

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
КАТЕДРА ПО ВЪТРЕШНИ БОЛЕСТИ
КЛИНИКА ПО РЕВМАТОЛОГИЯ

д-р Добромир Иванов Танев

**ВЛИЯНИЕ НА НЯКОИ ХОРМОН-
РЕЦЕПТОРНИ ПОЛИМОРФИЗМИ ВЪРХУ
КЛИНИЧНАТА ИЗЯВА НА СИСТЕМНИЯ
ЛУПУС ЕРИТЕМАТОЗУС ПРИ ЖЕНИ**

АВТОРЕФЕРАТ

*на дисертационен труд за присъждане на
образователна и научна степен „Доктор”*

Научен ръководител: Проф. д-р Златимир Коларов, дмн

Научен консултант: Проф. д-р Филип Куманов, дмн

Научна специалност: 03.01.18 – Ревматология

София, 2015

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
КАТЕДРА ПО ВЪТРЕШНИ БОЛЕСТИ
КЛИНИКА ПО РЕВМАТОЛОГИЯ

д-р Добромир Иванов Танев

**ВЛИЯНИЕ НА НЯКОИ ХОРМОН-
РЕЦЕПТОРНИ ПОЛИМОРФИЗМИ ВЪРХУ
КЛИНИЧНАТА ИЗЯВА НА СИСТЕМНИЯ
ЛУПУС ЕРИТЕМАТОЗУС ПРИ ЖЕНИ**

АВТОРЕФЕРАТ

*на дисертационен труд за присъждане на
образователна и научна степен „Доктор”*

Научен ръководител: Проф. д-р Златимир Коларов, дмн

Научен консултант: Проф. д-р Филип Куманов, дмн

Научна специалност: 03.01.18 – Ревматология

София, 2015

Дисертационният труд съдържа 156 стандартни машинописни страници и е онагледен с 13 таблици и 40 фигури. Библиографската справка съдържа 215 литературни източника. Във връзка с дисертационния труд са направени 9 публикации и 6 участия в български и международни форуми (конгреси и конференции).

Материалите по защитата са на разположение в отдел „Наука” на Медицински факултет.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за представяне пред научно жури от Катедрата по вътрешни болести на Медицински университет, гр. София. Защитата на дисертационния труд ще се състои на 24.11.2015г. от 14 часа в аулата на УМБАЛ «Св. Ив. Рилски».

НАУЧНО ЖУРИ:

1. Проф. д-р Златимир Коларов, д.м.н., Клиника по ревматология, УМБАЛ „Ив. Рилски”, МУ –София
2. Проф. д-р Рашо Рашков, д.м.н., Клиника по ревматология, УМБАЛ „Ив. Рилски”, МУ – София
3. Доц. д-р Катя Тодорова, д.м., Началник на Клиника по ендокринология, УМБАЛ “Д-р Г. Странски” – Плевен; МУ Плевен
4. Доц. д-р Николай Николов, д.м., УМБАЛ “Д-р Г. Странски” – Плевен; МУ – Плевен
5. Доц. д-р Антоанета Тончева, д.м., Началник Клиника по вътрешни болести, НМТБ „Цар Борис III” - София

Резервни членове:

1. Доц. Алексей Савов, д.б., Национална Генетична Лаборатория, МУ – София
2. Доц. Катя Ковачева, д.м., Медицинска генетика, МУ – Плевен

СЪДЪРЖАНИЕ

Съдържание.....	5
Съкращения.....	6
Въведение.....	7
Цели и задачи.....	9
Материали и методи.....	10
Резултати.....	17
Обобщение.....	35
Основни изводи.....	40
Приноси.....	41
Публикации.....	43
Благодарности.....	45

Често използвани съкращения:

- AP - андрогенен рецептор*
- ГР - глюкокортикоиден рецептор*
- ГСПХ – глобулин, свързващ половите хормони*
- ДХЕА- дехидроепиандростерон*
- ДХЕАС- дехидроепиандростеронсулфат*
- ЕР – естрогенен рецептор*
- ЕР-α - естрогенен рецептор-алфа*
- ЕР-β - естрогенен рецептор-бета*
- МР –мелатонинов рецептор*
- ПР – прогестеронов рецептор*
- РА- ревматоиден артрит*
- СЛЕ- системен лупус еритематозус*
- ACR - американски колеж по ревматология*
- SAG – триплет цитозин – аденин - гуанин*
- IL-1 - интерлевкин-1*
- IL-4 - интерлевкин 4*
- IL-5 - интерлевкин-5*
- IL-6 - интерлевкин-6*
- IL-10 - интерлевкин 10*
- IL-12 - интерлевкин-12*
- IL-17 - интерлевкин-17*
- IL-21 - интерлевкин-21*
- SLEDAI - индекс за активност на СЛЕ*
- SLICC – индекс на хроничните увреди при СЛЕ*
- Th - Т-хелпер*
- VDR – рецептор за витамин D*

ВЪВЕДЕНИЕ

Системният лупус еритематозус (СЛЕ) е болест на съединителната тъкан, която засяга преди всичко жени в репродуктивна възраст. Въпреки множеството проучвания, етиологията и патогенезата на СЛЕ не са напълно проучени. Болестта се характеризира с производство на различни автоантитела и разнообразна клинична картина. Голямата честота на хроничните увреждания и високата смъртност при болните с лупус оправдава усилията за търсене на фактори, които да предскажат клиничното протичане на СЛЕ при всеки отделен пациент.

Патологичните промени в невроендокринната система са сред основните причини за развитие на автоимунни болести. Голямата честота на болни от лупус жени предполага особено силно въздействие на хормоналните фактори при СЛЕ. Литературните данни показват съществуването на редица ендокринни промени при болните с лупус (Таблица 1).

Таблица 1. Хормонални нарушения при болни със СЛЕ. ↓ - понижени в сравнение със здрави контроли. ↑ - повишени в сравнение със здрави контроли. N – подобни в сравнение със здрави контроли. ? – липсват данни.

Хормони	Жени със СЛЕ	Мъже със СЛЕ
Тестостерон	↓	N
ДХЕАС/ДХЕА	↓	↓
Естрадиол	↑	N
Прогестерон	↓	?
Кортизол	↓	↓
25-ОН-витамин Д	↓	↓
Мелатонин	?	?

Особено важно е промененото съотношение между различните хормони с имunosупресивни (андрогени, кортикостероиди, прогестерон), имуномодулиращи (мелатонин, витамин Д) и имуностимулиращи (естрогени и техни метаболити) ефекти. За разлика от хормоналните концентрации, ролята на хормоналните рецептори при СЛЕ е слабо проучена. В последните години широко се проучват различни полиморфизми в гените за хормонални рецептори, които могат да променят функцията на кодираните протеини.

Изясняването на връзката между ендокринната система, генетичните полиморфизми и автоимунните болести е основа за разработване на нови терапевтични стратегии. Освен това допълнителните проучвания биха подпомогнали изясняването на фундаменталните взаимоотношения между генетичния код, ендокринната и имунната система.

Краткият преглед на проучванията върху хормоналното влияние и хормон-рецепторните взаимодействия при СЛЕ показва, че в литературата съществуват редица неизяснени въпроси, като например:

- каква е ролята на рецепторните полиморфизми в гените за андрогенния и естрогенните рецептори за автоимунитета и развитието на СЛЕ;

- какво е влиянието на андроген-рецепторния и естроген-рецепторните полиморфизми върху появата и клиничните особености на СЛЕ;

- каква е ролята на рецепторните полиморфизми в гените за глюкокорикоидния рецептор и рецептора за витамин D за автоимунитета и развитието на СЛЕ;

- каква е ролята на мелатонина и на неговите рецептори за появата и клиничната картина на СЛЕ;

- какви са възможните терапевтични стратегии, основани върху ролята на съответните хормонални рецептори, в патогенезата на СЛЕ.

Всички тези неизяснени въпроси ни накараха да си поставим следните цели и задачи:

Цели на дисертационния труд:

- да се изясни влиянието на някои хормон-рецепторни полиморфизми в гените за андрогенния, естрогенния, прогестероновия, кортикостероидния и витамин D - рецепторите върху клиничните прояви и протичането на СЛЕ у жени;

- да се изясни ролята на хормона мелатонин и полиморфизмите в гена за мелатониновия рецептор 1B за клиничните прояви и протичането на СЛЕ у жени.

