca) rozcieńczono w mieszaninie reakcyjnej o składzie: 2 mM każdego dNTP (PROMEGA), 2 pM odpowiednich starterów, 2 μ l buforu do PCR (10 \times stężony bufor, skład: 100 mM Tris-HCl pH 8,3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0,01% żelatyny) (SIGMA ALDRICH, Saint Louis, Stany Zjednoczone) oraz woda traktowana dietylopirowęglanem (DEPC) (FERMENTAS, Wilno, Litwa). Łączna objętość mieszaniny wynosiła 20 μ l. W próbce stanowiącej kontrolę ujemną 2 μ l matrycy zastąpiono równoważną ilością wody DEPC. Do całości dodawano 1 U polimerazy

Redtaq (Redtaq genomic DNA polymerase, SIGMA, Niemcy) o stężeniu 5 U/μl. Temperaturę przylegania dla par starterów dobierano wykonując gradient temperaturowy na termocyklerze BIOMETRA. Kolejne etapy reakcji PCR przedstawiono w Tab. 7. Po zakończonej reakcji próbki inkubowano w temp. 4°C przez ok.15 min.

Tab. 7. Etapy amplifikacji DNA w obrębie intronu 27 genu CR1 metodą PCR

ETAP	TEMPERATURA	CZAS TRWANIA
WSTĘPNA DENATURACJA	95°C	3 min
AMPLIFIKACJA (40 cykli)	<i>denaturacja</i>	95°C
	<i>przyłączanie starterów</i>	59°C
	<i>wydłużanie</i>	72°C
KOŃCOWE WYDŁUŻANIE	72°C	7 min.

3.9. Przygotowanie żelu agarozowego do elektroforezy

Celem przygotowania 1,5% żelu agarozowego 1,5 g sypkiej agarozy (Serva, Heidelberg, Niemcy) zawieszono w 1x stężonym buforze TAE (o składzie 40 mM Tris-CH₃COOH pH 8,0, 2 mM EDTA pH 8,0) do objętości 100 ml. Zawiesinę ogrzewano w kuchence mikrofalowej w temp. 60°C przez 5 minut i dodawano 1 μl bromku etydyny o stężeniu 5 mg/ml (Sigma Aldrich, Saint Louis, Stany Zjednoczone) i pozostawiano roztwór do wystygnięcia. Po ostudzeniu agarozę wylewano do wanienki aparatu elektroforetycznego formując żel o grubości 0,5cm. Do płynnego ciążę żelu w odpowiednim czasie wkładano grzebień, który po zastygnięciu żelu wyjmowano. Tak powstały żel umieszczano w aparacie

do elektroforezy i zalewano buforem TAE. Do uformowanych kieszonek wprowadzano badane próby obciążone w 1/10 objętości barwnikiem o składzie: 30% glicerol, 0,5% błękit bromofenolowy, 0,25% ksylencjanol (SIGMA ALDRICH). W pierwszej kieszonce uformowanego żelu umieszczano marker DNA Ladder, czyli wzorzec mas cząsteczkowych (EURx Ltd., Gdańsk, Polska).

3.10. Elektroforeza

Rozdziału elektroforetycznego dokonywano w aparacie do elektroforezy GNA 200 (AMERSHAM BIOSCIENCES, Buckinghamshire, Wielka Brytania). Elektroforezę prowadzono przy napięciu 70-100V i natężeniu 80-100 mA, w temperaturze pokojowej, w czasie 30-60 minut. Wizualizacji produktów PCR po rozdziale elektroforetycznym na żelu agarozowym dokonywano za pomocą kamery video emitującej promienie UV i programu do analizy i dokumentacji żeli (VILBERT LOUMART, Marnes la Valle, Francja). Zdjęcia zapisywano w formie elektronicznej.

3.11. Przygotowywanie produktów PCR do dalszych analiz

Oczyszczanie produktów PCR ze składników mieszanin reakcyjnych przeprowadzano przy użyciu zestawu DNA Clean-up (A&A BIOTECHNOLOGY, Gdańsk, Polska). Do próbki zawierającej mieszaninę PCR dodawano 400 µl roztworu wiążącego „G”, zawierającego sól chalotropową. Następnie po wymieszaniu próbki zawartość próbki nanoszono na minikolumnę umieszczoną w probówce o objętości 1,5 µl i wirowano przez 30 s przy obrotach 14000 RPM w temp. 4°C. Powstały supernatant usuwano. Następnie na minikolumnę nanoszono 600 µl roztworu płuczającego „A1” (zawierającego etanol) i całość wirowano przy 14000 RPM przez 30 s. Po uprzednim usunięciu nadsącza na minikolumnę ponownie nanoszono 300 µl roztworu „A1”. Całość wirowano przez 2 minuty przy 14000 RPM, supernatant usunięto. Osuszoną minikolumnę umieszczano następnie w nowej probówce i dodawano 30 µl buforu TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA). Po 3-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej próbkę ponownie wirowano otrzymując supernatant zawierający

oczyszczone DNA. Powstały przesącz zamrażano i przechowywano w temperaturze -20°C celem użycia do dalszych badań.

3.12. Analiza restrykcyjna produktów amplifikacji

Celem oceny polimorfizmu rs11118133 genu CR1 w obrębie intronu 27 użyto techniki PCR i enzymu restrykcyjnego *HindIII* (Amersham Life Science, Stany Zjednoczone) do cięcia wcześniej otrzymanego i oczyszczonego produktu tej reakcji [Cornillet 1991]. Sekwencją rozpoznawaną przez wspomniany enzym jest: 5'-A↓AGCTT -3'. W skład mieszaniny o objętości 30 µl, w której przeprowadzano reakcję restrykcji wchodziło: 1 µl enzymu restrykcyjnego *HindIII* o stężeniu 10 U/µl, 25 µl roztworu oczyszczonego DNA (10 µl oczyszczonego wcześniej produktu PCR +15 µl wody DEPC), 3 µl buforu (o składzie: 10 mM Tris-HCl, pH 8,5, 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0,1 mg/ml BSA) oraz 1 µl wody DEPC (FERMENTAS). Probówkę z 30 µl mieszaniny inkubowano w temperaturze 37°C w bloku grzejnym. Po około 16 godzinach inkubacji dokonywano rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji restrykcji na 2% żelu agarozowym. Dwu procentowy żel agarozowy otrzymywano po rozpuszczeniu 2,0 g sypkiej agarozy w 100 ml 1x stężonego TAE buforu w warunkach opisanych wcześniej w rozdz. 3.6.

3.13. Cytometria przepływowa

Do analizy użyto 2 ml dobrze wymieszanej krwi, pobranej na EDTA z żyły odłokciowej. Badanie wykonywano do 2-3 godzin od pobrania krwi, utrzymując ją przez ten czas w temperaturze otoczenia.

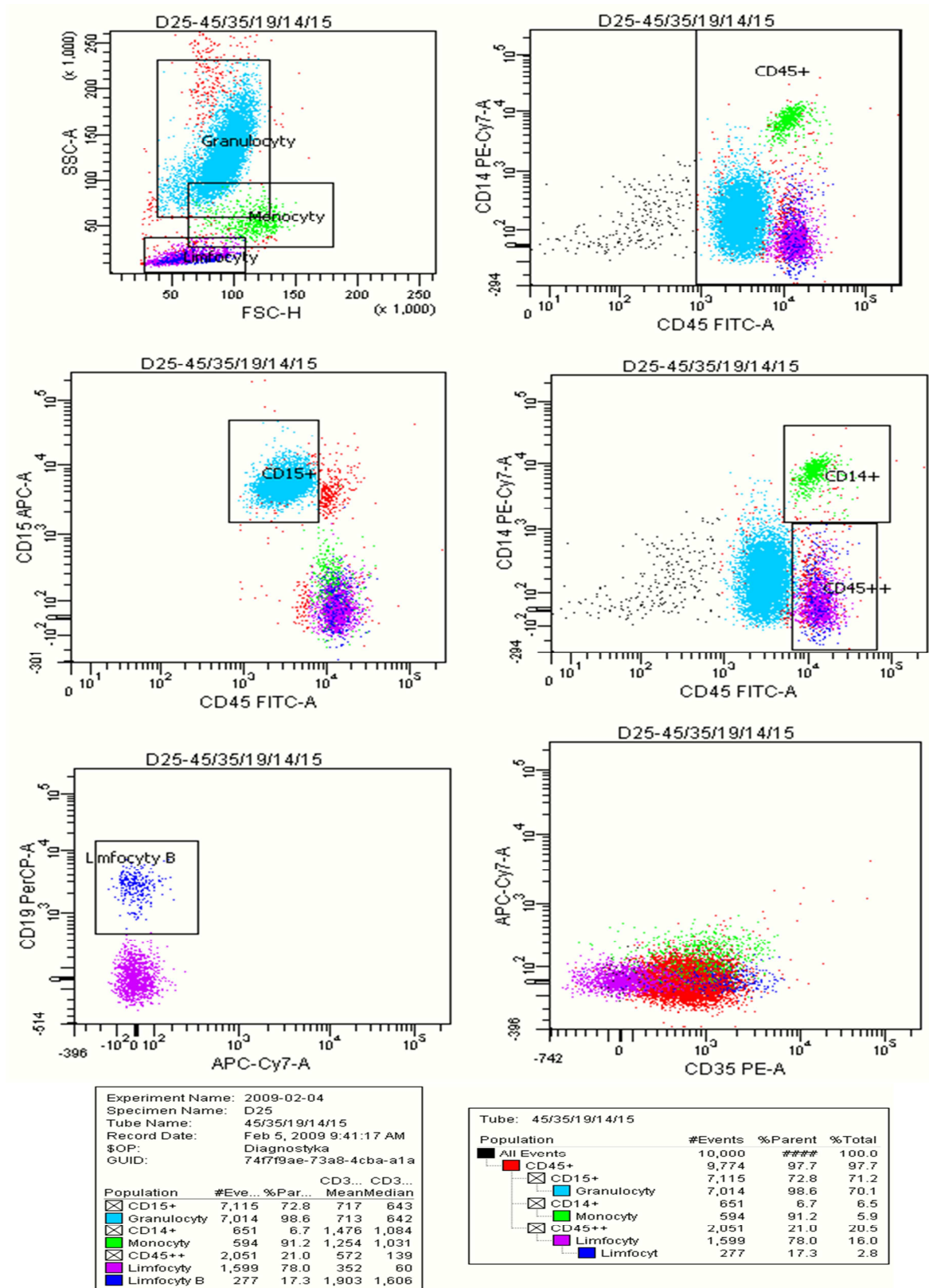
Celem określenia głównych subpopulacji leukocytów (neutrofile, monocyty, limfocyty i limfocyty B) 100 µl krwi inkubowano w obecności przeciwciał monoklonalnych znakowanych fluorochromem: przeciw CD45 (znakowane FITC), CD19 (znakowane PerCP), CD14 (znakowane Pe-Cy7) i CD15 (znakowane APC) oraz odpowiednich izotypów IgG1 i IgG2b służących jako kontrola. Do oceny subpopulacji leukocytów używano przeciwciał firmy Becton-Dickinson (San Jose, CA, Stany Zjednoczone). Subpopulacje leukocytów były definiowane na podstawie bramek utworzonych w oparciu o parametry rejestrowanego światła rozproszonego na komórce (FSC i SSC określające odpowiednio wielkość i ziarnistość komórek)

oraz światła emitowanego przez wzbudzony fluorochrom, związanym z odpowiednim przeciwciałem monoklonalnym (neutrofile CD45+ CD15+ CD14-; monocyty CD45+ CD14+; limfocyty CD45+ CD14-, w tym limfocyty B CD19+) (Ryc. 4a). Akwizycja populacji erytrocytów była wykonywana z osobnej nielizowanej próbki. Erytrocyty zostały określone jako populacja CD45- i wykazująca ekspresję glikoforyny A (CD235a, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) oraz wykazująca niskie FSC (Ryc. 4b). Do określenia ekspresji receptora CR1 na określonych wcześniej populacjach leukocytów i erytrocytów użyto przeciwciała monoklonalnego przeciw CD35 znakowanego fikoerytryną (PE)-klon E11 (Becton Dickinson). Badania wykonano w Zakładzie Immunologii Katedry Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

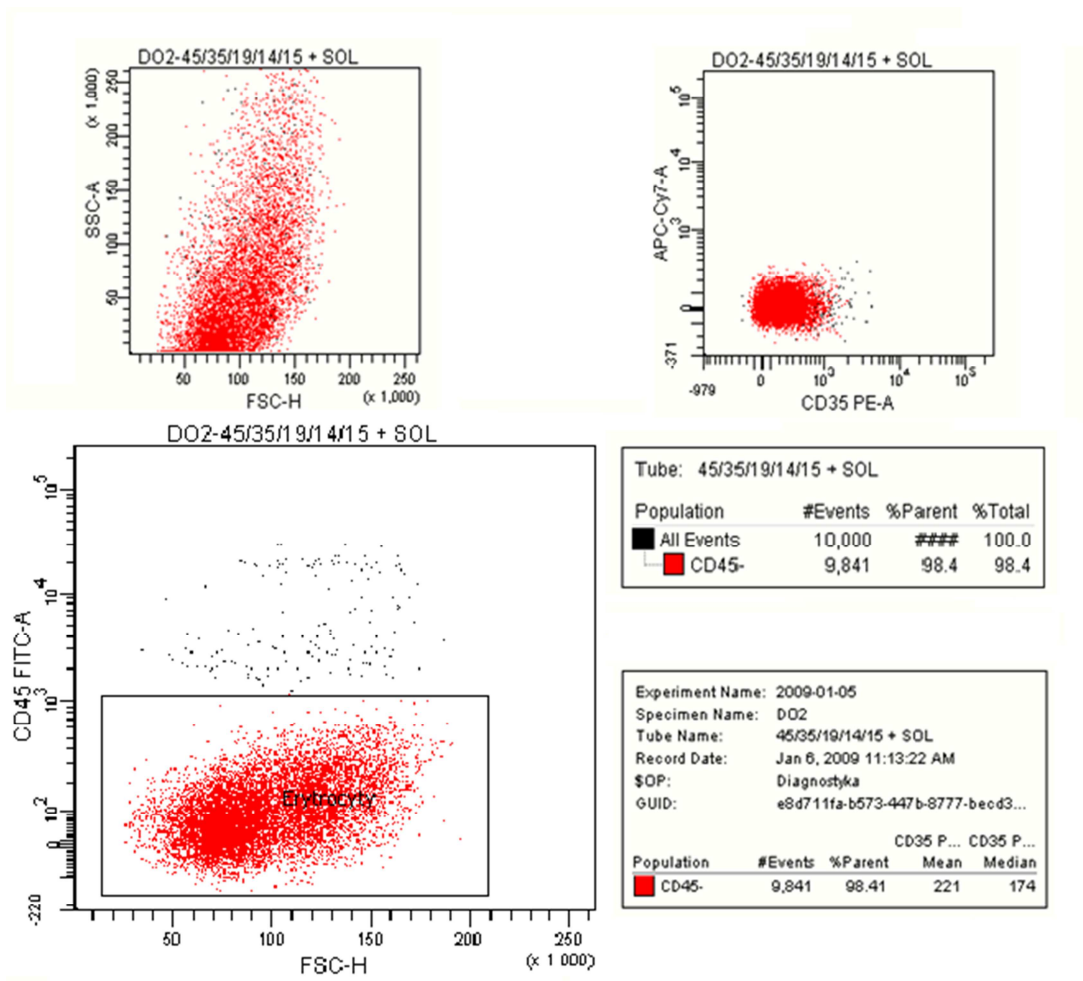
W pierwszym etapie, do próbek cytometrycznych (Falcon, 5 ml) dodawano po 5 µl odpowiednich przeciwciał, a następnie 100 µl badanej krwi. Zawartość próbek mieszano, następnie inkubowano przez 15 min w warunkach ciemnej komory, w temperaturze pokojowej. Do każdej próbki dodawano 500 µl świeżo przygotowanego płynu lizującego (BD FACS Lysing Solution; Becton Dickinson, USA). Po zmieszaniu, próbki ponownie inkubowano przez 10 min w temperaturze pokojowej (liza erytrocytów). Do próbek dodano po 3 ml PBS-u o pH 7,4 (zatrzymanie lizy), zawartość przepłukiwano, następnie wirowano z prędkością 1200 RPM przez 4 min (temp. -4°C-+4 °C). Supernatant zlewano osuszając resztki płynu na bibule. Do próbek ponownie dodawano po 3 ml PBS-u, zawartość po wymieszaniu wirowano jak poprzednio. Supernatant zlewano, odsączało resztki płynu na bibule. Do próbek zawierających na dnie pelet leukocytów dodawano po 500 µl PBS-u. Bezpośrednio po znakowaniu próbki poddawano akwizycji (10 000 zdarzeń) na cytofluorometrze (FACS CANTO, Becton-Dickinson), następnie dane analizowano przy pomocy programu BD FACS DIVA v. 6.1.2. software (Becton-Dickinson). Ekspresja receptora CR1 została określona jako średnia intensywność fluorescencji (MFI) [87,123].

Akwizycja populacji erytrocytów była wykonywana z osobnej nielizowanej próbki. Erytrocyty zostały określone jako populacja CD45- i wykazująca ekspresję glikoforyny A (CD235a, Becton Dickinson) oraz wykazująca niskie FSC (Ryc. 4b). Do określenia ekspresji receptora CR1 na określonych wcześniej populacjach leukocytów i erytrocytów użyto przeciwciała monoklonalnego przeciw CD35

znakowanego fikoerytryną (PE) (Becton Dickinson). 1 ml krwi pacjenta przepłukiwano 10 ml soli fizjologicznej przez około 4 min. Następnie do 20 μ l krwi pacjenta dodawano po 2 μ l każdego przeciwciała i inkubowano przez 15 min w temperaturze pokojowej w ciemności. Powstałą zawiesinę przepłukiwano ponownie 2 razy 1ml soli fizjologicznej i poddawano niezwłocznie akwizycji na cytofluorometrze (Ryc. 4b).



Ryc. 4a. Metoda bramkowania subpopulacji leukocytów w cytometrii przepływowej z użyciem przeciwciał przeciwko CD45, CD 15, CD14, CD19 i CD35



Ryc. 4b. Bramkowanie erytrocytów (populacja CD45-) w cytometrii przepływowej

3.14. Metody statystyczne

Wyniki zostały przedstawione w postaci średnich \pm SD, średnich \pm SEM, lub jako wartości procentowe. Wartości SLEDAI-2K i wiek 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 zmiennych ilościowych niepowiązanych wykorzystano jednoczynnikową analizę wariancji dla zmiennych niepowiązanych (ANOVA). W przypadku uwzględniania wpływu zmiennej towarzyszącej przy porównywaniu grup zastosowano analizę kowariancji (ANCOVA). Do porównania zmiennych ilościowych niepowiązanych w dwóch grupach użyto testu t-Studenta (dla zmiennych parametrycznych) i testu Manna-Whitneya (dla zmiennych nieparametrycznych). Do oceny różnic częstości

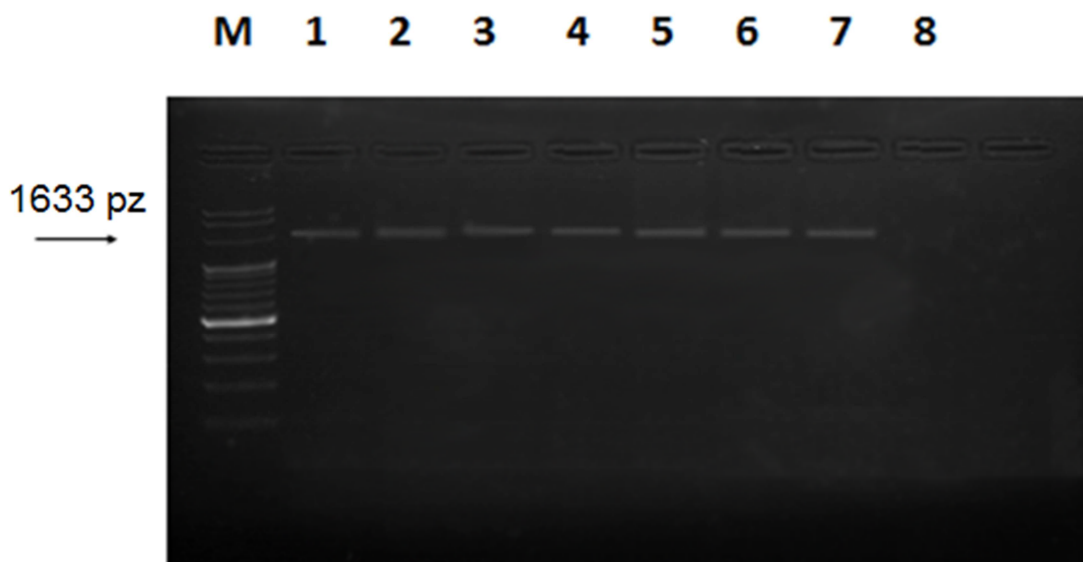
występowania genotypu między grupami użyto testu Fishera-Freemana-Haltona. Zgodność rozkładu genotypów polimorfizmu rs11118133 z prawem Hardy'ego-Weinberga w grupie chorych oraz w grupie kontrolnej sprawdzono testem χ^2 i testem Fischera. Aby ocenić wpływ danego genotypu na wystąpienie choroby i ekspresję CR1 na badanych komórkach oraz stężenie sCR1 w surowicy użyto odpowiednich modeli regresji logistycznej. Do oceny wpływu polimorfizmu rs11118133, czynnika płci, wieku badanych, stosowanego leczenia, stężenia kreatyniny w surowicy, wielkości białkomoczu i klirensu kreatyniny na stężenie sCR1 w surowicy i ekspresję CR1 na powierzchni badanych populacji komórek wykorzystano także modele hierarchicznej regresji wielorakiej. Przy uwzględnieniu ograniczeń wynikających z liczebności grupy do modelu nie włączano na raz więcej niż jednego predyktora na 10 przypadków. Ocenę modelu przeprowadzono kierując się skorygowanym R^2 . Związek pomiędzy stężeniem sCR1 w surowicy i ekspresją CR1 na powierzchni komórek a polimorfizmem rs11118133, sterydoterapią u badanych chorych i aktywnością TZN analizowano przy pomocy wieloczynnikowej wstecznej analizy logistycznej. Do analizy korelacji między badanymi parametrami wykorzystano współczynnik korelacji liniowej r Pearsona (dla zmiennych parametrycznych) lub korelacji rangowej r_s Spearmana (dla zmiennych nieparametrycznych). Jako istotne statystycznie przyjęto wartości $p < 0,05$.

4. WYNIKI

4.1. Analiza produktu *HindIII* RFLP

4.1.1. Analiza produktu PCR

Zgodnie z oczekiwaniami, otrzymany produkt amplifikacji DNA z wykorzystaniem metody PCR i par starterów specyficznych dla intronu 27 genu CR1 miał długość 1633 pz (Ryc. 5).



Ryc. 5. Produkt PCR otrzymany przy użyciu starterów dla intronu 27 w obrębie genu CR1 o długości 1633 pz

Objaśnienia: M-marker; 1-7 –produkt PCR uzyskany u kolejnych badanych osób; 8- kontrola negatywna (woda)

4.1.2. Analiza produktów reakcji restrykcji z użyciem enzymu *HindIII*

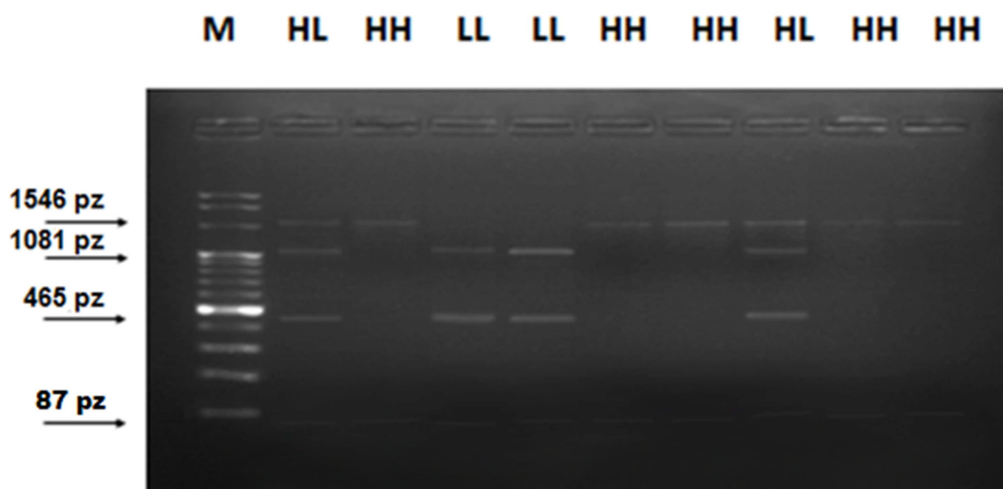
Długości fragmentów powstałych w reakcji restrykcji z użyciem enzymu *HindIII* wynosiły 1546pz, 1081pz, 465pz i 87pz. Wyróżniono trzy wersje genotypu w obrębie polimorfizmu intronu 27 genu CR1 przy użyciu enzymu restrykcyjnego *HindIII* i techniki RFLP:

→ genotyp HH, który odpowiadał fragmentom DNA o długości 1546 i 87 pz;

→genotyp HL odpowiadający fragmentom DNA o długości 1546 pz, 1080 pz, 465 pz i 87pz;

→genotyp LL odpowiadający fragmentom DNA o długości 1080 pz, 465 pz i 87pz (Ryc. 6a).

Obecność fragmentu DNA o długości 87 pz po zastosowaniu cięcia enzymem *HindIII* wynika z obecności dodatkowego konstytutywnego miejsca cięcia dla enzymu *HindIII* w obrębie odcinka DNA wyznaczonego przez parę użytych starterów, niezależnego od polimorfizmu rs11118133. Pojawia się on w każdym badanym przypadku bez względu na rodzaj genotypu polimorfizmu rs11118133. Miejsce cięcia enzymu *HindIII* zależne od mutacji A→T, będące podstawą badanego polimorfizmu, i wspomniane wcześniej miejsce konstytutywne zaznaczone zostały na Ryc. 6b. Homozygota HH posiadała nieaktywne dla enzymu restrykcyjnego miejsce działania związane z polimorfizmem rs11118133 (brak mutacji A→T), stąd fragment 1546 pz nie uległ dalszemu cięciu. W przypadku heterozygoty HL fragment 1546 pz uległ częściowemu cięciu na fragmenty 1080 pz i 465 pz, co wynika z obecności mutacji A→T w allelu L. W przypadku homozygoty LL fragment DNA o długości 1546 pz uległ całkowitemu cięciu na 1080 i 465 pz, co wynika z obecności wspomnianej mutacji.



Ryc. 6a. Żel obrazujący możliwe wersje polimorfizmu rs11118133 genu CR1 przy użyciu enzymu restrykcyjnego *HindIII*

Objaśnienia: M-marker, HH-homozygota HH (produkty o długości 1546 i 87 pz); HL-heterozygota HL (produkty o długości 1546 pz, 1080 pz, 465 pz i 87pz); LL-homozygota LL (produkty o długości 1080 pz, 465 pz i 87pz)

CAGCAGAGCCAACTTCTG**ACCC**AGTCTCAGATAGACAAACTAACTATTGCTCCCTTTACTTTAAA
 AGCAAGCAATAGGACTTATAGATGGAGATGATACGTTGGACATAGCCATATGATCAAAGGAATACA
 AAAAAAGAAGGTACAATATGTATTGTATTGTAACCAGAGGAGGGCAACATGTTCTGTCAAAGGTG
GTACATGTGAAACCTGGTCAGGCATTCATTGGATGAAAAGGAGCAGCTTACAAATAAGGAAAAGG
 AAAAAAGGTAGTTGAACCATGTAACCTCCTTAACTGAGATCAGTAGGTAATACAGTTGAGTTGGA
 GGACCCTGAAGCAGAGTTTGGGAGGGTAAACATTAATTGTAACAGCAGCTCTGGAAGAGTATGCA
 TCAAAGTGCACACAGAGAGGAGACATTATGGGGTTCTTGCTCTTGACTTCTCCTTGGGACAAGTA
 GCCACACCAAAAGCCATTGCCTCAACTGAGAAGGGGCTTTTAAAAACTCTGGAGTGGACCTCCAT
 CAAACTCCAGCAGACCTGCAGCAGAGGGGCTGACTGTTAGAAGATAAACTAACAAACATAAAGG
 AATAGCATCAACATTAACAAAAAGGACGTCCACATGAAAACCCCATCAAAGGTCACCAACATCAA
 AGACCAATGATAGATAAATCCACGAAGATGAGGAAAAACCAGCACAAAAAGGCTGAAAATTCCCG
 AAACCAGAAATGCCTCTTCTCCTCAAAGGATCACAACTCCTTGCCAGCAAGAGAACAAAACTGGG
 TGGAGAATGAGTGAGTTGGACAGATTGACAGAAGTAGGCTTCAGAAGGTGGGTAATAACAAACTC
 CTCTGAGCTAAAGGAGCATGTTCTAACCAATGCAAGGAAGCGAAGAACCTTAAAAACAGGTTA
 GAGGAATTAATACTAGAATAACCAGTTTAGAAAAGAACATAAATGACCTGATGGAGCTGAAAAAC
 ACAGCACAAAGAATTCATGAAGCATACAAAGTATCAATAGCCGAATCGATCAAGTGAACAAAGG
 ATATCAGAGATTGAAGATCAACTTAATGAAATA**A|AGCA|TT**GAAAGACAAAAAAGAATGAAAAGG
 AATGAACAAAGCCTCCAAGAAATATGGGACTATGTGAAAAGACCAAACCTACGTTTGATTGGTGT
 CCTGAAAGTGACGGGGAGAATGGAACCAAGTTGAAAACACTCTTCAAGATATTATCCAGGAGAA
 CTGCCCAACCTAGCAAGACAGTCCAGCATTCAAATTCAGGAAATACAGAGAACACCACAAAGAT
 ACTCCTTGAGAAGAGCAACCCCAAGACACGTAATTGTGAGATTACCAAGGTTGAAATGAAGGAA
 AAAAAATGTTAAGGGCAGCCAGAGAGAAAGGTCGGGTACCTACAAAGGGAAGCCATCAGACTAA
 CAGTGAATCTCTCTGCAGAAACCCTACAAGCCAGAAGAGAGTGGGGGCCAATATTCAACATTCTT
 AAAGAAAAGAATTTTCAACCCAGAATTCATATCTAGCCAAACT**A|AGCTT**CATAAGTGAAGGAGAA
 AATAAATCCTTTACAGACAAGCAAATGCTGAGGGATTTTGTACCA**CCAGACTTGCCTTACAAGG**
G

Ryc. 6b. Sekwencja nukleotydów w uzyskanym produkcie PCR. Na żółto zaznaczono fragmenty wyznaczone przez parę starterów oraz miejsce mutacji A→T, będące podstawą polimorfizmu rs11118133. Pojedynczą ciągłą linią zaznaczone jest miejsce konstytutywne działania enzymu restrykcyjnego *HindIII*. Podwójną linią ciągłą oznaczone jest miejsce działania tego enzymu w przypadku obecności mutacji A→T

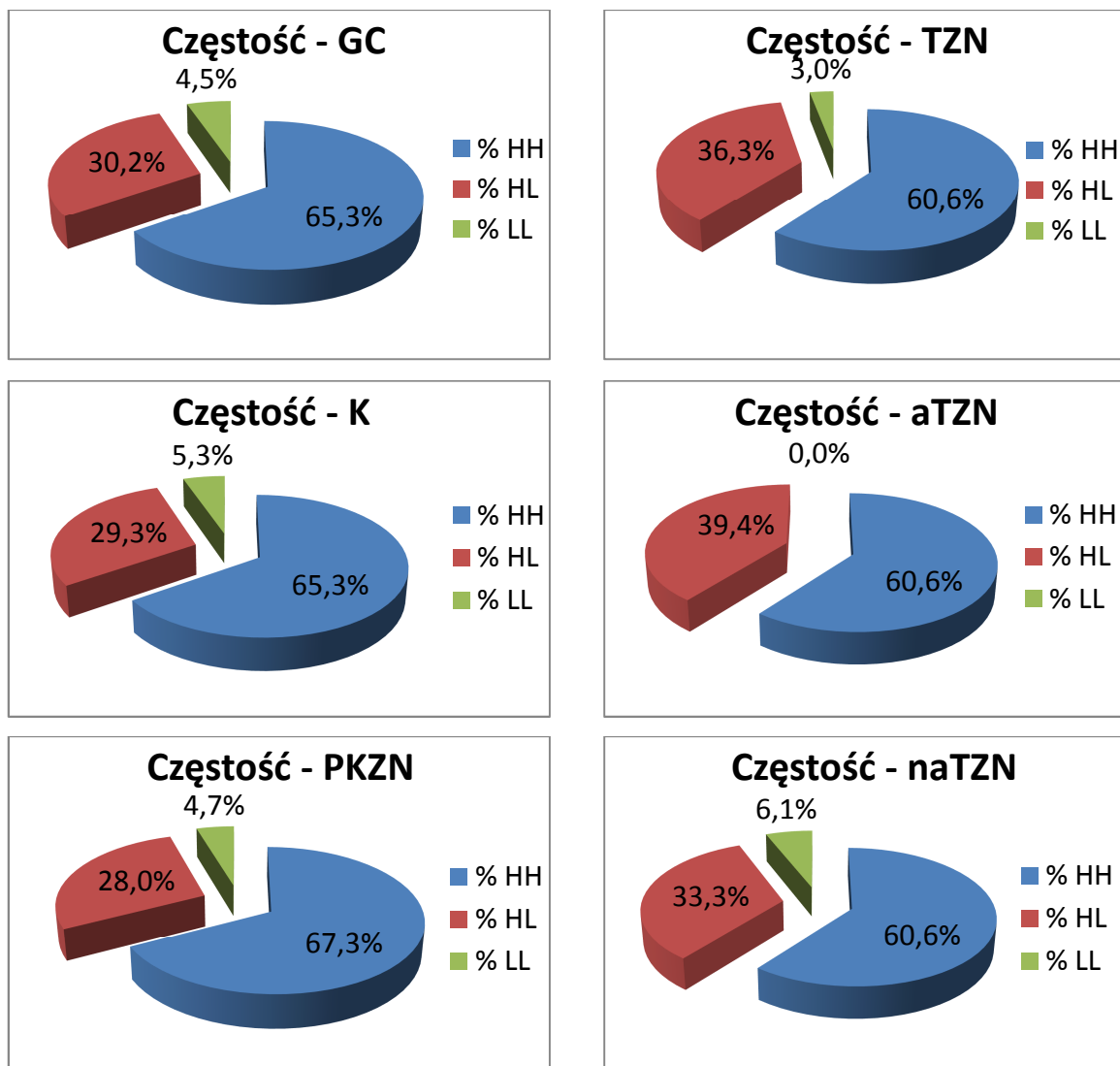
4.2. Ocena częstości występowania genotypów HH, HL i LL w badanej populacji

Całą badaną populację (291 osób) podzielono według uzyskanego genotypu na grupę HH (190 osób), HL (88 osób) i LL (13 osób), w tym:

-K	(HH-49 osób; HL-22 osoby; LL-4 osoby)
-PKZN	(HH-101 osób; HL-42 osoby; LL-7 osób)
-aTZN	(HH-20 osób; HL-13 osób; LL-0 osób)
-naTZN	(HH-20 osób; HL-11 osób; LL-2 osoby).

Rozkład procentowy występowania poszczególnych genotypów w badanych podgrupach przedstawiono na Ryc. 7. Zarówno w całej badanej populacji (GC), jak i w poszczególnych podgrupach (K, PKZN i TZN) najczęściej występował genotyp HH, najrzadziej LL. Częstość występowania genotypów HH, HL i LL nie różniła się

istotnie statystycznie pomiędzy grupami K, PKZN i TZN ($p=0,77$) i grupami K, PKZN, aTZN, naTZN ($p=0,76$). Rozkład genotypów analizowanego polimorfizmu był zgodny z prawem Hardy'ego-Weinberga zarówno w grupie K, jak i chorych na PKZN i TZN ($p>0,05$) (Tab. 8).



Ryc. 7. Częstość występowania genotypu HH, HL, LL w GC, K, PKZN, TZN, aTZN i naTZN

GC – Grupa całkowita, K – kontrola, PKZN – przewlekłe kłębuszkowe zapalenie nerek, TZN – toczniowe zapalenie nerek, aTZN – aktywne toczniowe zapalenie nerek, naTZN – nieaktywne toczniowe zapalenie nerek.

Tab. 8. Równanie Hardy'ego-Weinberga dla częstości występowania genotypów polimorfizmu *HindIII* CR1

Kontrola (MAF^a = 0,2)				
Genotyp	Obserwowane	Oczekiwane	p ^b	p ^c
HH	49	48	p = 0,47	p = 0,77
HL	22	24		
LL	4	3		
PKZN (MAF^a = 0,19)				
Genotyp	Obserwowane	Oczekiwane	p ^b	p ^c
HH	101	99	p = 0,42	p = 0,63
HL	42	46		
LL	7	5		
TZN (MAF^a = 0,21)				
Genotyp	Obserwowane	Oczekiwane	p ^b	p ^c
HH	40	41	p = 0,71	p = 0,77
HL	24	22		
LL	2	3		

a – MAF – minor allele frequency; b – Fisher exact test; c – χ^2

4.3. Ocena wpływu genotypów *HindIII* CR1 na wystąpienie PKZN i TZN

Poza oceną częstości występowania genotypów HH, HL, LL w poszczególnych badanych grupach (K, PKZN i TZN), które nie wykazały różnic pomiędzy grupami, do oceny wpływu polimorfizmu rs11118133 na wystąpienie PKZN i TZN wykorzystano model regresji logistycznej (Tab. 9). Model ten nie wykazał istotnego ryzyka zachorowania na TZN i PKZN związanego z posiadaniem określonego genotypu *HindIII* genu CR1.