За осъществяване на тези цели си поставихме следните задачи:

1. Да се проучи ролята на (CAG)_n полиморфизма в гена за андрогенния рецептор за изявата и клиничното протичане на СЛЕ при жени;
2. Да се изясни ролята на PvuII T/C и XbaI A/G полиморфизмите на естрогенния рецептор алфа за изявата и клиничното протичане на СЛЕ при жени;
3. Да се проучи честотата на PROGINS полиморфизма в прогестероновия рецептор при здрави жени и болни от лупус и да се изясни ролята му за клиничните прояви на болестта при жени;
4. Да се проучи честотата на BclI и ER22/23EK полиморфизмите в кортикостероидния рецептор при здрави жени и болни от лупус и да се изясни ролята им за клиничните прояви на болестта при жени;
5. Да се изясни ролята на BsmI и FokI полиморфизмите на VDR за изявата и клиничното протичане на СЛЕ при жени;
6. Да се проучи честотата на полиморфизмите rs1562444, rs10830962 и rs10830963 в гена на мелатониновия рецептор 1B при здрави жени и болни от СЛЕ;
7. Да се проучи ролята на полиморфизмите на мелатониновия рецептор 1B - rs1562444, rs10830962 и rs10830963 за клиничната изява и протичането на СЛЕ;
8. Да се изясни ролята на мелатонина за изявата и клиничната картина на СЛЕ при жени.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Съобразно целите и задачите бяха извършени 7 подизследвания върху хомогенна група жени със СЛЕ и здрави контроли:

А. Определяне на полиморфизма на андрогенния рецептор и андрогените при жени с лупус;

Б. Определяне на PvuII T/C и XbaI A/G полиморфизмите на естрогенния рецептор алфа при пациентки със СЛЕ и здрави контроли;

В. Определяне на PROGINS полиморфизма на прогестероновия рецептор при пациентки със СЛЕ и здрави контроли;

Г. Определяне на VcII и ER22/23EK полиморфизмите на глюкокортикоидния рецептор при здрави жени и болни с лупус;

Д. Определяне на BsmI и FokI полиморфизмите на VDR при здрави жени и болни с лупус;

Е. Определяне на rs1562444, rs10830962 и rs10830963 полиморфизмите на мелатониновия рецептор 1B при здрави жени и болни с лупус;

Ж. Определяне на нивата на мелатонина при жени с лупус и здрави контроли.

А. Определяне на полиморфизма на андрогенния рецептор и андрогените при жени с лупус

В проучването бяха включени сто и шестдесет жени от кавказката раса на възраст между 19 и 58 години. Сто и шестнадесет пациентки с установена диагноза СЛЕ бяха набрани в Клиниката по Ревматология към УМБАЛ „Св. Ив. Рилски“ - София. Те изпълваха модифицираните АСР класификационни критерии от 1997 г. При всички жени беше снета подробна анамнеза, както и общ физикален статус. От наличната медицинска документация бяха събрани данните относно отделните клинични прояви при всяка болна и имунологичния статус, включващ отделните изследвани антитела. С помощта на конкретен въпросник беше подробно описано предходното и настоящо лечение с кортикостероиди, имunosупресори, антималярици и други специфични за болестта медикаменти. Настоящата доза на

преднизолонa също беше регистрирана. При всички болни бяха определени индекс за активност на СЛЕ (SLEDAI), както и индекс за хронични промени (SLICC).

Четиридесет и четири контроли бяха набрани сред медицинския персонал или студентки - клинично здрави жени без системни заболявания на съединителната тъкан или фамилна анамнеза за такива болести. Никоя от изследваните жени не беше приемала перорални контрацептиви или хормоно-заместително лечение.

Кръвните проби от пациентките бяха вземани веднага след приемането им в клиниката и преди пулсова или друг вид терапия. Предишни пулсове на пациентките бяха правени най-малко 30 дни преди вземането на кръв. Протоколът на проучването беше обяснен на участниците и те собственоръчно подписаха информирано съгласие за участие. Проучването беше одобрено от етичната комисия на Медицинския университет-София.

Серумните нива на общия тестостерон и глобулина, свързващ половите хормони (ГСПХ), бяха определяни по метод DELFIA с търговски набори реактиви на фирмата (Perkin Elmer, Wallac Oy, Turku, Финландия). Свободният тестостерон беше определен от общия тестостерон, ГСПХ и албумина по формулата на Vermeulen. Нивата на ДХЕАС бяха измерени по метода на радиоимунологичния анализ със стандартен кит на фирмата Immunotech, Marseille, France. Хормоналните изследвания бяха извършени в РИЛ към Университетската болница по ендокринология "Акад. Иван Пенчев" по утвърдена методика.

Генетичен анализ беше осъществен при 137 жени (36 здрави контроли и 101 пациентки). ДНК се екстрахира от венозна кръв по метода на изсолване на белтъците според стандартната процедура. Извърши се PCR амплификация на САG триплетите в екзон 1 на андрогенния рецептор по вече утвърдена в Национална генетична лаборатория методика.

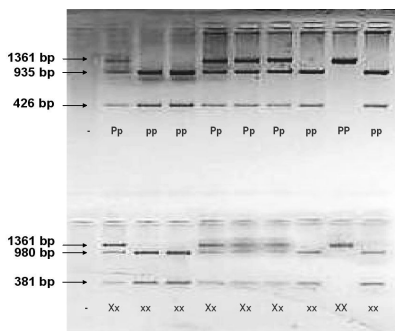
Генът за AP е локализиран върху X-хромозомата и всяка жена носи два обикновено различни (САG)_n алела. Тъй като само 17 жени в проучването бяха хомозиготи, при всяка жена бяха определени „по-къс” и „по-дълъг” алел. Като „по-къс” алел (САG-short) беше означен алелът, носещ по-малък брой САG триплети, а като „по-дълъг” (САG-long) – този с по-голям брой САG мотиви.

Беше определено влиянието на всеки от двата алела върху клиничната изява на системния лупус.

При жени влиянието на (CAG)_n полиморфизма е трудно определимо поради локализацията на андрогенния рецептор върху X хромозомата и феномена на X – инактивация. С оглед на това всички изследвани алели бяха допълнително разделени на две групи - (S) и (L), съобразно 50-я перцентил (брой на CAG триплетите - 22). По този начин генотипът на всички жени беше означен като LL (носители на два алела, в които броят на CAG триплетите е над 22), SS (носители на два алела с 22 или по-малко CAG триплета) и SL (жени, при които единият алел е с повече от 22 CAG триплета, а другият - с 22 или по-малко CAG триплета).

Б. Определяне на PvuII T/C и XbaI A/G полиморфизмите на естрогенния рецептор алфа при пациентки със СЛЕ и здрави контроли

В проучването бяха включени 162 жени - 112 с лупус и 50 здрави контроли. При всички пациентки бяха регистрирани показателите, посочени в т. А. Контролната група беше набрана сред медицински персонал и студентки. Всички болни и здрави жени дадоха информирано съгласие за участие в проучването.



Фигура 1. Електрофоретограма на 2.5% агарозен гел за определяне на полиморфизмите PvuII T/C и XbaI A/G в гена за естрогенния рецептор α.

Пациентките и здравите контроли бяха генотипизирани за ER α полиморфизмите PvuII T/C и XbaI A/G чрез RFLP анализ, по вече утвърдена в Национална генетична лаборатория методика. Липсата на PvuII и XbaI рестрикционни участъци бе обозначена като "P" и "X", а наличието съответно като "p" и "x". Всички изследвани генотипи при контролната група бяха в съответствие със закона на Hardy-Weinberg.

В. Определяне на PROGINS полиморфизма на прогестероновия рецептор при пациентки със СЛЕ и здрави контроли

Двеста и двадесет жени на средна възраст (41.13 \pm 11.87 години /20-68/) бяха включени в проучването. Сто и петнадесет пациентки със СЛЕ бяха набрани сред пациентките на Ревматологична клиника – УМБАЛ «Ив. Рилски». При всички пациентки бяха регистрирани показателите, посочени в т. А. Сто и пет клинично здрави жени без системни ревматологични заболявания бяха набрани сред медицински персонал и студенти. Всички болни и здрави жени дадоха информирано съгласие за участие в проучването.

Генотипирането за PROGINS полиморфизма беше извършено чрез определяне на Alu инсерцията в прогестероновия рецептор в Национална генетична лаборатория. Беше използван рестрикционен (RFLP) анализ. Амплифицираните продукти бяха анализирани чрез Fragment Manager V1.2 software (Pharmacia). Всички изследвани генотипи при контролната група бяха в съответствие със закона на Hardy-Weinberg.