Tab. 9. Model regresji logistycznej dotyczący częstości występowania genotypów *HindIII* CR1 i ryzyka zachorowania na PKZN i TZN

Zmienna (genotyp)	PKZN (n = 150) n (%) [1]	K (n = 75) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość P
<i>HindIII</i> CR1				
HH	101 (67,33)	49 (65,33)	1,00	p = 0,808 p = 0,803 p = 0,764
HL	42 (28,00)	22 (29,33)	0,93 (0,50 – 1,72)	
LL	7 (4,67)	4 (5,34)	0,85 (0,24 – 5,07)	
HL/LL	49	26	0,91 (0,51 – 1,65)	

Zmienna (genotyp)	TZN (n = 66) n (%) [1]	K (n = 75) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość P
<i>HindIII</i> CR1				
HH	40 (60,61)	49 (65,33)	1,00	p = 0,425 p = 0,575 p = 0,562
HL	24 (36,36)	22 (29,33)	1,34 (0,65 – 2,75)	
LL	2 (3,03)	4 (5,34)	0,61 (0,10 – 5,60)	
HL/LL	26	26	1,22 (0,61 – 2,45)	

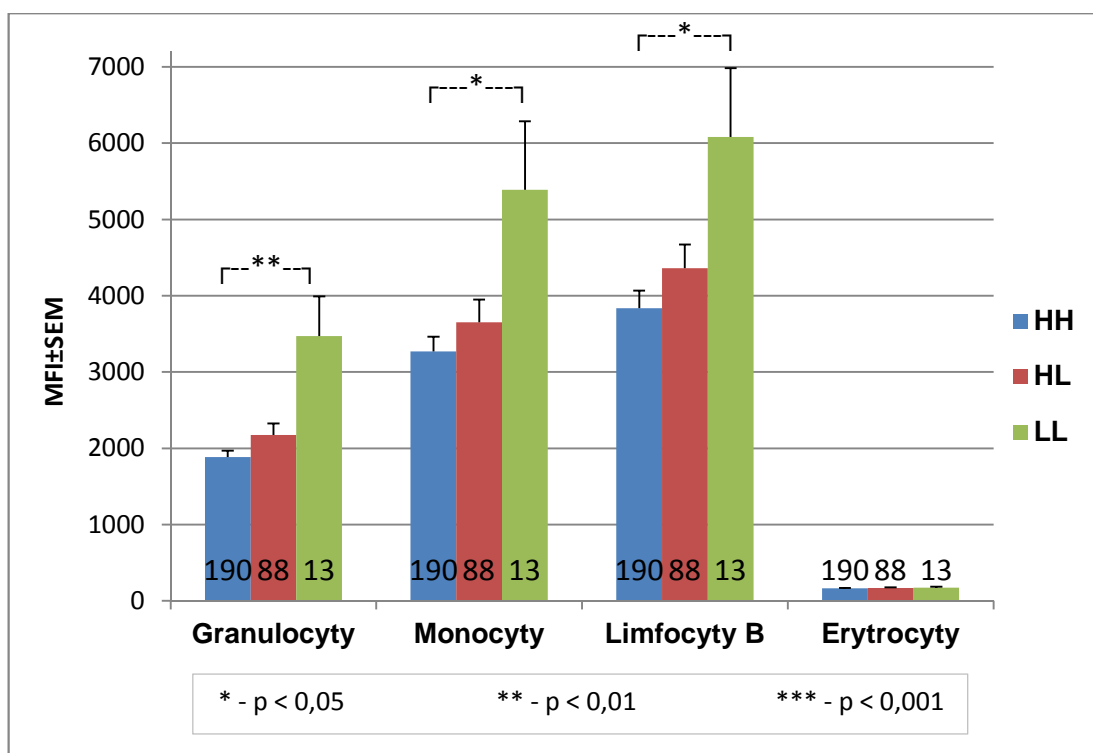
Zmienna (genotyp)	TZN (n = 66) n (%) [1]	PKZN (n = 150) n (%) [1]	IL (95% PU)	Wartość P
<i>HindIII</i> CR1				
HH	40 (60,61)	101 (67,33)	1,00	p = 0,250 p = 0,684 p = 0,341
HL	24 (36,36)	42 (28,00)	1,44 (0,77 – 2,69)	
LL	2 (3,03)	7 (4,67)	0,72 (0,14 – 3,69)	
HL/LL	26	49	1,34 (0,73 – 2,45)	

Zmienna (genotyp)	TZN + PKZN (n = 216) n (%) [1]	K (n = 75) n (%) [1]	IL (95% PU)	Wartość P
<i>HindIII</i> CR1				
HH	141 (65,27)	49 (65,33)	1,00	p = 0,888 p = 0,697 p = 0,993
HL	66 (30,56)	22 (29,33)	1,04 (0,58 – 1,87)	
LL	9 (4,17)	4 (5,34)	0,78 (0,23 – 2,67)	
HL/LL	75	26	1,00 (0,58 – 1,74)	

K-grupa kontrolna; PKZN-pierwotne kłębuszkowe zapalenie nerek, TZN-toczniove zapalenie nerek; IL – iloraz szans, PU – przedział ufności

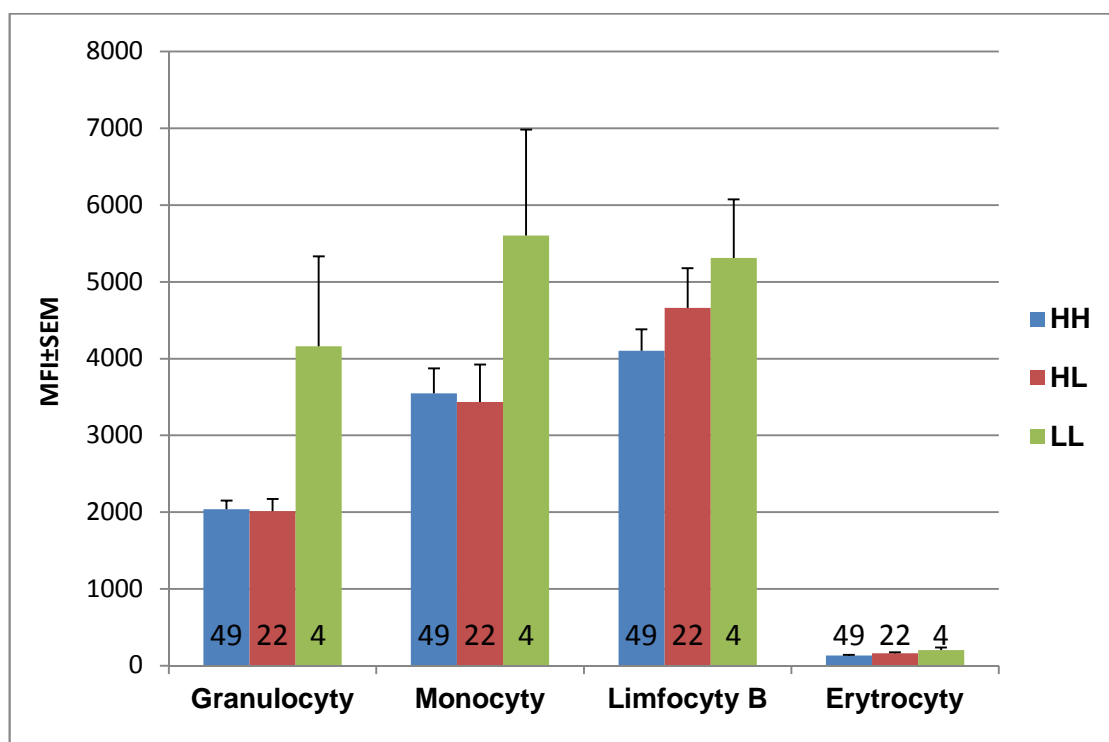
4.4. Ocena i porównanie ekspresji CR1 na różnych komórkach w grupach osób z różnymi genotypami

Porównanie ekspresji CR1 na różnych typach komórek krwi między grupami osób posiadających odmienny genotyp w całej badanej grupie wykazało, że największą ekspresję CR1 ma granulocyty, monocyty i limfocyty B stwierdzono u osób z genotypem LL. Różnice te były statystycznie istotne pomiędzy grupami HH i LL (dla G-CR1 $p < 0,01$, natomiast dla M-CR1 i B-CR1 $p < 0,05$). Grupa osób z genotypem HL wykazywała pośrednią ekspresję na granulocytych, monocytych i limfocytych B w porównaniu do grupy HH i LL, ale bez statystycznie istotnych różnic w porównaniu do grupy HH i LL. Nie stwierdzono natomiast różnic w ekspresji CR1 na erytrocytach pomiędzy wspomnianymi grupami (Ryc. 8).

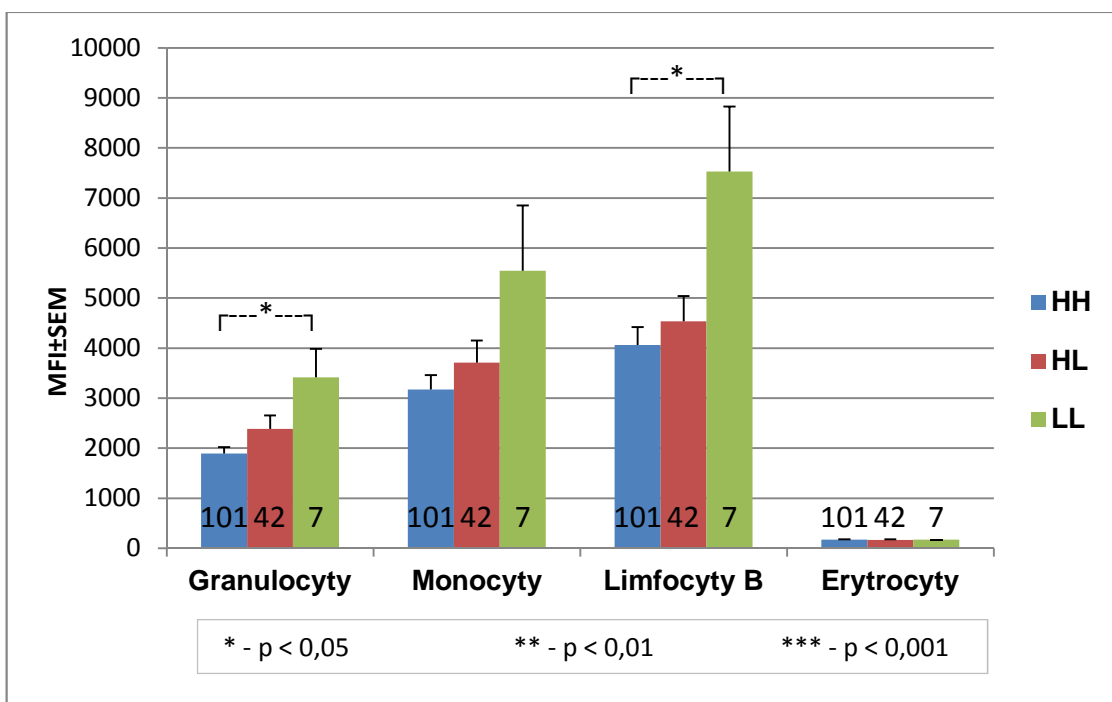


Ryc. 8. Porównanie ekspresji receptora CR1 na poszczególnych typach komórek krwi u osób z różnymi genotypami *HindIII* CR1 w całej badanej populacji

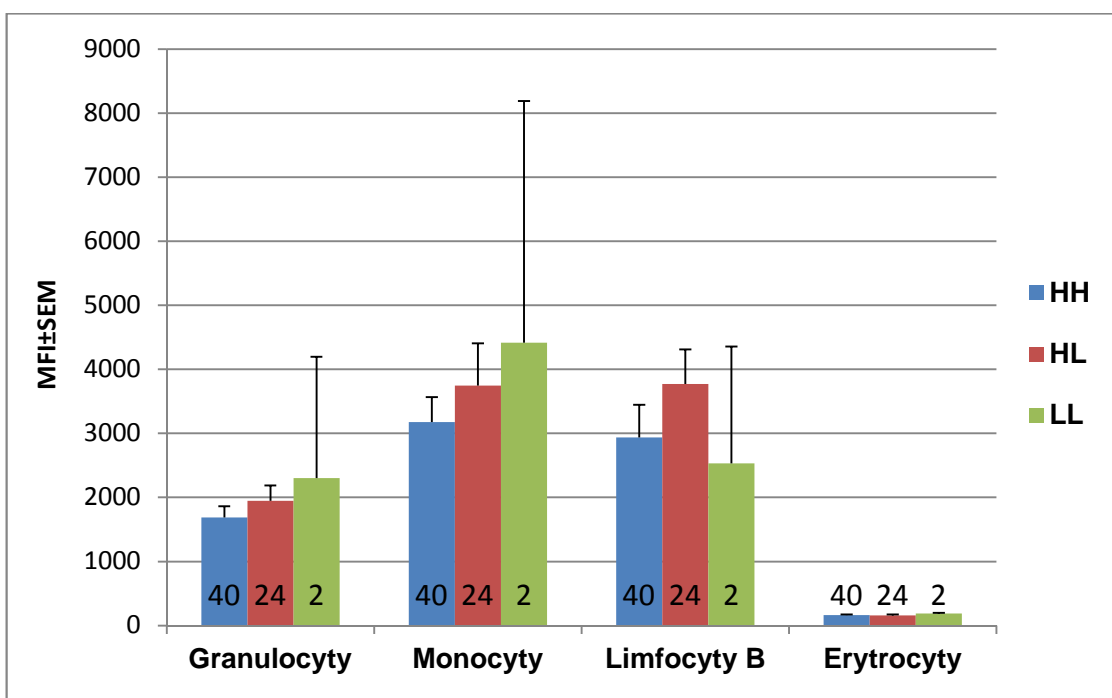
Następnie porównano ekspresję CR1 na komórkach krwi osób z różnymi genotypami w grupie K (Ryc. 9a), PKZN (Ryc. 9b), i TZN (Ryc. 9c). Statystycznie znamienne różnice w ekspresji CR1 pomiędzy grupą HH i LL stwierdzono na granulocytach ($p < 0,05$) i limfocytach B ($p < 0,05$), ale tylko u chorych na PKZN. Różnice te były również widoczne na monocytach, ale nie spełniały wymogów istotności statystycznej. Wśród chorych na PKZN, podobnie jak to zaobserwowano w GC, największą ekspresję wykazywały leukocyty u osób z genotypem LL, pośrednią z HL, a najmniejszą z HH. Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic w ekspresji G-CR1, M-CR1 i B-CR1 pomiędzy osobami z różnymi genotypami w grupie K i TZN. W grupie K można jednak było zauważyć tendencję do wyższej ekspresji G-CR1, M-CR1 i B-CR1 u osób z genotypem LL. Podobnie genotyp LL predysponował do wyższej ekspresji G-CR1 i M-CR1 u chorych na TZN. Nie odnotowano różnic pomiędzy ekspresją E-CR1 u osób z różnymi genotypami wśród chorych na PKZN i TZN oraz w grupie K.



Ryc. 9a. Porównanie ekspresji receptora CR1 na poszczególnych typach komórek krwi u osób z genotypami HH, HL, LL w grupie K



Ryc. 9b. Porównanie ekspresji receptora CR1 na poszczególnych typach komórek krwi u osób z genotypami HH, HL, LL u chorych na PKZN



Ryc. 9c. Porównanie ekspresji receptora CR1 na poszczególnych typach komórek krwi u osób z genotypami HH, HL, LL u chorych na TZN

4.5. Ocena wpływu posiadanego genotypu *HindIII* CR1 na wysokość jego ekspresji na komórkach krwi osób badanych

W celu potwierdzenia możliwości wpływu genotypów HH, HL, LL na wysokość ekspresji CR1 na komórkach krwi zbudowano model regresji logistycznej oparty na podziale grupy badanej na podgrupy z wysoką (w), średnią (s) i niską (n) ekspresją CR1. Granice dla podziału na grupy w, s, n przedstawiono w Tab. 10. Zostały one wyznaczone przez wartości 25 i 75 percentyla dla G-CR1, M-CR1, B-CR1 i E-CR1 osiągnięte w grupie K, które wyznaczały również sztywne granice dla n, s i w ekspresji w grupie GC, PKZN i TZN.

Tab. 10. Granice podziału na niską (n), średnią (s), i wysoką (w) ekspresję CR1 na poszczególnych populacjach badanych komórek w grupie K

Rodzaj komórki	Minimum	Maksimum	Niska ekspresja (n) ≤ 25 percentyla	Średnia ekspresja (s) > 25 i < 75 percentyla	Wysoka ekspresja (w) ≥ 75 percentyla
G-CR1 (MFI)	699,00	7100,00	≤ 1405,06	> 1405,06 i < 2479,00	≥ 2479,00
M-CR1 (MFI)	911,87	10821,00	≤ 1621,50	>1621,50 i < 5452,00	≥ 5452,00
B-CR1 (MFI)	1436,80	10872,00	≤ 2653,00	>2653,00 i < 6037,00	≥ 6037,00
R-CR1 (MFI)	53,25	268,72	≤ 120,57	>120,57 i < 205,22	≥ 205,22

Cztery modele regresji logistycznej dotyczące wpływu polimorfizmu rs11118133 na wysokość ekspresji G-CR1 (Tab. 11a), M-CR1 (Tab. 11b), B-CR1 (Tab. 11c) i E-CR1 (Tab. 11d) w całej badanej grupie wykazały istotną statystycznie tendencję do wyższej ekspresji CR1 na leukocytach u osób z genotypem LL i HL/LL w stosunku do genotypu HH, a w przypadku granulocytów również istotną statystycznie tendencję do wyższej ekspresji G-CR1 u osób z genotypem HL w porównaniu do grupy HH. Brak natomiast było tych zależności w modelu dotyczącym E-CR1.

W grupie K, modele regresji logistycznej wykazały istotną statystycznie wyższą ekspresję G-CR1 u osób z genotypem LL względem osób z genotypem HH (Tab. 12). Różnica ta była jednak mniej wyraźna niż w GC. Natomiast nie stwierdzono różnic w ekspresji CR1 na pozostałych badanych komórkach.

Wśród chorych na PKZN, zaobserwowano istotnie statystycznie wyższą ekspresję G-CR1 i B-CR1 u osób z genotypem LL i HL/LL względem HH (Tab. 13a i 13c). W modelu dotyczącym G-CR1 zaznaczyła się również wyższa ekspresja CR1 na granulocytach u osób z genotypem HL względem HH (Tab. 13a). Pomiędzy podgrupami w, s i n najmniej widoczne były różnice w ekspresji M-CR1 (Tab. 13b), chociaż obserwowano statystycznie istotne różnice między genotypem HL/LL a HH. Nie stwierdzono różnic w ekspresji E-CR1 pomiędzy powyższymi podgrupami.

Zastosowanie modeli regresji logistycznej do oceny ekspresji CR1 na komórkach krwi u chorych na TZN nie wykazało istotnych statystycznie różnic w B-CR1 i G-CR1 pomiędzy osobami z różnymi genotypami (Tab. 14). Nie stwierdzono różnic w liczbie CR1 również na pozostałych komórkach w tej podgrupie.

Tab. 11a. Model regresji logistycznej dotyczący wpływu polimorfizmu rs11118133 na ekspresję G-CR1 w GC

Zmienna	GC-w G-CR1 (n = 75) n (%) [1]	GC-s G-CR1 (n = 118) n (%) [0]	IL(95% PU)	Wartość p
<i>HindIII</i> CR1				
HH	39 (52,00)	77 (68,81)	1,00	p = 0,115 p = 0,002 p = 0,067
HL	21 (36,00)	39 (29,70)	1,37 (0,73 – 2,56)	
LL	9 (12,00)	2 (1,49)	8,88 (1,80 – 43,80)	
HL/LL	36	41	1,73 (0,46 – 3,14)	

Zmienna	GC-s G-CR1 (n = 118) n (%) [1]	GC-n G-CR1 (n = 98) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość p
<i>HindIII</i> CR1				
HH	77 (68,81)	74 (75,51)	1,00	p = 0,085 p = 0,969 p = 0,100
HL	39 (29,70)	22 (22,45)	1,70 (0,92 – 3,15)	
LL	2 (1,49)	2 (2,04)	0,96 (0,13 – 7,08)	
HL/LL	41	24	1,64 (0,90 – 2,99)	

Zmienna	GC-w G-CR1 (n = 75) n (%) [1]	GC-n G-CR1 (n = 98) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość p
<i>HindIII</i> CR1				
HH	39 (52,00)	74 (75,51)	1,00	p = 0,015 p = 0,002 p = 0,001
HL	21 (36,00)	22 (22,45)	2,33 (1,17 – 4,64)	
LL	9 (12,00)	2 (2,04)	8,54 (1,73 – 42,14)	
HL/LL	36	24	2,85 (1,48 – 5,45)	

Zmienna	GC-w G-CR1 (n = 75) n (%) [1]	GC-n+s G-CR1 (n=216) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość p
<i>HindIII</i> CR1				
HH	39 (52,00)	151 (69,99)	1,00	p = 0,068 p < 0,001 p = 0,006
HL	21 (36,00)	61 (28,24)	1,71 (0,96 – 3,05)	
LL	9 (12,00)	4 (1,85)	8,71 (2,53 – 30,01)	
HL/LL	36	65	2,14 (1,25 – 3,68)	

IL – iloraz szans; PU – przedział ufności; GC-w G-CR1 – grupa osób wykazująca wysoką ekspresję CR1 na granulocytach w GC; GC-s G-CR1 – grupa osób wykazująca średnią ekspresję CR1 na granulocytach w GC; GC-n G-CR1 – grupa osób wykazująca niską ekspresję CR1 na granulocytach w GC; GC-n+s G-CR1 – grupa osób wykazująca niską i średnią ekspresję CR1 na granulocytach w GC

Tab. 11b. Model regresji logistycznej dotyczący wpływu polimorfizmu rs11118133 na ekspresję M-CR1 w GC

Zmienna	GC-w M-CR1 (n = 56) n (%) [1]	GC-s M-CR1 (n = 161) n (%) [0]	IL (95% PU)	P value
<i>HindIII</i> CR1				
HH	32 (57,14)	103 (63,98)	1,00	p = 0,926 p = 0,015 p = 0,366
HL	17 (30,36)	53 (32,92)	1,03 (0,52 – 2,03)	
LL	7 (12,50)	5 (3,11)	4,51 (1,32 – 15,33)	
HL/LL	24	58	1,33 (0,71 – 2,48)	

Zmienna	GC-s M-CR1 (n = 161) n (%) [1]	GC-n M-CR1 (n = 74) n (%) [0]	IL(95% PU)	P value
<i>HindIII</i> CR1				
HH	103 (63,98)	55 (74,32)	1,00	p = 0,150 p = 0,330 p = 0,112
HL	53 (32,92)	18 (24,32)	1,57 (0,84 – 2,95)	
LL	5 (3,11)	1 (1,35)	2,67 (0,30 – 23,81)	
HL/LL	58	19	1,63 (0,88 – 3,02)	

Zmienna	GC-w M-CR1 (n = 56) n (%) [1]	GC-n M-CR1 (n = 74) n (%) [0]	IL (95% PU)	P value
<i>HindIII</i> CR1				
HH	32 (57,14)	55 (74,32)	1,00	p = 0,232 p = 0,004 p = 0,040
HL	17 (30,36)	18 (24,32)	1,62 (0,73 – 3,62)	
LL	7 (12,50)	1 (1,35)	12,03 (1,38 – 105,21)	
HL/LL	24	19	2,17 (1,02 – 4,60)	

Zmienna	GC-w M-CR1 (n = 56) n (%) [1]	GC-n+s M-CR1 (n = 235) n (%) [0]	IL (95% PU)	P value
<i>HindIII</i> CR1				
HH	32 (57,14)	158 (67,23)	1,00	p = 0,616 p = 0,004 p = 0,159
HL	17 (30,36)	71 (30,21)	1,18 (0,61 – 2,27)	
LL	7 (12,50)	6 (2,55)	5,76 (1,80 – 18,41)	
HL/LL	24	77	1,54 (0,85 – 2,80)	

IL – iloraz szans; PU – przedział ufności; GC-w M-CR1 – grupa osób wykazująca wysoką ekspresję CR1 na monocytach w GC; GC-s M-CR1 – grupa osób wykazująca średnią ekspresję CR1 na monocytach w GC; GC-n M-CR1 – grupa osób wykazująca niską ekspresję CR1 na monocytach w GC; GC-n+s M-CR1 – grupa osób wykazująca niską i średnią ekspresję CR1 na monocytach w GC

Tab. 11c. Model regresji logistycznej dotyczący wpływu polimorfizmu rs11118133 na ekspresję B-CR1 w GC

Zmienna	GC-w B-CR1 (n = 56) n (%) [1]	GC-s B-CR1 (n = 129) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość p
HindIII CR1				
HH	30 (53,57)	82 (63,57)	1,00	p = 0,447 p = 0,066 p = 0,203
HL	20 (35,71)	42 (32,56)	1,30 (0,66 – 2,57)	
LL	6 (10,71)	5 (3,88)	3,28 (0,92 – 11,69)	
HL/LL	26	47	1,51 (0,80 – 2,87)	

Zmienna	GC-s B-CR1 (n = 129) n (%) [1]	GC-n B-CR1 (n = 106) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość p
HindIII CR1				
HH	82 (63,57)	78 (73,58)	1,00	p = 0,143 p = 0,287 p = 0,100
HL	42 (32,56)	26 (24,53)	1,54 (0,86 – 2,75)	
LL	5 (3,88)	2 (1,89)	2,58 (0,44 – 12,77)	
HL/LL	47	28	1,60 (0,91 – 2,81)	

Zmienna	GC-w B-CR1 (n = 56) n (%) [1]	GC-n B-CR1 (n = 106) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość p
HindIII CR1				
HH	30 (53,57)	78 (73,58)	1,00	p = 0,060 p = 0,008 p = 0,011
HL	20 (35,71)	26 (24,53)	2,00 (0,97 – 4,13)	
LL	6 (10,71)	2 (1,89)	7,80 (1,46 – 12,77)	
HL/LL	26	28	2,41 (1,22 – 4,79)	

Zmienna	GC-w B-CR1 (n = 56) n (%) [1]	GC-n+s B-CR1 (n = 235) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość p
HindIII CR1				
HH	30 (53,57)	160 (68,08)	1,00	p = 0,168 p = 0,014 p = 0,043
HL	20 (35,71)	68 (28,93)	1,57 (1,15 – 3,26)	
LL	6 (10,71)	7 (2,98)	4,57 (1,42 – 14,66)	
HL/LL	26	75	1,85 (1,02 – 3,35)	

IL – iloraz szans; PU – przedział ufności; GC-w B-CR1 – grupa osób wykazująca wysoką ekspresję CR1 na limfocytach B w GC; GC-s B-CR1 – grupa osób wykazująca średnią ekspresję CR1 na limfocytach B w GC; GC-n B-CR1 – grupa osób wykazująca niską ekspresję CR1 na limfocytach B w GC; GC-n+s B-CR1 – grupa osób wykazująca niską i średnią ekspresję CR1 na limfocytach B w GC

Tab. 11d. Model regresji logistycznej dotyczący wpływu polimorfizmu rs11118133 na ekspresję E-CR1 w GC

Zmienna	GC-w E-CR1 (n = 63) n (%) [1]	GC-s E-CR1 (n = 155) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość P
<i>HindIII</i> CR1				
HH	42 (66,67)	96 (61,94)	1,00	p = 0,665 p = 0,371 p = 0,509
HL	19 (30,76)	50 (32,26)	0,87 (0,45 – 1,65)	
LL	2 (3,72)	9 (5,81)	0,50 (0,10 – 2,48)	
HL/LL	21	59	0,81 (0,44 – 1,51)	

Zmienna	GC-s E-CR1 (n = 155) n (%) [1]	GC-n E-CR1 (n = 66) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość P
<i>HindIII</i> CR1				
HH	96 (61,94)	47 (71,23)	1,00	p = 0,267 p = 0,291 p = 0,182
HL	50 (32,26)	17 (25,76)	1,44 (0,75 – 2,77)	
LL	9 (5,81)	2 (3,03)	2,20 (0,45 – 10,74)	
HL/LL	59	19	1,52 (0,81 – 2,85)	

Zmienna	GC-w E-CR1 (n = 63) n (%) [1]	GC-n E-CR1 (n = 66) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość P
<i>HindIII</i> CR1				
HH	42 (66,67)	47 (71,23)	1,00	p = 0,571 p = 0,912 p = 0,577
HL	19 (30,76)	17 (25,76)	1,25 (0,67 – 2,74)	
LL	2 (3,72)	2 (3,03)	1,12 (0,15 – 8,53)	
HL/LL	21	19	1,24 (0,58 – 2,63)	

Zmienna	GC-w E-CR1 (n = 63) n (%) [1]	GC-n+s E-CR1 (n = 221) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość P
<i>HindIII</i> CR1				
HH	42 (66,67)	143 (64,70)	1,00	p = 0,911 p = 0,523 p = 0,772
HL	19 (30,76)	67 (30,31)	0,96 (0,52 – 1,79)	
LL	2 (3,72)	11 (4,98)	0,62 (0,13 – 2,93)	
HL/LL	21	78	0,92 (0,45 – 2,40)	

IL – iloraz szans; PU – przedział ufności; GC-w E-CR1 – grupa osób wykazująca wysoką ekspresję CR1 na erytrocytach w GC; GC-s E-CR1 – grupa osób wykazująca średnią ekspresję CR1 na erytrocytach w GC; GC-n E-CR1 – grupa osób wykazująca niską ekspresję CR1 na erytrocytach w GC; GC-n+s E-CR1 – grupa osób wykazująca niską i średnią ekspresję CR1 na erytrocytach w GC

Tab. 12. Model regresji logistycznej dotyczący wpływu polimorfizmu rs11118133 na ekspresję G-CR1 w grupie K

Zmienna	K-w G-CR1 (n = 19) n (%) [1]	K-s G-CR1 (n = 37) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość P
<i>HindIII</i> CR1				
HH	11 (38,46)	75 (70,49)	1,00	p = 0,960 p = 0,840 p = 0,477
HL	5 (38,46)	11 (27,87)	1,03 (0,28 – 3,81)	
LL	3 (23,08)	1 (1,64)	6,82 (0,59 – 78,99)	
HL/LL	8	18	1,51 (0,47 – 4,87)	

Zmienna	K-s G-CR1 (n = 37) n (%) [1]	K-n G-CR1 (n = 19) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość P
<i>HindIII</i> CR1				
HH	75 (70,49)	13 (100,00)	1,00	p = 0,938 ---
HL	11 (27,87)	6 (0,00)	0,95 (0,28 – 3,25)	
LL	1 (1,64)	0 (0,00)	---	
HL/LL	18	6	1,04 (0,31 – 3,50)	

Zmienna	K-w G-CR1 (n = 19) n (%) [1]	K-n G-CR1 (n = 19) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość P
<i>HindIII</i> CR1				
HH	11 (38,46)	13 (100,00)	1,00	p = 0,983 ---
HL	5 (38,46)	6 (0,00)	0,48 (0,22 – 4,35)	
LL	3 (23,08)	0 (0,00)	---	
HL/LL	8	6	1,58 (0,40 – 6,23)	

Zmienna	K-w G-CR1 (n = 19) n (%) [1]	K-n+s G-CR1 (n = 56) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość P
<i>HindIII</i> CR1				
HH	11 (38,46)	38 (67,86)	1,00	p = 0,174 p = 0,034 p = 0,435
HL	5 (38,46)	17 (30,36)	1,02 (0,30 – 3,47)	
LL	3 (23,08)	1 (1,79)	10,36 (0,92 – 116,31)	
HL/LL	8	18	1,53 (0,52 – 4,55)	

IL – iloraz szans; PU – przedział ufności; **K-w G-CR1** – grupa osób wykazująca wysoką ekspresję CR1 na granulocytach w grupie K; **K-s G-CR1** – grupa osób wykazująca średnią ekspresję CR1 na granulocytach w grupie K; **K-n G-CR1** – grupa osób wykazująca niską ekspresję CR1 na granulocytach w grupie K; **K-n+s G-CR1** – grupa osób wykazująca niską i średnią ekspresję CR1 na granulocytach w grupie K

Tab. 13a. Model regresji logistycznej dotyczący wpływu polimorfizmu rs11118133 na ekspresję G-CR1 u chorych na PKZN

Zmienna	PKZN-w G-CR1 (n = 45) n (%) [1]	PKZN-s G-CR1 (n = 51) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość P
<i>HindIII</i> CR1				
HH	23 (51,11)	34 (66,67)	1,00	p = 0,305 p = 0,039 p = 0,121
HL	17 (37,78)	16 (31,37)	1,57 (0,65 – 3,77)	
LL	5 (11,11)	1 (1,96)	7,39 (0,77 – 70,56)	
HL/LL	22	17	1,91 (0,83 – 4,41)	
Zmienna	PKZN-s G-CR1 (n = 51) n (%) [1]	PKZN-n G-CR1 (n = 54) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość P
<i>HindIII</i> CR1				
HH	34 (66,67)	44 (81,48)	1,00	p = 0,074 p = 0,857 p = 0,081
HL	16 (31,37)	9 (16,67)	2,30 (0,90 – 5,90)	
LL	1 (1,96)	1 (1,83)	1,29 (0,07 – 22,41)	
HL/LL	17	10	2,20 (0,88 – 5,47)	
Zmienna	PKZN-w G-CR1 (n = 45) n (%) [1]	PKZN-n G-CR1 (n = 54) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość P
<i>HindIII</i> CR1				
HH	23 (51,11)	44 (81,48)	1,00	p = 0,007 p = 0,018 p = 0,021
HL	17 (37,78)	9 (16,67)	5,61 (1,38 – 9,49)	
LL	5 (11,11)	1 (1,83)	9,56 (1,01 – 90,19)	
HL/LL	22	10	4,21 (1,69 – 10,49)	
Zmienna	PKZN-w G-CR1 (n = 45) n (%) [1]	GC-n+s G-CR1 (n = 105) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość P
<i>HindIII</i> CR1				
HH	23 (51,11)	78 (74,29)	1,00	p = 0,035 p = 0,009 p = 0,006
HL	17 (37,78)	25 (23,81)	2,31 (1,06 – 5,02)	
LL	5 (11,11)	2 (1,90)	8,78 (1,51 – 47,55)	
HL/LL	22	27	2,76 (1,32 – 5,77)	

IL – iloraz szans; PU – przedział ufności; PKZN-w G-CR1 – grupa osób z PKZN wykazująca wysoką ekspresję CR1 na granulocytach; PKZN-s G-CR1 – grupa osób z PKZN wykazująca średnią ekspresję CR1 na granulocytach; PKZN-n G-CR1 – grupa osób z PKZN wykazująca niską ekspresję CR1 na granulocytach; PKZN-n+s G-CR1 – grupa osób z PKZN wykazująca niską i średnią ekspresję CR1 na granulocytach

Tab. 13b. Model regresji logistycznej dotyczący wpływu polimorfizmu rs11118133 na ekspresję M-CR1 w PKZN

Zmienna	PKZN-w M-CR1 (n = 28) n (%) [1]	PKZN-s M-CR1 (n = 84) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość P
<i>HindIII</i> CR1				
HH	16 (57,94)	54 (64,29)	1,00	p = 0,747 p = 0,268 p = 0,501
HL	9 (32,14)	26 (30,95)	1,17 (0,45 – 3,03)	
LL	3 (10,71)	4 (4,76)	2,53 (0,50 – 12,84)	
HL/LL	12	30	1,35 (0,56 – 3,26)	
Zmienna	PKZN-s M-CR1 (n = 84) n (%) [1]	PKZN-n M-CR1 (n = 38) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość P
<i>HindIII</i> CR1				
HH	54 (64,29)	31 (81,58)	1,00	p = 0,103 --- p = 0,048
HL	26 (30,95)	7 (18,42)	2,13 (0,82 – 5,54)	
LL	4 (4,76)	0 (0,00)	---	
HL/LL	30	7	2,46 (0,96 – 6,32)	
Zmienna	PKZN-w M-CR1 (n = 28) n (%) [1]	PKZN-n M-CR1 (n = 38) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość P
<i>HindIII</i> CR1				
HH	16 (57,94)	31 (81,58)	1,00	p = 0,120 --- p = 0,030
HL	9 (32,14)	7 (18,42)	2,49 (0,76 – 8,11)	
LL	3 (10,71)	0 (0,00)	---	
HL/LL	12	7	3,32 (1,07 – 10,30)	
Zmienna	PKZN-w M-CR1 (n = 28) n (%) [1]	GC-n+s M-CR1 (n = 119) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość P
<i>HindIII</i> CR1				
HH	16 (57,94)	85 (71,53)	1,00	p = 0,430 p = 0,105 p = 0,810
HL	9 (32,14)	33 (27,73)	1,45 (0,58 – 3,63)	
LL	3 (10,71)	4 (3,36)	3,98 (0,80 – 19,89)	
HL/LL	12	37	1,72 (0,74 – 4,03)	