Г. Определяне на VcII и ER22/23EK полиморфизмите на глюкокортикоидния рецептор при здрави жени и болни с лупус

Сто и единадесет пациентки на средна възраст 42.63 \pm 11.91 години, изпълняващи модифицираните ACR критерии, бяха набрани сред пациентките на Ревматологична клиника – УМБАЛ «Ив. Рилски». При всички пациентки бяха регистрирани показателите, посочени в т. А. Сто и една клинично здрави жени без системни ревматологични заболявания на средна възраст 39.88 \pm 11.35 години бяха набрани сред медицински персонал и студенти. Всички болни

и здрави жени дадоха информирано съгласие за участие в проучването.

Полиморфизмите в гена за кортикостероидния рецептор *BCII* (rs41423247) и ER22/23EK (rs6189/ rs6190) бяха определени чрез разработен в Национална генетична лаборатория RFLP метод. Всички изследвани генотипи при контролната група бяха в съответствие със закона на Hardy-Weinberg.

Д. Определяне на BsmI и FokI полиморфизмите на VDR при здрави жени и болни с лупус

Сто и шест жени със СЛЕ бяха набрани сред пациентките на Ревматологична клиника – УМБАЛ «Ив. Рилски». При всички пациентки бяха регистрирани показателите, посочени в т. А. Контролната група се състоеше от сто и четиринадесет клинично здрави жени без заболявания на съединителната тъкан. Изследването беше одобрено от Етичната комисия на Медицински университет – София, като всички участници изразиха писмено информираното си съгласие за участие в изследването.

VDR *BsmI* и *FokI* полиморфизмите на гена VDR бяха определени чрез PCR-RFLP анализ по вече утвърдена в Национална генетична лаборатория методика. Разпределението на всички изследвани генотипи при здравите жени беше в съответствие със закона на Hardy-Weinberg.

Е. Определяне на rs1562444, rs10830962 и rs10830963 полиморфизмите на мелатониновия рецептор 1B при здрави жени и болни с лупус;

В проучването бяха включени 210 жени. Група от 109 жени на възраст 41.72 ± 11.71 години отговаряше на критериите за СЛЕ, а 101 клинично здрави жени (39.36 ± 11.97 години), набрани сред медицинския персонал и студентки, бяха включени в контролната група. При всички болни бяха отбелязани клиничните прояви на СЛЕ (отразени в т. А). Изследването беше одобрено от Етичната комисия на Медицински университет – София, като всички

участници изразиха писмено информираното си съгласие за участие в изследването.

Генотипирането беше осъществено чрез PCR-RFLP анализ. Трите различни полиморфизма rs1562444, rs10830962 и rs10830963 бяха амплифицирани чрез PCR. Нуклеотидните замени G към C (за rs10830962), C към G (за rs10830963) и A към G (за rs1562444) създават разпознаваем участък за ендонуклеазата, поради което ензимната дигестия води до образуването на два типа алелни фрагменти. Липсата на рестрикционен участък за rs10830962 G/C е характерна за алел G (210 bp), а наличието – за алел C (с два фрагмента 184 bp и 26 bp). За rs10830963 C/G полиморфизма големината на фрагментите е 105 bp и 20 bp (за алел G) и 125 bp (за алел C). За полиморфизма rs1562444 A/G нуклеотидната замяна A към G създава допълнителен рестриктазен NlaIII участък. Електрофорезата на 3.0% агарозен гел разкрива три генотипни модела: G/G (с фрагменти 319 bp и 81 bp), G/A (с фрагменти 319 bp, 163 bp, 156 bp и 81 bp) и A/A (с фрагменти 163 bp, 156 bp и 81 bp). Няколко случайно избрани проби бяха секвенирани и тяхната идентичност беше потвърдена. Разпределението на всички генотипи при здравите жени беше в съответствие със закона на Hardy-Weinberg. Генетичният анализ на всички полиморфизми беше осъществен в Национална Генетична Лаборатория.

Ж. Определяне на мелатонин при жени с лупус и здрави контроли.

Сто петдесет и седем жени на възраст между 19 и 67 години бяха включени в проучването. Пациентките със СЛЕ (n=111) бяха набрани между август 2010г. и януари 2011г., а контролите (n=46) - в периода октомври 2010 - януари 2011г. Поради известните сезонни вариации в секрецията на мелатонин, сравнения бяха направени само между болните и здравите жени, при които кръвните проби бяха взети по време на полусезона с по-кратка средна продължителност на светлия период (октомври - януари). Характеристиките на болните и здравите жени са описани в т. А. При болните и здравите жени бяха определени дневните мелатонинови нива с Melatonin Direct RIA китове (DIASource ImmunoAssay S.A., Nivelles, Belgium) с аналитична чувствителност

2 pg/ml, с коефициент на грешка на вътрешния анализ 9.8% и междуаналитична грешка 9.6%. Хормоналните изследвания бяха извършени в Радиоимунологична лаборатория към Университетската болница по ендокринология “Акад. Иван Пенчев” по утвърдена методика.

Използвани статистически методи (статистически пакет SPSS)

A. Описателни методи и методи за оценка

1. Вариационен анализ;
2. Честотен анализ;

Б. Методи за проверка на хипотези (прието ниво на значимост - 0.05)

1. Параметрични методи;
 - 1.1. Т-тест за две независими извадки;
 - 1.2. Еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA – независими извадки) с използване на Post Hoc тестове за множествени сравнения. При равенство на дисперсиите беше използван методът на Bonferroni или LSD. При различия на дисперсиите беше използван методът на Tamhane's T2;
2. Непараметрични методи;
 - 2.1 Метод на Kolmogorov-Smirnov - проверка за нормалност на разпределението на количествена променлива;
 - 2.2 Метод на Mann-Whitney;
 - 2.3 Метод на Kruskal-Wallis;
 - 2.4 Метод хи-квадрат (Chi-square test) или точен тест на Фишер;

В. Корелационен и регресионен анализ;

1. Коефициент на линейна корелация – параметричен (Pearson) и непараметричен (Spearman);
2. Логистичен регресионен анализ (logistic regression analysis).

РЕЗУЛТАТИ

Резултатите са обособени в следните групи:

А. Определяне на полиморфизма на андрогенния рецептор и серумните андрогени при жени с лупус;

Б. Определяне на PvuII T/C и XbaI A/G полиморфизмите на естрогенния рецептор алфа при пациентки със СЛЕ и здрави контроли;

В. Определяне на PROGINS полиморфизма на прогестероновия рецептор при пациентки със СЛЕ и здрави контроли;

Г. Определяне на ER22/23EK и VclI полиморфизмите на глюкокортикоидния рецептор при здрави жени и болни с лупус;

Д. Определяне на BsmI и FokI полиморфизмите на VDR при здрави жени и болни с лупус;

Е. Определяне на rs1562444, rs10830962 и rs10830963 полиморфизмите на мелатониновия рецептор 1B при здрави жени и болни с лупус;

Ж. Определяне на дневен мелатонин при жени с лупус и здрави контроли.

А. Определяне на полиморфизма на андрогенния рецептор и серумните андрогени при жени с лупус

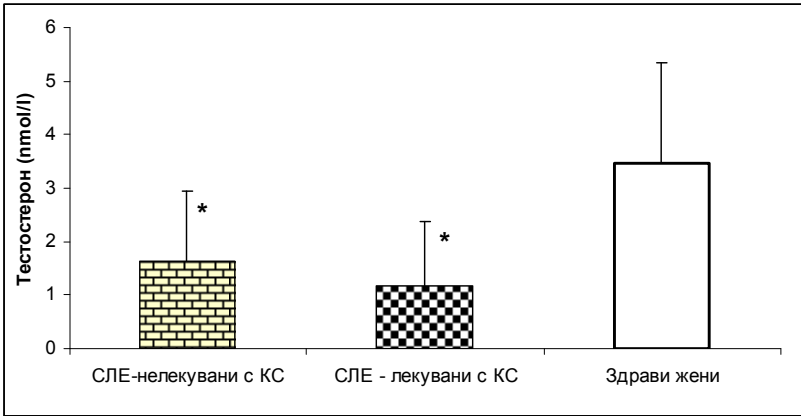
Главните характеристики на изследваните болни са представени на таблица 2. Липсва разлика във възрастта на здравите контроли и болните (40.34 ± 10.17 (40) срещу 40.36 ± 10.81 (39.5) години, $p=0.991$). Пациентките със СЛЕ са със значително по-ниски нива на общия тестостерон (1.21 ± 1.21 (0.75) срещу 3.46 ± 1.89 (3.26) nmol/l, $p<0.001$), свободния тестостерон (14.51 ± 17.30 (8.60) срещу 44.23 ± 31.75 (37.05) pmol/l, $p<0.001$) и ДХЕАС (0.95 ± 0.97 (0.66) срещу 5.65 ± 3.43 (4.75) $\mu\text{mol/l}$, $p<0.001$) в сравнение с контролната група.

Таблица 2. Общи характеристики и най-важни клинични показатели при изследваните болни със СЛЕ.

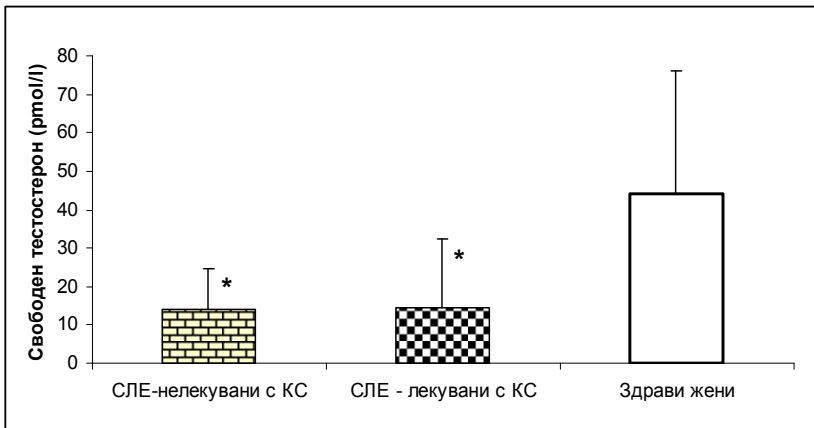
Общи характеристики	Пациентки със СЛЕ
Възраст (години)	40.36±10.81 (39.5)
Възраст на изява (години)	33.27±11.15 (33)
Продължителност на болестта (години)	7.09±6.90 (4)
Някои симптоми:	
<i>Пеперудообразен обрив</i>	40.5%
<i>Дискоиден обрив</i>	9.5%
<i>Фоточувствителност</i>	73.3%
<i>Орална афтоза</i>	24.1%
<i>Серозит</i>	16.4%
<i>Бъбречно засягане</i>	25.9%
<i>Неврологично засягане</i>	32.8%
<i>Хематологично засягане</i>	62.1%
<i>Имунологично засягане</i>	79.3%
SLEDAI	7.47±5.43 (7.5)
SLICC	0.76±1.04 (0)

Жените със СЛЕ, които не провеждат лечение с кортикостероиди са със сигнификантно по-ниски нива на тестостерон, свободен тестостерон и ДХЕАС в сравнение със здравите контроли (Фигури 2-4).

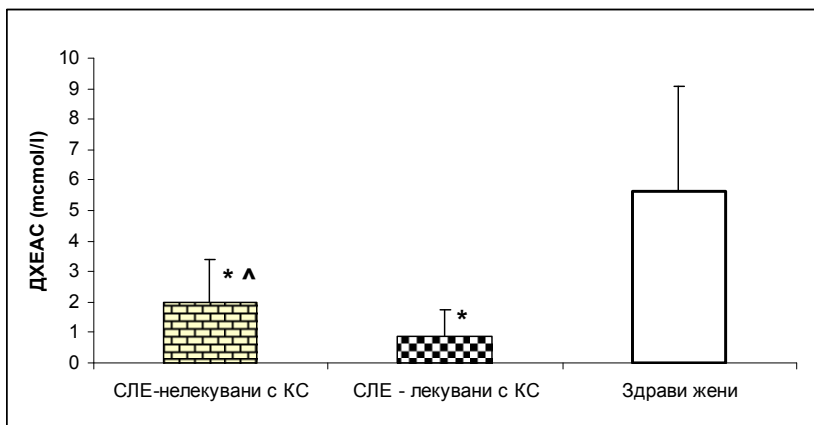
Не се намира статистически значима разлика в алелното разпределение на (CAG)_n полиморфизма на андрогенния рецептор между здравите и болните жени. Алелните честоти в двете групи са представени на фигура 5. Броят на CAG триплетите е сходен при здравите контроли и пациентките със СЛЕ (23.72±2.62 [24] срещу 23.90±2.47 [24], p=0.692 за CAG-long, и 20.50±2.92 [21] срещу 20.43±2.10 [20], p=0.961 за CAG-short). Полиморфизмът на андрогенния рецептор не е свързан сигнификантно с никой от ACR критериите (Таблица 3).



Фигура 2. Концентрации на общия тестостерон при здравите жени, болните с и без кортикостероидно лечение. (* $p < 0.05$ - разлика спрямо здравите контроли).



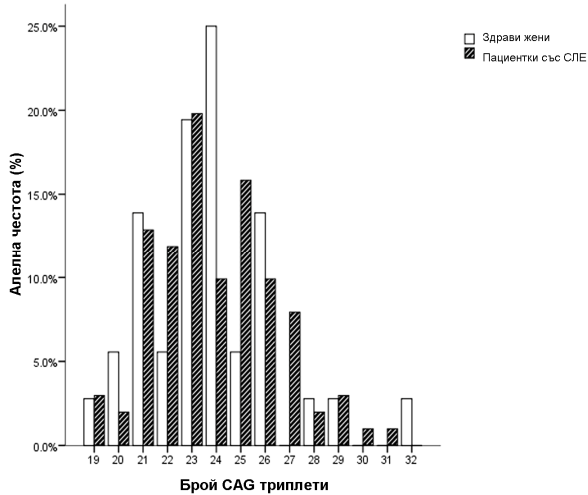
Фигура 3. Концентрации на свободния тестостерон при здравите жени, и болните с и без кортикостероидно лечение; (* $p < 0.05$ - разлика спрямо здравите контроли).



Фигура 4. Концентрации на ДХЕАС при здравите жени и болните с и без кортикостероидно лечение. (* $p < 0.05$ - разлика спрямо здравите контроли; ^ $p < 0.05$ - разлика между лекувани и нелекувани пациентки със СЛЕ).

Жените с LL генотип (носители на два алела с повече от 22 CAG триплети), имат сигнификантно по-високи серумни нива на ГСПХ (101.51 ± 61.81 (101.79) срещу 69.22 ± 45.93 (54.87) nmol/l, $p = 0.015$) и ДХЕАС (3.11 ± 2.65 (2.24) срещу 2.11 ± 3.06 (0.86) $\mu\text{mol/l}$, $p = 0.007$), както и тенденция към по-високи нива на тестостерона (2.35 ± 2.10 (1.79) срещу 1.71 ± 1.70 (0.97) nmol/l, $p = 0.056$), в сравнение с другите жени. Не се установяват хормонални различия при жените с генотип SS или SL. SLICC индексът е обратно пропорционален на броя на триплетите в CAG long ($r = -0.258$, $p = 0.009$).

За да се установи влиянието на възрастта върху изследваните показатели, ние разделихме болните на млади и възрастни, като използвахме 50-я перцентил (възраст 40 години) като граница. При жените над 40 години по-големият брой CAG триплети в CAG long е значимо обратно свързан със SLICC ($r = -0.443$, $p = 0.001$).



Фигура 5. Алелно разпределение на (CAG)*n* полиморфизма при здрави жени и пациентки с лупус ($p > 0.05$).

Таблица 3. Връзка между отделните генотипи и някои клинични прояви на системния лупус. Показан е процентът на пациентките със съответното органно засягане според генотипа (SS, LL или SL).

	SS	SL	LL	p
Пеперудообразен обрив	36.7%	37.5%	46.7%	0.784
Дискоиден обрив	3.3%	14.3%	6.7%	0.243
Фоточувствителност	80%	71.4%	73.3%	0.684
Орална афтоза	23.3%	14.3%	40.0%	0.086
Серозит	16.7%	12.5%	20.0%	0.727
Бъбречно засягане	26.7%	23.2%	26.7%	0.923
Неврологично засягане	43.3%	25.0%	53.3%	0.060
Хематологично засягане	70.0%	62.5%	53.3%	0.539
Имунологично засягане	76.7%	82.1%	73.3%	0.696

Б. Определяне на PvuII T/C и XbaI A/G полиморфизмите на естрогенния рецептор алфа при пациентки със СЛЕ и здрави контроли

Алелните честоти на XbaI и PvuII полиморфизмите са определени при болните жени със СЛЕ, както и в контролната група. Не се установяват съществени различия в алелното разпределение между двете групи (Таблица 4).

Разпределението на алелните честоти спрямо клиничните признаци е показано на таблици 5 и 6.

Най-често срещаните комбинирани генотипи сред изследваната популация са PPXX (8.6%), PpXx (43.8%) и ppxx (36.4%). Болните с генотип PPXX страдат значимо по-рядко от неврологични усложнения в сравнение с останалите (0% срещу 35.9%, $p=0.028$). При болните с генотипи PPXX и PpXx значително по-често се среща фоточувствителност в сравнение с болните с алели ppxx (82% срещу 58.5%, $p=0.013$).