IL – iloraz szans; PU – przedział ufności; PKZN-w M-CR1 – grupa osób z PKZN wykazująca wysoką ekspresję CR1 na monocytach; PKZN-s M-CR1 – grupa osób z PKZN wykazująca średnią ekspresję CR1 na monocytach; PKZN-n M-CR1 – grupa osób z PKZN wykazująca niską ekspresję CR1 na monocytach; PKZN-n+s M-CR1 – grupa osób z PKZN wykazująca niską i średnią ekspresję CR1 na monocytach

Tab. 13c. Model regresji logistycznej dotyczący wpływu polimorfizmu rs11118133 na ekspresję B-CR1 w PKZN

Zmienna	PKZN-w B-CR1 (n = 28) n (%) [1]	PKZN-s B-CR1 (n = 71) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość P
<i>HindIII</i> CR1				
HH	15 (53,57)	46 (64,79)	1,00	p = 0,965 p = 0,004 p = 0,304
HL	8 (28,57)	24 (35,80)	1,02 (0,27 – 2,78)	
LL	5 (17,86)	1 (1,41)	15,33 (1,59 – 147,48)	
HL/LL	13	25	1,59 (0,65 – 3,92)	
Zmienna	PKZN-s B-CR1 (n = 71) n (%) [1]	PKZN-n B-CR1 (n = 51) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość P
<i>HindIII</i> CR1				
HH	46 (64,79)	40 (78,43)	1,00	p = 0,083 p = 0,922 p = 0,099
HL	24 (35,80)	10 (19,61)	2,09 (0,88 – 4,93)	
LL	1 (1,41)	1 (1,96)	0,87 (0,05 – 14,99)	
HL/LL	25	11	1,98 (0,86 – 4,55)	
Zmienna	PKZN-w B-CR1 (n = 28) n (%) [1]	PKZN-n B-CR1 (n = 51) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość P
<i>HindIII</i> CR1				
HH	15 (53,57)	40 (78,43)	1,00	p = 0,181 p = 0,007 p = 0,023
HL	8 (28,57)	10 (19,61)	2,13 (0,69 – 6,55)	
LL	5 (17,86)	1 (1,96)	13,33 (1,37 – 129,61)	
HL/LL	13	11	3,15 (1,14 – 8,69)	
Zmienna	PKZN-w B-CR1 (n = 28) n (%) [1]	GC-n+s B-CR1 (n = 122) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość P
<i>HindIII</i> CR1				
HH	15 (53,57)	86 (70,49)	1,00	p = 0,539 p = 0,001 p = 0,018
HL	8 (28,57)	34 (27,87)	1,35 (0,22 – 0,65)	
LL	5 (17,86)	2 (1,64)	14,33 (2,40 – 87,41)	
HL/LL	13	36	2,87 (1,20 – 6,84)	

IL – iloraz szans; PU – przedział ufności; PKZN-w B-CR1 – grupa osób z PKZN wykazująca wysoką ekspresję CR1 na limfocytach B; PKZN-s B-CR1 – grupa osób z PKZN wykazująca średnią ekspresję CR1 na limfocytach B; PKZN-n B-CR1 – grupa osób z PKZN wykazująca niską ekspresję CR1 na limfocytach B; PKZN-n+s B-CR1 – grupa osób z PKZN wykazująca niską i średnią ekspresję CR1 na limfocytach B

Tab. 14a. Model regresji logistycznej dotyczący wpływu polimorfizmu rs11118133 na ekspresję G-CR1 w TZN

Zmienna	TZN-w G-CR1 (n = 11) n (%) [1]	TZN-s G-CR1 (n = 30) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość P
HindIII CR1				
HH	5 (45,45)	18 (60,00)	1,00	p = 0,581
HL	5 (45,45)	12 (40,00)	1,50 (0,34 – 6,63)	
LL	1 (9,09)	0 (0,00)	---	
HL/LL	6	12	1,80 (0,43 – 7,58)	
				p = 0,407
Zmienna	TZN-s G-CR1 (n = 30) n (%) [1]	TZN-n G-CR1 (n = 25) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość P
HindIII CR1				
HH	18 (60,00)	17 (68,00)	1,00	p = 0,405
HL	12 (40,00)	7 (28,00)	1,62 (0,50 – 5,22)	
LL	0 (0,00)	1 (4,00)	---	
HL/LL	12	8	1,42 (0,45 – 4,43)	
				P = 0,538
Zmienna	TZN-w G-CR1 (n = 11) n (%) [1]	TZN-n G-CR1 (n = 25) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość P
HindIII CR1				
HH	5 (45,45)	17 (68,00)	1,00	p = 0,252
HL	5 (45,45)	7 (28,00)	2,43 (0,50 – 11,79)	
LL	1 (9,09)	1 (4,00)	3,40 (0,15 – 76,76)	
HL/LL	6	8	1,55 (0,56 – 11,52)	
				p = 0,425
				p = 0,204
Zmienna	TZN-w G-CR1 (n = 11) n (%) [1]	TZN-n+s G-CR1 (n = 55) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość P
HindIII CR1				
HH	5 (45,45)	35 (63,64)	1,00	p = 0,380
HL	5 (45,45)	19 (34,55)	1,84 (0,46 – 7,37)	
LL	1 (9,09)	1 (1,82)	7,00 (0,34 – 143,03)	
HL/LL	6	20	2,10 (0,55 – 7,96)	
				p = 0,215
				p = 0,265

IL – iloraz szans; PU – przedział ufności; TZN-w G-CR1 – grupa osób z TZN wykazująca wysoką ekspresję CR1 na granulocytach; TZN-s G-CR1 – grupa osób z TZN wykazująca średnią ekspresję CR1 na granulocytach; TZN-n B-CR1 – grupa osób z TZN wykazująca niską ekspresję CR1 na granulocytach; TZN-n+s B-CR1 – grupa osób z TZN wykazująca niską i średnią ekspresję CR1 na granulocytach

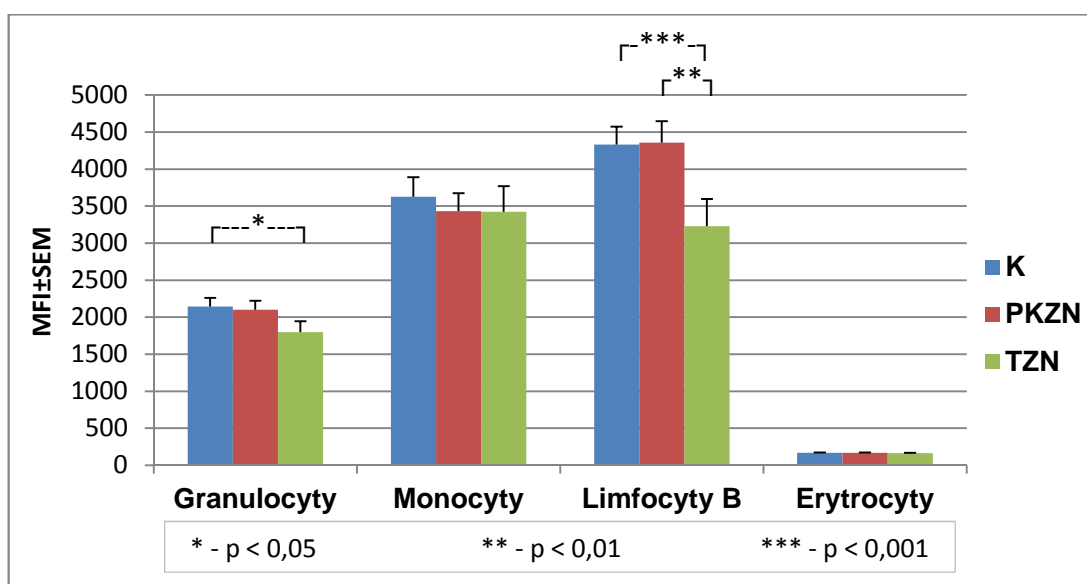
Tab. 14b. Model regresji logistycznej dotyczący wpływu polimorfizmu rs11118133 na ekspresję B-CR1 w TZN

Zmienna	TZN-w B-CR1 (n = 9) n (%) [1]	TZN-s B-CR1 (n = 21) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość P
HindIII CR1				
HH	3 (33,33)	13 (61,90)	1,00	p = 0,111 --- p = 0,148
HL	6 (66,67)	7 (33,33)	3,71 (0,65 – 21,18)	
LL	0 (0,00)	1 (4,76)	---	
HL/LL	6	8	3,25 (0,58 – 18,08)	
Zmienna	TZN-s B-CR1 (n = 21) n (%) [1]	TZN-n B-CR1 (n = 36) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość P
HindIII CR1				
HH	13 (61,90)	24 (66,67)	1,00	p = 0,786 p = 0,676 P = 0,717
HL	7 (33,33)	11 (30,56)	1,17 (0,36 – 3,86)	
LL	1 (4,76)	1 (2,78)	1,85 (0,10 – 35,24)	
HL/LL	8	12	1,23 (0,39 – 3,87)	
Zmienna	TZN-w B-CR1 (n = 9) n (%) [1]	TZN-n B-CR1 (n = 36) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość P
HindIII CR1				
HH	3 (33,33)	24 (66,67)	1,00	p = 0,055 --- p = 0,070
HL	6 (66,67)	11 (30,56)	4,36 (1,07 – 21,37)	
LL	0 (0,00)	1 (2,78)	---	
HL/LL	6	12	4,00 (0,81 – 19,70)	
Zmienna	TZN-w B-CR1 (n = 9) n (%) [1]	TZN-n+s B-CR1 (n = 57) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość P
HindIII CR1				
HH	3 (33,33)	37 (64,91)	1,00	p = 0,055 --- p = 0,075
HL	6 (66,67)	18 (31,58)	4,11 (0,89 – 18,90)	
LL	0 (0,00)	2 (3,51)	---	
HL/LL	6	20	3,70 (0,81 – 16,87)	

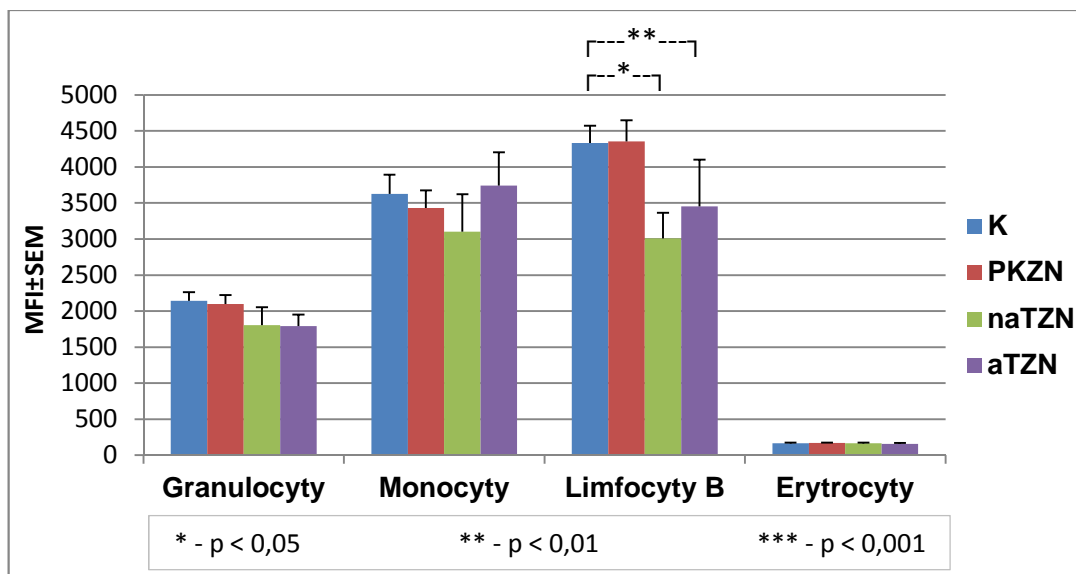
IL – iloraz szans; PU – przedział ufności; TZN-w B-CR1 – grupa osób z TZN wykazująca wysoką ekspresję CR1 na limfocytach B; TZN-s B-CR1 – grupa osób z TZN wykazująca średnią ekspresję CR1 na limfocytach B; TZN-n B-CR1 – grupa osób z TZN wykazująca niską ekspresję CR1 na limfocytach B; TZN-n+s B-CR1 – grupa osób z TZN wykazująca niską i średnią ekspresję CR1 na limfocytach B

4.6. Ocena średniej ekspresji CR1 na komórkach krwi w badanych grupach niezależnie od genotypu.

Porównanie średniej ekspresji CR1 na badanych komórkach krwi w analizowanych podgrupach niezależnie od genotypu wykazało niższą ekspresję G-CR1 i B-CR1 u chorych na TZN w stosunku do grupy kontrolnej ($p < 0,05$ i $p < 0,001$ odpowiednio dla G-CR1 i B-CR1). Ekspresja B-CR1 u chorych na TZN była również istotnie niższa w stosunku do wyników otrzymanych u chorych na PKZN. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w ekspresji M-CR1 i E-CR1 pomiędzy badanymi grupami (Ryc. 10a). Przy podziale chorych na TZN na grupę aktywną (aTZN) i nieaktywną (naTZN), obniżenie ekspresji B-CR1 pozostawało nadal wyraźne i statystycznie istotnie niższe pomiędzy grupą aTZN i K ($p < 0,01$) oraz grupą naTZN i K ($p < 0,05$). Nie stwierdzono różnic pomiędzy ekspresją B-CR1 w aTZN i naTZN. Przy uwzględnieniu ostatniego podziału, nie stwierdzono również różnic w ekspresji G-CR1 pomiędzy tymi podgrupami (Ryc. 10b).



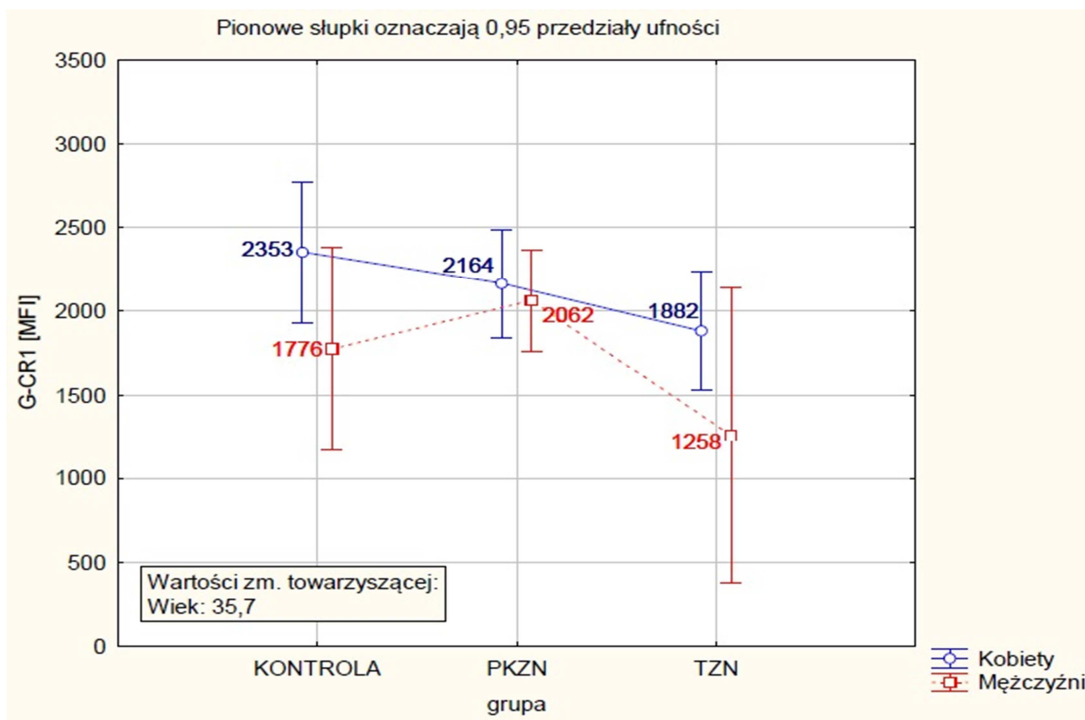
Ryc. 10a. Średnia ekspresja CR1 na komórkach krwi w grupie K i u chorych na PKZN i TZN



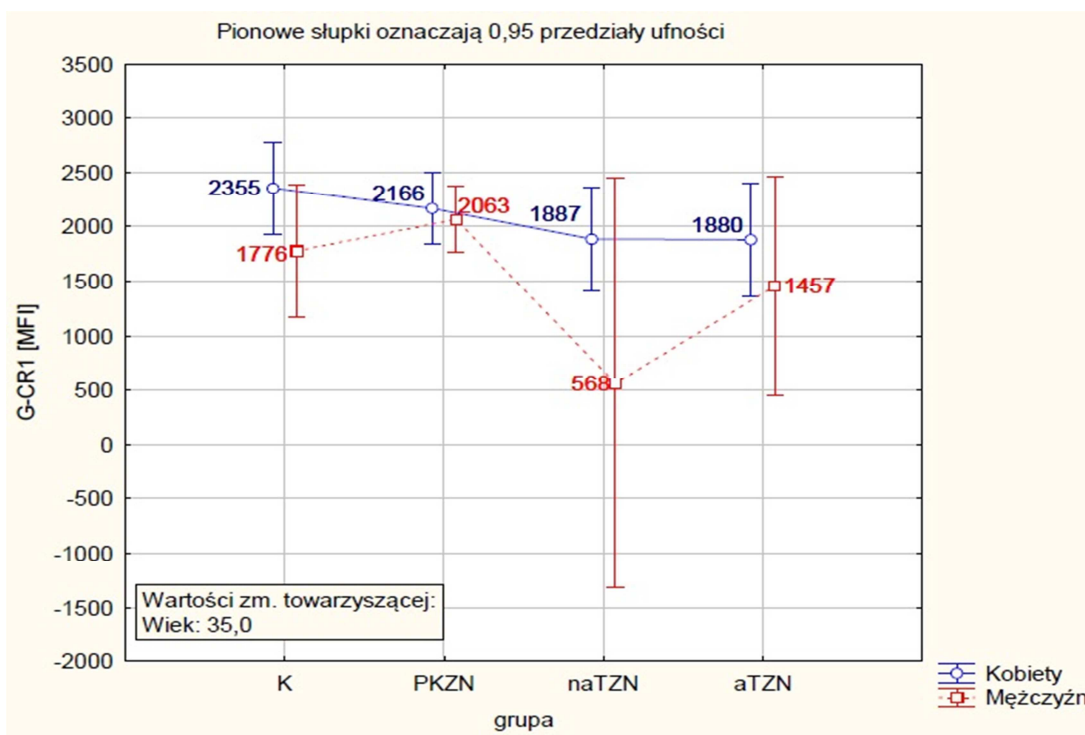
Ryc. 10b. Średnia ekspresja CR1 na komórkach krwi w grupie K i u chorych na PKZN, naTZN i aTZN

4.7. Porównanie ekspresji CR1 na komórkach krwi między grupami osób z różnym rozpoznaniem klinicznym z uwzględnieniem płci i wieku

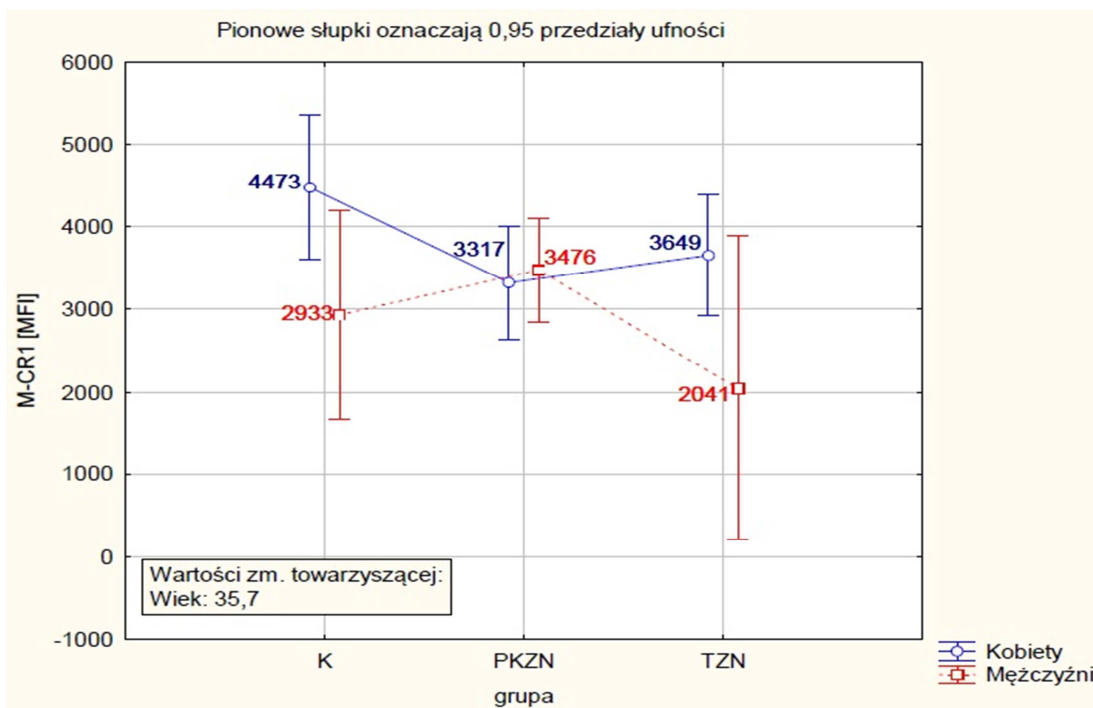
Porównanie ekspresji CR1 na komórkach krwi kobiet i mężczyzn, bez uwzględniania posiadanego genotypu *HindIII*, nie wykazało istotnych statystycznie różnic w G-CR1, M-CR1, B-CR1 i E-CR1 pomiędzy osobami różnej płci w trzech analizowanych podgrupach (K, PKZN i TZN) (Ryc. 11a+b, 12a+b, 13a+b, 14a+b). Zaobserwowano natomiast różnicę (na granicy istotności statystycznej) między ekspresją M-CR1 wśród zdrowych kobiet i zdrowych mężczyzn ($p=0,051$) (Ryc. 12a i 12b). Dla obu płci, istotne statystycznie różnice stwierdzono przy analizie ekspresji B-CR1 pomiędzy grupą K a TZN ($p<0,05$) i PKZN a TZN ($p<0,01$) (Ryc. 13a). Porównanie ekspresji B-CR1 między grupą K, PKZN, aTZN i naTZN wykazało, że różnice w ekspresji B-CR1 między grupą K i naTZN oraz między PKZN i naTZN dotyczyły tylko kobiet. Wykazano również różnice w ekspresji M-CR1 między kobietami z grupy K i PKZN ($p=0,040$). Nie stwierdzono natomiast różnic w ekspresji B-CR1 między grupą aTZN i naTZN (Ryc. 13b).



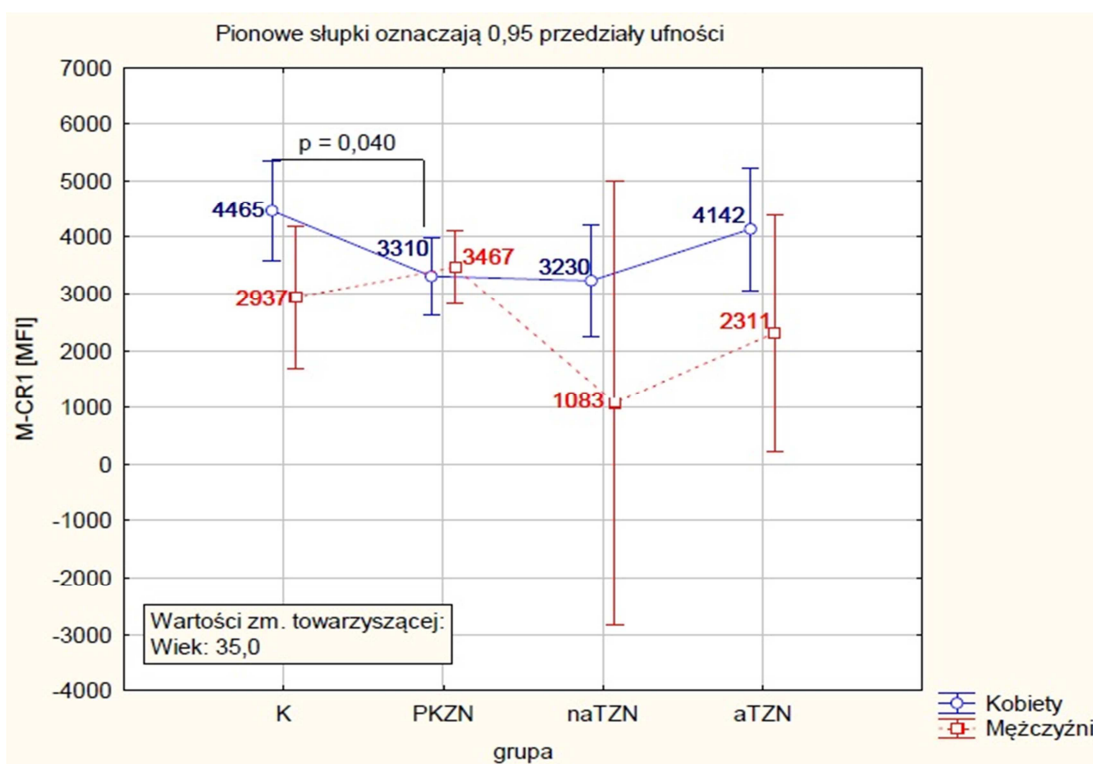
Ryc. 11a. Porównanie ekspresji G-CR1 w grupie chorych na PKZN i TZN oraz w grupie K z uwzględnieniem płci i wieku badanych



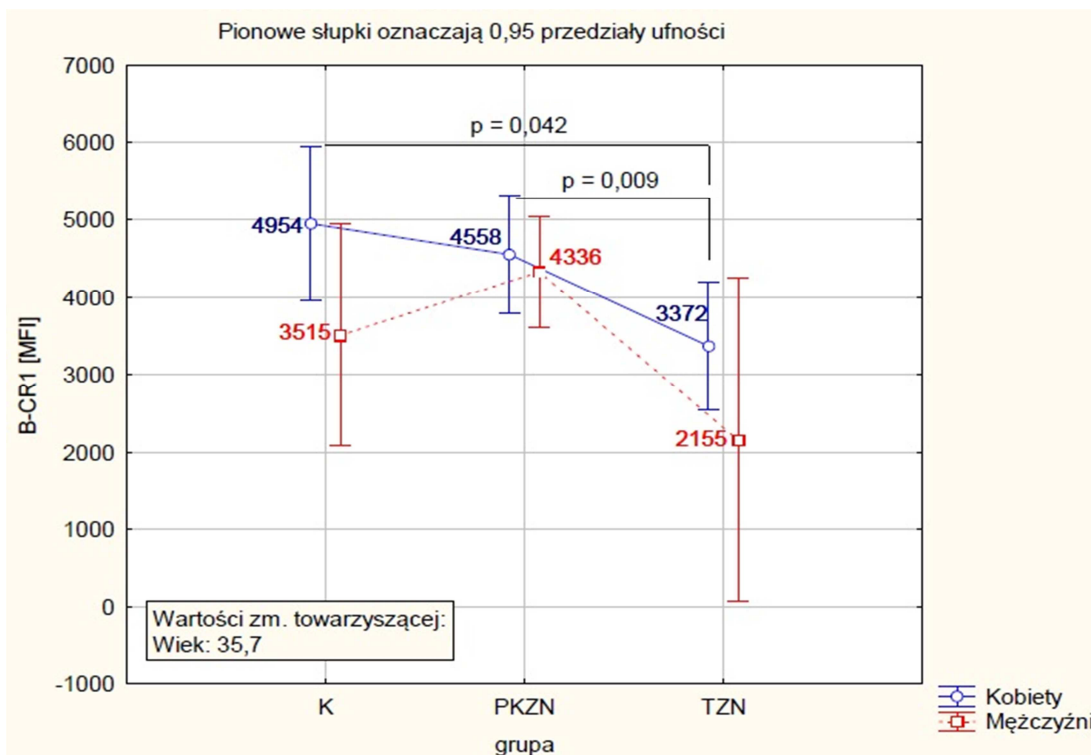
Ryc. 11b. Porównanie ekspresji G-CR1 u chorych na PKZN, aTZN i naTZN oraz w grupie K z uwzględnieniem płci i wieku badanych



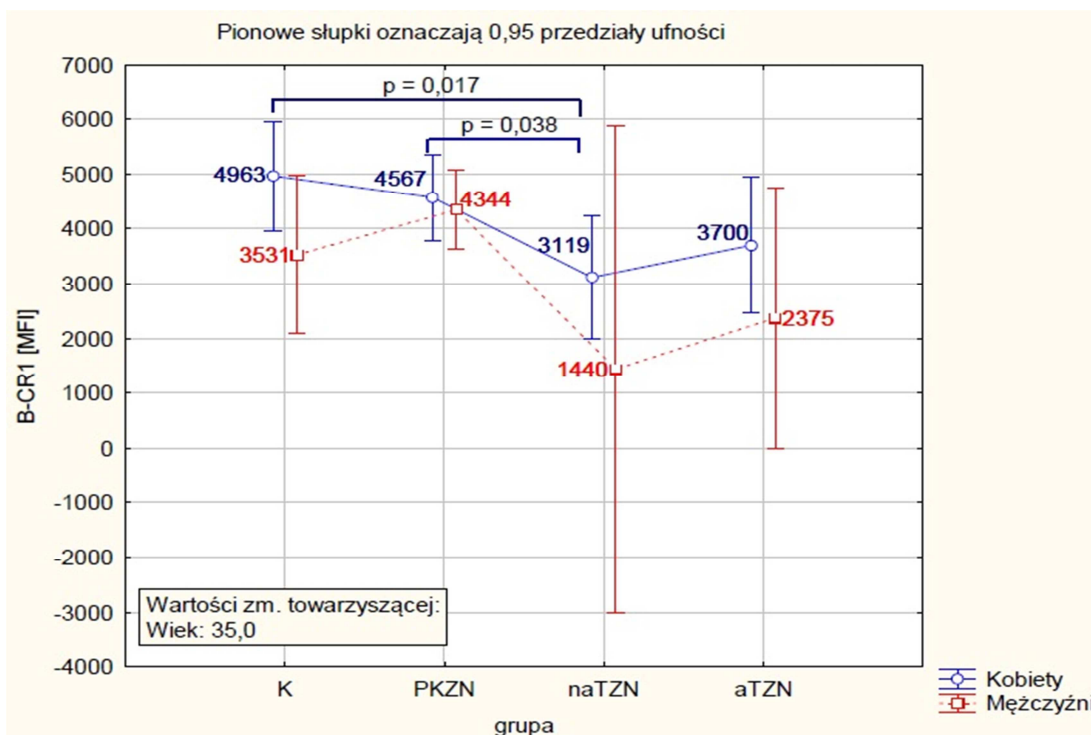
Ryc. 12a. Porównanie ekspresji M-CR1 u chorych na PKZN i TZN oraz w grupie K z uwzględnieniem płci i wieku badanych



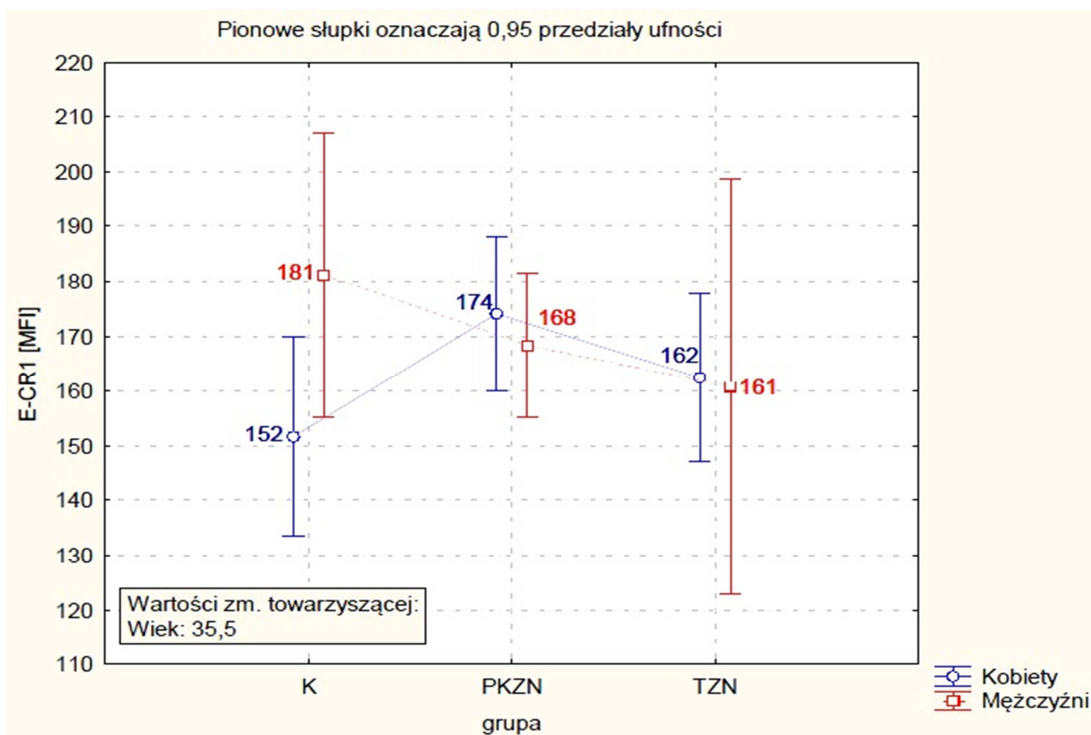
Ryc. 12b. Porównanie ekspresji M-CR1 u chorych na PKZN, aTZN i naTZN oraz w grupie K z uwzględnieniem płci i wieku badanych



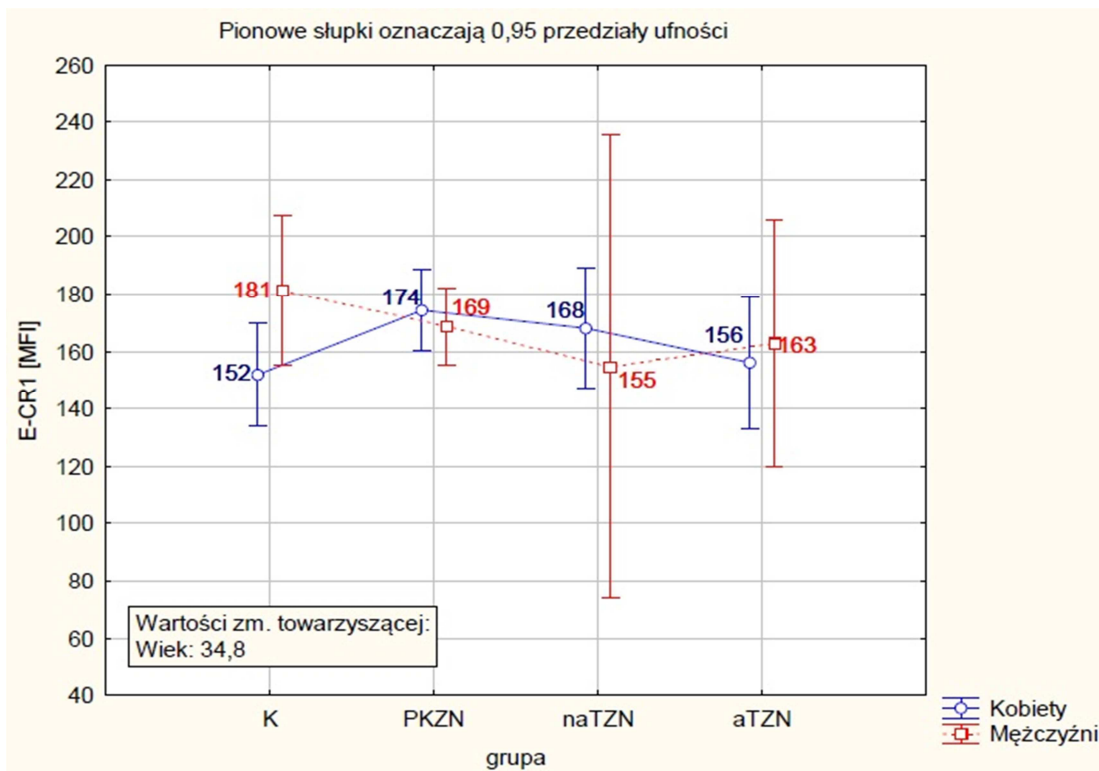
Ryc. 13a. Porównanie ekspresji B-CR1 u chorych na PKZN i TZN oraz w grupie K z uwzględnieniem płci i wieku badanych



Ryc. 13b. Porównanie ekspresji B-CR1 u chorych na PKZN, aTZN i naTZN oraz w grupie K z uwzględnieniem płci i wieku badanych



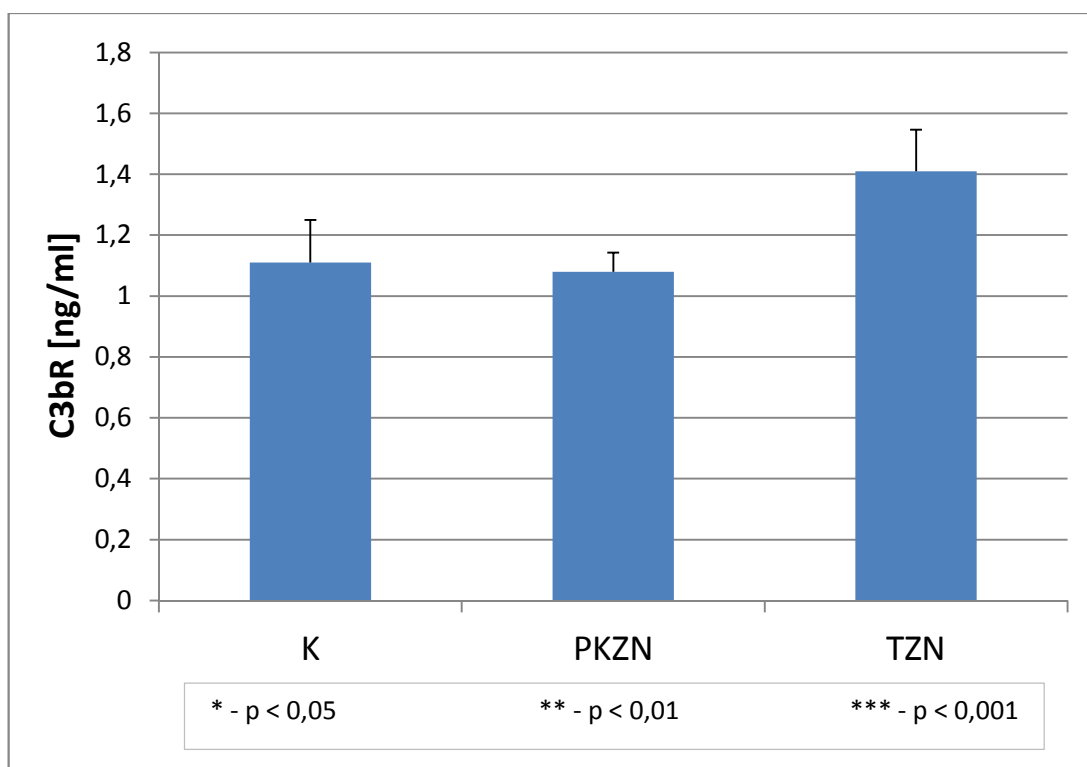
Ryc. 14a. Porównanie ekspresji E-CR1 u chorych na PKZN i TZN oraz w grupie K z uwzględnieniem płci i wieku badanych



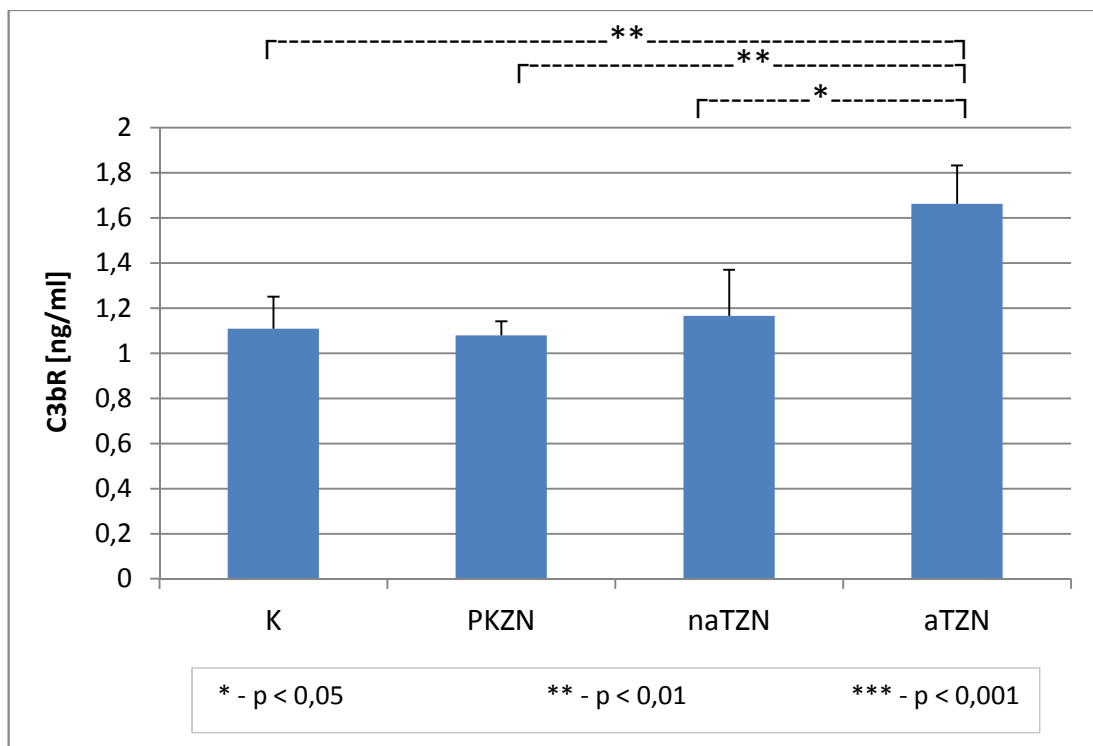
Ryc. 14b. Porównanie ekspresji E-CR1 u chorych na PKZN, aTZN i naTZN oraz w grupie K z uwzględnieniem płci i wieku badanych

4.8. Porównanie stężeń sCR1 w surowicy zdrowych i chorych na PKZN i TZN

Porównanie stężeń sCR1 w surowicy osób badanych wykazało wyższe stężenia tego receptora w grupie chorych na TZN (Ryc. 15a). Osiągnęły one jednak statystyczną istotność przy podziale grupy chorych na TZN na grupę aktywną i nieaktywną. Zaobserwowano wówczas znamiennie wyższe stężenia sCR1 w grupie aTZN w porównaniu do grupy K ($p < 0,01$), PKZN ($p < 0,01$) i naTZN ($p < 0,05$) (Ryc.15b).