Честотата на останалите клинични признаци е сходна сред болните с трите най-често срещани генотипи ($p>0.05$). Останалите комбинирани генотипи не са интерпретирани поради малката им честота в изследваната група.

Таблица 4. Разпределение на алелните честоти на полиморфизмите XbaI и PvuII в гена за EРa при болните и здравите жени.

Полиморфизми	Генотип	Здрави жени	Болни със СЛЕ
<i>XbaI</i>	XX	8%	8%
<i>XbaI</i>	Xx	42%	49.1%
<i>XbaI</i>	xx	50%	42.9%
<i>PvuII</i>	PP	12%	9.8%
<i>PvuII</i>	Pp	52%	52.7%
<i>PvuII</i>	pp	36%	37.5%

Таблица 5. Алелни честоти на *XbaI* полиморфизма спрямо някои клинични прояви ($p > 0.05$ за всички клинични характеристики).

<i>XbaI</i>	<i>XX</i>	<i>Xx</i>	<i>xx</i>
Пеперудообразен обрив	33.3%	40%	33.3%
Дискоиден обрив	11.1%	9.1%	14.6%
Фоточувствителност	88.9%	80.0%	60.4%
Афтоза	33.3%	16.4%	20.8%
Серозит	22.2%	16.4%	16.7%
Бъбречно засягане	22.2%	25.5%	22.9%
Неврологично засягане	0%	33.3%	36.4%
Хематологично засягане	55.6%	58.2%	72.9%
Имунологично засягане	66.7%	80.0%	75.0%

Таблица 6. Алелни честоти на *RvuII* полиморфизма спрямо някои клинични прояви ($p > 0.05$ за всички клинични характеристики).

<i>RvuII</i>	<i>PP</i>	<i>Pp</i>	<i>pp</i>
Пеперудообразен обрив	27.3%	39.0%	35.7%
Дискоиден обрив	9.1%	8.5%	16.7%
Фоточувствителност	81.8%	79.7%	59.5%
Афтоза	27.3%	15.3%	23.85
Серозит	18.2%	20.3%	11.9%
Бъбречно засягане	18.2%	25.4%	23.8%
Неврологично засягане	9.1%	32.2%	38.1%
Хематологично засягане	54.5%	61.0%	71.4%
Имунологично засягане	63.6%	79.7%	76.2%

В. Определяне на PROGINS полиморфизма на прогестероновия рецептор при пациентки със СЛЕ и здрави контроли

Полиморфен PROGINS (Alu) алел се установява при 15.45% от изследваните жени, а обичаен алел се намира при 84.55% от участничките.

Не се установява разлика в алелните или генотипните честоти между пациентките и контролите, въпреки че хомозиготният AluAlu генотип е по-чест сред здравите жени (4.76% vs. 0.87%, $p=0.208$) отколкото при болните (Фигура 6).

Полиморфизмът на прогестероновия рецептор не е свързан значимо с клиничните прояви на болестта, активността ѝ, тежестта на хроничните усложнения, наличието на вторични синдроми на Raynaud или Sjögren ($p>0.05$).

PROGINS също така не е свързан значимо с провежданата имunosупресивна терапия за СЛЕ ($p>0.05$ за всички).

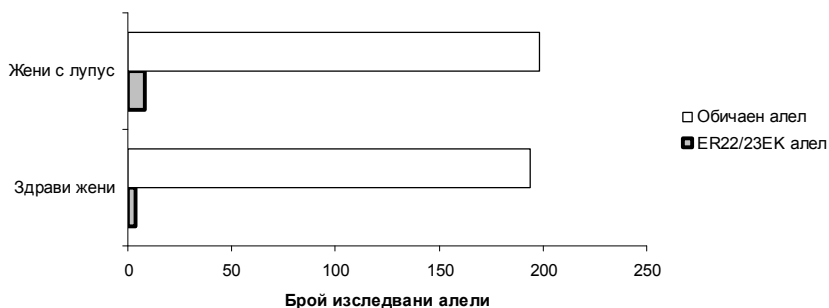


Фигура 6. PROGINS генотипни честоти при болните с лупус и здравите жени ($p>0.05$). Alu - PROGINS (Alu) полиморфен алел. N – обичаен алел.

Г. Определяне на ER22/23ЕК и VcII полиморфизмите на глюкокортикоидния рецептор при здрави жени и болни с лупус

Полиморфният ER22/23ЕК алел се установява при 5.9% от изследваните жени, като се среща само в хетерозиготно състояние. Не се установява хомозиготно носителство на два ER22/23ЕК алела.

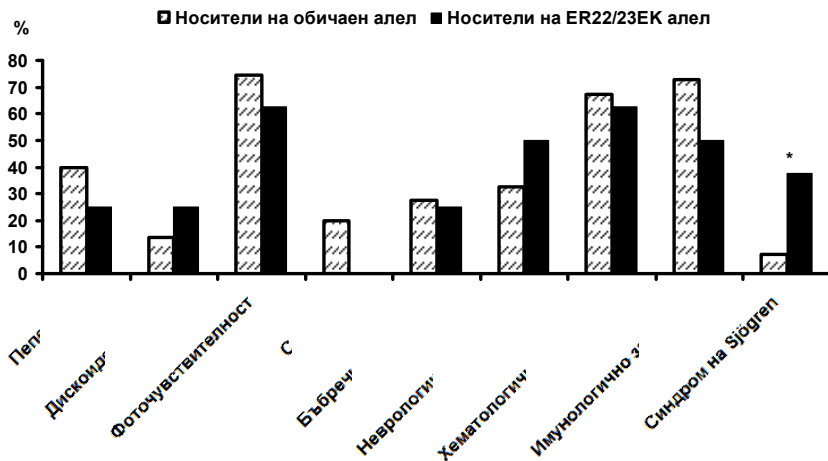
Не се установява значима разлика в алелната или генотипната честота на ER22/23ЕК между пациентките с лупус и здравите контроли (Фигура 7), въпреки че хетерозиготният ER22/23ЕК генотип е по-чест сред болните жени, отколкото сред здравите (7.8% срещу 4.0%, $p=0.374$).



Фигура 7. Алелни честоти на глюкокортикоидния рецепторен ER22/23ЕК полиморфизъм при болни с лупус и здрави жени ($p>0.05$).

ER22/23ЕК полиморфизмът на глюкокортикоидния рецептор не е свързан значимо с изследваните клинични признаци, тежестта или активността на болестта ($p>0.05$ за всички). Хетерозиготният генотип е по-чест при болните със СЛЕ и съпътстващ синдром на Sjögren (Фигура 8).

Наличието на полиморфен ER22/23ЕК алел не е свързано с различия в дозовите режими на кортикостероидната терапия ($p>0.05$).



Фигура 8. Генотипна честота на ER22/23EK полиморфизма при болни с лупус в зависимост от някои клинични признаци и наличието на съпътстващ синдром на Sjögren. * $p=0.028$.

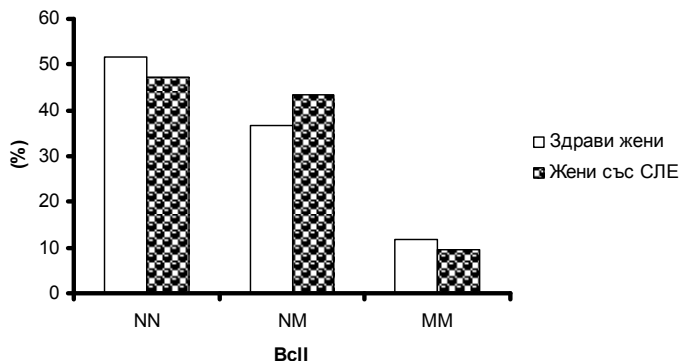
Алелната и генотипната честота на глюкокортикоидния VcII рецепторен полиморфизъм е сходна при жените с лупус и здравите контроли (Фигура 9).

Носителите на полиморфния M алел са със значително по-голям брой имунологични нарушения в сравнение с носителите на обичайния NN генотип (Фигура 10).