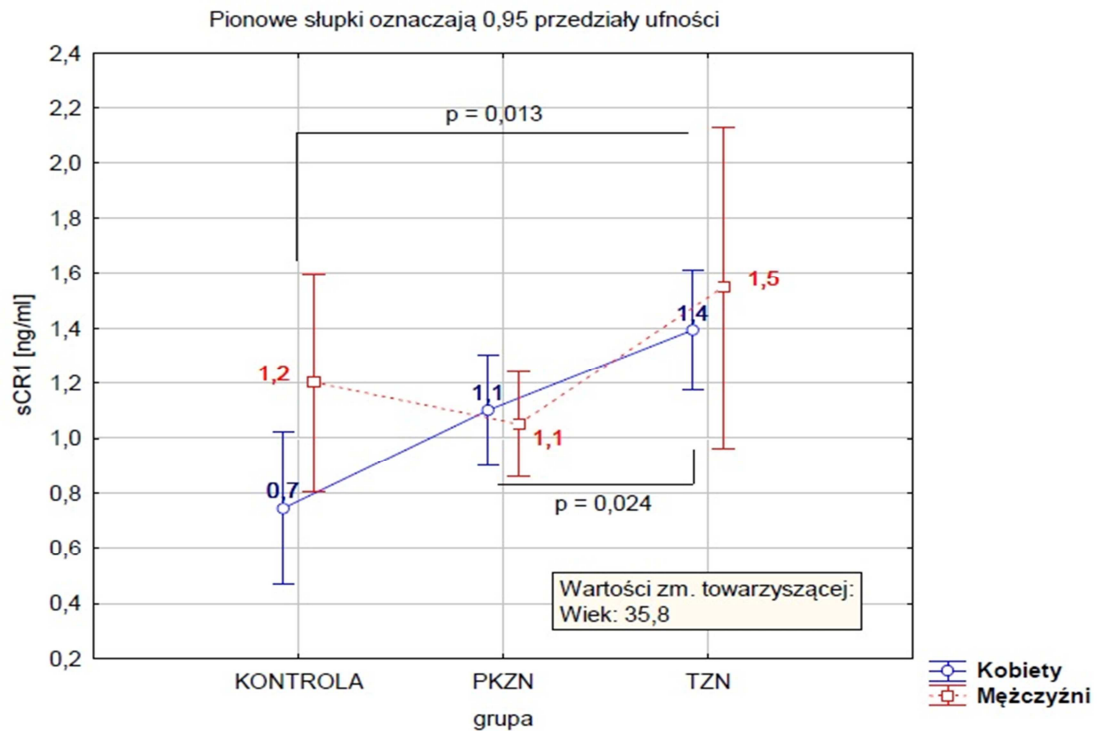
Ryc. 15a. Porównanie stężeń sCR1 w surowicy w grupie K i u chorych na PKZN i TZN



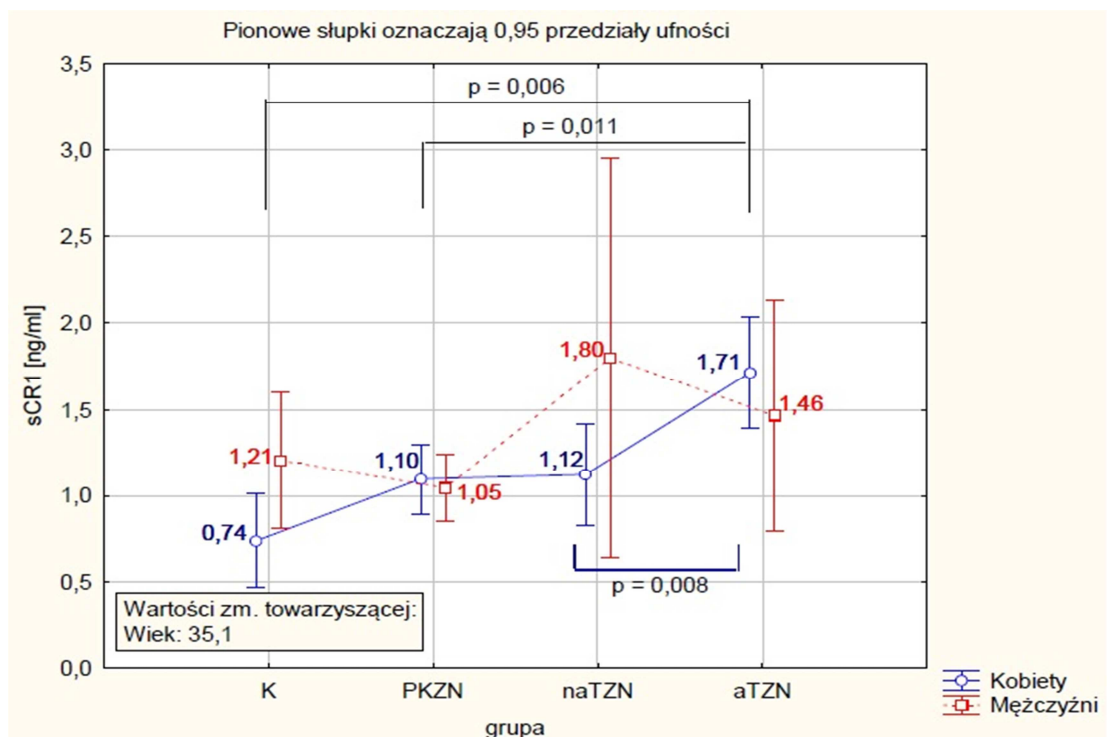
Ryc. 15b. Porównanie stężeń rozpuszczalnego receptora sCR1 w surowicy w grupie K i u chorych na PKZN, aTZN i naTZN

4.9. Porównanie stężeń sCR1 w badanych grupach osób z uwzględnieniem płci i wieku

Porównanie stężeń sCR1 między grupą K, PKZN i TZN z uwzględnieniem czynnika płci i wieku nie wykazało istotnych statystycznie różnic pomiędzy kobietami i mężczyznami (Ryc.16a), chociaż różnica między stężeniem sCR1 u zdrowych kobiet i zdrowych mężczyzn była na granicy istotności statystycznej ($p=0,066$). Wykazano istotnie wyższe stężenie sCR1 u chorych na TZN w porównaniu do grupy K ($p=0,013$) i chorych na PKZN ($p=0,024$) (Ryc.16a). Przy uwzględnieniu podziału TZN na grupę aktywną i nieaktywną, różnice między grupą aTZN i K ($p=0,006$) oraz aTZN i PKZN ($p=0,011$) stały się bardziej wyraźne i istotniejsze statystycznie oraz były niezależne od czynnika płci (Ryc. 16b). Różnice pomiędzy sCR1 w aTZN i naTZN zaobserwowano tylko w grupie kobiet z wynikiem istotnie statystycznie wyższym dla kobiet chorych na aTZN ($p<0,008$) (Ryc. 16b).



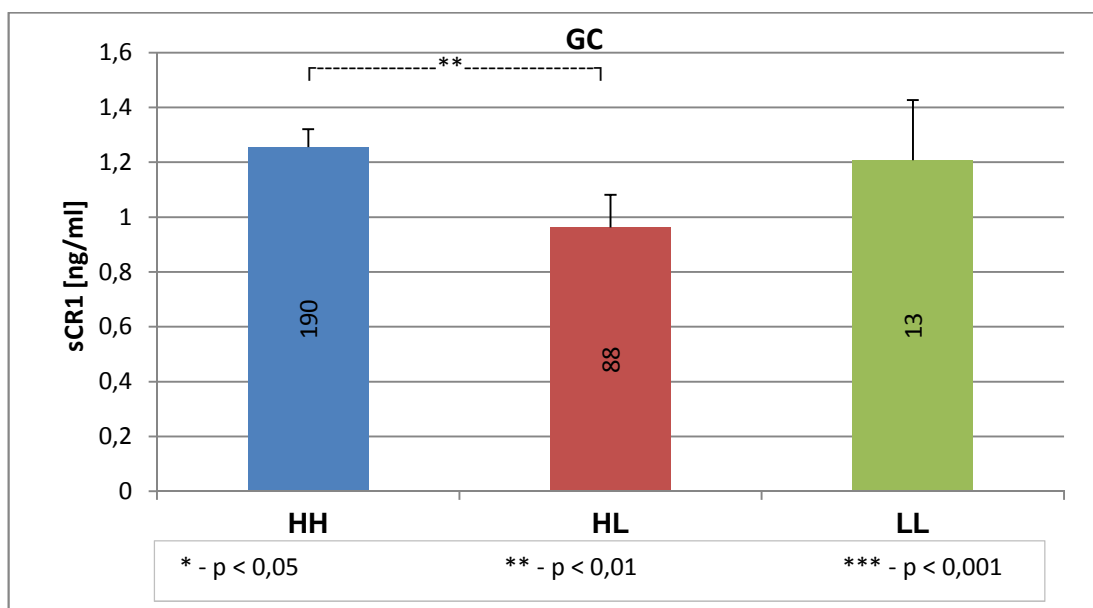
Ryc. 16a. Porównanie stężeń sCR1 w surowicy w grupie K i u chorych na PKZN i TZN z uwzględnieniem płci i wieku



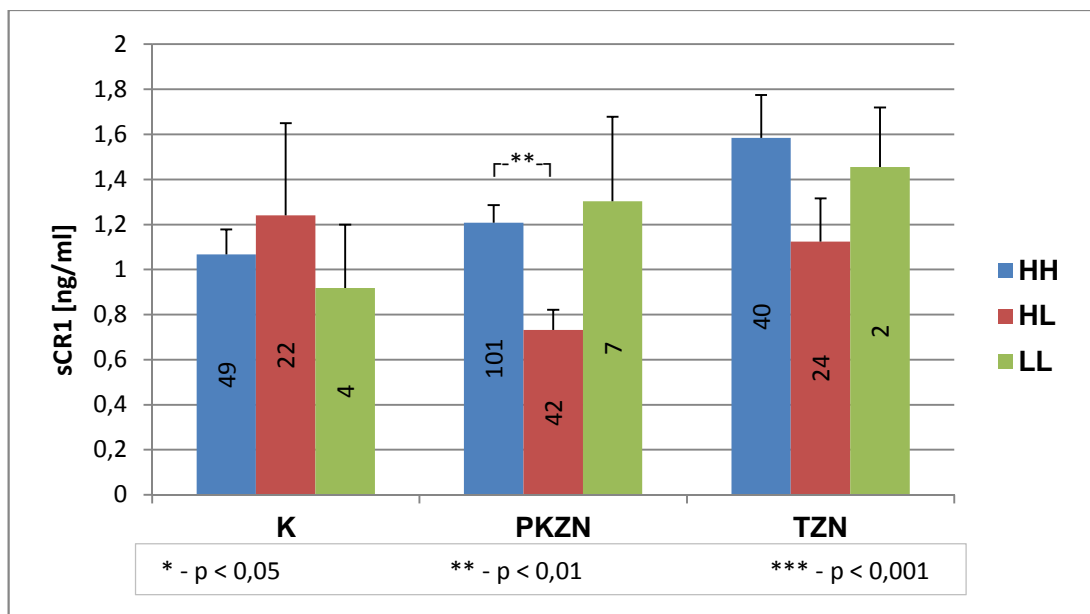
Ryc. 16b. Porównanie stężeń sCR1 w surowicy w grupie K i u chorych na PKZN i TZN z uwzględnieniem płci i wieku

4.10. Porównanie stężeń sCR1 w surowicy badanych zdrowych i chorych między grupami z różnym genotypami *HindIII* CR1

Ocena stężeń sCR1 u osób z różnymi genotypami polimorfizmu rs11118133 w całej badanej grupie wykazała najniższe stężenie sCR1 u osób z genotypem HL i statystycznie istotną różnicę względem grupy HH ($p < 0,01$). Stężenie sCR1 w grupie LL wykazywało pośrednie wartości, bez statystycznie istotnych różnic w porównaniu do grupy HH i HL (Ryc.17a). W przypadku podziału grupy badanej na K, PKZN i TZN, znamienne statystycznie obniżenie stężenia sCR1 w grupie HL obserwowane było tylko w PKZN ($p < 0,01$). Nie stwierdzono różnic w stężeniu sCR1 u osób z różnymi genotypami w grupie K i u chorych na TZN. W grupie K zaobserwowano tendencję do wyższych stężeń sCR1 u osób z genotypem HL w porównaniu do tych z genotypami HH i LL, jednak bez istotności statystycznej (Ryc. 17b).



Ryc. 17a. Porównanie stężeń sCR1 w surowicy w grupie GC u osób z różnymi genotypami (HH, HL, LL)



Ryc. 17b. Porównanie stężeń sCR1 w surowicy w grupie K i u chorych na PKZN i TZN między osobami z różnymi genotypami (HH, HL, LL)

4.11. Ocena wpływu genotypów polimorfizmu rs11118133 na stężenie sCR1 w surowicy osób badanych

W celu potwierdzenia możliwości wpływu rodzaju posiadanego genotypu HH, HL lub LL na stężenie sCR1 w surowicy zbudowano model regresji logistycznej oparty na podziale grupy badanej na podgrupy z wysokim (w), średnim (s) i niskim (n) stężeniem sCR1 wyznaczonym przez 25 i 75 percentyl w grupie K. Granice dla podziału na grupy w, s, n przedstawione zostały w Tab. 15.

Tab. 15. Granice podziału na niskie (n), średnie (s) i wysokie (w) stężenia sCR1 w grupie K

	Minimum	Maksimum	Niskie stężenie (n) ≤ 25 percentyla	Średnie stężenie (s) > 25 i < 75 percentyla	Wysokie stężenie (w) ≥ 75 percentyla
sCR1 [ng/ml]	0,10	8,65	≤ 0,33	> 0,33 i < 1,40	≥ 1,40

Wykorzystany model regresji logistycznej w GC wykazał istotnie statystycznie niższe stężenie sCR1 u osób z HL i HL/LL względem HH (Tab. 16a). Podobne różnice uzyskano w grupie PKZN (Tab. 16c). Nie wykazano istotnych zależności pomiędzy genotypem a stężeniem sCR1 w grupie TZN (Tab. 16d). W grupie K zaobserwowano tendencję do wysokich wartości stężenia sCR1 u osób z genotypem HL (Tab. 16b).

Tab. 16a. Model regresji logistycznej dotyczący wpływu genotypów polimorfizmu rs11118133 na stężenie sCR1 w surowicy w GC

Zmienna	GC-w sCR1 (n = 90) n (%) [1]	GC-s sCR1 (n = 122) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość p
<i>HindIII</i> CR1				
HH	68 (75,36)	74 (60,60)	1,00	
HL	17 (18,89)	42 (34,43)	0,44 (0,22 – 0,84)	p = 0,011
LL	5 (5,56)	6 (4,92)	0,91 (0,26 – 3,14)	p = 0,876
HL/LL	22	48	0,50 (0,27 – 0,91)	p = 0,026

Zmienna	GC-w sCR1 (n = 90) n (%) [1]	GC-n sCR1 (n = 67) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość p
<i>HindIII</i> CR1				
HH	68 (75,36)	39 (58,21)	1,00	
HL	17 (18,89)	26 (38,81)	0,37 (0,18 – 0,78)	p = 0,007
LL	5 (5,56)	2 (2,99)	1,43 (0,26 – 7,89)	p = 0,669
HL/LL	22	28	0,45 (0,23 – 0,90)	p = 0,021

Zmienna	GC-s sCR1 (n = 122) n (%) [1]	GC-n sCR1 (n = 67) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość p
<i>HindIII</i> CR1				
HH	74 (60,60)	39 (58,21)	1,00	
HL	42 (34,43)	26 (38,81)	0,85 (0,45 – 1,60)	p = 0,614
LL	6 (4,92)	2 (2,99)	1,58 (0,30 – 8,34)	p = 0,574
HL/LL	48	28	0,90 (0,49 – 1,66)	p = 0,743

Zmienna	GC-w+s sCR1 (n = 212) n (%) [0]	GC-n sCR1 (n = 67) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość p
<i>HindIII</i> CR1				
HH	142 (66,98)	39 (58,21)	1,00	
HL	59 (27,83)	26 (38,81)	0,62 (0,35 – 1,12)	p = 0,114
LL	11 (5,19)	2 (2,99)	1,51 (0,32 – 7,17)	p = 0,586
HL/LL	70	28	0,69 (0,39 – 1,21)	p = 0,193

IL – iloraz szans; PU – przedział ufności; GC-w sCR1 – grupa osób wykazująca wysokie stężenie sCR1 w GC ; GC-s sCR1 – grupa osób wykazująca średnie stężenie sCR1 w GC; GC-n sCR1 – grupa osób wykazująca niskie stężenie sCR1 w GC; GC-w+s sCR1 – grupa osób wykazująca wysokie i średnie stężenie sCR1 w GC

Tab. 16b. Model regresji logistycznej dotyczący wpływu genotypów polimorfizmu rs11118133 na stężenie sCR1 w surowicy w grupie K

Zmienna	K-w sCR1 (n = 17) n (%) [1]	K-s sCR1 (n = 32) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość p
<i>HindIII</i> CR1				
HH	11 (64,71)	19 (59,38)	1,00	p = 0,031
HL	5 (29,41)	10 (31,25)	8,64 (0,81 – 91,07)	
LL	1 (5,88)	3 (9,38)	0,58 (0,05 – 6,84)	
HL/LL	6	13	0,80 (0,23 – 2,79)	

Zmienna	K-s sCR1 (n = 32) n (%) [1]	K-n sCR1 (n = 18) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość p
<i>HindIII</i> CR1				
HH	19 (59,38)	13 (72,22)	1,00	p = 0,630
HL	10 (31,25)	5 (27,78)	1,37 (0,36 – 5,12)	
LL	3 (9,38)	0 (0,00)	---	
HL/LL	13	5	1,78 (0,49 – 6,41)	

Zmienna	K-w sCR1 (n = 17) n (%) [1]	K-n sCR1 (n = 18) n (%) [0]	IL (95%PU)	Wartość p
<i>HindIII</i> CR1				
HH	11 (64,71)	13 (72,22)	1,00	p = 0,086
HL	5 (29,41)	5 (27,78)	5,91 (0,38 – 4,44)	
LL	1 (5,88)	0 (0,00)	---	
HL/LL	6	5	1,42 (0,32 – 6,28)	

Zmienna	K-w+s sCR1 (n = 43) n (%) [1]	K-n sCR1 (n = 18) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość p
<i>HindIII</i> CR1				
HH	30 (69,77)	13 (72,22)	1,00	p = 0,666
HL	15 (34,88)	5 (27,78)	1,30 (0,54 – 4,44)	
LL	4 (9,30)	0 (0,00)	---	
HL/LL	19	5	1,65 (0,49 – 5,48)	

IL – iloraz szans; PU – przedział ufności; K-w sCR1 – grupa osób zdrowych wykazująca wysokie stężenie sCR1; K-s sCR1 – grupa osób zdrowych wykazująca średnie stężenie sCR1; K-n sCR1 – grupa osób zdrowych wykazująca niskie stężenie sCR1; K-w+s sCR1 – grupa osób zdrowych wykazująca wysokie i średnie stężenie sCR1

Tab. 16c. Model regresji logistycznej dotyczący wpływu genotypów polimorfizmu rs11118133 na stężenie sCR1 w surowicy w PKZN

Zmienna	PKZN-w sCR1 (n = 43) n (%) [1]	PKZN-s sCR1 (n = 68) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość p
<i>HindIII</i> CR1				
HH	36 (83,72)	44 (64,71)	1,00	
HL	4 (9,30)	22 (32,35)	0,29 (0,09 – 0,94)	p = 0,024
LL	3 (6,98)	2 (2,94)	1,22 (0,23 – 6,58)	p = 0,813
HL/LL	7	24	0,36 (0,13 – 0,93)	p = 0,026

Zmienna	PKZN-s sCR1 (n = 68) n (%) [1]	PKZN-n sCR1 (n = 36) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość p
<i>HindIII</i> CR1				
HH	44 (64,71)	19 (52,78)	1,00	
HL	22 (32,35)	15 (41,67)	0,63 (0,27 – 1,49)	p = 0,292
LL	2 (2,94)	2 (5,56)	0,43 (0,05 – 3,43)	p = 0,423
HL/LL	24	17	0,61 (0,26 – 1,40)	p = 0,238

Zmienna	PKZN-w sCR1 (n = 43) n (%) [1]	PKZN-n sCR1 (n = 36) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość p
<i>HindIII</i> CR1				
HH	36 (83,72)	19 (52,78)	1,00	
HL	4 (9,30)	15 (41,67)	0,14 (0,04 – 0,49)	p = 0,001
LL	3 (6,98)	2 (5,56)	0,79 (0,12 – 5,36)	p = 0,808
HL/LL	7	17	0,22 (0,07 – 0,63)	p = 0,005

Zmienna	PKZN-w+s sCR1 (n = 111) n (%) [1]	PKZN-n sCR1 (n = 36) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość p
<i>HindIII</i> CR1				
HH	80 (72,07)	19 (52,78)	1,00	
HL	26 (23,42)	15 (41,67)	0,41 (0,18 – 0,93)	p = 0,033
LL	5 (4,50)	2 (5,56)	0,59 (0,10 – 3,36)	p = 0,565
HL/LL	31	17	0,43 (0,20 – 0,95)	p = 0,035

IL – iloraz szans; PU – przedział ufności; PKZN-w sCR1 – grupa osób z PKZN wykazująca wysokie stężenie sCR1; PKZN-s sCR1 – grupa osób z PKZN wykazująca średnie stężenie sCR1; PKZN-n sCR1 – grupa osób z PKZN wykazująca niskie stężenie sCR1; PKZN-w+s sCR1 – grupa osób z PKZN wykazująca wysokie i średnie stężenie sCR1

Tab. 16d. Model regresji logistycznej dotyczący wpływu genotypów polimorfizmu rs11118133 na stężenie sCR1 w surowicy w TZN

Zmienna	TZN-w sCR1 (n = 30) n (%) [1]	TZN-s sCR1 (n = 22) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość p
HindIII CR1				
HH	21 (70,00)	11 (50,00)	1,00	p = 0,146 p = 0,661 p = 0,143
HL	8 (26,67)	10 (45,45)	0,42 (0,12 – 1,41)	
LL	1 (3,33)	1 (4,55)	0,52 (0,03 – 10,30)	
HL/LL	9	11	0,43 (0,13 – 1,38)	

Zmienna	TZN-s sCR1 (n = 22) n (%) [1]	TZN-n sCR1 (n = 13) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość p
HindIII CR1				
HH	11 (50,00)	7 (53,85)	1,00	p = 0,934 --- p = 0,826
HL	10 (45,45)	6 (46,15)	1,06 (0,25 – 4,48)	
LL	1 (4,55)	0 (0,00)	---	
HL/LL	11	6	1,17 (0,28 – 4,86)	

Zmienna	TZN-w sCR1 (n = 30) n (%) [1]	TZN-n sCR1 (n = 13) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość p
HindIII CR1				
HH	21 (70,00)	7 (53,85)	1,00	p = 0,243 --- p = 0,312
HL	8 (26,67)	6 (46,15)	0,44 (0,44 – 1,81)	
LL	1 (3,33)	0 (0,00)	---	
HL/LL	9	6	0,50 (0,12 – 1,99)	

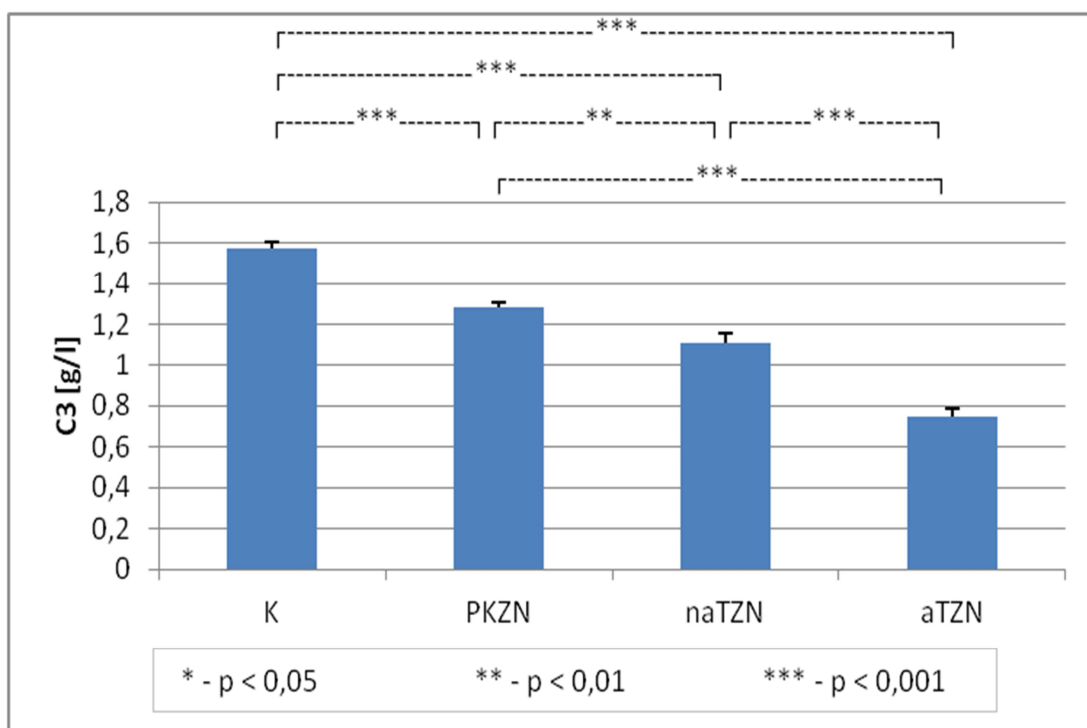
Zmienna	TZN-w+s sCR1 (n = 52) n (%) [1]	TZN-n sCR1 (n = 13) n (%) [0]	IL (95% PU)	Wartość p
HindIII CR1				
HH	32 (61,54)	7 (53,85)	1,00	p = 0,505 --- p = 0,614
HL	18 (34,62)	6 (46,15)	0,66 (0,19 – 2,31)	
LL	2 (3,85)	0 (0,00)	---	
HL/LL	20	6	0,73 (0,21 – 2,54)	

IL – iloraz szans; PU – przedział ufności, TZN-w sCR1 – grupa osób z TZN wykazująca wysokie stężenie sCR1; TZN-s sCR1 – grupa osób z TZN wykazująca średnie stężenie sCR1; TZN-n sCR1 – grupa osób z TZN wykazująca niskie stężenie sCR1; TZN-w+s sCR1 – grupa osób z TZN wykazująca wysokie i średnie stężenie sCR1

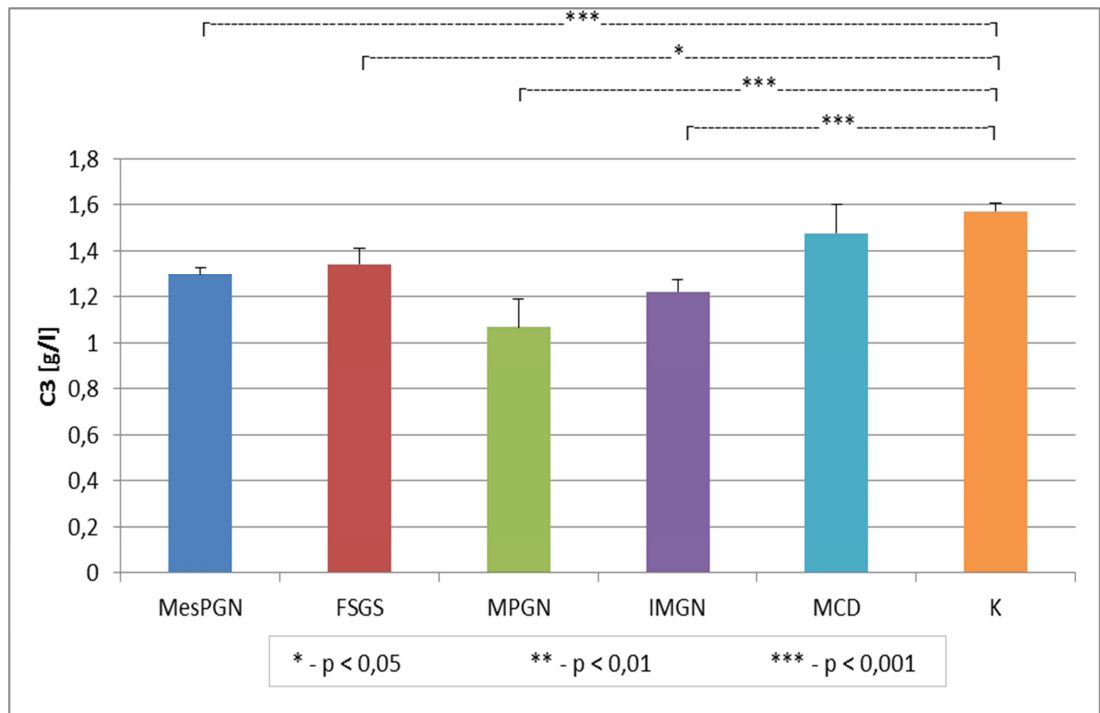
4.12. Ocena stężeń składników dopełniacza C3 i C4 w surowicy badanych

4.12.1. Ocena stężeń składników dopełniacza C3 w surowicy badanych w grupie K, PKZN i TZN

Uzyskane wyniki badań potwierdziły spodziewane różnice w stężeniu C3 w surowicy pomiędzy grupą K a PKZN ($p < 0,001$), K a naTZN ($p < 0,001$), K a aTZN ($p < 0,001$), aTZN a PKZN ($p < 0,001$), aTZN a naTZN ($p < 0,001$) oraz PKZ a naTZN ($p < 0,01$). Najwyższe stężenie C3 obserwowano w grupie K (Ryc. 18a). Wykazano również statystycznie istotne różnice pomiędzy stężeniem C3 w surowicy w grupie K a różnymi postaciami morfologicznymi PKZN: mezangialnym KZN ($p < 0,001$), ogniskowym segmentalnym stwardnieniem kłębuszków nerkowych ($p < 0,05$), błoniasto-rozplemowym KZN ($p < 0,001$) i błoniastym ($p < 0,001$). Nie zaobserwowano natomiast istotnej różnicy pomiędzy stężeniem C3 u osób chorych na submikroskopowe KZN i osób zdrowych (Ryc. 18b). Tylko pacjenci z grupy aTZN wykazywali stężenie C3 w surowicy poniżej 0,9 g/l, czyli poniżej wartości przyjętej za dolną granicę normy dla stężenia C3 w surowicy.