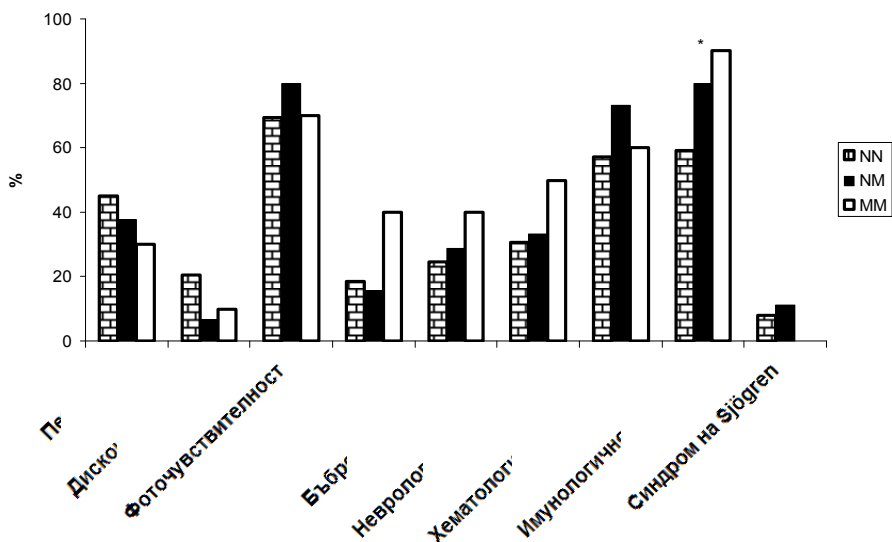
По отношение на другите изследвани клинични прояви на системния лупус не се установява статистически значима разлика ($p>0.05$).

VcII рецепторният полиморфизъм не показва връзка с възрастта на изява на болестта, нейната активност или тежест ($p>0.05$).

Изследваният полиморфизъм не е значимо свързан с различните дозови режими на кортикостероидното лечение на болните ($p>0.05$).



Фигура 9. Генотипни честоти на *BclI* рецепторния полиморфизъм при болни с лупус и здрави жени ($p>0.05$). М - *BclI* полиморфен алел. N – обичаен алел.



Фигура 10. Генотипна честота на *BclI* полиморфизма при болни с лупус в зависимост от някои клинични прояви и наличието на синдром на Sjögren. М - *BclI* полиморфен алел. N – обичаен алел.

* $p=0.034$.

Д. Определяне на BsmI и FokI полиморфизмите на VDR при здрави жени и болни с лупус

Болните и контролите, изследвани за VDR FokI (rs2228570) полиморфизма, са на сходна възраст (40.46±11.72 срещу 42.55±11.53 години, p=0.186). Генотипното разпределение на FokI полиморфизма е представено на таблица 7. Не се установяват значими различия в алелните честоти между болните жени и здравите контроли. VDR FokI полиморфизмът не е свързан значимо с клиничните признаци на болестта (p>0.05).

Установихме значима връзка само между наличието на ff генотип и повишен риск от пеперудообразен обрив при болните с лупус [OR=3.375; 95%CI (1.043-10.922); p=0.042].

Таблица 7. VDR FokI (rs2228570) полиморфизъм при болни с лупус и здрави контроли.

VDR FokI	Здрави жени n (%)	Пациентки с лупус n (%)	p
FF	54 (47.4)	38 (35.8)	0.215
Ff	47 (41.2)	54 (50.9)	
ff	13 (11.4)	14 (13.2)	
F алел	155 (67.98)	130 (61.32)	0.162

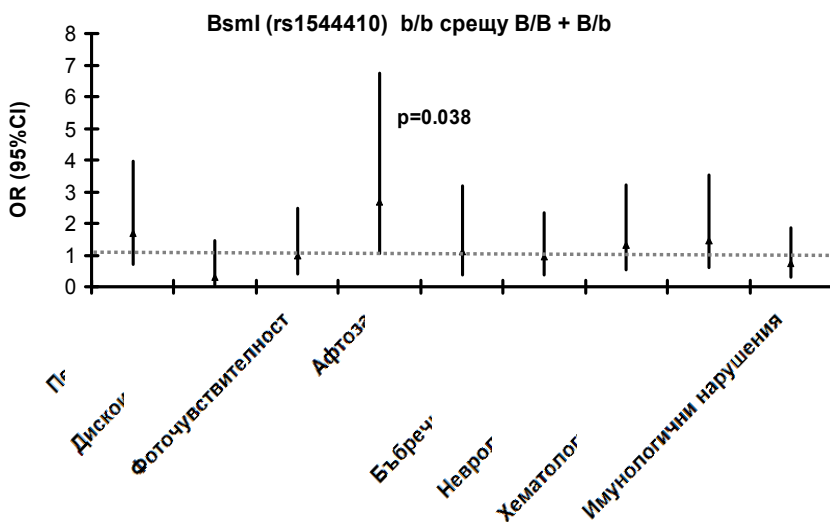
Генотипното разпределение на VDR BsmI полиморфизма е представено на таблица 8.

Не се установяват значими разлики в алелното и генотипното разпределение между болните и здравите, въпреки че при болните са налице по-малко BB хомозиготни носители.

От получените данни не се обективизират значими асоциации между генотипите BB и bb от една страна и органните увреждания при СЛЕ от друга страна. Установихме значима връзка само между носителството на b/b генотип и повишен риск от афтоза при болните с лупус (Фигура 11).

Таблица 8. VDR BsmI (rs1544410) полиморфизъм при болни с лупус и здрави контроли.

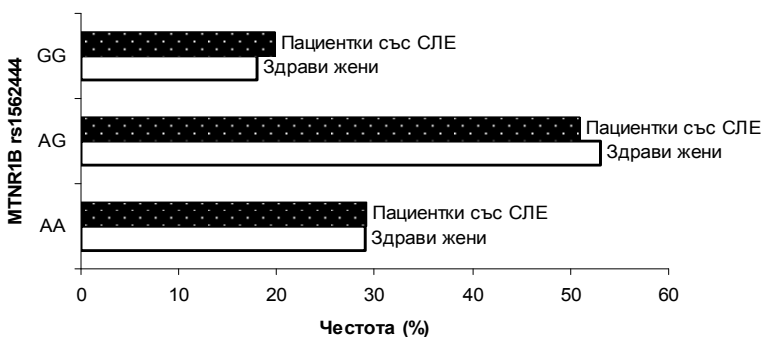
VDR BsmI	Здрави жени n (%)	Пациентки с лупус n (%)	p
BB	24 (24.0)	14 (14.7)	0.244
Bb	41 (41.0)	46 (48.4)	
bb	35 (35.0)	35 (36.8)	
В алел	89/200 (44.50)	74/190 (38.94)	0.305



Фигура 11. VDR BsmI (rs1544410) b/b срещу B/B + B/b генотипи според по-честите клинични признаци у болните с лупус. (Отношението на шансовете (OR) е означено с триъгълник, а отвесната линия изобразява 95 % доверителен интервал (95 % CI)).

Е. Определяне на rs1562444, rs10830962 и rs10830963 полиморфизмите на мелатониновия рецептор 1B при здрави жени и болни с лупус

По отношение на полиморфизма rs1562444 в гена за мелатониновия рецептор тип 1B не се установява сигнификантна разлика в разпределението на генотипните и алелните честоти между пациентки и контроли (Фигура 12). Изследваният полиморфизъм е свързан значимо с развитието на левкопения, докато връзка с останалите симптоми не се установява ($p > 0.05$). Пациентките с генотип G/G са със значимо повишен риск за развитие на левкопения в сравнение с носителите на A/A генотип (OR 3.771; 95CI [1.135–12.533], $p = 0.030$).



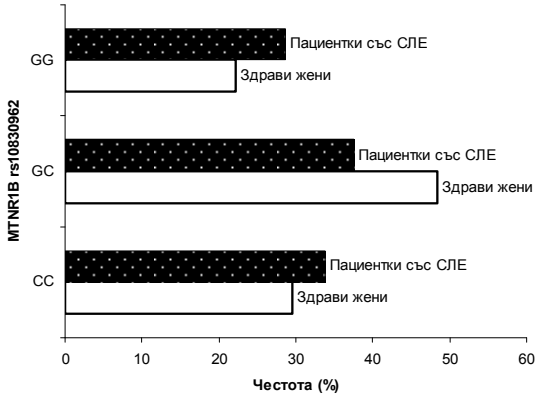
Фигура 12. Генотипно разпределение на полиморфизма rs1562444 в гена за мелатониновия рецептор тип 1B при здрави жени и пациентки с лупус ($p > 0.1$).