Ryc. 18a. Porównanie stężeń składnika dopełniacza C3 w surowicy zdrowych i chorych na PKZN, naTZN i aTZN

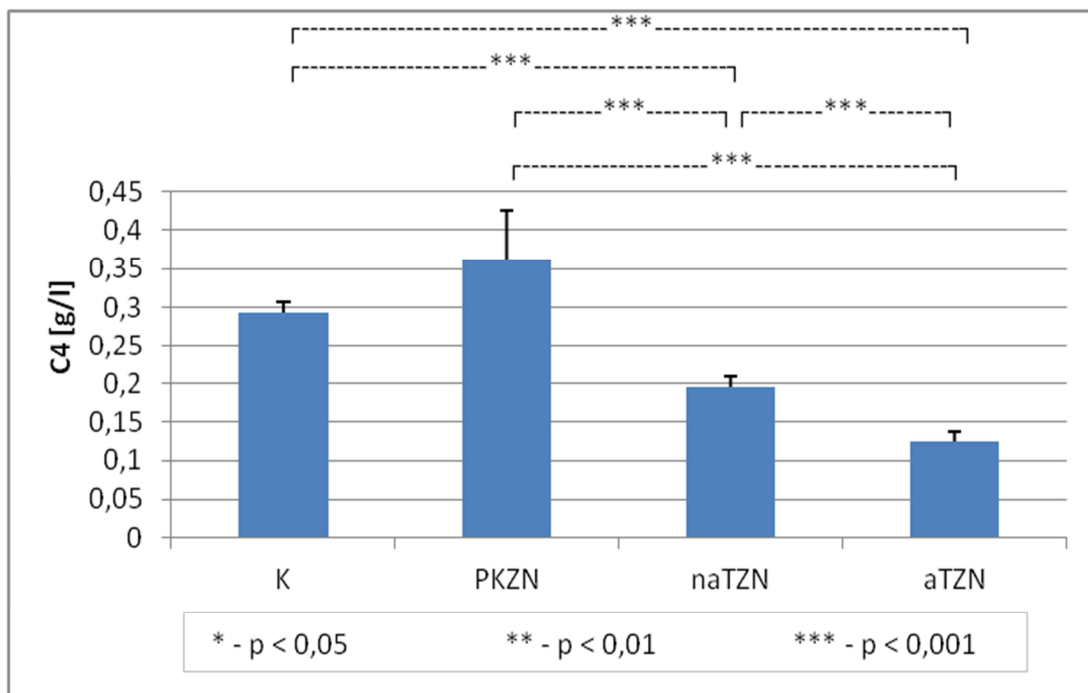


Ryc. 18b. Porównanie stężeń składnika dopełniacza C3 w surowicy zdrowych i chorych na różne postacie morfologiczne PKZN

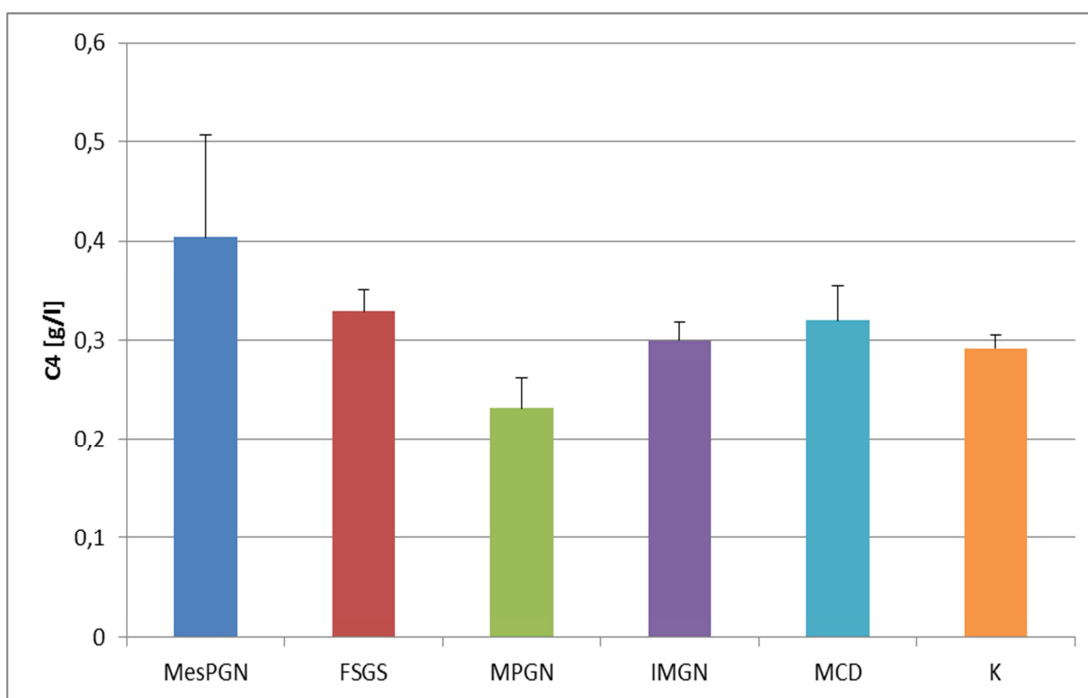
MesPGN – mezangialne KZN; FSGS – ogniskowe segmentalne stwardnienie kłębuszków nerkowych; MPGN – błoniasto-rozplamowe KZN; IMGN – błoniaste KZN; MCD – submikroskopowe KZN

4.12.2. Ocena stężeń składników dopełniacza C4 w surowicy badanych w grupie K, PKZN i TZN

Analiza stężeń C4 w surowicy osób badanych wykazała istotne statystycznie różnice pomiędzy grupą K a naTZN ($p < 0,001$), K a aTZN ($p < 0,001$), aTZN a PKZN ($p < 0,001$), aTZN a naTZN ($p < 0,001$) oraz PKZ a naTZN ($p < 0,01$). Najwyższe stężenie C4 obserwowano w grupie PKZN. Nie wykazano statystycznie istotnych różnic pomiędzy stężeniem C4 w surowicy osób zdrowych i pacjentów z różnymi postaciami morfologicznymi PKZN (Ryc. 19.b). We wszystkich badanych grupach stężenie C4 w surowicy było powyżej 0,1 g/l, czyli wartości przyjętej za dolną granicę normy dla stężenia C4 w surowicy.



Ryc. 19a. Porównanie stężeń składnika dopełniacza C4 w surowicy zdrowych i chorych na PKZN, naTZN i aTZN

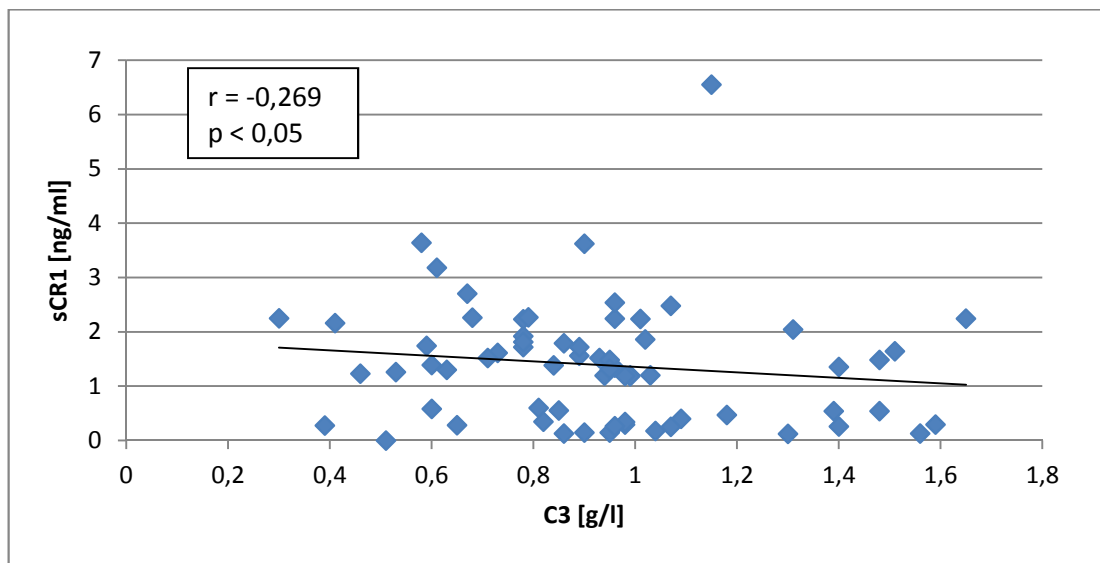


Ryc. 19b. Porównanie stężeń składnika dopełniacza C4 w surowicy zdrowych i chorych na różne postacie morfologiczne PKZN

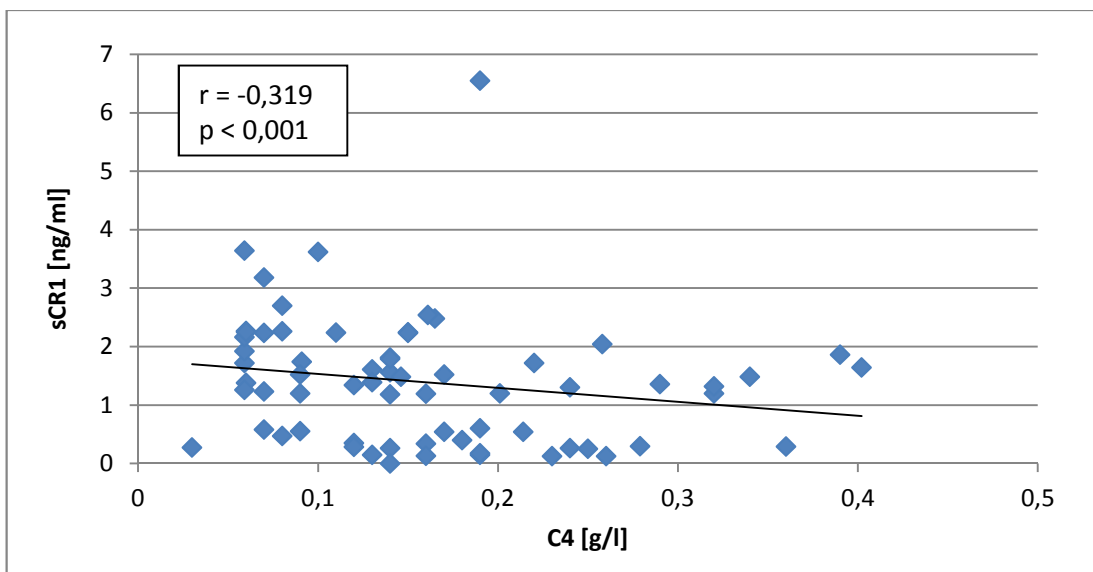
MesPGN- mezangialne KZN; FSGS- ogniskowe segmentalne stwardnienie kłębuszków nerkowych; MPGN- błoniasto-rozplamowe KZN; IMGN- błoniaste KZN; MCD- submikroskopowe KZN

4.13. Badanie korelacji pomiędzy wybranymi parametrami w grupie K i u chorych na TZN oraz PKZN

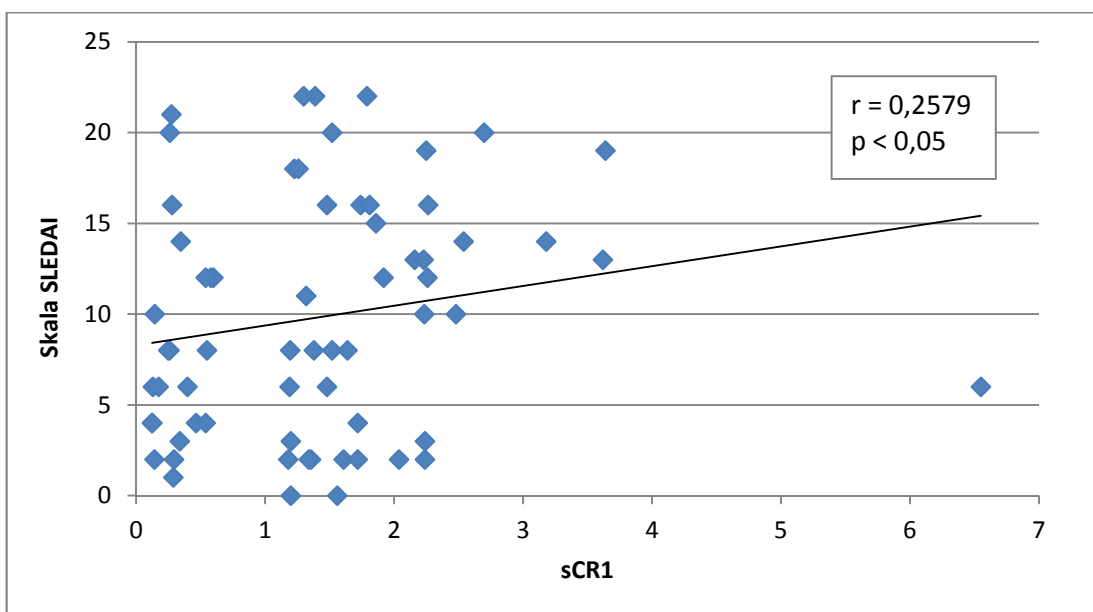
Nie stwierdzono statystycznie istotnych korelacji pomiędzy stężeniem sCR1 w surowicy badanych a ekspresją G-CR1, M-CR1, B-CR1 i E-CR1 w grupie K, PKZN i TZN. Nie wykazano również znamiennej korelacji pomiędzy stężeniem sCR1 a C3 i C4 w surowicy w grupie K i u chorych na PKZN. Stwierdzono natomiast istotną ujemną korelację pomiędzy stężeniem sCR1 a stężeniem C3 ($r = -0,269$; $p < 0,05$) i C4 ($r = -0,319$; $p < 0,001$) w surowicy chorych na TZN (Ryc. 20a + b). W grupie tej, stężenie sCR1 korelowało też istotnie z punktacją w skali SLEDAI-2K ($r = 0,2579$; $p < 0,05$) (Ryc. 21). Nie uzyskano natomiast korelacji pomiędzy stężeniem sCR1 a stężeniem p-dsDNA w grupie TZN oraz między sCR1 a stężeniem kreatyniny w surowicy w grupie TZN i PKZN. Nie wykazano również istotnej korelacji pomiędzy stężeniem C3 i C4 w surowicy a ekspresja G-CR1, M-CR1, B-CR1 i E-CR1 w grupie K, PKZN i TZN.



Ryc. 20a. Korelacja pomiędzy stężeniem C3 a stężeniem sCR1 w surowicy chorych na TZN



Ryc. 20b. Korelacje pomiędzy stężeniem C4 a stężeniem sCR1 w surowicy chorych na TZN



Ryc. 21. Korelacja pomiędzy stężeniem sCR1 w surowicy i punkcją w skali SLEDAI-2K u chorych na TZN

4.14. Ocena wpływu wybranych czynników klinicznych, biochemicznych i genetycznych na wysokość ekspresji CR1 na komórkach krwi oraz stężenie sCR1 w surowicy w grupie K i u chorych na PKZN oraz TZN z zastosowaniem modeli regresji wielorakiej

W wykorzystanych modelach regresji wielorakiej dotyczących grupy K i uwzględniających wiek i płeć badanego oraz posiadany genotyp polimorfizmu rs11118133 wykazano, że: płeć męska jest ujemnym predyktorem dla ekspresji M-CR1 ($p < 0,025$) i B-CR1 ($p < 0,043$) i dodatnim predyktorem dla ekspresji E-CR1 ($p < 0,033$), genotyp HL jest dodatnim predyktorem dla ekspresji E-CR1 ($p < 0,038$), genotyp LL dodatnim predyktorem dla ekspresji G-CR1 ($p < 0,001$), a wiek badanych ujemnym predyktorem dla stężenia sCR1 ($p < 0,001$) (Tab. 17a).

Do budowy modelu regresji wielorakiej w grupie PKZN wybrano genotyp rs11118133, płeć, klirens kreatyniny wg MDRD, stężenie kreatyniny, białkomocz dobowy i wiek badanych. Wykazano, że genotyp LL jest dodatnim predyktorem dla ekspresji G-CR1 ($p < 0,001$), M-CR1 ($p < 0,003$) i B-CR1 ($p < 0,001$), natomiast genotyp HL dodatnim predyktorem dla ekspresji G-CR1 ($p < 0,048$). Dla stężenia sCR1 w grupie chorych na PKZN ujemnym predyktorem jest płeć męska ($p < 0,032$) i genotyp HL ($p < 0,001$) (Tab. 17b).

W konstrukcji modelu regresji wielorakiej u chorych na TZN wzięto pod uwagę: aktywność choroby, genotyp polimorfizmu rs11118133, płeć, klirens kreatyniny wg MDRD, stężenie kreatyniny, wielkość białkomoczu dobowego oraz wiek. Zaobserwowano, że aktywność choroby jest dodatnim predyktorem dla stężenia sCR1 ($p < 0,001$) i ekspresji G-CR1 ($p < 0,002$) i M-CR1 ($p < 0,024$), klirens kreatyniny dodatnim predyktorem dla ekspresji M-CR1 ($p < 0,042$) i B-CR1 ($p < 0,023$), stężenie kreatyniny dodatnim predyktorem dla ekspresji G-CR1 ($p < 0,012$), wiek dodatnim predyktorem dla B-CR1 ($p < 0,001$). Natomiast genotyp HL okazał się dodatnim predyktorem dla G-CR1 ($p < 0,004$) i B-CR1 ($p < 0,017$) oraz ujemnym dla stężenia sCR1 ($p < 0,018$) (Tab. 17c).

W modelu regresji wielorakiej dla grupy PKZN i TZN analizowanych łącznie wykorzystano wiek, płeć osób badanych, rodzaj choroby (PKZN bądź TZN), genotyp rs11118133, klirens kreatyniny wg MDRD, stężenie kreatyniny w surowicy, wielkość białkomoczu dobowego, leczenie glikokortykosteroidami (lub jego brak),

azatiopryną, chlorambucylem, chlorochiną, mykofenalem mofetilu, cyklosporyną lub cyklofosfamidem. Wykazano, że genotyp LL jest dodatnim predyktorem dla ekspresji G-CR1 ($p < 0,0001$), M-CR1 ($p < 0,0001$) i B-CR1 ($p < 0,0001$), genotyp HL ujemnym predyktorem dla stężenia sCR1 ($p < 0,0001$), ale dodatnim dla ekspresji B-CR1 ($p < 0,002$) i G-CR1 ($p < 0,008$). Leczenie glikokortykosteroidami okazało się ujemnym predyktorem dla ekspresji M-CR1 ($p < 0,004$), ale dodatnim dla stężenia sCR1 ($p < 0,001$). Leczenie azatiopryną było ujemnym, a chlorambucylem dodatnim predyktorem dla ekspresji G-CR1 ($p < 0,009$ dla AZA i $p < 0,007$ dla chlorambucylu) i M-CR1 ($p < 0,030$ dla AZA i $p < 0,003$ dla chlorambucylu). Leczenie chlorochiną było dodatnim predyktorem dla stężenia sCR1 ($p < 0,002$). Samo wystąpienie TRU stanowiło dodatni predyktor dla ekspresji M-CR1 ($p < 0,0001$) i ujemny dla ekspresji B-CR1 ($p < 0,001$) (Tab. 17d).

Tab. 17a. Model regresji wielorakiej dla grupy K

Parametr Betha p	Kontrola				
	Wyraz wolny	Płeć K-0 M-1	HL HL-1 HH-0 LL-0	LL LL-1 HH-0 HL-0	Wiek [lata]
Model sCR1 skor. R ² =0,32 p<0,001	p<0,001				-0,58 p<0,001
Model G-CR1 skor. R ² =0,21 p<0,001	p<0,001			0,47 p<0,001	
Model M-CR1 skor. R ² =0,07 p=0,025	p<0,001	-0,29 p=0,025			
Model B-CR1 skor. R ² =0,05 p=0,043	p<0,001	-0,26 p=0,043			
Model E-CR1 skor. R ² =0,10 p=0,017	p<0,001	0,26 P=0,033	0,26 p=0,038		

HH-genotyp HH; HL-genotyp HL; LL-genotyp LL; K – kobiety; M – mężczyźni; sCR1 – rozpuszczalny CR1; sCR1-rozpuszczalny CR1; G-CR1-ekspresja CR1 na powierzchni granulocytów; M-CR1-ekspresja CR1 na powierzchni monocytów; B-CR1-ekspresja CR1 na powierzchni limfocytów B; E-CR1-ekspresja CR1 na powierzchni erytrocytów

Tab. 17b. Model regresji wielorakiej dla grupy PKZN

PKZN								
Parametr Beta p	Wyraz wolny	HL HL-1 HH-0 LL-0	LL LL-1 HH-0 HL-0	Płeć K-0 M-1	eGFR (MDRD) [ml/min/1,73m ²]	Scr [μmol/l]	TPUR [g/24h]	Wiek [lata]
Model sCR1 skor. R ² =0,12 p<0,001	p<0,001	-0,31 p<0,001	---	-0,17 p=0,032	---	---	---	---
Model G-CR1 skor. R ² =0,12 p<0,001	p<0,001	0,16 p=0,048	0,34 p<0,001	---	---	---	---	---
Model M-CR1 skor. R ² =0,05 p=0,004	p<0,001	---	0,24 p=0,003	---	---	---	---	---
Model B-CR1 skor. R ² =0,11 p<0,001	p<0,001	---	0,34 p<0,001	---	---	---	---	---

PKZN-pierwotne kłębuszkowe zapalenie nerek; ; HH-genotyp HH; HL-genotyp HL; LL-genotyp LL; eGFR wg MDRD- szacowana filtracja kłębuszkowa wg Modification of Diet in Renal Disease; Scr- stężenie kreatyniny w surowicy; TPUR-białkomocz dobowy; K – kobiety; M – mężczyźni; sCR1 – rozpuszczalny CR1; G-CR1-ekspresja CR1 na powierzchni granulocytów; M-CR1-ekspresja CR1 na powierzchni monocytów; B-CR1-ekspresja CR1 na powierzchni limfocytów B; E-CR1-ekspresja CR1 na powierzchni erytrocytów

Tab. 17c. Model regresji wielorakiej dla grupy TZN

TZN									
Parametr Beta p	Wyraz wolny	Aktywność choroby 1- aktywny 0- nieaktywny	HL HL-1 HH-0 LL-0	LL LL-1 HH-0 HL-0	Płeć K-0 M-1	eGFR (MDRD) [ml/min/1,73m ²]	Scr [μmol/l]	TPUR [g/24h]	Wiek [lata]
Model sCR1 skor. R ² =0,18 p<0,001	p<0,001	0,39 p=0,002	-0,28 p=0,018	---	---	---	---	---	---
Model G-CR1 skor. R ² =0,61 p<0,001	---	0,36 p=0,002	0,27 p=0,004	---	---	---	0,28 p=0,012	---	---
Model M-CR1 skor. R ² =0,11 p=0,015	p=0,018	0,28 p=0,024	---	---	---	0,25 p=0,042	---	---	---
Model B-CR1 skor. R ² =0,68 p<0,001	---	---	0,21 p=0,017	---	---	0,28 p=0,023	---	---	0,45 P<0,001

TZN-toczniove zapalenie nerek; ; HH-genotyp HH; HL-genotyp HL; LL-genotyp LL; eGFR wg MDRD- szacowana filtracja kłębuszkowa wg Modification of Diet in Renal Disease; Scr- stężenie kreatyniny w surowicy; TPUR-białkomocz dobowy; sCR1 – rozpuszczalny CR1; G-CR1-ekspresja CR1 na powierzchni granulocytów; M-CR1-ekspresja CR1 na powierzchni monocytów; B-CR1-ekspresja CR1 na powierzchni limfocytów B; E-CR1-ekspresja CR1 na powierzchni erytrocytów

Tab. 17d. Model regresji wielorakiej dla grup PKZN i TZN analizowanych łącznie

Chorzy PKZN + TZN																
Parametr Beta p	Wyraz wolny	Grupa PKZN-0 TZN-1	Płeć K-0, M-1	HL-1 LL-0 HH-0	LL-1 HL-0 HH-0	Wiek	eGFR MDRD	Scr [μmol/l]	TPUR	GKS	AZA	Chloram- bucyl	Chloro-china	MMF	CsA	CYC
Model sCR1 skor. R ² =0,20 p<0,001	p<0,0001	---	---	-0,27 p<0,0001	---	---	---	---	---	0,24 p<0,001	---	---	0,20 p=0,002	---	---	---
Model G-CR1 skor. R ² =0,23 p<0,001	p<0,0001	---	---	---	0,43 p<0,0001	---	---	---	---	---	-0,18 p=0,009	0,19 0,007	---	---	---	---
Model M-CR1 skor. R ² =0,21 p<0,001	p<0,0001	0,34 p<0,0001	---	---	0,39 p<0,0001	---	---	---	---	-0,22 p=0,004	-0,16 p=0,03	0,22 p=0,003	---	---	---	---
Model B-CR1 skor. R ² =0,23 p<0,001	p<0,0001	-0,21 p<0,0001	---	0,20 p=0,002	0,41 p<0,0001	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

PKZN - pierwotne kłębuszkowe zapalenie nerek; TZN-toczniove zapalenie nerek; HH-genotyp HH; HL-genotyp HL; LL-genotyp LL; eGFR wg MDRD - szacowana filtracja kłębuszkowa wg Modification of Diet in Renal Disease; Scr- stężenie kreatyniny w surowicy; TPUR-białkomocz dobowy; GKS-glikokortykosteroidy; AZA; azatiopryna; MMF-mykofenolan mofetilu; CsA-cyklosporyna; CYC- cyklofosamid; sCR1 – rozpuszczalny CR1; G-CR1-ekspresja CR1 na powierzchni granulocytów; M-CR1-ekspresja CR1 na powierzchni monocytów; B-CR1-ekspresja CR1 na powierzchni limfocytów B; E-CR1-ekspresja CR1 na powierzchni erytrocytów

4.15. Wieloczynnikowa wsteczna analiza logistyczna dotycząca wpływu polimorfizmu *rs11118133* genu CR1 na komórkach krwi oraz stężenie sCR1 w surowicy badanych osób

Wsteczna wieloczynnikowa analiza logistyczna wykazała statystycznie rzadsze występowanie wysokiej ekspresji G-CR1, M-CR1 i B-CR1 (powyżej 75 percentyla) u badanych osób posiadających genotyp HH i HL (dla G-CR1 $p = 0,002$ i $p = 0,0054$; dla M-CR1 $p = 0,008$ i $p = 0,0046$; dla B-CR1 $p = 0,0033$ i $p = 0,0412$ odpowiednio) (Tab. 18a). U osób z genotypem HL, statystycznie istotnie rzadsze było występowanie niskiej ekspresji G-CR1 (poniżej 25 percentyla) ($p = 0,0054$) (Tab. 18b). Istotnie częstsze występowanie niskiej ekspresji B-CR1 (poniżej 25 percentyla) odnotowano u osób z genotypem HH ($p = 0,0187$) (Tab. 18b). Genotyp HH i HL predysponował również do rzadszego występowania wysokiej ekspresji G-CR1 ($p = 0,0247$ i $p = 0,0233$) i M-CR1 ($p = 0,0312$ i $p = 0,0130$) w grupie K (Tab. 19a). Genotyp HL wiązał się na granicy istotności statystycznej z rzadszym występowaniem niskiej ekspresji G-CR1 (poniżej 25 percentyla) w grupie K ($p = 0,06$) (Tab. 19b). Natomiast u chorych na PKZN zarysowała się istotna tendencja do rzadszego występowania wysokiej ekspresji B-CR1 (powyżej 75 percentyla) u osób z genotypem HH ($p = 0,025$) i HL ($p = 0,0412$) (Tab. 20a) oraz częstszego występowania niskiej ekspresji B-CR1 (poniżej 25 percentyla) u pacjentów z genotypem HH ($p = 0,0187$) (Tab. 20b). W grupie PKZN, genotyp HH predysponował do rzadszego występowania wysokiej ekspresji G-CR1 (powyżej 75 percentyla) ($p = 0,0064$) (Tab. 20a) i częstszego występowania niskiej ekspresji M-CR1 (poniżej 25 percentyla) ($p = 0,0187$) (Tab. 20b). Wieloczynnikowa wsteczna analiza logistyczna wykazała również, że w całej grupie badanej statystycznie istotna była tendencja do rzadszego występowania wysokich stężeń sCR1 (powyżej 75 percentyla) u osób z genotypem HL ($p = 0,0051$) (Tab. 18a) i częstszego występowania pośrednich wartości sCR1 (> 25 percentyla i < 75 percentyle) u osób z genotypem LL ($p < 0,0001$) (Tab. 18c). W grupie chorych na PKZN genotyp HH predysponował do rzadszego występowania niskich stężeń sCR1 w surowicy (poniżej 25 percentyla) (Tab. 20b) oraz genotyp HL do rzadszego występowania wysokich stężeń sCR1 w surowicy (powyżej 75 percentyla) (Tab. 20a), ale wyniki te były na granicy istotności statystycznej ($p = 0,0618$).

Tabela 18a. Wyniki wieloczynnikowej wstecznej analizy logistycznej wpływu polimorfizmu rs11118133 na ekspresję CR1 na komórkach krwi oraz stężenie sCR1 w surowicy w GC

	G-CR1 > 75 percentyla			M-CR1 > 75 percentyla			B-CR1 > 75 percentyla			Stężenie sCR1 > 75 percentyla		
	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>
HH	-2,27 (0,62)	0,10 (0,03-0,35)	0,0002	-1,97 (0,58)	0,14 (0,04-0,44)	0,0008	-1,67 (0,57)	0,19 (0,06-0,57)	0,0033		-	-
HL	-1,76 (0,64)	0,17 (0,05-0,59)	0,0054	-1,73 (0,61)	0,18 (0,05-0,57)	0,0046	-1,21 (0,59)	0,30 (0,09-0,95)	0,0412	-0,87 (0,30)	0,42 (0,23-0,77)	0,0051
LL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
χ^2		16,37			11,86			8,91			8,53	

Objaśnienia: IL – iloraz szans, PU – przedział ufności, W – współczynnik wpływu, SE – błąd standardowy

Tabela 18b. Wyniki wieloczynnikowej wstecznej analizy logistycznej wpływu polimorfizmu rs11118133 na ekspresję CR1 na komórkach krwi oraz stężenie sCR1 w surowicy w GC

	GCR1 < 25 percentyla			MCR1 < 25 percentyla			BCR1 < 25percentyla			Stężenie sCR1 < 25 percentyla		
	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>
HH	-	-	-	-	-	-	0,63 (0,26)	1,88 (1,11-3,19)	0,0187	-	-	-
HL	-0,84 (0,29)	0,43 (0,24-0,77)	0,0054	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
χ^2		8,59			-			5,74				

Objaśnienia: IL – iloraz szans, PU – przedział ufności, W – współczynnik wpływu, SE – błąd standardowy

Tab. 18c. Wyniki wieloczynnikowej wstecznej analizy logistycznej wpływu polimorfizmu rs11118133 na ekspresję CR1 na komórkach krwi oraz stężenie sCR1 w surowicy w GC

	GCR1 >25 i <75 percentyla			MCR1 >25 i <75 percentyla			BCR1 >25 i <75percentyla			Stężenie sCR1 >25 i <75 percentyla		
	W (SE)	IL(95% PU)	<i>p</i>	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>
HH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,57 (1,06)	96,46 (11,97-777,52)	<0,0001
χ^2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	39,92	-

Objaśnienia: IL – iloraz szans, PU – przedział ufności, W – współczynnik wpływu, SE – błąd standardowy

Tabela 19a. Wyniki wieloczynnikowej wstecznej analizy logistycznej wpływu polimorfizmu rs11118133 na ekspresję CR1 na komórkach krwi oraz stężenie sCR1 w surowicy w grupie K

	GCR1 > 75 percentyla			MCR1 > 75 percentyla			BCR1 > 75 percentyla			Stężenie sCR1 > 75 percentyla		
	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>
HH	-2,62 (1,16)	0,07 (0,007-0,71)	0,0247	-2,51 (1,16)	0,08 (0,008-0,79)	0,0312	-	-	-	-	-	-
HL	-2,83 (1,24)	0,06 (0,005-0,67)	0,0233	-3,17 (1,28)	0,04 (0,003-0,51)	0,0130	-	-	-	-	-	-
LL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
χ^2		7,25			8,11							

Objaśnienia: IL – iloraz szans, PU – przedział ufności, W – współczynnik wpływu, SE – błąd standardowy

Tabela 19b. Wyniki wieloczynnikowej wstecznej analizy logistycznej wpływu polimorfizmu rs11118133 na ekspresję CR1 na komórkach krwi oraz stężenie sCR1 w surowicy w grupie K

	GCR1 < 25 percentyla			MCR1 < 25 percentyla			BCR1 < 25 percentyla			Stężenie sCR1 < 25 percentyla		
	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>
HH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HL	-1,47 (0,79)	0,22 (0,04-1,079)	0,0652	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
χ^2		4,41			-			5,74				

Objaśnienia: IL – iloraz szans, PU – przedział ufności, W – współczynnik wpływu, SE – błąd standardowy

Tabela 20a. Wyniki wieloczynnikowej wstecznej analizy logistycznej wpływu polimorfizmu rs11118133 na ekspresję CR1 na komórkach krwi oraz stężenie sCR1 w surowicy u chorych na PKZN

	GCR1 > 75 percentyla			MCR1 > 75 percentyla			BCR1 > 75 percentyla			Stężenie sCR1 > 75 percentyla		
	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>
HH	-1,01 (0,37)	0,36 (0,17-0,75)	0,0064	-	-	-	-2,66 (0,88)	0,06 (0,01-0,39)	0,0025	-	-	-
HL	-	-	-	-	-	-	-2,21 (0,91)	0,11 (0,01-0,66)	0,0412	-1,68 (0,56)	0,18 (0,06-0,56)	0,0618
LL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
χ^2		7,47						10,42			12,01	

Objaśnienia: IL – iloraz szans, PU – przedział ufności, W – współczynnik wpływu, SE – błąd standardowy

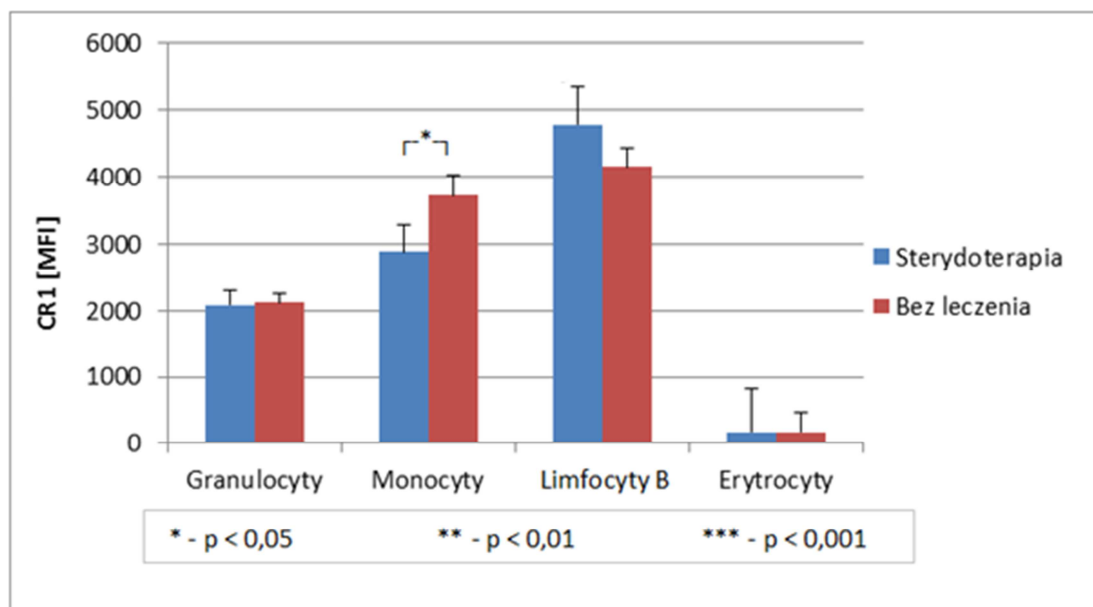
Tabela 20b. Wyniki wieloczynnikowej wstecznej analizy logistycznej wpływu polimorfizmu rs11118133 na ekspresję CR1 na komórkach krwi oraz stężenie sCR1 w surowicy u chorych na PKZN

	GCR1 < 25 percentyla			MCR1 < 25 percentyla			BCR1 < 25 percentyla			Stężenie sCR1 < 25 percentyla		
	W (SE)	IL(95% PU)	<i>p</i>	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>
HH	-	-	-	0,97 (0,46)	2,66 (1,07-6,57)	0,0343	0,91 (0,40)	2,49 (1,11-5,56)	0,0187	-0,74 (0,39)	0,47 (0,21-1,03)	0,0618
HL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
χ^2					5,04			5,4			3,44	

Objaśnienia: IL – iloraz szans, PU – przedział ufności, W – współczynnik wpływu, SE – błąd standardowy

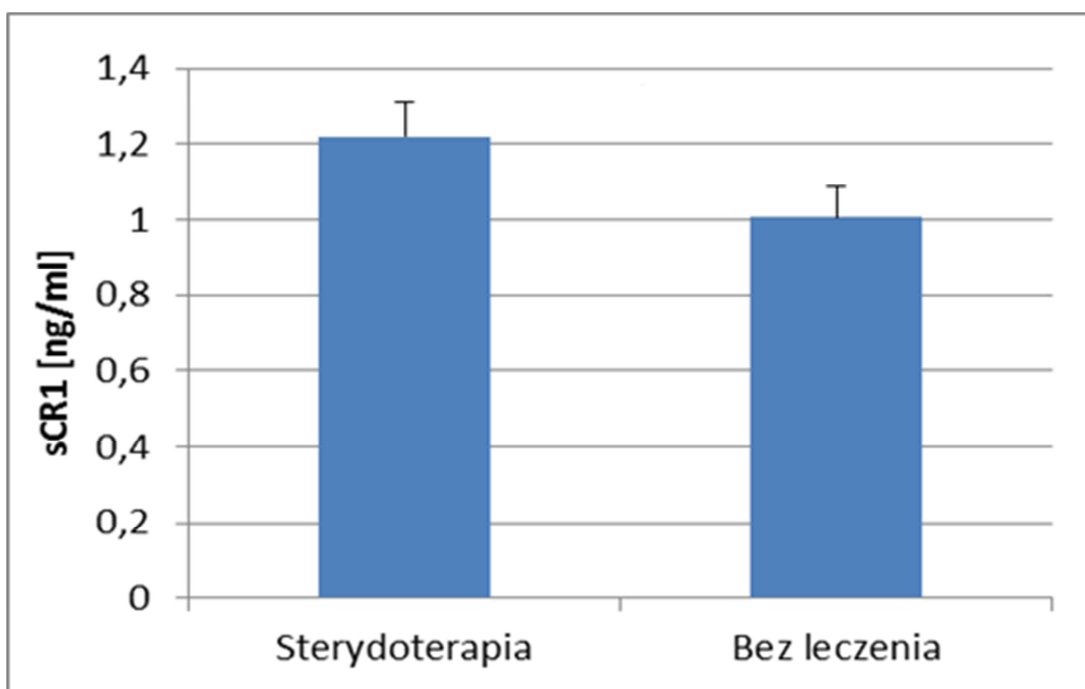
4.16. Analiza wpływu leczenia glikokortykoidami na ekspresję CR1 na komórkach krwi i stężenie sCR1 w surowicy chorych na PKZN i TZN

Celem oceny wpływu glikokortykoterapii na ekspresję CR1 na badanych komórkach krwi porównano ekspresję G-CR1, M-CR1, B-CR1 i E-CR1 między grupą chorych na PKZN leczonych (51 chorych) i nieleczonych GKS (99 chorych). Statystycznie istotne różnice stwierdzono tylko w ekspresji M-CR1 ($p < 0,05$), z tendencją do niższej ekspresji M-CR1 u chorych leczonych (Ryc. 22). Wieloczynnikowa wsteczna analiza logistyczna (Tab. 21a) wykazała statystycznie rzadsze występowanie wysokiej ekspresji M-CR1 (powyżej 75 percentyla) u chorych na PKZN i TZN leczonych GKS.



Ryc. 22. Porównanie ekspresji CR1 na komórkach krwi chorych na PKZN leczonych i nieleczonych glikokortykosteroidami

U chorych na PKZN leczonych GKS zaobserwowano również tendencję do wyższego stężenia sCR1 w porównaniu do chorych nieleczonych (Ryc. 23). Różnice te nie były jednak statystycznie znamienne. Jednakże, wieloczynnikowa wsteczna analiza logistyczna wykazała predyspozycję do częstszego występowania wyższego stężenia sCR1 (powyżej 75 percentyla), na granicy istotności statystycznej, u chorych na PKZN i TZN leczonych GKS (Tab. 21a). Zaobserwowano natomiast istotnie statystycznie rzadsze występowanie niskiego stężenia sCR1 (poniżej 25 percentyla) w tej grupie chorych (Tab. 21b).



Ryc. 23. Porównanie stężenia sCR1 w surowicy chorych na PKZN leczonych i nieleczonych glikokortykosteroidami

Tab. 21a. Wyniki wieloczynnikowej wstecznej analizy logistycznej wpływu leczenia glikokortykoidami na ekspresję CR1 na komórkach krwi i stężenie sCR1 w surowicy chorych na PKZN i TZN

	GCR1 > 75 percentyla			MCR1 > 75 percentyla			BCR1 > 75 percentyla			Stężenie sCR1 > 75 percentyla		
	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>
PKZN + TZN	-	-	-	-0,67 (0,32)	0,51 (0,26-0,99)	0,0493	-	-	-	0,59 (0,30)	1,81 (0,99-3,26)	0,0503
PKZN	-	-	-	-0,84 (0,46)	0,43 (0,17-1,07)	0,0696	-	-	-	-	-	-
χ^2	-	-	-	-	6,76	-	-	-	-	-	6,76	-

Objaśnienia: IL – iloraz szans, PU – przedział ufności, W – współczynnik wpływu, SE – błąd standardowy

Tab. 21b. Wyniki wieloczynnikowej wstecznej analizy logistycznej wpływu leczenia glikokortykoidami na ekspresję CR1 na komórkach krwi i stężenie sCR1 w surowicy chorych na PKZN i TZN

	GCR1 < 25 percentyla			MCR1 < 25 percentyla			BCR1 < 25 percentyla			Stężenie sCR1 < 25 percentyla		
	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>
PKZN + TZN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,89 (0,34)	0,41 (0,21-0,79)	0,0086
PKZN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-1,17 (0,49)	0,31 (0,12-0,80)	0,0159
χ^2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,2	-

Objaśnienia: IL – iloraz szans, PU – przedział ufności, W – współczynnik wpływu, SE – błąd standardowy

4.17. Analiza wpływu aktywności TRU mierzonej w skali SLEDAI-2K na ekspresję CR1 na komórkach krwi i stężenie sCR1 w surowicy chorych na TZN

Wieloczynnikowa wsteczna analiza logistyczna uwzględniająca aktywność TRU mierzoną w skali SLEDAI-2K wykazała statystycznie istotnie częstsze występowanie wysokiego stężenia sCR1 (powyżej 75 percentyla) i statystycznie istotnie rzadsze występowanie niskiego stężenia (poniżej 25 percentyla) tego receptora u pacjentów z TZN w aktywnej fazie choroby (Tab. 22a i 22b). Nie zaobserwowano wpływu aktywności TZN na ekspresję G-CR1 i B-CR1, natomiast zaobserwowano tendencję (na granicy istotności statystycznej) do rzadszego występowania niskiej ekspresji M-CR1 (poniżej 25 percentyla) u chorych w aktywnej fazie TZN (Tab. 22b).

Tab. 22a. Wyniki wieloczynnikowej wstecznej analizy logistycznej uwzględniającej aktywność TRU mierzoną w skali SLEDAI-2K w powiązaniu z ekspresją CR1 na komórkach krwi i stężeniem sCR1 w surowicy chorych na TZN

	GCR1 > 75 percentyla			MCR1 > 75 percentyla			BCR1 > 75 percentyla			Stężenie sCR1 > 75 percentyla		
	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>
SLEDAI-2K > 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,07 (0,51)	2,92 (1,06-8,03)	0,0375
χ^2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,48	-

Objaśnienia: IL – iloraz szans, PU – przedział ufności, W – współczynnik wpływu, SE – błąd standardowy

Tab. 22b. Wyniki wieloczynnikowej wstecznej analizy logistycznej uwzględniającej aktywność TRU mierzoną w skali SLEDAI-2K w powiązaniu z ekspresją CR1 na komórkach krwi i stężeniem sCR1 w surowicy chorych TZN

	GCR1 < 25 percentyla			MCR1 < 25 percentyla			BCR1 < 25 percentyla			Stężenie sCR1 < 25 percentyla		
	W (SE)	IL(95% PU)	<i>p</i>	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>	W (SE)	IL (95% PU)	<i>p</i>
SLEDAI-2K > 10	-	-	-	-1,13 (0,63)	0,32 (0,09-1,1)	0,0702	-	-	-	-1,13 (0,68)	0,32 (0,08-1,22)	0,0375
χ^2	-	-	-	-	5,77	-	-	-	-	-	5,77	-

Objaśnienia: IL – iloraz szans, PU – przedział ufności, W – współczynnik wpływu, SE – błąd standardowy

5. OMÓWIENIE I DYSKUSJA

5.1. Analiza częstości występowania genotypu HH, HL i LL u zdrowych i chorych na PKZN i TZN oraz wpływu genotypów polimorfizmu rs11118133 na rozwój PKZN i TZN oraz ekspresję CR1 na komórkach krwi

Rola polimorfizmu rs11118133 w określaniu podatności na rozwój TRU i PKZN nadal pozostaje niejasna. Wyniki badań własnych nie wykazały różnic w częstości występowania poszczególnych genotypów HH, HL i LL u osób zdrowych i u chorych na PKZN i TZN. Zarówno w grupie kontrolnej, jak i w grupie chorych najczęściej występował genotyp HH, a najrzadziej LL. Podobną dystrybucję genotypów obserwowano w populacji kaukaskiej, afroamerykańskiej i japońskiej [41,124]. Natomiast w zdrowej populacji indyjskiej częstość występowania genotypów HH, HL i LL zmieniała się na korzyść genotypu HL [107]. Satoh i wsp. odnotowali podobny do obserwowanego w badaniach własnych rozkład częstości występowania genotypów polimorfizmu rs11118133 w zdrowej populacji oraz u chorych na TRU [124]. Badania wykonane przez Panchamoorthy i wsp. nie wykazały różnic w rozkładzie częstości badanych allotypów pomiędzy osobami zdrowymi i chorymi na ostre kłębuszkowe zapalenia nerek [106]. Inni autorzy zaobserwowali częstsze występowanie allelu związanego z wysoką ekspresją E-CR1 w porównaniu z allelem związanym z mniejszą liczbą E-CR1, zarówno w grupie zdrowych, jak i chorych na TRU, bez statystycznie istotnych różnic między grupami. Autorzy tych badań sugerowali brak wpływu polimorfizmu rs11118133 na zwiększoną podatność na zapadalność na TRU [125]. Potwierdził to również wykorzystany w badaniach własnych model regresji logistycznej. Poprzednie prace sugerowały częstsze występowanie genotypu LL, jako głównej przyczyny obniżonej ekspresji E-CR1 u chorych na TRU [13], gdyż genotyp ten miał predysponować do niskiej ekspresji E-CR1 w przeciwieństwie do genotypu HH z wysoką ekspresją E-CR1 i HL z pośrednią ekspresją tego receptora [39]. Natomiast w badaniach indyjskich allel H wiązał się z większą podatnością na rozwój KZN, a allel L wydawał się pełnić rolę ochronną [107].

Przedstawione wyniki badań własnych nie wykazały różnic w ekspresji E-CR1 pomiędzy osobami z różnymi genotypami. Od lat 80-tych ukazało się wiele doniesień, które albo potwierdzały albo odrzucały wpływ polimorfizmu rs11118133 na ekspresję E-CR1 [40,107]. Rozbieżności w uzyskiwanych wynikach

badania mogą mieć związek z czynnikiem geograficznym. Korelacje pomiędzy wysokością ekspresji E-CR1 a polimorfizmem rs11118133 obserwowano w populacji europejskiej, północnoamerykańskiej (rasa kaukaska), afroamerykańskiej, ale nie u rodzimych Afrykańczyków [40,41].

Z dostępnych danych wynika, że przedstawione wyniki badań własnych należą do nielicznych w literaturze prób poszukiwania związku między polimorfizmem rs11118133 a ekspresją CR1 na leukocytach krwi u chorych na PKZN i TZN. W 1986 roku Wilson i wsp. wskazywali, że polimorfizm rs11118133 nie wpływał na ekspresję CR1 na limfocytach B i neutrofilach u osób zdrowych [39]. Tłumaczono to krótszym przeżyciem leukocytów w krążeniu w porównaniu do krwinek czerwonych i mniejszą podatnością leukocytów na proces starzenia się wiązany z utratą receptora. Genotyp LL, wiązany z mniejszą stabilizacją cząsteczki CR1 i obniżoną ekspresją E-CR1, miał wykazywać ograniczony wpływ na ekspresję receptora na leukocytach [41]. Wyniki badań własnych wykazały jednak związek pomiędzy genotypem polimorfizmu rs11118133 a ekspresją CR1 na badanych subpopulacjach leukocytów (monocytach, granulocytach i limfocytach B) w całej badanej grupie. Genotyp LL predysponował do najwyższych wartości ekspresji G-CR1, M-CR1 i B-CR1, a HH do najniższej ekspresji tego receptora na badanych leukocytach (zjawisko najbardziej wyraźne w grupie chorych na PKZN). Sugeruje to, że czynniki genetyczne mogą mieć wpływ na ekspresję CR1 na leukocytach, podobnie jak to obserwowano na erytrocytach. Uzyskane wyniki nie odzwierciedlają jednak tendencji obserwowanych wcześniej związanych z wyższą E-CR1 pod wpływem genotypu HH [39]. Jednakże Katyal i wsp. (podobnie do obserwacji poczynionych w badaniach własnych dotyczących ekspresji CR1 na leukocytach), wykazali większą utratę E-CR1 u pacjentów z genotypem HH. Autorzy tego badania sugerowali, że genotyp HH stanowi czynnik ryzyka zachorowania na KZN, zwiększając podatność na zachorowanie na KZN około 3-krotnie w stosunku do osób posiadających genotyp HL i LL [107]. Szybsza utrata E-CR1 w procesie starzenia się krwinek czerwonych u osób z genotypem HH była stwierdzana już wcześniej [126]. W badaniach własnych wykazano niższą ekspresję CR1 na leukocytach u osób z genotypem HH, pośrednią z genotypem HL i najwyższą z genotypem LL, właśnie u chorych na PKZN. Brak statystycznie istotnych różnic w ekspresji G-CR1, M-CR1 i B-CR1 między osobami z różnymi

genotypami w grupie K i u chorych na TZN może mieć związek z mniejszą liczebnością tych grup w stosunku do liczebności grupy PKZN. Tym niemniej, w grupie K oraz u chorych na TZN zauważalna była tendencja do wyższej ekspresji CR1 na leukocytach osób z genotypem LL. Najbardziej zaburzoną ekspresję CR1 wykazano na limfocytach B u chorych na TZN. Modele regresji wielorakiej pokazały, że inne czynniki, takie jak wiek, klirens kreatyniny, czy sam wpływ TRU, mogą mieć istotny związek z wielkością ekspresji B-CR1 w TZN. U chorych na TZN uwidocznił się również wpływ innych czynników poza genotypem na ekspresję CR1 na leukocytach. Ekspresję G-CR1 może mieć związek ze stężeniem kreatyniny w surowicy, a ekspresja M-CR1 - wielkością przesączania kłębuszkowego. Na ekspresję M-CR1 i G-CR1 u chorych na PKZN i TZN wydaje się też istotnie wpływać stosowane leczenie. Biorąc pod uwagę niewielką wartość predykcijną wykorzystanych modeli regresji wielorakich (skorygowany R² wahał się od 0,11-0,68) i obserwowane istotne statystycznie zależności pomiędzy polimorfizmem rs11118133 a ekspresją CR1 na leukocytach w GC i PKZN wydaje się, że problem ekspresji CR1 na komórkach krwi jest złożony i wpływ na nią mogą mieć zarówno czynniki genetyczne, jak i nabyte.

5.2. Analiza ekspresji CR1 na komórkach krwi u chorych na PKZN i TZN

5.2.1 Analiza ekspresji E-CR1

Analiza ekspresji E-CR1 u 291 badanych osób wykazała indywidualne różnice wahające się w przedziale od 5 do 318 MFI, nie zaobserwowano jednak istotnych statystycznie różnic w ekspresji E-CR1 między chorymi na PKZN, TZN i grupą K. Poprzednie dane z piśmiennictwa wskazywały na obniżoną ekspresję E-CR1 u chorych na TRU i PKZN [13,91,96,103-107]. Kalunian i wsp., w oparciu o wykorzystanie cytometrii przepływowej odnotowali niższą ekspresję E-CR1 u chorych na TRU w stosunku do osób zdrowych i chorych na inne choroby reumatyczne, ale nie uznali tego za parametr wystraszająco specyficzny, który ułatwiłby rozpoznanie TRU u osób z ujemnymi przeciwciałami przeciw dsDNA [87].

Niską ekspresją E-CR1 u chorych na TRU tłumaczono upośledzonym usuwaniem KI i upatrywano w tym przyczynę rozwoju uszkodzenia tkanek, chociaż Panchamoorthy i wsp. zaobserwowali, że powinowactwo CR1 do C3b pozostawało

niezależne od liczby E-CR1 [106]. Zjawisko obniżenia ekspresji E-CR1 tłumaczono mechanizmami uwarunkowanymi genetycznie [38,127], bądź procesami nabytymi [17,95,96,106]. W oparciu o obserwacje własne i innych autorów, można założyć, że istnieją dwie możliwe teorie genetycznego wpływu na liczbę CR1 na erytrocytach. Po pierwsze, erytrocyt w momencie utraty jądra nie ma już możliwości zmiany liczby CR1 na jego powierzchni. Z drugiej strony uwzględniając stabilność cząsteczki, zmiany w sekwencji pojedynczych nukleotydów mogą mieć wpływ na sekwencję aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym i tym samym wpływać na jego wrażliwość na zewnątrzkomórkową proteolizę. Utrata receptora w procesie starzenia się krwinek czerwonych, związana z proteolizą enzymatyczną, była obserwowana już wcześniej [16,38,128]. Tym samym, zwiększenie aktywności wewnątrzczyniowych proteaz tłumaczyłoby nabyty mechanizm utraty CR1 z powierzchni erytrocytów. Blokada CR1 poprzez związane z C3b i C4b KI, bądź obecność przeciwciał przeciwko CR1 były również postulowane w literaturze jako potencjalne nabyte mechanizmy obniżenia ekspresji E-CR1 [17,95,129]. Istnieje jednak możliwość, że niższa ekspresja E-CR1, a przez to mniejsze przeładowanie związanymi KI, przedłuża żywotność erytrocytów w krążeniu, a zwłaszcza ich powrót do krążenia po przejściu przez wątrobę i śledzionę. To właśnie układ siateczkowo-śródbłonkowy wątroby i śledziony może być głównym miejscem utraty CR1 z powierzchni erytrocytów [95].

Ross i wsp. zaobserwowali, że ekspresja E-CR1 koreluje ujemnie z aktywnością TRU i jest najniższa u chorych w fazie aktywnej choroby [95]. Podobne różnice w ekspresji E-CR1 między aktywną i nieaktywną fazą TRU odnotowali również inni badacze [91]. Zjawisko to nie jest jednak specyficzne dla TRU i może pojawić się w każdej chorobie przebiegającej ze wzmożoną aktywnością dopełniacza, m. in. w autoimmunologicznej niedokrwistości hemolitycznej, nocnej napadowej hemoglobinurii, zespole Sjögrena i mykoplazmatycznym zapaleniu płuc [95]. W badaniach własnych nie zaobserwowano różnicy w ekspresji E-CR1 między grupami aktywnych i nieaktywnych TZN. Nie wykazano również zależności między stężeniem C3 i C4 w surowicy a ekspresją E-CR1 w grupie TZN i PKZN.

W ocenie ekspresji E-CR1 istotna może być metoda jej ewaluacji. W uprzednich badaniach była ona wykonywana różnymi metodami: metodą IAHA

(immune adherence haemagglutination) [124,127], radioimmunologiczną (RIA; radioimmunoassay) z użyciem przeciwciał poliklonalnych i monoklonalnych [38,46,93,96], immunoenzymatyczną [40] oraz ostatnio cytometrii przepływowej [87]. Użyta w badaniach własnych metoda cytometrii przepływowej jest aktualnie szeroko stosowana i została uznana za wiarygodny sposób oceny ekspresji E-CR1 [87,107,130]. Zastosowane w badaniu własnym przeciwciało przeciw CD35 (klon E11) reaguje z wszystkimi czterema allotypami receptora CR1 A, B, C i D i łączy się dystalnie od miejsca wiązania z kompleksami immunologicznymi [92,131]. Dlatego długość łańcucha polipeptydowego receptora, czy stężenie krążących kompleksów immunologicznych nie powinna mieć wpływu na otrzymywane wyniki ekspresji CR1.

5.2.2. Analiza ekspresji CR1 na leukocytach krwi

Wyniki badań własnych wykazały obniżoną ekspresję G-CR1 u chorych na TZN w porównaniu do grupy K. Zaobserwowano również niższą ekspresję CR1 na limfocytach B u chorych na TZN w porównaniu do grupy kontrolnej i PKZN. Liczba B-CR1 u chorych z aktywną fazą TZN nie różniła się od ekspresji tego receptora u pacjentów z nieaktywną fazą TZN. Nie stwierdzono natomiast różnic w ekspresji M-CR1 między grupą K, PKZN i TZN. Również Arora i wsp., wykorzystując do oceny ekspresji CR1 na powierzchni leukocytów cytometrię przepływową zauważyli istotnie niższą ekspresję G-CR1 u chorych na TRU w porównaniu do grupy zdrowych osób i nie odnotowali statystycznie istotnych różnic w ekspresji M-CR1 między grupą kontrolną i chorych na TRU [102]. Obniżenie ekspresji CR1 na neutrofilach u chorych na TZN było obserwowane też przez innych badaczy [100]. Fyfe i wsp. zauważyli, że liczba CR1 na granulocytach jest wyraźnie niższa u chorych z aktywnym TRU w porównaniu do pacjentów w fazie nieaktywnej choroby [91]. W badaniach własnych nie wykazano korelacji pomiędzy stężeniem C3 i C4 a ekspresją G-CR1 u chorych na TRU. Podobne obserwacje poczynili Wilson i wsp. [100]. Ponieważ rolą G-CR1 jest m. in. fagocytoza opłaszczonych przez składniki dopełniacza KI, zmniejszenie G-CR1 może przyczyniać się do obniżonego klirensu tych kompleksów w TRU [101]. Z drugiej strony, krążące KI hamują ekspresję CR1 na powierzchni neutrofilów poprzez zjawisko „down-regulation”. Podobnie działa też interleukina (IL)-4, co zaobserwowano u osób zdrowych [102]. W badaniach *in vitro* zauważono,

że aktywacja granulocytów przez chemoatraktanty (np. FMLP, C5a *in vivo*) wywołuje gwałtowny wzrost ekspresji receptora CR1 na powierzchni granulocytów na drodze translokacji presyntetyzowanego wcześniej receptora z przestrzeni wewnątrzkomórkowych na powierzchnię komórki „up-regulation” [91,132-134]. Wzrost ekspresji CR1 na neutrofilach u osób zdrowych i chorych na TRU może wywołać również interferon (INF)- γ [102]. Ekspresja G-CR1 zmniejsza się znacznie w obecności enzymów proteolitycznych i może zostać zahamowana poprzez użycie inhibitora proteaz serynowych, np. fluorku fenylometylosulfonu (PMSF) lub α 1-antytrypsyny [133]. Powyższa obserwacja może świadczyć o tym, że obserwowane obniżenie ekspresji G-CR1 u chorych na TRU może wynikać z aktywacji wewnątrznaczyniowych, endogennych proteaz lub zaburzeń w wydzielaniu cytokin przez komórki immunokompetentne.

Z dotychczasowych badań wynika, że w TRU, podobnie jak w immunopatogenezie innych chorób autoimmunologicznych, główną rolę pełnią limfocyty B. Autoreaktywne limfocyty B są nie tylko prekursorami plazmocytów i źródłem nadmiernej ilości produkowanych autooprzeciwciał, ale stają się również komórkami prezentującymi antygeny własne [135]. W TRU następuje przełamanie tolerancji limfocytów B na własne antygeny komórkowe, cytoplazmatyczne i jądrowe. Nieprawidłowy klirens ciał apoptotycznych przez makrofagi i ekspozycja antygenów jądrowych na ich powierzchni skutkuje pozytywną selekcją limfocytów B w ośrodkach germinalnych, reagujących na te antygeny. Te autoreaktywne limfocyty B przechodzą zależne od limfocytów T procesy dojrzewania i przekształcenia w długożyjące plazmocyty [88]. Limfocyty B w TRU mogą wpływać na odpowiedź komórkową poprzez bezpośrednią interakcję z komórkami pamięci T oraz regulację rozwoju komórek dendrytycznych. Produkują one również szereg cytokin prozapalnych, m. in. IL-6 i INF- α , a także cytokin immunoregulatorowych, m. in. IL-10. Zwiększona liczba plazmocytów i obniżenie liczby limfocytów B jest korelowane z aktywnym klinicznie TRU [83,136]. Nadmierna produkcja autooprzeciwciał, zwłaszcza przeciwciał p-dsDNA w klasie IgG, sprzyja formowaniu KI. Dochodzi do przeładowania zdolności oczyszczającego układu siateczkowo-śródbłonkowego. KI aktywują komórki dendrytyczne (poprzez receptory Toll-like – TLR-9), które są odpowiedzialne za produkcję cytokin prozapalnych, m. in. INF- α . Powoduje to nasilenie odpowiedzi humoralnej i produkcji autooprzeciwciał [88]. KI

odkładają się w narządach i wtórnie aktywują UD, co leży u podłoża uszkodzenia tkanek w TRU [137].

Obniżenie ekspresji CR1 na limfocytach B było obserwowane wcześniej u chorych na TRU [99,100] i reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) [138]. Marquart i wsp. wykazali związek pomiędzy obniżeniem E-CR1 i zmniejszeniem liczby B-CR1 u chorych na TRU [99]. W 2008 roku Isaak i wsp. ocenili ekspresję B-CR1 na różnych subpopulacjach limfocytów B u pacjentów z TRU. Wykazali oni zwiększoną ekspresję tego receptora na limfocytach B pamięci w porównaniu z naiwnymi limfocytami B w grupie kontrolnej, natomiast zjawisko „up-regulation” było wyraźnie zaburzone u pacjentów z TRU. Redukcja ekspresji B-CR1 na komórkach B pamięci była bardziej widoczna u chorych z aktywnym TRU w porównaniu do chorych w nieaktywnej fazie choroby. Według powyższych autorów, obniżenie B-CR1 na komórkach pamięci w znacznym stopniu przyczynia się do nieprawidłowej odpowiedzi tej subpopulacji i wywiera silny wpływ na nieprawidłowe różnicowanie w kierunku produkujących przeciwciała plazmacytów [139]. Badania na szczepie mysim lpr/lpr, pozbawionym genetycznie CR1/CR2, wykazały, że CR1 i CR2 odgrywa istotną rolę w utrzymaniu tolerancji własnej przez anergiczne, autoreaktywne limfocyty B. Niedobór CR1 i CR2 zwiększa ryzyko autoagresji [140]. Zjawisko „down-regulation” receptora B-CR1 może sprzyjać rozwojowi autoagresji, ale niekoniecznie wpływać na ciężkość zachorowania [138,141].

Aktywacja limfocytów B zależy od równowagi pomiędzy sygnałami stymulującymi i hamującymi, modulującymi sygnały BCR. B-CR1 wydaje się być receptorem hamującym [59,135], a jego niedobór może sprzyjać rozwojowi procesów autoimmunologicznych [138]. Poprzednie badania wykazały, że B-CR1 bierze udział w regulacji proliferacji limfocytów B, wykazując raczej aktywność hamującą. Zwiększone zdolności proliferacyjne limfocytów B z obniżoną ekspresją B-CR1 były obserwowane m. in. u chorych na RZS [59,138]. Jozsi i wsp. zaobserwowali, że użycie zmodyfikowanej cząsteczki C3, naśladującej multimeryczny C3b i łączącej się silnie i zależnie od dawki z CR1 hamuje zależną od anty-IgM proliferację limfocytów B [59,137]. Hamujące limfocyty B właściwości B-CR1 zostały również wykorzystane w selektywnej supresji autoreaktywnych limfocytów B u pacjentów z TRU. Voynova i wsp. stworzyli molekularną chimerę

złożoną z peptydu przypominającego ds-DNA, połączonego ze specyficznym monoklonalnym przeciwciałem przeciwko ludzkiemu CR1. Użycie tej molekuly, krzyżowo i specyficznie łączącej się z B-CR1 i powierzchniową immunoglobuliną na powierzchni limfocytów B, produkujących przeciwciała przeciwko ds-DNA, spowodowało znaczny spadek liczby tych komórek [135]. Przeciwciała skierowane przeciwko CR1 były już wykorzystane w leczeniu chorych na TRU. Iking-Konert i wsp. utworzyli sztuczny kompleks (ETI-104) złożony z dsDNA połączonego z mysim przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko CR1. Zastosowanie tego kompleksu u chorych na TRU pacjentów wywołało znaczny spadek przeciwciał p-dsDNA w klasie IgG. Autorzy tłumaczą mechanizm działania ETI-104 tworzeniem kompleksów z krążącym IgG p-dsDNA i łączeniem z E-CR1. Ułatwia to oczyszczanie surowicy z krążących przeciwciał i usuwanie ich w wątrobie i śledzionie, a przez to minimalizuje ryzyko uszkodzenia tkanek i narządów [142].

Mechanizm odpowiedzialny za redukcję ekspresji B-CR1 i G-CR1 u chorych na TZN nie jest do końca jasny. Wyniki badań własnych wskazują, że niska ekspresja B-CR1 i G-CR1 nie wiąże się z częstszym występowaniem któregoś z genotypów polimorfizmu *HindIII* CR1 w grupie TZN w porównaniu z grupą kontrolną. Nasuwa się jednak pytanie, czy niewielka liczba osób z genotypem LL w grupie TZN (dwóch pacjentów na 66 chorych) i brak wystąpienia genotypu LL w grupie aTZN, nie miało wpływu na średni wynik B-CR1 i G-CR1 u tych chorych? Odpowiednie modele regresji logistycznej potwierdziły jednak brak statystycznie istotnej zależności pomiędzy polimorfizmem rs11118133 a ekspresją B-CR1 i G-CR1 w tej grupie. Nie wyklucza to jednak genetycznych przyczyn obniżenia ekspresji CR1 na powierzchni komórek. U chorych na TRU obserwowano obniżoną transkrypcję genu CR1 w leukocytach, która korelowała ujemnie ze stężeniem krążących KI i stężeniem przeciwciał p-ds-DNA oraz dodatnio ze stężeniem C3 w surowicy i ekspresją CR1 na powierzchni leukocytów [101,143]. Zjawisko „down-regulation” przez nadmierne ilości krążących KI, bądź enzymatyczne usuwanie z powierzchni komórek było również postulowane w literaturze jako potencjalny mechanizm tłumaczący niską ekspresję B-CR1 i G-CR1 u chorych na TRU [48,102,137]. Z drugiej strony zmniejszenie ekspresji CR1 na komórkach żernych, m. in. G-CR1, może przyczyniać się do wzrostu stężenia krążących KI w surowicy [101].

Za dodatni modulator transkrypcji CR1 w granulocytach u chorych na TRU uznany został INF- γ [102]. Jednakże wzrost transkrypcji genu dla INF- γ w neutrofilach [102] i wzrost stężenia INF- γ w surowicy, obserwowany u chorych na TRU [144], nie tłumaczy stwierdzanego spadku ekspresji G-CR1 u tych pacjentów. Z drugiej strony, krążące KI i/lub IL-4 zdają się hamować efekt „up-regulation” G-CR1 wywołany przez INF- γ [102].

5.2.3. Wpływ glikokortykosteroidów i czynnika płci na ekspresję CR1 na leukocytach krwi

Wpływ na ekspresję CR1 na komórkach krwi może mieć także stosowane leczenie. Wyniki badań własnych wykazały statystycznie istotnie niższą ekspresję M-CR1 u chorych na PKZN i TZN leczonych GKS. Podobną obserwację poczynił Torsteinsdóttir i wsp. w badaniu na chorych na RZS. W toku 4-6 tygodniowego leczenia niskimi dawkami prednizolonu wykazali niższą ekspresję M-CR1 u chorych leczonych GKS w porównaniu do wyników przed włączeniem leczenia. Co więcej, zastosowanie metyraponu, substancji, która hamuje syntezę endogennego kortyzolu poprzez hamowanie aktywności 11 β -hydroksylazy, wywołało wzrost liczby M-CR1 u chorych na RZS [145]. Poprzednie badania wykazały, że GKS mogą hamować transkrypcję wielu cytokin, np. IL-1, TNF- α czy IL-6 [145]. Glikokortykosteroidy, łącząc się ze swoimi receptorami w cytoplazmie przekraczają jądro, gdzie następnie mogą wiązać się wybiórczo z miejscami regulacyjnymi DNA [146]. Drugim potencjalnym mechanizmem jest hamowanie aktywności czynników transkrypcyjnych, m. in. AP-1 (activator protein-1), których połączenie z GKS uniemożliwia przekroczenie granicy jądra komórkowego [147]. W badaniach własnych nie wykazano wpływu GKS na ekspresję E-CR1, B-CR1 i G-CR1 u chorych na PKZN i TZN. Brak wpływu prednizolonu na liczbę G-CR1 u osób zdrowych był obserwowany już wcześniej przez innych autorów [148].

W badaniach własnych nie wykazano statystycznie istotnych różnic w ekspresji G-CR1, M-CR1 i B-CR1 między kobietami i mężczyznami w grupach K, PKZN i TZN, chociaż zaobserwowano tendencję do wyższej liczby CR1 na badanych leukocytach u kobiet w porównaniu do mężczyzn, zarówno w grupie K, jak i w TZN. Ta tendencja była na granicy istotności statystycznej dla ekspresji M-CR1 między zdrowymi osobami różnej płci, co potwierdził również model

regresji wielorakiej wskazując na płeć męską, jako ujemny predyktor dla ekspresji M-CR1 i B-CR1 w grupie K.

Płeć może mieć wpływ na występowanie wielu chorób autoimmunologicznych, m. in. RZS, czy TRU, które występują znacznie częściej u kobiet. Może mieć to związek z modulującym wpływem hormonów płciowych, np. estrogenów na układ immunologiczny [149,150]. Mechanizm immunosupresji wywołany przez estrogeny nie jest do końca jasny. W zwierzęcym modelu RZS (zapalenie stawów indukowane kolagenem-CIA) leczenie estrogenami powoduje zahamowanie rozwoju choroby, co wydaje się mieć związek z wpływem estrogenów na odpowiedź limfocytów B [151]. Niedobór CR1/CR2 u myszy płci żeńskiej czyni je bardziej podatnymi na CIA. Tęgo zjawiska nie obserwuje się u osobników męskich [141]. Owarektomia u myszy płci żeńskiej redukuje ekspresję CR1 na limfocytach B i nasila podatność na CIA. CR1 ma hamujący wpływ na rozwój zapalenia stawów u myszy płci żeńskiej, co jest przypisywane działaniu estrogenów [141]. Badania Nilssona i wsp. wykazały, że w odróżnieniu od mężczyzn, ekspresja B-CR1 maleje u kobiet z wiekiem [141]. Może mieć to związek ze spadkiem stężenia estrogenów. Wyniki tych obserwacji mogą wskazywać na estrogeny jako czynnik utrzymujący u kobiet wyższe stężenie CR1 na powierzchni leukocytów, a zwłaszcza limfocytów B, co sugerowałoby ich rolę ochronną. Nie wyjaśnia to jednak mechanizmu częstszego występowania TRU u kobiet.

5.3. Analiza stężenia sCR1 w surowicy zdrowych i chorych na PKZN i TZN

sCR1 w surowicy u osób zdrowych wykrywano już wcześniej [47]. Wyższe stężenia sCR1 obserwowano w chorobach nowotworowych (głównie krwi), chorobach zapalnych, w schyłkowej niewydolności nerek (chorzy dializowani) i marskości wątroby o różnej etiologii. W dwóch ostatnich grupach autorzy powyższych badań odnotowywali spadek sCR1 po transplantacji narządu, odpowiednio nerki lub wątroby [46]. W badaniach własnych obserwowano wzrost stężenia sCR1 w surowicy chorych z aktywnym TZN w stosunku do osób zdrowych i chorych na PKZN. Stężenie sCR1 było statystycznie istotnie wyższe u chorych na aTZN w porównaniu z pacjentami z nieaktywnym TZN oraz korelowało dodatnio z punktacją w skali SLEDAI-2K, oceniającej aktywność TRU. Wykazano również ujemną korelację sCR1 ze stężeniem C3 i C4 w surowicy chorych na TZN. Takiej

korelacji nie obserwowano w grupie kontrolnej i PKZN. sCR1 wykrywany w surowicy zachowuje miejsca wiązania C3b i zdolność wiązania KI [16,47]. W związku z tym nasuwa się pytanie, czy wzrost sCR1 u chorych na TZN jest reakcją obronną, która ma hamować przed nadmierną aktywacją UD? Rola UD w rozwoju TZN jest złożona, ale jego nadmierna aktywacja w sposób bezpośredni przyczynia się do uszkodzenia tkanek i narządów. Wzrost stężenia sCR1 w surowicy może w sposób niespecyficzny wzrastać w aktywnej fazie TRU, jako czuły marker zapalny. Trudno w tej chwili odpowiedzieć na pytanie, czy sCR1 może stanowić marker aktywności TRU, a w szczególności TZN. Wzrost stężenia sCR1 w surowicy chorych na TRU obserwowali inni autorzy, jednakże odnotowane różnice między chorymi i grupą kontrolną były nieistotne statystycznie. Na wynik mógł wpłynąć brak uwzględnienia czynnika aktywności TRU. Badania własne wykazały, że wzrost stężenia sCR1 w surowicy obserwowany jest tylko w grupie pacjentów w fazie aktywnej choroby. Obserwacji tej nie potwierdzili Pascual i wsp., którzy nie odnotowali różnicy w stężeniu sCR1 między grupą chorych z aktywnym TRU a grupą zdrowych osób [46].

Aby ocenić, czy sCR1 może być markerem aktywności TRU, należałoby ocenić większą grupę badanych. Interesującym byłoby również porównanie chorych na TRU z zajęciem nerek w toku procesu chorobowego z chorymi bez rozwiniętej nefropatii toczniowej. Ułatwiło by to odpowiedź na kolejne pytanie, czy wzrost sCR1 może być traktowany jako wskaźnik uszkodzenia nerek w przebiegu nefropatii toczniowej. Wstępne badania wykazały, że stężenie sCR1 nie koreluje z klirensiem kreatyniny, stężeniem kreatyniny w surowicy i białkomoczem u badanych chorych z zajęciem nerek, i jest zdecydowanie niższe u chorych na PKZN w porównaniu do grupy aTZN.

Z danych z piśmiennictwa wynika, że stężenie sCR1 koreluje z liczbą E-CR1 [46]. W badaniach własnych nie zaobserwowano jednak korelacji między stężeniem sCR1 a ekspresją E-CR1, G-CR1, M-CR-1 i B-CR1, zarówno w grupie TZN, jak i grupach K i PKZN. Badania *in vitro* wykazują, że źródłem sCR1 w surowicy są prawdopodobnie leukocyty, a nie erytrocyty. Świadczyłyby o tym chociażby wykrywanie obecności sCR1 w supernatantach z hodowli monocytów, limfocytów i neutrofilów. W badaniach na myszach, obciążonych ciężkim mieszanym niedoborem odporności, którym wstrzyknięto ludzkie leukocyty, stwierdzono

w surowicy ludzki sCR1. Ponieważ sCR1 nie wykryto w surowicy osobników bez ludzkich leukocytów, może to stanowić kolejny dowód na to, że źródłem sCR1 są leukocyty [46]. Duża część sCR1 u chorych z TRU jest prawdopodobnie związana z KI, w skład których wchodzi C3b/C4b [152]. Może mieć to na celu usuwanie nadmiernej ilości krążących KI w aktywnym TRU. Nie dziwi więc fakt ujemnej korelacji między stężeniem sCR1 a stężeniem C3 i C4 w surowicy. Stężenie KI w surowicy koreluje z aktywnością TRU [153]. Wysokie stężenie krążących KI wiąże się ze zwiększoną aktywnością UD i zużyciem składników C3 i C4. Im więcej KI związanych z C3 i C4, przy np. niewydolnym układzie erytrocytarnym, tym większe zapotrzebowanie na sCR1 w surowicy celem ich neutralizacji. Nasuwa się wniosek, że TP-10 może stanowić potencjalny środek terapeutyczny dla chorych na TRU, zwłaszcza z zajęciem nerek. Pozytywne efekty terapii przy pomocy sCR1 uzyskano już w eksperymentalnym KZN u szczurów. Zastosowanie tej terapii wywołało redukcję białkomoczu zarówno w rozplemowych, jak i nierozplemowych postaciach KZN [44].