Няма сигнификантна разлика в разпределението на rs10830962 алелните и генотипните честоти между пациентки и контроли ($p > 0.05$), въпреки че хетерозиготното състояние е по-рядко при пациентките със СЛЕ, отколкото при контролите (Фигура 13). Пациентките с генотип rs10830962 C/C имат значимо по-висок риск от развитие на имунологични нарушения (OR 3.134; 95CI

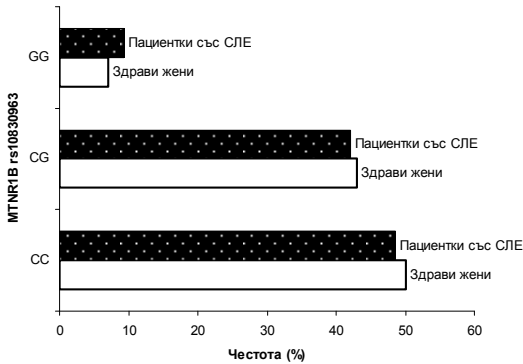
[1.035 – 9.486], $p=0.043$) при съпоставка с болните с генотип G/G. Наличието на генотип C/C у пациентките с лупус е свързано с увеличена честота на левкопения (38.2% срещу 17.9%, $p=0.031$) при сравнение с болните носителки на G алел (т.е. жените с генотипи GC и GG). Наличието на генотип C/C увеличава два пъти риска от развитие на левкопения (OR 2.837; 95CI [1.117 – 7.205], $p=0.028$), като същата тенденция се запазва и след корекция за възраст и имunosупресивно лечение. Налице е тенденция за изява на болестта в по-ранна възраст (31.53 ± 12.63 [25.5] срещу 35.91 ± 11.93 [35] години, $p=0.061$).

Не се установява значима разлика в разпределението на алелните и генотипните честоти между болните и здравите контроли по отношение на rs10830963 полиморфизма в гена за мелатониновия рецептор тип 1Б. (Фигура 14). При пациентките с генотип G/G липсва неврологично засягане, както и серозит, но не се установяват значими разлики поради ниската популационна честота на G алела. Наличието на C/C генотип е свързано с увеличена честота на левкопения в сравнение с тази при носителите на G алел (генотипове C/G и G/G) (36.5% срещу 14.5%, $p=0.014$). Генотипът C/C е свързан с повишен риск от левкопения (OR 3.383; 95CI [1.324–8.645], $p=0.011$), като тенденцията се запазва и след корекция за възраст и имunosупресивно лечение. Честотата на хематологичните нарушения също е повишена при пациентките с C/C генотип (75.0% срещу 52.7%, $p=0.026$) в сравнение с носителите на алел G.

Броят на проявените клинични симптоми е свързан значимо с rs10830963 полиморфизма, вероятно, поради описаните по-горе клинични различия. Средният общ брой (медиана) критерии е 5.79 ± 1.40 (6) при болните с генотип C/C, 5.09 ± 1.16 (5) при пациентките с генотип C/G и 4.60 ± 0.70 (4.5) при тези с генотип G/G, като разликата е статистически значима ($p=0.005$). И трите полиморфизма в гена за мелатониновия рецептор 1 Б не показват значима връзка с индексите за активност или хронични увреждания.



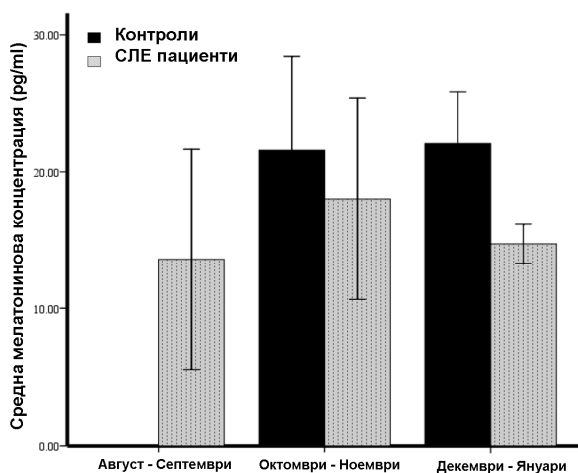
Фигура 13. Генотипно разпределение на полиморфизма rs10830962 в гена за мелатониновия рецептор тип 1Б при здрави жени и пациентки с лупус ($p > 0.1$).



Фигура 14. Генотипно разпределение на полиморфизма rs10830963 в гена за мелатониновия рецептор тип 1Б при здрави жени и пациентки с лупус ($p > 0.1$).

Ж. Определяне на нивата на хормона мелатонин при жени с лупус и здрави контроли

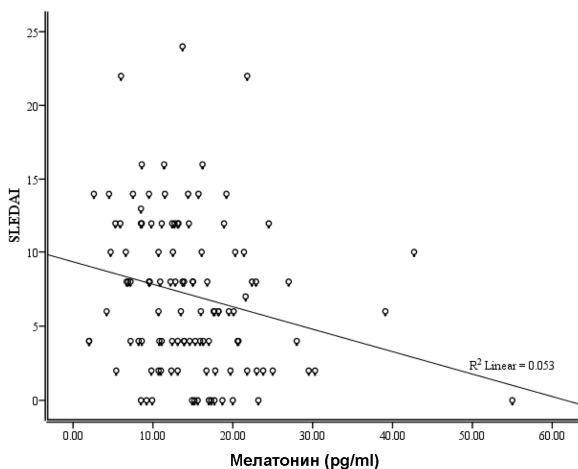
Дневните нива на мелатонина при пациентките със СЛЕ са значимо по-ниски през сезона с голяма продължителност на светлия период /август и септември/, отколкото през сезона с малка продължителност на светлия период /октомври-януари/ (13.59 ± 8.06 [12.30] срещу 17.75 ± 7.13 pg/ml [16.05], $p=0.009$) (Фигура 15).



Фигура 15. Средни концентрации на мелатонина според месеците, в които са взети кръвните проби при болните с лупус и здравите жени.

Болните със СЛЕ са със значимо по-ниски стойности на мелатонина, в сравнение със здравите жени (17.75 ± 7.13 [16.05] срещу 21.63 ± 6.60 pg/ml [20.10], $p=0.012$).

Серумните нива на хормона корелират с индекса SLEDAI ($r = -0.268$, $p=0.004$), но не и със SLICC (Фигура 16).



Фигура 16. Зависимост между концентрациите на мелатонина и индекса на активност SLEDAI при болните с лупус.

Връзката между мелатонина и активността на болестта е значима след съотнасяне за за възраст, месец на вземане на пробата и кортикостероидна доза ($r = -0.215$, $p = 0.025$). Хормоналните нива не са свързани с определен клиничен симптом, органно засягане или имунологичен показател ($p > 0.05$ за всички). Освен това те не зависят от хроничното перорално лечение с антималярици или имunosупресори и не показват връзка с дозите на кортикостероидното лечение ($p > 0.05$).

ОБОБЩЕНИЕ

I. Генни полиморфизми на стероидните рецептори и СЛЕ

Първата цел на настоящото изследване беше да изясни влиянието на някои генни полиморфизми в стероидните рецептори (андрогенен рецептор, естрогенен рецептор- α , прогестеронов рецептор, кортикостероиден рецептор и рецептор за витамин D) върху клиничните особености и протичането на СЛЕ при жени.

Съобразно това бяха изследвани най-широко проучваните в световен мащаб генни полиморфизми на стероидните рецептори, за които е доказана функционална значимост (Таблица 9): (CAG) $_n$ полиморфизъм на андрогенния рецептор, PvuII T/C и XbaI A/G полиморфизми на естрогенния рецептор- α , PROGINS полиморфизъм в прогестероновия рецептор, BclII и ER22/23EK полиморфизми в кортикостероидния рецептор, BsmI и FokI полиморфизми на рецептора за витамин D.

Повишената честота на СЛЕ при жени в репродуктивна възраст предполага влияние на мъжките и женските полови хормони, както и съответно на техните рецептори, върху изявата и клиничната картина на болестта. С оглед на това е логично да се изследва ролята на генните полиморфизми в андрогенния, естрогенния и прогестероновия рецептор. В настоящото проучване бяха подбрани чести и добре познати при други заболявания генетични варианти: (CAG) $_n$ полиморфизма в гена за андрогенния рецептор, SNP полиморфизмите PvuII и XbaI в гена за естрогенния рецептор-алфа, както и PROGINS полиморфизма в гена за прогестероновия рецептор.

Както може да се очаква при широко разпространени в популацията полиморфизми, генотипното и алелното разпределение за всички изследвани варианти при здравите жени и болните с лупус беше сходно. Независимо от това проучването показва връзка между някои от полиморфизмите и клиничната изява на СЛЕ.

Алелите с по-голям брой CAG триплети в гена за AP са протективни по отношение на хроничните увреждания при системен лупус. Този ефект е по-изразен при жените над 40

години и съответно с по-ниски нива на серумните андрогени. Същевременно (CAG)*n* полиморфизмът модулира нивата на серумните андрогени и глобулина, свързващ половите хормони при изследваните жени.