5. PODSUMOWANIE

1. Wśród badanych chorych na pierwotne i toczniowe KZN oraz u osób z grupy kontrolnej najczęściej stwierdzano występowanie genotypu HH polimorfizmu rs11118133, a najrzadziej genotypu LL, bez istotnych statystycznie różnic między grupami.
2. Najwyższą ekspresję CR1 na leukocytach krwi obserwowano u osób z genotypem LL, a najniższą u osób z genotypem HH. Nie wykazano różnicy w ekspresji E-CR1 między poszczególnymi genotypami.
3. Obserwowano istotnie statystycznie niższą i niezależną od genotypu ekspresję CR1 na limfocytach B u chorych na toczniowe KZN, w porównaniu z grupą kontrolną, jak i chorych na pierwotne KZN.
4. Najwyższe stężenia sCR1 stwierdzono u chorych na aktywne toczniowe KZN. U chorych na pierwotne i toczniowe KZN występowanie genotypu HL wiązało się z niższymi stężeniami sCR1, czego nie obserwowano w grupie kontrolnej.
5. U chorych na toczniowe KZN wykazano istotne statystycznie korelacje pomiędzy stężeniem sCR1 a stężeniami C3 i C4 w surowicy oraz pomiędzy stężeniem sCR1 a skalą SLEDAI-2K.
6. U chorych na pierwotne KZN i toczniowe KZN leczenie glikokortykoidami może mieć wpływ na zmniejszenie ekspresji M-CR1 i zwiększenie stężenia sCR1 w surowicy.

7. WNIOSKI

1. Polimorfizmu rs11118133 może wpływać na ekspresję CR1 na leukocytach krwi i stężenie sCR1 w surowicy osób zdrowych i chorych, ale nie wykazuje związku z zapadalnością na pierwotne i toczniowe KZN.
2. Niższa ekspresja CR1 na limfocytach B i granulocytach chorych na toczniowe KZN może wskazywać, że niedobór tego receptora predysponuje do rozwoju tocznia rumieniowatego układowego.
3. Wysokie stężenie sCR1 wraz z uzyskanymi korelacjami między sCR1 a stężeniami składników dopełniacza C3 i C4 oraz skalą SLEDAI-2K u chorych na toczniowe KZN wydają się wskazywać na sCR1 jako potencjalny marker aktywności tocznia rumieniowatego układowego.

8. PIŚMIENNICTWO

1. Jakóbisiak M. Układ dopełniacza. (w) Immunologia. Gołąb J., Jakóbisiak M., Lasek W., Stokłosa T. (red.). Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa, 2012, 13, 210-221.
2. Morgan 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.
3. Nangaku M. Complement regulatory proteins in glomerular diseases. *Kidney Int*, 1998, 54, 1419-1428.
4. Weiss L., Fischer E., Haeffner-Cavaillon N., Jouvin M. H., Appay M. D., Bariety J., Kazatchkine M. The human C3b receptor (CR1). *Adv Nephrol Necker Hosp*, 1989, 18, 249-269.
5. Nauta A. J., Roos A., Daha M. R. A regulatory role of complement in innate immunity and autoimmunity. *Int Arch Allergy Immunol*, 2004, 134, 310-323.
6. Trouw L. A., Seelen M. A., Daha M. R. Complement and renal disease. *Mol Immunol*, 2003, 40, 125-134.
7. Nielsen C. H., Pedersen M. L., Marquart H. V., Prodinger W. M., Leslie R. G. The role of complement receptors type 1 (CR1, CD35) and 2 (CR2, CD21) in promoting C3 fragment deposition and membrane attack complex formation on normal peripheral human B cells. *Eur J Immunol*, 2002, 32, 1359-1367.
8. Hansen S., Holmskov U. Structural aspects of collectins and receptors for collectins. *Immunobiology*, 1998, 199, 165-89.
9. Seelen M. A., Trouw L. A., Van Der Hoorn J. W., Fallaux-van den Houten F. C., Huizinga T. W., Daha m. R., Roos A. Autoantibodies against mannose-binding lectin in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol*, 2003, 134, 335-343.
10. Matsushita M., Thiel S., Jensenius J. C., Terai I., Fujita T. Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease. *J Immunol*, 2000, 165, 2637-42.
11. Moulds J. M., Kassambara L., Middleton J. J., Baby M., Sagara I., Guindo A., Coulibaly S., Yalcouye D., Diallo D. A., Miller L., Doumbo O.

- Identification of complement receptor one (CR1) polymorphism in West Africa. *Genes Immun*, 2000, 1, 325-329.
12. Rodgaard A., Christensen L. D., Thomsen B. S., Wiik A., Bendixen G. Complement receptor type 1 (CR1, CD35) expression on peripheral T lymphocytes: both CD4- and CD8-positive cells express CR1. *Complement Inflamm*, 1991, 8, 303-309.
 13. Wilson J. G., Wong W. W., Murphy III E. E., Schur P. H., Fearon D. T. Deficiency of the C3b/ C4b receptor (CR1) of erythrocytes in systemic lupus erythematosus: analysis of the stability of the defect and of a restriction fragment length polymorphism of the CR1 gene. *J Immunol*, 1987, 138, 2708-2710.
 14. Wong W. W., Cahill J. M., Rosen M. D., Kennedy C. A., Bonaccio E. T., Morris M. J., Wilson J. G., Klickstein L. B., Fearon D.T. Structure of the human CR1 gene. Molecular basis of the structural and quantitative polymorphisms and identification of a new CR1-like allele. *J Exp Med*, 1989, 169, 847-63.
 15. Kubiak-Wlekły A., Perkowska-Ptasińska A., Olejniczak P., Rochowiak A., Kaczmarek E., Durlik M., Czekalski S., Niemir Z.I. The comparison of the podocyte expression of synaptopodin, CR1 and neprilysin in human glomerulonephritis: could the expression of CR1 be clinically relevant? *Int J Biomed Sci*, 2009, 5, 28-36.
 16. Ripoche J., Sim R. B. Loss of complement receptor type 1(CR1) on ageing of erythrocytes. Studies of proteolytic release of the receptor. *Biochem J*, 1986, 235, 815-21.
 17. Holme E., Fyfe A., Zoma A., Veitch J., Hunter J., Whaley K. Decreased C3b receptors (CR1) on erythrocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol*, 1986, 63, 41-48.
 18. Hamer I., Paccaud J. P., Belin D., Maeder C., Carpentier J. L. Soluble form of complement C3b/C4b receptor (CR1) results from proteolytic cleavage in the C-terminal region of CR1 transmembrane domain. *Biochem J*, 1998, 29, 183-190.
 19. Weis J. H., Morton C. C., Bruns G. A. P., Weis J. J., Klickstein L. B., Wong W. W., Fearon D. T. A complement receptor locus: genes encoding C3b/C4b

- receptor and Cad/Epstein-Barr virus receptor map to 1q32. *J Immunol*, 1987, 138, 312-5.
20. Xiang L., Rundles J. R., Hamilton D. R., Wilson J. G. Quantitative alleles of CR1: coding sequence analysis and comparison of haplotypes in two ethnic groups. *J Immunol*, 1999, 163, 4939-4945.
 21. Birmingham D. J., Irshaid F., Gavit K. F., Nagaraja H. N., Yu C. Y., Rovin B. H., Hebert L. A. A polymorphism in the type one complement receptor (CR1) involves an additional cysteine within the C3b/C4b binding domain that inhibits ligand binding. *Mol Immunol*, 2007, 44,3510-3516.
 22. Khera R., Das N. Complement receptor 1: Disease associations and therapeutic implications. *Mol Immunol*, 2009, 761-772.
 23. Lublin D. M., Griffith R. C., Atkinson J. P. Influence of glycosylation on allelic and cell-specific Mr variation, receptor processing, and ligand binding of the human complement C3b/C4b receptor. *J Biol Chem*, 1986, 261, 5736-44.
 24. Ross G. d., Lambris J. D., Cain J. A., Newman S. L. Generation of three different fragments of bound C3 with purified factor I or serum. II. Requirements for factor H vs. CR1 cofactor activity. *J Immunol*, 1982, 129, 2051-2060.
 25. Rowe J. A., Rogerson S. J., Raza A., Moulds J. M., Kazatchkine M. D., Marsh K , Newbold C. I., Atkinson J. P., Miller L. H. Mapping of the region of complement receptor (CR) 1 required for *Plasmodium falciparum* rosetting and demonstration of the importance of CR1 in resetting in field isolates. *J Immunol*, 2000, 165, 6341-6346.
 26. Ghiran I., Barbashov S. F., Klickstein L. B., Tas S. W., Jensenius J. C., Nicholson –Weller A. Complement receptor 1/ CD35 is a receptor for Mannan-binding lectine. *J Exp Med*, 2000, 192, 1797-1808.
 27. Moulds J. M., Zimmerman P. A., Doumbo O. K., Kassambara L., Sagara I., Diallo D. A., Atkinson J. P., Krych-Goldberg M., Hauhart R. E., Hourcade D. E., McNamara D. T., Birmingham D. J., Rowe J. A., Moulds J. J., Miller L. H. Molecular identification of Knops blood group polymorphism found in long homologous region D of complement receptor 1. *Blood*, 2001, 97, 2879-2885.

28. Klickstein L. B., Barbashov S. F., Liu T., Jack R. M., Nicholson-Weller A. Complement receptor type 1 is a receptor for C1q. *Immunity*, 1997, 7, 345-355.
29. Moulds J. M., Thomas B. J., Doumbo O., Diallo D. A., Lyke K. E., Plove C. V., rowe j. A., Birmingham D. J. Identification of the Kna/KnB polymorphism and a method for Knops genotyping. *Transfusion*, 2004, 44, 164-169.
30. Moulds J. M., Reveille J. D., Arnett F. C. Structural polymorphism of complement receptor 1 (CR1) in systemic lupus erythematosus (SLE) patient and normal controls of three ethnic groups. *Clin Exp Immunol*, 1996, 105, 302-305.
31. Moulds J. M., Nickells M. W., Moulds J. J., Brown M. C., Atkinson J. P. The C3b/CC4b receptor is recognized by the Knops, McCoy, Swain-Langley, and York blood group sera. *J Exp Med*, 1991, 173, 1159-1163.
32. Rao N., Ferguson D. J., Lee S. F., Telen M. J. Identification of human erythrocyte blood group antigens on the C3b/C4b receptor. *J Immunol*, 1991, 146, 3501-3507.
33. Dykman T. R., Hatch J. A., Aqua M. S., Atkinson J. P. Polymorphism of the C3b/C4b receptor (CR1): characterization of a fourth allele. *J Immunol*, 1985, 134, 1787-1789.
34. Holers V. M., Chaplin D. D., Leykam J. F., Grunar B. A., Kumar V., Atkinson J. P. Human complement C3b/C4b receptor mRNA polymorphism that correlates with the CR1 allelic molecular weight polymorphism. *Proc Natl Acad Sci*, 1987, 84, 2459-2463.
35. Wong W. W., Farrell S. A. Proposed structure of the F' allotype of human CR1. Loss of a C3b binding site may be associated with altered function. *J Immunol*, 1991, 146, 656-662.
36. Cornillet P., Gredy P., Pennaforte J. L., Meyer O., Kazatchkine M. D., Cohen J. H. Increased frequency of the long (S) allotype of CR1 (the C3b/C4b receptor, CD35) in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol*, 1992, 89, 22-25.
37. Cornillet P., Philbert F., Kazatchkine M. D., Cohen J. H. M. Genomic determination of CR1 (CD35) density polymorphism on erythrocytes using

- polymerase chain reaction amplification and *HindIII* restriction enzyme digestion. *J Immunol Methods*, 1991, 136, 193-197.
38. Wilson J. G., Wong W. W., Schur P. H., Fearon D. T. Mode of inheritance of decreased C3b receptors on erythrocytes of patients with systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*, 1982, 307, 981-986.
 39. Wilson J. G., Murphy E. E., Wong W. W., Klickstein L. B., Weis J. H., Fearon D. T. Identification of a restriction fragment length polymorphism by a CR1 cDNA that correlates with the number of CR1 on erythrocytes. *J Exp Med*, 1986, 164, 50-59.
 40. Rowe J. A., Raza A., Diallo D. A., Baby M., Poudiougou B., Coulibaly D., Cockburn I. A., Middleton J., Lyke K. E., Plowe C. V., Doumbo O. K., Moulds J. M. Erythrocyte CR1 expression level does not correlate with a *HindIII* restriction fragment length polymorphism in Africans; implications for studies on malaria susceptibility. *Genes Immun*, 2002, 3, 497-500.
 41. Herrera A. H, Xiang L., Martin, S. G., Lewis J., Wilson J. G. Analysis of complement receptor type 1 (CR1) expression on erythrocytes and of CR1 allelic markers in Caucasian and African-American populations. *Clin Immunol Immunopathol*, 1998, 87, 176-183.
 42. Katyal M., Sivasankar B., Ayub S., Das N. Genetic and structural polymorphism of complement receptor 1 in normal Indian subjects. *Immunol Lett*, 2003, 89, 93-98.
 43. Currie M. S., Vala M., Pisetsky D. S., Greenberg C. S., Crawford J., Cohen H. J. Correlation between erythrocyte CR1 reduction and other blood proteinase markers in patients with malignant and inflammatory disorders. *Blood*, 1990, 75, 1699-1704.
 44. Couser W. G., Johnson R. J., Young B. A., Yeh C. G., Toth C. A., Rudolph A. R. The effects of soluble recombinant complement receptor 1 on complement mediated experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*, 1995, 5, 1888-1894.
 45. Weisman H. F., Bartow T., Leppo M. K., Marsh H. C. Jr, Carson G. R., Concino M. F., Boyle M. P., Roux K. H., Weisfeldt M. L., Fearon D. T. Soluble human complement receptor type 1: in vivo inhibitor of complement

- suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis. *Science*, 1990, 249, 146-151.
46. Pascual M., Duchosal M. A., Steiger G., Giostra E., Pechere A., Paccaud J. P., Danielsson C., Schifferli J. A. Circulating soluble CR1 (CD35). Serum levels in diseases and evidence for its release by human leukocytes. *J Immunol* 1993, 151, 1702-1711.
 47. Yoon S. H., Fearon D. T. Characterisation of soluble form of the C3b/C4b receptor (CR1) in human plasma. *J Immunol*, 1985, 134, 3332-8.
 48. Danielsson C. Pascual M., French L., Steiger G., Schifferli J. A. Soluble complement receptor type 1 (CD35) is released from leukocytes by surface cleavage. *Eur J Immunol*, 1994, 24, 2725-2731.
 49. Woo P. P., Lachmann P. J., Harrison R. A., Amos N., Cooper C., Rosen F. S. Simultaneous turnover of normal and dysfunctional C1 inhibitor as a probe of in vivo activation of C1 and contact activatable proteases. *Clin Exp Immunol* 1985, 61, 1-8.
 50. Sissons J. G., Liebowitch P. J., Amos N., Peters D. K. Metabolism of the fifth component of human complement, and its relation to metabolism of the third component, in patients with complement activation. *J Clin Invest*, 1977, 59, 704-715.
 51. Kaplan R. A., Curd J. G., Deheer D. H., Carson D. A., Pangburn M. K., Muller- Eberhard H. J., Vaughan J. H. Metabolism of C4 and factor B in rheumatoid arthritis. Relation to rheumatoid factor. *Arthritis Rheum*, 1980, 23, 911-920.
 52. Pascual M., Steiger G., Sadallah S., Paccaud J. P., Carpentier J. L., James R., Schifferli J. A. Identification of membrane-bound CR1 (CD35) in human urine: evidence for its release by glomerular podocytes. *J Exp Med*, 1994, 179, 889-899.
 53. Cornacoff J. B., Hebert L. A., Smead W. L., VanAman M. E., Birmingham D. J., Waxman F. J. Primate erythrocyte-immune complex-clearing mechanism. *J Clin Invest*, 1983, 71, 236-47.
 54. Cosio F. G., Shen X. P., Birmingham D. J., Van Aman M., Hebert L. A. Evaluation of the mechanisms responsible for the reduction in erythrocyte

- complement receptors when immune complexes form in vivo in primates. *J Immunol*, 1990, 145, 4198-4206.
55. Yoshida K., Yukiya Y., Miyamoto T. Interaction between immune complexes and C3b receptors on erythrocytes. *Clin Immunol Immunopathol*, 1986, 39, 213-221.
 56. Schorlemmer H. U., Hofstaetter T., Seiler F. R. Phagocytosis of immune complexes by human neutrophils and monocytes: relative importance of Fc and C3b receptors. *Behring Inst Mitt*, 1984, 76, 88-97.
 57. Fearon D. T., Kaneko I., Thomson G. G. Membrane distribution and adsorptive endocytosis by C3b receptors on human polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med.*, 1981, 153, 1615-1628.
 58. Fingeroth J. D., Heath M. E., Ambrosino D. M. Proliferation of resting B cells is modulated by CR2 and CR1. *Immunol Lett*, 1989, 21, 291-301.
 59. Jozsi M., Prechl J., Bajtay Z., Erdei A. Complement receptor type 1 (CD35) mediates inhibitory signals in human B lymphocytes. *J Immunol*, 2002, 168, 2782-2788.
 60. Nielsen C. H., Marquart H. V., Prodinger W. M., Leslie R. G. CR2-mediated activation of the complement alternative pathways results in formation of membrane attack complexes on the human B cell surface. *Immunology*, 2001, 104, 418-422.
 61. Kraus S., Fishelson Z. Cell desensitization by sublytic C5b-9 complexes and calcium ionophores depends on the activation of protein kinase. *C Eur J Immunol*, 2000, 30, 1272-1280.
 62. Nicholson-Weller A., Halperin J. A. Membrane signaling by complement C5b-9, the membrane attack complex. *Immunol Res*, 1993, 12, 244-257.
 63. Sato T., Van Dixhoorn M. G., Prins F. A., Mooney A., Verhagen N., Muizert Y., Savill J., Van Es L. A., Daha m. R. The terminal sequence of complement plays an essential role in antibody-mediated renal cell apoptosis. *J Am Soc Nephrol*, 1999, 10, 1242-1252.
 64. Wiedmer T., Andbo B., Sims P. J. Complement C5b-9-stimulated platelet secretion is associated with a Ca²⁺-initiated activation of cellular protein kinases. *J Biol Chem*, 1987, 262, 13674-13681.
 65. Mollnes T. E., Kirschfink M. Strategies of therapeutic complement inhibition. *Mol Immunol*. 2006, 43, 102-121.

66. Eror A. T., Stojadinovic A., Starnes B. W., Makrides S. C., Tsokos G. C., Shea-Donohue T. Antiinflammatory effects of soluble complement receptor type 1 promote rapid recovery of ischemia/reperfusion injury in rat small intestine. *Clin Immunol*, 1999, 90, 266-275.
67. Rabinovici R., Yeh C. G., Hillegass L. M., Griswold D. E., DiMartino D. J., Vernick J., Fong K. L., Feuerstein G. Role of complement in endotoxin/platelet-activating factor-induced lung injury. *J Immunol*, 1992, 149, 1744-1750.
68. Goodfellow R. M., Williams A. S., Levin J. L., Williams B. D., Morgan B. P. Soluble complement receptor one (sCR1) inhibits the development and progression of rat collagen-induced arthritis. *Clin Exp Immunol*, 2000, 119, 210-216.
69. Metcalfe R. A., McIntosh R. S., Morgan B. P., Levin J. L., Weetman A. P. The effect of soluble complement receptor 1 (sCR1) and human thyroid antibodies on the course of experimental autoimmune thyroiditis in rats. *Autoimmunity*, 1996, 23, 1-8.
70. Weisman H. F., Bartow T., Leppo M. K., Boyle M. P., Marsh H. C. Jr, Carson G. R., Roux K. H., Weisfeldt M. L., Fearon D. T. Recombinant soluble CR1 suppressed complement activation, inflammation, and necrosis associated with reperfusion of ischemic myocardium. *Trans Assoc Am Physicians*, 1990, 103, 64-72.
71. Pruitt S. K., Baldwin W. M. III, Marsh H. C. Jr, Lin S. S., Yeh C. G., Bollinger R. R. The effect of soluble complement receptor type 1 on hyperacute xenograft rejection. *Transplantation*, 1991, 52, 868-73.
72. Pruitt S. K., Bollinger R. R. The effect of soluble complement receptor type one on hyperacute allograft rejection. *J Surg Res*, 1991, 50, 350-355.
73. Rioux P. TP-10 (AVANT immunotherapeutics). *Curr Opin Investig Drugs*, 2001, 2, 364-371.
74. Zimmerman J. L., Dellinger R. P., Straube R. C., Levin J. L. Phase I trial of the recombinant soluble complement receptor 1 in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*, 2000, 28, 3149-3154.
75. Li J. S., Sanders S. P., Perry A. E., Stinnett S. S., Jagers J., Bokesch P., Reynolds L., Nassar R., Anderson P. A. Pharmacokinetics and safety of

- TP10, soluble complement receptor 1, in infants undergoing cardiopulmonary bypass. *Am Heart J*, 2004, 147, 173-180.
76. Lazar H. L., Hamasaki T., Bao Y., Rivers S., Bernard S. A., Shemin R. J. Soluble complement receptor type 1 limits damage during revascularization of ischemic myocardium. *Ann Thorac Surg*, 1998, 65, 973-977.
 77. Makrides S. C., Nygren P. A., Andrews B., Ford P. J., Evans K. S., Hayman E. G., Adari H., Uhlen M., Toth C. A. Extended in vivo half-life of human soluble complement receptor type 1 fused to a serum albumin-binding receptor. *J Pharmacol, Exp Ther*, 1996, 277, 534-542.
 78. Scesney S. M., Makrides S. C., Gosselin M. L., Ford P. J., Andrews B. M., Hayman E. G., Marsh H. C. Jr A soluble deletion mutant of the human complement receptor type 1, which lacks the C4b binding site, is a selective inhibitor of the alternative complement pathway. *Eur J Immunol*, 1996, 26, 1729-1735.
 79. Oudin S., Libyh M. T., Goossens D., Dervillez X., Philbert F., Réveil B., Bougy F., Tabary T., Rouger P., Klatzmann D., Cohen J.H. A soluble recombinant multimeric anti-Rh(D) single-chain Fv/CR1 molecule restores the immune complex binding ability of CR1-deficient erythrocytes. *J Immunol*, 2000, 164, 1505-1513.
 80. Mikata S., Miyagawa S., Yoshitatsu M., Ikawa M., Okabe M., Matsuda H., Shirakura R. Prevention of hyperacute rejection by phosphatidylinositol-anchored mini-complement receptor type 1. *Transpl Immunol*, 1998, 6, 107-110.
 81. Cervera R., Khamashta M. A., Font J., Sebastiani G.D., Gil A., Lavilla P., Mejía J.C., Aydintug A.O., Chwalinska-Sadowska H., de Ramón E., Fernández-Nebro A., Galeazzi M., Valen M., Mathieu A., Houssiau F., Caro N., Alba P., Ramos-Casals M., Ingelmo M., Hughes G.R.; European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus. Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients. *Medicine (Baltimore)*, 2003, 82, 299-308.
 82. Mok C. C. Biomarkers for lupus nephritis: a critical appraisal. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 2010, Article ID 638413.

83. de Zubiria Saldago A., Herrera-Diaz C. Lupus Nephritis: An overview of recent findings. *Autoimmune Dis.*, 2012, 2012:849684.
84. Schur P., Sandson J. Immunological factors and clinical activity in systemic lupus erythematosus. *N Eng J Med*, 1968, 278, 533-538.
85. Walport M., Complement and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res*, 2002, 4, 279-293.
86. Hauptmann G., Tappeiner G., Schifferli J. A. Inherited deficiency of fourth component of human complement. *Immunodef Rev*, 1988, 1, 3-22.
87. Kalunian K. C., Chatham W. W., Massarotti E. M., Reyes-Thomas J., Harris C., Furie R. A., Chitkara P., Putterman C., Gross R. L., Somers E. C., Kirou K. A., Ramsey-Goldman R., Hsieh c., Buyon J. P., Dervieux T., Weinstein A. Measurements of cell bound complement activation products enhance diagnostic performance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 2012, in press.
88. Toong C., Adelstein S., Phan T.G. Clearing the complexity: immune complexes and their treatment in lupus nephritis. *Int J Nephrol and Renovasc Dis*, 2011, 4, 17-28.
89. Birmingham D. J., Gavit K. F., McCarty S.M., Yu C. Y., Rovin B. H., Nagaraja H. N., Hebert L. A. Consumption of erythrocyte CR1 (CD35) is associated with protection against systemic lupus erythematosus renal flare., *Clin Exp Immunol*, 2006, 143, 274-280.
90. Corvetta A., Pomponio G., Bencivenga R., Luchetti M. M., Spycher M., Spaeth P. J., Danieli G. Low number of complement C3b/C4b receptors (CR1) on erythrocytes from patients with essential mixed cryoglobulinemia, systemic lupus erythematosus, and rheumatoid arthritis: relationship with disease activity, anticardiolipin antibodies, complement activation and therapy. *J Rheumatol*, 1991, 18, 1021-1025.
91. Fyfe H., Holme E. R., Zoma A., Whaley K. C3b receptor (CR1) expression on the polymorphonuclear leukocytes from patient with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol*, 1987, 67, 300-8.
92. Ross G. D., Yount W. J., Walport M. J., Winfield J. B., Parker C. J., Fuller C. R., Taylor R. P., Myones B. L., Lachmann P. J. Disease-associated loss of erythrocyte complement receptors (CR1, C3b receptors) in patients with

- systemic lupus erythematosus and other diseases involving autoantibodies and/or complement activation. *J Immunol*, 1985, 135, 2005-2014.
93. Iida K., Mornaghi R., Nussenzweig V. Complement receptor (CR1) deficiency in erythrocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Exp Med*, 1982, 155, 1427-1438.
 94. Minota S., Terai C., Nojima Y., Takano K., Takai E., Miyakawa Y., Takaku F. Low C3b receptor activity on erythrocytes from patients with systemic lupus erythematosus detected by immune adherence hemagglutination and radioimmunoassay with monoclonal antibody. *Arthritis Rheum*, 1984, 27, 1329-1335.
 95. Jouvin M. H., Wilson J. G., Bourgeois P., Fearon D. T., Kazatchkine M. D. Decreased expression of C3b receptor (CR1) on erythrocytes of patients with systemic lupus erythematosus contrasts with its normal expression in other systemic diseases and does not correlate with the occurrence of severity of SLE nephritis. *Complement*, 1986, 3, 88-96.
 96. Walport M. J., Ross G. D., Mackworth-Young C. i wsp. Family studies of erythrocyte complement type 1 levels: reduced levels in patient with SLE are acquired, not inherited. *Clin Exp Immunol*, 1985, 59, 547-54.
 97. Thomsen B. S., Nielsen H., Andersen V. Erythrocytes CR1 (C3b/C4b receptor) levels and disease activity in patients with SLE. *Scand J Rheumatol*, 1987, 16, 339-46.
 98. Van Dyne S., Holers M. V., Lublin D. M., Atkinson J. P. The polymorphism of the C3b/C4b receptor in the normal population and in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol*, 1987, 68, 570-579.
 99. Marquart H. V., Svendsen A., Rasmussen J. M., Nielsen C. H., Junker P., Svehag S. E., Leslie R. G. Complement receptor expression and activation of the complement cascade on B-lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus (SLE). 1995, *Clin Exp Immunol*, 101, 60-65.
 100. Wilson J. G., Ratnoff W. D., Schur P. H., Fearon D. T. Decreased expression of the C3b/C4b receptor (CR1) and the C3d receptor (CR2) on lymphocytes B and of CR1 on neutrophils of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, 1986, 29, 739-147.

101. Arora V., Verma J., Dutta R., Dutta R., Marvah V., Kumar A., Das N. Reduced complement receptor 1 (CR1, CD35) transcription in systemic lupus erythematosus., *Mol Immunol*, 2004, 41, 449-456.
102. Arora V., Mondal A.M., Grover R., Kumar A., Chattopadhyay P., Das N. Modulation of CR1 transcript in systemic lupus erythematosus (SLE) by IFN-gamma and immune complex., *Mol Immunol*, 2007, 44, 1722-1728.
103. Arora M., Arora R., Tiwari S. C. Das N., Srivastava L. M. Expression of complement regulatory proteins in diffuse proliferative glomerulonephritis., *Lupus*, 2000, 9, 127-131.
104. Raju K. R., Sivasankar B., Anand V., Luthra K., Tiwari S. C., Dinda A. K., Das N., Srivastava L. M. Use of complement receptor 1 (CD35) assay in the diagnosis and prognosis of immune complex mediated glomerulopathies. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 2001, 19, 23-27.
105. Arora M., Jain D., Dinda A. K., Das S. N., Anand V., Tiwari S. C., Srivastava L. M. Reduced CR1 expression on erythrocytes of idiopathic focal-segmental glomerulosclerosis patients., *Nephron*, 1998, 79, 365-366.
106. Panchamoorthy G., Tiwari S. C., Srivastava L. M. Inherited structural and quantitative polymorphism of C3b receptor (CR1) in normals and patients with glomerular diseases. *Asian Pac J Allergy Immunol.*, 1993, 11, 123-129.
107. Katyal M., Tiwari S. C., Kumar A., Dinda A. K., Arora V., Kumar R., Das N. Association of complement receptor 1 (CR1, CD35, C3b/C4b receptor) density polymorphism with glomerulonephritis in Indian subjects., *Mol Immunol*, 2004, 40, 1325-1332.
108. 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.
109. Ward M. M., Marx A. S., Barry N. N. Comparison of the validity and sensitivity to change of 5 activity indices in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*, 2000, 27, 664-670.
110. Bombardier C., Gladman D. D., Urowitz M. B., Caron D., Chang C. H. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum*, 1992, 35, 630-640.
111. Gladman D. D., Ibanez D., Urowitz M. B. Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000. *J Rheumatol*, 2002, 29, 288-291.

112. Cook R. J., Gladman D. D., Pericak D., Urowitz M. B. Prediction of short term mortality in systemic lupus erythematosus with time dependent measures of disease activity. *J Rheumatol*, 2000, 27, 1892-1895.
113. Gladman D. D., Urowitz M. B., Kagal A., Hallett D. Accurately describing changes in disease activity in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*, 2000, 27, 377-379.
114. Marks S. D., Tullus K. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Pediatr Nephrol*, 2012, 27, 1855-1868.
115. Egner W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. *J Clin Pathol*, 2000, 53, 424-432.
116. Isenberg D. A., Manson J. J., Ehrenstein M. R., Rahman A. Fifty years of anti-dsDNA antibodies: are we approaching journey's end? *Rheumatology*, 2007, 46, 1052-1056.
117. Alba P., Bento L., Cuadrado M. J., Karim Y., Tungekar M. F., Abbs I., Khamashta M. A., D'Cruz D., Hughes G. R. Anti-dsDNA anti-Sm antibodies, and the lupus anticoagulant: significant factors associated with lupus nephritis. *Ann Rheum Dis*, 2003, 62, 556-560.
118. Okamura M., Kanayama Y., Amastu K., Negoro N., Kohda S., Takeda T., Inoue T. Significance of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to double stranded and single stranded DNA in patients with lupus nephritis: correlation with severity of renal histology. *Ann Rheum Dis*, 1993, 52, 14-20.
119. Nasiri S., Karimifar M., Bonakdar Z. S., Salesi 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.
120. 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.
121. Niemir Z. I., Wągrowaska-Danilewicz M. Zmiany w nerkach w toczniu rumieniowatym układowym. *Pol Merk Lek*, 2010, 28, 144-151.
122. Levey A.S., Gassman J.J., Hall P.M., Walker W.G. Assessing the progression of renal disease in clinical studies: effects of duration of follow-up and

- regression to the mean. Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) Study Group. *J Am Soc Nephrol*, 1991, 1,1087-1094.
123. Dworacki G., Sikora J., Mizera-Nyczak E., Trybus M., Mozer-Lisewska I., Czyż A., Żeromski J. Flow cytometric analysis of CD35 and CD59 expression on blood cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Folia Histochem Cytobiol*, 2005, 43, 117-120.
 124. Satoh H., Yokota E., Tokiyama K., Kawaguchi T., Niho Y. Distribution of the *HindIII* restriction fragment length polymorphism among patients with systemic lupus erythematosus with different concentrations of CR1. *Ann Rheum Dis*, 1991, 50, 765-768.
 125. Moldenhauer F., David J., Fielder A. H., Lachmann P. J., Walport M. J. Inherited deficiency of erythrocyte complement receptor type 1 does not cause susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1987, 30, 961-966.
 126. Cohen J. H., Lutz H. U., Pennaforte J. L., Bouchard A., Kazatchkine M. D. Peripheral catabolism of CR1 (the C3b receptor, CD35) on erythrocytes from healthy individuals and patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Immunol*. 1992, 87, 422-428.
 127. Miyakawa Y., Yamada A., Kosaka A., Tsuda F., Kosugi E., Mayumi M. Defective immune-adherence (C3b) receptor on erythrocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Lancet*, 1981, 5, 493-497.
 128. Sim E., Sim R. B. Enzymic assay of C3b receptor on intact cells and solubilized cells. *Biochem J*, 1983, 210, 567-576.
 129. Wilson J. G., Jack R. M., Wong W. W., Schur P. H., Fearon D. T. Autoantibody to the C3b/C4b receptor and absence of this receptor from erythrocytes of a patient with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.*, 1985, 76, 182-190.
 130. Singh V., Mahoney J. A., Petri M. Erythrocyte C4d and complement receptor 1 in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*, 2008, 35, 1989-1993.
 131. Hogg N., Ross G. D., Jones D. B., Slusarenko M., Walport M. J., Lachmann P. J. Identification of an anti-monocyte monoclonal antibody that is specific for membrane complement receptor type one (CR1). *Eur J Immunol*, 1984, 14, 236-243.

132. O'Shea J. J., Brown E. J., Gaither T. A., Takahashi T., Frank M. M. Tumor promoting phorbol esters induce rapid internalization of the C3b receptor via a cytoskeleton-dependent mechanism. *J Immunol*, 1985, 135, 1325-1330.
133. Berger M., Sorensen R. U., Tosi M. F., Dearborn D. G., Doring G. Complement receptor expression on neutrophils at an inflammatory site, the *Pseudomonas*-infected lung in cystic fibrosis. *J Clin Invest*, 1989, 84, 1302-1313.
134. Nakahara R., Takemura S., Onodera H., Kasamatsu Y., Seto N., Ichio N., Doi T., Nakanishi S., Okamoto M., Yanagoda K., Ueda M., Deguchi M., Kondo M. Effect of macrophage colony-stimulating factor on complement receptors and complement regulatory proteins on human peripheral white blood cells. *Arerugi*, 1996, 45, 1256-1261.
135. Voynova E., Tchorbanov A., Prechl J., Nikolova M., Beleva M., Erdei A., Vassilev T. An antibody-based construct carrying DNA-mimotope and targeting CR1 (CD35) selectively suppresses human autoreactive B-lymphocytes. *Immunol Lett*, 2008, 116, 168-173.
136. Jacob N., Stohl W. Autoantibody-dependent and autoantibody-independent roles for B-cells in systemic lupus erythematosus: past, present, and future. *Autoimmunity*, 2010, 43, 84-97.
137. Erdei A., Isaak A., Torok K., Sandor N., Kremlitzka M., Prechl J., Bajtay Z. Expression and role of CR1 and CR2 on B and T lymphocytes under physiological and autoimmune conditions. *Mol Immunol*, 2009, 46, 2767-2773.
138. Prokopec K. J., Rhodiner M., Matt P., Lindqvist U., Kleinau S. Down regulation of Fc and complement receptors on B cells in rheumatoid arthritis. *Clin Immunol*, 2010, 137, 322-329.
139. Isaak A., Gergely P. Jr, Szekeres Z., Prechl J., Poor G., Erdei A., Gergely J. Physiological up-regulation of inhibitory receptors Fc gamma RII and CR1 on memory B cells is lacking in SLE patients. *Int Immunol*, 2008, 20, 185-192.
140. Prodeus A. P., Goerg S., Shen L. M., Pozdnyakova O. O., Chu L., Alicot E. M., Goodnow C. C., Carroll M. C. A critical role for complement in maintenance of self-tolerance. *Immunity*, 1998, 9, 721-731.

141. Nilsson K. E., Andren M., de Stahl T. D., Kleinau S. Enhanced susceptibility to low-dose collagen-induced arthritis in CR1/2-deficient female mice-possible role of estrogen on CR1 expression. *FASEB J*, 2009, 23, 2450-2458.
142. Iking-Konert C., Stocks S., Weinsberg F. First clinical trials of a new heteropolymer technology agent in normal healthy volunteers and patients with systemic lupus erythematosus: safety and proof of principle of the antigen-heteropolymer ETI-104. *Ann Rheum Dis*, 2004, 63, 1104-1112.
143. Verma J., Arora V., Marwaha V., Kumar A., Das N. Association of leukocyte CR1 gene transcription with the disease severity and renal involvement in systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 2005, 14, 273-279.
144. Al-Janadi M., al-Balla S., al-Dalaan A., Raziuddin S. Cytokine profile in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other rheumatic diseases. *J Clin Immunol*, 1993, 13, 58-67.
145. Torsteinsdóttir I., Arvidson N. G., Hällgren R., Håkansson L. Monocyte activation in rheumatoid arthritis (RA): increased integrin, Fc γ and complement receptor expression and the effect of glucocorticoids. *Clin Exp Immunol*, 1999, 115, 554-560.
146. Boumpas D. T., Chrousos G. P., Wilder R. L., Cupps T. R., Balow J. E. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann Intern Med*, 1993, 119, 1198-1208.
147. de Waal R. M. W. The anti-inflammatory activity of glucocorticoids. *Mol Biol Rep*, 1994, 19, 81-88.
148. Laroche F., Kahan A., Letrait M., Cohen C., Jamin P., Strauch G. Ketoprofen and prednisolone do not modulate neutrophil CR1, CR3 and Fc γ RIII expression in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol*, 1994, 38, 441-445.
149. Jansson L., Holmdahl R. Estrogen-mediated immunosuppression in autoimmune diseases. *Inflamm Res*, 1998, 47, 290-301.
150. Ostensen M. Sex hormones and pregnancy in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ann NY Acad Sci*, 1999, 876, 131-143.
151. Jansson L., Holmdahl R. Oestrogen induced suppression of collagen arthritis. IV. Progesterone alone does not affect the course of arthritis but enhances the oestrogen-mediated therapeutic effect. *J Reprod Immunol*, 1989, 15, 141-150.

152. Csipo I., Kiss E., Bako E., Szegedi G., Kawai M. Soluble complement receptor 1 (CD35) bound to immune complexes in sera of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 2005, 52, 2950-2951.
153. Levinsky R. J., Cameron J. S., Soothill J. F. Serum immune complexes and disease activity in lupus nephritis. *Lancet*, 1977, 1, 564-567.

9. Spis rycin

- **Ryc. 1.** Schemat aktywacji układu dopełniacza-str. 13
- **Ryc. 2.** Budowa receptora CR1 (allel A)-str. 17
- **Ryc. 3.** Zasada metody oznaczania sCR1 w surowicy-str. 44
- **Ryc. 4a.** Metoda bramkowania subpopulacji leukocytów w cytometrii przepływowej z użyciem przeciwciał przeciwko CD45, CD 15, CD14, CD19 i CD35-str. 51
- **Ryc. 4b.** Bramkowanie erytrocytów (populacja CD45-) w cytometrii przepływowej-str. 52
- **Ryc. 5.** Produkt PCR otrzymany przy użyciu starterów dla intronu 27 w obrębie genu CR1 o długości 1633pz-str. 54
- **Ryc. 6a.** Żel obrazujący możliwe wersje polimorfizmu rs11118133 genu CR1 przy użyciu enzymu restrykcyjnego *HindIII* -str. 55
- **Ryc. 6b.** Sekwencja nukleotydów w uzyskanym produkcie PCR-str. 56
- **Ryc. 7.** Częstość występowania genotypu HH, HL, LL w GC, K, PKZN, TZN, aTZN i naTZN-str. 58
- **Ryc. 8.** Porównanie ekspresji receptora CR1 na poszczególnych typach komórek krwi u osób z różnymi genotypami *HindIII* CR1 w całej badanej populacji-str. 61
- **Ryc. 9a.** Porównanie ekspresji receptora CR1 na poszczególnych typach komórek krwi u osób z genotypami HH, HL, LL w grupie K-str. 62
- **Ryc. 9b.** Porównanie ekspresji receptora CR1 na poszczególnych typach komórek krwi u osób z genotypami HH, HL, LL u chorych na PKZN-str. 63
- **Ryc. 9c.** Porównanie ekspresji receptora CR1 na poszczególnych typach komórek krwi u osób z genotypami HH, HL, LL u chorych na TZN-str. 63
- **Ryc. 10a.** Średnia ekspresja CR1 na komórkach krwi w grupie Ki u chorych na PKZN i TZN-str. 76

- **Ryc. 10b.** Średnia ekspresja CR1 na komórkach krwi w grupie K i u chorych na PKZN, naTZN i aTZN-str. 77
- **Ryc. 11a.** Porównanie ekspresji G-CR1 u chorych na PKZN i TZN oraz w grupie K z uwzględnieniem płci i wieku badanych-str. 78
- **Ryc. 11b.** Porównanie ekspresji G-CR1 u chorych na PKZN, aTZN i naTZN oraz w grupie K z uwzględnieniem płci i wieku badanych-str. 78
- **Ryc. 12a.** Porównanie ekspresji M-CR1 u chorych na PKZN i TZN oraz w grupie K z uwzględnieniem płci i wieku badanych-str. 79
- **Ryc. 12b.** Porównanie ekspresji M-CR1 u chorych na PKZN, aTZN i naTZN oraz w grupie K z uwzględnieniem płci i wieku badanych-str.79
- **Ryc. 13a.** Porównanie ekspresji B-CR1 u chorych na PKZN i TZN oraz w grupie K z uwzględnieniem płci i wieku badanych-str. 80
- **Ryc. 13b.** Porównanie ekspresji B-CR1 u chorych na PKZN, aTZN i naTZN oraz w grupie K z uwzględnieniem płci i wieku badanych-str. 80
- **Ryc. 14a.** Porównanie ekspresji E-CR1 u chorych na PKZN i TZN oraz w grupie K z uwzględnieniem płci i wieku badanych-str. 81
- **Ryc. 14b.** Porównanie ekspresji E-CR1 u chorych na PKZN, aTZN i naTZN oraz w grupie K z uwzględnieniem płci i wieku badanych-str. 81
- **Ryc. 15a.** Porównanie stężeń sCR1 w surowicy w grupie K i u chorych na PKZN i TZN-str. 82
- **Ryc. 15b.** Porównanie stężeń rozpuszczalnego receptora sCR1 w surowicy w grupie K i u chorych na PKZN, aTZN i naTZN-str. 83
- **Ryc. 16a.** Porównanie stężeń sCR1 w surowicy w grupie K i u chorych na PKZN i TZN z uwzględnieniem płci i wieku-str. 84
- **Ryc. 16b.** Porównanie stężeń sCR1 w surowicy w grupie K i u chorych na PKZN i TZN z uwzględnieniem płci i wieku-str. 84
- **Ryc. 17a.** Porównanie stężeń sCR1 w surowicy w grupie GC u osób z różnymi genotypami (HH, HL, LL)-str. 85

- **Ryc. 17b.** Porównanie stężeń sCR1 w surowicy w grupie K i u chorych na PKZN i TZN między osobami z różnymi genotypami (HH, HL, LL)-str. 86
- **Ryc. 18a.** Porównanie stężeń składnika dopełniacza C3 w surowicy zdrowych i chorych na PKZN, naTZN i aTZN-str. 92
- **Ryc. 18b.** Porównanie stężeń składnika dopełniacza C3 w surowicy zdrowych i chorych na różne postacie morfologiczne PKZN- str. 93
- **Ryc. 19a.** Porównanie stężeń składnika dopełniacza C4 w surowicy zdrowych i chorych na PKZN, naTZN i aTZN- str. 94
- **Ryc. 19b.** Porównanie stężeń składnika dopełniacza C4 w surowicy zdrowych i chorych na różne postacie morfologiczne PKZN-str. 94
- **Ryc. 20a.** Korelacja pomiędzy stężeniem C3 a stężeniem sCR1 w surowicy chorych na TZN-str. 95
- **Ryc. 20b.** Korelacje pomiędzy stężeniem C4 a stężeniem sCR1 w surowicy chorych na TZN- str. 96
- **Ryc. 21.** Korelacja pomiędzy stężeniem sCR1 w surowicy i punktacją w skali SLEDAI-2K u chorych na TZN-str. 96
- **Ryc. 22.** Porównanie ekspresji CR1 na komórkach krwi chorych na PKZN leczonych i nieleczonych glikokortykosteroidami-str. 108
- **Ryc. 23.** Porównanie stężenia sCR1 w surowicy chorych na PKZN leczonych i nieleczonych glikokortykosteroidami-str. 109

10. Spis tabel

- **Tab. 1.** Dane morfologiczne, kliniczne i biochemiczne chorych na PKZN-str. 34
- **Tab. 2.** Dane morfologiczne, kliniczne i biochemiczne chorych na TZN-str. 35
- **Tab. 3.** Zasady przyznawania punktacji w skali SLEDAI-2K-str. 37
- **Tab. 4.** Charakterystyka kliniczna i immunologiczna chorych na aTZN i naTZN w czasie pobierania krwi-str. 38
- **Tab. 5.** Leczenie w grupach chorych na PKZN, aTZN, naTZN w ciągu ostatniego miesiąca poprzedzającego pobranie krwi-str. 39
- **Tab. 6.** Zakres wartości referencyjnych dla określonych parametrów biochemicznych, morfologicznych i immunologicznych-str. 41
- **Tab. 7.** Etapy amplifikacji DNA w obrębie intronu 27 genu CR1 metodą PCR-str. 46
- **Tab. 8.** Równanie Hardy'ego-Weinberga dla częstości występowania genotypów polimorfizmu *HindIII* CR1-str. 59
- **Tab. 9.** Model regresji logistycznej dotyczący częstości występowania genotypów *HindIII* CR1 i ryzyka zachorowania na PKZN i TZN-str. 60
- **Tab. 10.** Granice podziału na niską (n), średnią (s), i wysoką (w) ekspresję CR1 na poszczególnych populacjach badanych komórek w grupie K-str.64
- **Tab. 11a.** Model regresji logistycznej dotyczący wpływu polimorfizmu rs11118133 na ekspresję G-CR1 w GC-str. 66
- **Tab. 11b.** Model regresji logistycznej dotyczący wpływu polimorfizmu rs11118133 na ekspresję M-CR1 w GC-str. 67
- **Tab. 11c.** Model regresji logistycznej dotyczący wpływu polimorfizmu rs11118133 na ekspresję B-CR1 w GC-str. 68
- **Tab. 11d.** Model regresji logistycznej dotyczący wpływu polimorfizmu rs11118133 na ekspresję E-CR1 w GC-str. 69

- **Tab. 12.** Model regresji logistycznej dotyczący wpływu polimorfizmu rs11118133 na ekspresję G-CR1 w grupie K-str. 70
- **Tab. 13a.** Model regresji logistycznej dotyczący wpływu polimorfizmu rs11118133 na ekspresję G-CR1 u chorych na PKZN-str. 71
- **Tab. 13b.** Model regresji logistycznej dotyczący wpływu polimorfizmu rs11118133 na ekspresję M-CR1 w PKZN-str. 72
- **Tab. 13c.** Model regresji logistycznej dotyczący wpływu polimorfizmu rs11118133 na ekspresję B-CR1 w PKZN-str. 73
- **Tab. 14a.** Model regresji logistycznej dotyczący wpływu polimorfizmu rs11118133 na ekspresję G-CR1 w TZN-str. 74
- **Tab. 14b.** Model regresji logistycznej dotyczący wpływu polimorfizmu rs11118133 na ekspresję B-CR1 w TZN-str. 75
- **Tab. 15.** Granice podziału na niskie (n), średnie (s) i wysokie (w) stężenia sCR1 w grupie K-str. 86
- **Tab. 16a.** Model regresji logistycznej dotyczący wpływu genotypów polimorfizmu rs11118133 na stężenie sCR1 w surowicy w GC-str. 88
- **Tab. 16b.** Model regresji logistycznej dotyczący wpływu genotypów polimorfizmu rs11118133 na stężenie sCR1 w surowicy w grupie K-str. 89
- **Tab. 16c.** Model regresji logistycznej dotyczący wpływu genotypów polimorfizmu rs11118133 na stężenie sCR1 w surowicy w PKZN-str. 90
- **Tab. 16d.** Model regresji logistycznej dotyczący wpływu genotypów polimorfizmu rs11118133 na stężenie sCR1 w surowicy w TZN- str. 91
- **Tab. 17a.** Model regresji wielorakiej dla grupy K-str. 99
- **Tab. 17b.** Model regresji wielorakiej dla grupy PKZN-str. 100
- **Tab. 17c.** Model regresji wielorakiej dla grupy TZN-str. 101
- **Tab. 17d.** Model regresji wielorakiej dla grupy PKZN i TZN analizowanych łącznie-str. 102

- **Tab. 18a.** Wyniki wieloczynnikowej wstecznej analizy logistycznej wpływu polimorfizmu rs11118133 na ekspresję CR1 na komórkach krwi oraz stężenie sCR1 w surowicy w GC-str. 104
- **Tab. 18b.** Wyniki wieloczynnikowej wstecznej analizy logistycznej wpływu polimorfizmu rs11118133 na ekspresję CR1 na komórkach krwi oraz stężenie sCR1 w surowicy w GC- str. 104
- **Tab. 18c.** Wyniki wieloczynnikowej wstecznej analizy logistycznej wpływu polimorfizmu rs11118133 na ekspresję CR1 na komórkach krwi oraz stężenie sCR1 w surowicy w GC- str. 105
- **Tab. 19a.** Wyniki wieloczynnikowej wstecznej analizy logistycznej wpływu polimorfizmu rs11118133 na ekspresję CR1 na komórkach krwi oraz stężenie sCR1 w surowicy w grupie K-str. 106
- **Tab. 19b.** Wyniki wieloczynnikowej wstecznej analizy logistycznej wpływu polimorfizmu rs11118133 na ekspresję CR1 na komórkach krwi oraz stężenie sCR1 w surowicy w grupie K-str. 106
- **Tab. 20a.** Wyniki wieloczynnikowej wstecznej analizy logistycznej wpływu polimorfizmu rs11118133 na ekspresję CR1 na komórkach krwi oraz stężenie sCR1 w surowicy u chorych na PKZN-str. 107
- **Tab. 20b.** Wyniki wieloczynnikowej wstecznej analizy logistycznej wpływu polimorfizmu rs11118133 na ekspresję CR1 na komórkach krwi oraz stężenie sCR1 w surowicy u chorych na PKZN-str. 107
- **Tab. 21a.** Wyniki wieloczynnikowej wstecznej analizy logistycznej wpływu leczenia glikokortykoidami na ekspresję CR1 na komórkach krwi i stężenie sCR1 w surowicy chorych na PKZN i TZN-str. 110
- **Tab. 21b.** Wyniki wieloczynnikowej wstecznej analizy logistycznej wpływu leczenia glikokortykoidami na ekspresję CR1 na komórkach krwi i stężenie sCR1 w surowicy chorych na PKZN i TZN-str. 110
- **Tab. 22a.** Wyniki wieloczynnikowej wstecznej analizy logistycznej uwzględniającej aktywność TRU mierzoną w skali SLEDAI-2K w powiązaniu z ekspresją CR1 na komórkach krwi i stężeniem sCR1 w surowicy chorych na TZN-str. 112
- **Tab. 22b.** Wyniki wieloczynnikowej wstecznej analizy logistycznej uwzględniającej aktywność TRU mierzoną w skali SLEDAI-2K w

powiązaniu z ekspresją CR1 na komórkach krwi i stężeniem sCR1 w surowicy chorych TZN-str. 112

11. Streszczenie

Analiza ekspresji receptora CR1 na komórkach krwi chorych na pierwotne i wtórne kłębuszkowe zapalenia nerek (KZN)

CR1, (CD35, C3bR), błonowy receptor dla składników C3b/C4b dopełniacza występuje na większości komórek krwi, m. in. na erytrocytach (E-CR1), granulocytach (G-CR1), monocytach (M-CR1) i limfocytach B (B-CR1), a w kłębuszku nerkowym na podocytach. Ponad 90% krążącego CR1 jest związane z erytrocytami. CR1 zbudowany jest z pojedynczego łańcucha glikoproteinowego składającego się z części zewnątrzkomórkowej, przezbłonowej i cytoplazmatycznej. W surowicy i w moczu wykrywana jest rozpuszczalna forma CR1 (sCR1), pozbawiona części przezbłonowej i cytoplazmatycznej. Źródłem sCR1 mogą być erytrocyty i leukocyty. CR1 pełni wiele funkcji. Reguluje kaskadę aktywacji układu dopełniacza (UD) poprzez hamowanie konwertazy C3 i C5. Działa również jako kofaktor czynnika I. Pełni ważną rolę w usuwaniu kompleksów immunologicznych (KI). Ułatwia fagocytozę KI opłaszczonych składnikami dopełniacza przez komórki żerne (G-CR1 i M-CR1). E-CR1 stanowi główny mechanizm transportowy dla KI, które, związane z C3b i C4b, transportowane są za pomocą E-CR1 do wątroby i śledziony i dalej metabolizowane przez komórki żerne. B-CR1 bierze udział w regulacji proliferacji limfocytów B i modulacji odpowiedzi limfocytów B na bodźce antygenowe.

Liczba E-CR1 może różnić się 10-krotnie u poszczególnych osób. Poprzednie badania sugerowały, że ekspresja E-CR1 jest genetycznie uwarunkowana i koreluje z występowaniem dwóch alleli: allelu H (high expression) związanego z wysoką ekspresją E-CR1 i allelu L (low expression) odpowiadającego niskiej ekspresji E-CR1. Za zjawisko to odpowiedzialny ma być polimorfizm rs11118133 związany z pojedynczą wymianą adeniny na tyminę w obrębie intronu 27 genu CR1. Dwa autosomalne kodominujące allele mogą dać trzy warianty genotypów: dwie homozygoty HH i LL, korespondujące odpowiednio z wysoką i niską ekspresją E-CR1 oraz heterozygota HL związana z ekspresją pośrednią.

Niektóre badania wykazały obniżoną ekspresję CR1 na erytrocytach, leukocytach i podocytach u chorych na toczeń rumieniowaty układowy (TRU), co wiązano z rozwojem choroby. Dotychczasowe badania nie wyjaśniły,

czy obniżenie ekspresji E-CR1 jest uwarunkowane genetycznie, czy też jest nabyte. Pojedyncze doniesienia wskazują na częstsze występowanie alellu L u chorych na TRU. Do tej pory nie przeprowadzono jednak badań, które oceniałyby wpływ polimorfizmu rs11118133 na ekspresję CR1 na leukocytach u chorych na TRU.

Celem podjętych badań była ocena częstości występowania poszczególnych genotypów polimorfizmu rs11118133, ilościowa ocena i porównanie ekspresji CR1 na komórkach krwi oraz stężenia sCR1 w surowicy osób zdrowych i chorych na pierwotne i toczniowe KZN. Materiał do badań stanowiła krew obwodowa 291 osób (174 kobiety), w tym: 150 chorych (68 kobiet) na pierwotne kłębuszkowe zapalenie nerek (PKZN) w wieku 35 (18-74) lat, 66 chorych (57 kobiet) na toczniowe zapalenie nerek (TZN) w wieku 32 (18-73) lat oraz 75 zdrowych ochotników (49 kobiet) w wieku 38 (21-58) lat służących jako grupa kontrolna (K). Rozpoznanie pierwotnego i toczniowego KZN poparte było wynikiem badania histopatologicznego i immunopatologicznego bioptatu nerki. Szesnastu chorych bez biopsji nerki w grupie TZN spełniało kryteria kliniczne i biochemiczne wykładników uszkodzenia nerek. Do określenia aktywności TRU użyto skali SLEDAI-2K (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000). Trzydziestu trzech chorych na TZN było w aktywnej fazie choroby-aTZN (punktacja SLEDAI-2K ≥ 10 , mediana 16), pozostałych 33 pacjentów z grupy TZN- w fazie nieaktywnej (naTZN) (punktacja SLEDAI-2K < 10 , mediana 4).

Ekspresję CR1 na komórkach krwi oceniano za pomocą cytometrii przepływowej z zastosowaniem specyficznych znakowanych przeciwciał przeciw CD35. Do bramkowania poszczególnych populacji komórek użyto znakowanych przeciwciał przeciw CD14 (monocyty), CD15 (granulocyty), CD19 (limfocyty B) oraz przeciw CD45 (wszystkie leukocyty). Populacja CD45 ujemna i wykazująca świecenie glikoforyny A została uznana za erytrocyty. Ekspresja E-CR1 była oceniana na dodatkowych, nielizowanych próbkach krwi. Dane zostały wyrażone jako średnia intensywność fluorescencji (MFI, Mean Fluorescence Intensity). Do oceny polimorfizmu rs11118133 u osób badanych wykorzystano technikę RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Namnożony DNA z użyciem metody PCR i par starterów specyficznych dla intronu 27 w obrębie genu CR1 cięto z wykorzystaniem enzymu restrykcyjnego *HindIII*. W zależności od długości otrzymanych prążków po rozdiale elektroforetycznym chorych kwalifikowano do grupy z genotypem HH (1546 i 87 pz), HL (1546, 1081, 465 i 87 pz) bądź LL

(1081, 465 i 87 pz). Stężenie sCR1 w surowicy oznaczono metodą immunoenzymatyczną C3bR ELISA.

Wyniki badań wykazały, że częstość występowania genotypów HH, HL i LL nie różniła się istotnie statystycznie pomiędzy grupami K, PKZN i TZN ($p=0,77$) i grupami K, PKZN, aTZN, naTZN ($p=0,76$). Zarówno w całej badanej populacji (GC), jak i w poszczególnych podgrupach (K, PKZN i TZN) najczęściej występował genotyp HH, najrzadziej LL. Rozkład genotypów polimorfizmu rs 11118133 spełniał wymogi równania Hardy'ego-Weinberga zarówno w grupie K, jak i chorych na PKZN i TZN. W całej badanej grupie (GC), osoby z genotypem LL wykazywały największą ekspresję G-CR1, M-CR1 i B-CR1 w porównaniu do grupy osób z genotypem HH. Różnice te były statystycznie znamienne pomiędzy grupami HH i LL (dla G-CR1 $p<0,01$, natomiast dla M-CR1 i B-CR1 $p<0,05$). Grupa osób z genotypem HL wykazywała pośrednią ekspresję G-CR1, M-CR1 i B-CR1 w porównaniu do grupy HH i LL (bez różnic istotnych statystycznie). Nie stwierdzono natomiast różnic w ekspresji CR1 na erytrocytach pomiędzy wspomnianymi grupami. U chorych na PKZN statystycznie znamienne różnice w ekspresji CR1 pomiędzy grupą HH i LL stwierdzono na granulocytach ($p<0,05$) i limfocytach B ($p<0,05$). Różnice te były również widoczne na monocytach, ale nie były istotne statystycznie. W tej grupie chorych, podobnie jak w GC, najwyższą ekspresję CR1 wykazywały leukocyty u osób z genotypem LL, pośrednią z HL, a najmniejszą z HH. Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic w ekspresji G-CR1, M-CR1 i B-CR1 pomiędzy osobami z różnymi genotypami w K i TZN. W grupie K można jednak było zauważyć tendencję do wyższej ekspresji G-CR1, M-CR1 i B-CR1 u osób z genotypem LL. Podobnie, w grupie TZN genotyp LL predysponował do wyższej ekspresji G-CR1 i M-CR1. Nie odnotowano różnic pomiędzy ekspresją E-CR1 u osób z różnymi genotypami w obrębie badanych podgrup.

Porównanie średniej ekspresji CR1 na komórkach krwi w grupach K, PKZN i TZN niezależnie od genotypu wykazało niższą ekspresję G-CR1 i B-CR1 u chorych na TZN w stosunku do grupy kontrolnej (odpowiednio: $p<0,05$ i $p<0,001$). Ekspresja B-CR1 u chorych na TZN była również istotnie niższa w stosunku do wyników otrzymanych w grupie PKZN ($p<0,01$). Obniżenie B-CR1 pozostawało nadal statystycznie istotnie niższe pomiędzy grupą z aktywnym TZN (aTZN) i K ($p<0,01$) oraz grupą z nieaktywnym TZN (naTZN) i K ($p<0,05$). Nie stwierdzono jednak

różnic pomiędzy ekspresją B-CR1 w aTZN i naTZN. Nie wykryto też istotnych statystycznie różnic w ekspresji M-CR1 i E-CR1 pomiędzy badanymi grupami. Porównanie ekspresji CR1 na komórkach krwi kobiet i mężczyzn, bez względu na posiadany genotyp, nie wykazało istotnych statystycznie różnic w ekspresji G-CR1, M-CR1, B-CR1 i E-CR1 pomiędzy badanymi podgrupami.

Porównanie stężeń sCR1 w surowicy osób badanych wykazało wyższe stężenia w grupie chorych na TZN. Osiągnęły one jednak statystyczną istotność przy podziale grupy na aTZN i naTZN. Zaobserwowano wówczas znamienne wyższe stężenia sCR1 w grupie aTZN w porównaniu z naTZN ($p < 0,05$), PKZN ($p < 0,01$) i K ($p < 0,01$). W całej badanej grupie, podzielonej na HH, HL i LL, najniższe stężenia sCR1 wykazano u osób z genotypem HL i statystycznie istotną różnicę względem grupy HH ($p < 0,01$). Stężenie sCR1 w grupie LL wykazywało pośrednie wartości, bez statystycznie istotnych różnic w porównaniu z grupą HH i HL. Przy uwzględnieniu podziału na K, PKZN i TZN, znamienne statystycznie obniżenie stężenia sCR1 u osób z genotypem HL obserwowane było tylko w PKZN ($p < 0,01$) w porównaniu z osobami z genotypem HH. Nie stwierdzono różnic w stężeniu sCR1 u osób z różnymi genotypami w K i TZN, jednakże zaobserwowano tendencję do wyższych stężeń sCR1 u osób z grupy K z genotypem HL, w porównaniu z HH i LL.

Nie stwierdzono statystycznie istotnych korelacji pomiędzy stężeniem sCR1 w surowicy a ekspresją G-CR1, M-CR1, B-CR1 i E-CR1 w badanych podgrupach. Nie wykazano również znamienych korelacji pomiędzy stężeniem sCR1 a stężeniami składników C3 i C4 dopełniacza w surowicy chorych na PKZN i osób z grupy K. Wykazano natomiast istotne statystycznie ujemne korelacje pomiędzy stężeniem sCR1 a stężeniem C3 ($r = -0,269$, $p < 0,05$) i C4 ($r = -0,319$, $p < 0,001$) w surowicy chorych na TZN. U chorych na TZN stężenie sCR1 korelowało też istotnie z punktacją w skali SLEDAI-2K ($r = 0,2579$, $p < 0,05$). Nie wykazano korelacji pomiędzy stężeniem sCR1 a stężeniem przeciwciał przeciw dsDNA w grupie TZN oraz między sCR1 a stężeniem kreatyniny w surowicy i wielkością filtracji kłębuszkowej w grupie TZN i PKZN. Nie stwierdzono też istotnych korelacji pomiędzy stężeniami C3 i C4 w surowicy a ekspresją G-CR1, M-CR1, B-CR1 i E-CR1 w badanych grupach.

U chorych na PKZN leczonych glikokortykosteroidami zaobserwowano istotnie statystycznie niższą ekspresję M-CR1 ($p < 0,05$) oraz tendencję do wyższego

stężenia sCR1 w surowicy (wynik nieistotny statystycznie) w porównaniu z grupą chorych nieleczonych.

Wyniki przeprowadzonych badań pozwalają na stwierdzenie, że częstość występowania poszczególnych genotypów, wynikających z polimorfizmu rs11118133 genu CR1 w obrębie intronu 27, jest u chorych na toczeniowe i pierwotne KZN zbliżona do obserwowanej w grupie kontrolnej. Polimorfizm ten ma wpływ na ekspresję CR1 na leukocytach krwi i stężenie sCR1 w surowicy osób zdrowych i chorych, ale nie wykazuje związku z rozwojem PKZN i TZN. Niższa ekspresja CR1 na limfocytach B i granulocytach chorych na TZN może wskazywać, że niedobór tego receptora predysponuje do rozwoju TZN. Wysokie stężenia sCR1 wraz z uzyskanymi korelacjami między sCR1 a stężeniami składników dopełniacza C3 i C4 oraz skalą SLEDAI-2K u chorych na TZN wydają się wskazywać na sCR1 jako potencjalny marker aktywności TRU.

12. Summary

The analysis of CR1 expression on blood cells in patients with primary and secondary glomerulonephritis (PGN)

CR1 (CD35, C3bR), a membrane receptor for C3b/C4b complement components, is differentially expressed on most of peripheral blood cells like erythrocytes (E-CR1), granulocytes (G-CR1), monocytes (M-CR1), B-lymphocytes (B-CR1) and in the glomerulus, on podocytes. About 90% of the total circulating CR1 is bound to the erythrocytes. It is a single chain glycoprotein consisting of the extracellular, transmembrane and cytoplasmic domains. Soluble form of CR1 (sCR1), lacking the transmembrane and cytoplasmic domains, is present in the serum and in the urine (uCR1). The source of sCR1 are probably erythrocytes and blood leukocytes. CR1 serves many regulatory functions. It regulates the complement cascade activation by preventing formation of classical and alternative pathway convertases and by acting as a cofactor for factor I. It plays an important role in the removal of ICs coated with C3b/C4b by phagocytes in the process of phagocytosis (G-CR1 and M-CR1). E-CR1 acts as a main vehicle for clearance of ICs. ICs opsonized with C3b/C4b and bound to E-CR1 are transported to the liver and spleen and metabolized there by phagocytes. B-CR1 regulates the B-cell tolerance and proliferation.

The level of E-CR1 expression may vary about 10-folds between individuals. In previous studies, E-CR1 expression was supposed to be genetically determined and linked to high (H) and low (L) expression alleles identified by the rs11118133 polymorphism corresponding to a single nucleotide polymorphism in the intron 27 with the substitution of adenine to thymine. Two autosomal co-dominant alleles may give three variants of genotype: two homozygotes HH and LL associated with, respectively, high and low expression of E-CR1 and heterozygote HL associated with intermediate expression of E-CR1.

Some studies showed the decreased expression of CR1 on erythrocytes, leukocytes and podocytes in patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE), what was supposed to be associated with the development of the disease. Intensive investigations have not yet resolved the problem, if it is inherited or acquired phenomenon. However, some studies have shown positive correlation of the L allele

with SLE. There are no investigations that would have examined the influence of the rs11118133 polymorphism on the level of CR1 expression on leukocytes in patients with SLE.

The aim of our study was the analysis of the frequency of the rs11118133 polymorphism and comparison of the CR1 expression on blood cells and concentration of sCR1 in serum of healthy individuals and patients with primary glomerulonephritides (PGN) and lupus nephritis (LN).

The whole blood samples were obtained from 291 individuals (174 women): 150 patients with PGN (68 women) aged 35 (18-74) years, 66 with LN (57 women) aged 32 (18-73) years, and 75 healthy volunteers (49 women) serving as a control group (C) -aged 38 (21-58) years. The diagnosis of primary and secondary GN was based on conventional morphological and immunopathological examinations of renal biopsy specimens. Sixteen patients with SLE were not biopsy-proven. However, they have fulfilled the clinical or biochemical criteria of renal involvement. The activity of the disease was determined by using the Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000 (SLEDAI-2K). Among 66 patients with LN, 33 were in active phase of the disease (aLN) (SLEDAI score ≥ 10 , median 16) and remaining 33 in inactive phase of the disease (inLN) (SLEDAI score < 10 , median 4).

For the evaluation of the CR1 expression on blood cells, the flow cytometry and specific labeled antibodies against CD35 were used. The following combinations of monoclonal antibodies were used for determination of main subpopulations of leukocytes: anti-CD14 for monocytes, anti-CD15 for granulocytes and anti-CD19 for B-cells. All leukocyte subpopulations were CD45 positive. Erythrocytes were determined as CD45 negative and glycophorin A positive population. Analysis of E-CR1 were performed on separate not lysed samples. Expression of CD35 molecules was quantified by the determination of mean fluorescence intensity (MFI). For the determination of the rs11118133 polymorphism, the RFLP (restriction fragment length polymorphism) method was used. The isolated DNA was amplified using specific primers for intron 27 in CR1 gene and polymerase chain reaction (PCR), and then digested with the *HindIII* restriction enzyme. *HindIII* RFLP products were electroforesed on a 1.5% agarose gel and individuals were classified into HH (two bands at 1546 and 87 bp observed), HL (four bands at 1546, 1081, 465

and 87 bp observed) or LL group (three bands at 1081, 465 and 87 bp observed). The level of sCR1 in serum was evaluated by C3bR ELISA.

The frequency of HH, HL and LL genotypes appearance did not differ significantly between C, PGN and LN ($p=0,77$), as well as between C, PGN, aLN and inLN ($p=0,76$). The prevalence of the HH genotype was the highest and LL genotype was the lowest in the whole examined group as well as in C, PGN and LN groups. The distribution pattern of HH and LL genotypes fulfilled the Hardy-Weinberg equilibrium in C, PGN and LN group. The highest expression of G-CR1, M-CR1 and B-CR1 was associated with the LL genotype, whereas the lowest one with the HH genotype in the whole examined group. There were statistically significant differences between HH and LL group in G-CR1 ($p<0,01$), M-CR1 ($p<0,05$) and B-CR1 ($p<0,05$). The HL genotype determined intermediate CR1 expression in comparison to HH and LL genotype, but the differences were not statistically significant. We did not observe any differences in E-CR1 between HH, HL and LL groups. In PGN, statistically significant difference in G-CR1 ($p<0,05$) and B-CR1 ($p<0,05$) between HH and LL group were found. The same tendency was noticed in M-CR1, however it was not significant. Within PGN, similarly to the whole examined group, the highest expression of CR1 was revealed on leukocytes of patients with LL genotype, while the intermediate CR1 expression was associated with HL and the lowest with HH genotype. No differences in the expression of G-CR1, M-CR1 and B-CR1 between individuals with different genotypes within C and LN group were found. However, there was a tendency to the highest expression of G-CR1, M-CR1 and B-CR1 in individuals with LL genotype in C, as well as for G-CR1 and M-CR1 expression in LL lupus patients. No differences in E-CR1 between participants with HH, HL and LL genotype in C, PGN and LN were found.

The analysis of the mean CR1 expression on examined blood cells in C, PGN and LN independently of the genotype revealed lower G-CR1 and B-CR1 in patients with LN in comparison to C ($p<0,05$ and $p<0,001$ for G-CR1 and B-CR1 respectively). The B-CR1 expression was significantly lower in LN patients, when compared to PGN group ($p<0,01$). The decrease in B-CR1 was clear and still statistically significant between aLN and C ($p<0,01$) as well as between inLN and C ($p<0,05$). No differences were observed in B-CR1 between aLN and inLN. No differences in M-CR1 and E-CR1 between individuals in C, PGN and LN were

noticed. Likewise, G-CR1 expression did not also differ between C, PGN, aLN and inLN. The comparison of male and female G-CR1, M-CR1, B-CR1 and E-CR1 in C, PGN and LN independently of genotype did not reveal differences between women and men population.

Increased concentration of serum sCR1 was noticed in patients with LN and it was the highest in aLN. The difference was statistically significant between aLN and C ($p<0,01$), aLN and PGN ($p<0,01$) and between aLN and inLN ($p<0,05$). Within the whole examined group divided into HH, HL and LL subgroups, the lowest concentration of sCR1 was found in individuals with the HL genotype. This finding was statistically lower than observed in HH group ($p<0,01$). sCR1 concentration in LL group revealed intermediate result, however without statistically important differences in comparison to HH and HL group. A significant decrease in sCR1 level in PGN patients with HL genotype in comparison to patients with HH genotype ($p<0,01$) was also observed. No significant changes in sCR1 concentration were noticed between individuals with different genotypes in C and LN. On the other hand, the tendency to higher levels of sCR1 was observed in subjects with HL in comparison to LL and HH genotype in C. This observation was not statistically significant.

No statistically important correlation between serum sCR1 and G-CR1, M-CR1, B-CR1 and E-CR1 were found in C, PGN and LN. Serum sCR1 also did not correlate with C3 and C4 serum level in C and PGN, while significant negative correlation appeared between sCR1 level and C3 ($r=-0,269$; $p<0,05$) and C4 concentration ($r=-0,319$; $p<0,001$) in LN. A significant correlation was also observed between sCR1 level and SLEDAI-2K score in LN ($r=0,2576$; $p<0,05$). However, no correlations between sCR1 level and anti-dsDNA concentration in LN, as well as between creatinine serum level and sCR1 in LN and PGN were found.

In patients with PGN treated with the glucocorticoid therapy we observed statistically significant decrease in the expression of M-CR1 ($p<0,05$) and the tendency to the increased serum level of sCR1 (the result not statistically significant) in comparison to the not treated patients.

The results of the studies showed that the frequency of the rs11118133 polymorphism was the same in patients with PGN, LN and C. This polymorphism may influence the CR1 expression on blood leukocytes and serum sCR1 level in healthy population and patient suffering from PGN and LN, however there was no

correlation between this polymorphism and the development of the lupus nephritis and primary glomerulonephritis. Lower B-CR1 and G-CR1 expression in LN patients suggests that the lack of this receptor may contribute to the development of SLE. Increased expression of serum sCR1 in aLN and correlations obtained between concentration of sCR1 and C3, sCR1 and C4, as well as sCR1 and SLEDAI-2K score in LN indicate that serum sCR1 may be a potential marker of lupus activity.