Тясно свързаните полиморфизми PvuII и XbaI в екзон 2 на гена за естрогенния рецептор алфа не са свързани с възрастта на изява на системния лупус, както в други проучвания. Комбинираният генотип PPXX се асоциира с много по-малка честота на неврологично ангажиране в сравнение с тази при другите хетерозиготни и хомозиготни носители.

Нашите резултати показват също, че PROGINS полиморфизмът на прогестероновия рецептор не е рисков фактор за СЛЕ и не влияе върху неговите клинични прояви при българки.

Таблица 9. Функционално значение на генните полиморфизми на стероидните рецептори.

Рецептор (ген)	Генен полиморфизъм	Функционално значение
AP (Xq11-12)	(CAG)<i>n</i>	модуляция на андрогенната чувствителност
EP (6q24-27)	PvuII T/C	промени в регулацията на транскрипцията, усилване на някои от естрогенните ефекти
EP (14q21-22)	XbaI A/G	
PP (11q22)	PROGINS	отслабване на някои от гестагенните ефекти
KP (5q31)	BclI	повишена чувствителност към кортикостероиди в някои тъкани
KP (5q31)	ER22/23EK	намалена чувствителност към кортикостероиди
VDR (12q12-q14)	BsmI	модулира посттранскрипционната стабилност на рецептора
VDR (12q12-q14)	FokI	модулира чувствителността към витамин D и нивата на 25-хидрокси витамин D

С оглед на ниските ендогенни нива на кортикостероидите при жени с лупус, както и обичайната терапия с кортикостероиди при тези болни, е интересно, дали полиморфизмите на глюкокортикоидния рецептор повлияват възникването на СЛЕ, клиничните прояви и терапия, но до момента в литературата няма подобно проучване. С оглед на това в нашето проучване изследвахме ER22/23ЕК и VcII полиморфизмите на глюкокортикоидния рецептор. ER22/23ЕК полиморфни алели се срещат по-често при болните със СЛЕ в сравнение със здравите, въпреки че разликата не достига статистическа значимост. Същият полиморфизъм се среща значимо по-често при болните със СЛЕ и синдром на Sjögren в сравнение с останалите жени с лупус. Възможно е наличието на ER22/23ЕК алел да предразполага към развитие на автоимунни болести като цяло без да е специфичен рисков фактор за СЛЕ.

VcII полиморфизмът на глюкокортикоидния рецептор не е рисков фактор за развитието на СЛЕ, но показва значима връзка с имунологичните нарушения при болестта. И по отношение на двата полиморфизма не се установява значима асоциация с провежданата кортикостероидна терапия. Вероятно полиморфизмите на глюкокортикоидния рецептор модулират чувствителността към кортикостероиди при физиологични концентрации на кортизола, но тяхното значение отслабва при употреба на високи дози екзогенни кортикостероиди.

В последните години значително нарастна интересът към витамин D като имуномодулатор. С оглед на това проучихме полиморфизмите на рецептора за витамин D BsmI и FokI. Резултатите не показват връзка между двата полиморфизма и склонността към развитие на СЛЕ при българки. Не се установява повишен риск от лупусен нефрит при носителите на BsmI и FokI полиморфни алели. Двата полиморфизма се асоциират с някои кожно-лигавични прояви като пеперудообразен обрив и орална афтоза, но не и с други органични прояви на болестта, активността или степента на хроничните увреждания. Обобщение на посочените данни е показано на Фигура 17.

II. Мелатонин и полиморфизъм на мелатониновия рецептор при СЛЕ

Тъй като все повече проучвания в последно време акцентират върху тясната връзка между мелатонина и имунната система беше интересно да се проучи ролята на дневната мелатонинова секреция за развитието на СЛЕ. Нивата на мелатонина са значително пониски при болните с лупус в сравнение със здравите контроли. Те показват обратна корелация с индекса на болестна активност SLEDAI. Тези резултати подкрепят редица проучвания върху опитни женски животни, според които приложението на мелатонин може да окаже благоприятно влияние върху клиничната изява и имунологичните промени при СЛЕ.

Поради описаните в литературата ефекти на мелатонина върху имунната система, както и данните за експресия на мелатониновия рецептор тип 1Б в имунокомпетентните клетки, беше интригуващо да се проучи ролята на генетичните полиморфизми rs1562444, rs10830962 и rs10830963 в гена за същия рецептор при системен лупус еритематозус. Резултатите показаха, че и трите полиморфизма влияят върху склонността към левкопения при пациентките с лупус. Следователно мелатониновият рецептор тип 1Б и неговите полиморфизми може да играят роля в човешката миелопоеза и левкоцитното преживяване *in vivo*. Тези резултати са логични в контекста на неотдавна публикуваните експериментални проучвания, според които мелатонинът може да намали процеса на апоптоза в човешките левкоцити по рецепторно-зависим механизъм.

Въпреки че полиморфизмите на мелатониновия рецептор се изучават в последните пет години най-вече в контекста на захарния диабет, нашите резултати показват, че те вероятно имат отношение и към протичането на някои автоимунни болести. Необходими са бъдещи проучвания, които да установят конкретната роля на полиморфизмите на мелатониновия рецептор 1Б за имунната система и автоимунитета. Това би дало възможност за ранно селектиране на рискови болни (например за левкопения) и разработване на нови терапевтични подходи, базирани върху индивидуалните генетични особености на всеки пациент.



Фигура 17. Хормон-рецепторни полиморфизми и клинични особености на СЛЕ. АР–андрогенен рецептор; ЕР – естрогенен рецептор алфа; ГР –глюкокортикоиден рецептор; МР–мелатонинов рецептор тип 1Б; ВДР –рецептор за витамин Д.

* Б.А. Използваните в автореферата цитати са посочени в дисертационния труд.

ИЗВОДИ

1. *(CAG)_n полиморфизмът в гена на андрогенния рецептор не предразполага към развитие на СЛЕ, но повлиява изаята на хроничните увреждания при системен лупус. Същевременно, този полиморфизъм модулира нивата на серумните андрогени и глобулина, свързващ половите хормони при изследваните жени.*
2. *Полиморфизмите RvuII и XbaI в гена на естрогенния рецептор-алфа не предразполагат към развитие на СЛЕ, но могат да повлияят честотата на неврологично ангажиране при болните с лупус.*
3. *Полиморфният PROGINs алел в прогестероновия рецептор не е рисков фактор за СЛЕ и не се асоциира с клиничните прояви на болестта.*
4. *VcII и ER22/23EK полиморфизмите в кортико-стероидния рецептор не са значими рискови фактори за поява на СЛЕ. VcII полиморфизмът обуславя повишен риск от имунологични нарушения при лупус.*
5. *BsmI и FokI полиморфизмите на рецептора за витамин D не са значими рискови фактори за поява на СЛЕ. Двамата полиморфизма се асоциират с някои кожно-лигавични прояви на заболяването, но не и с други органни прояви на болестта или с нейната активност.*
6. *Дневната мелатонинова секреция е понижена при болните с лупус в сравнение със здравите контроли, като нивата на серумния мелатонин са свързани с активността на болестта.*
7. *Полиморфизмите rs1562444, rs10830962 и rs10830963 в гена за мелатониновия рецептор тип 1B не са рискови фактори за развитие на СЛЕ.*
8. *Полиморфизмите rs1562444, rs10830962 и rs10830963 в гена за мелатониновия рецептор тип 1B влияят върху склонността към развитие на левкопения при пациентките с лупус.*
9. *Полиморфизмите rs10830962 и rs10830963 в гена за мелатониновия рецептор 1B са свързани с възрастта на изява на системния лупус, както и с броя на наличните клинични прояви.*

ПРИНОСИ

С оригинален характер

- 1. За първи път е изследван (CAG)_n полиморфизмът на андрогенния рецептор в контекста на андрогенните нива при жени със системен лупус. Установено е влиянието на полиморфизма върху степента на хроничните увреждания при пациентките със СЛЕ.*
- 2. За първи път е изследван PROGINS полиморфизма сред здрави българки, като е установено генотипното разпределение на този полиморфизъм сред здравите жени. За първи път е изследван PROGINS сред болни със системен лупус, като резултатите показват, че този вариант на прогестероновия рецептор не е рисков фактор за СЛЕ и не се асоциира с клиничните прояви на болестта.*
- 3. За първи път са изследвани VcII и ER22/23EK полиморфизмите в кортикостероидния рецептор сред здрави българки, като е установено генотипното им разпределение в българската популация. За първи път тези полиморфизми са изследвани сред жени със системен лупус от бялата раса. Резултатите показват, че изследваните варианти на кортикостероидния рецептор не повишават риска от развитие на СЛЕ, но VcII полиморфизмът обуславя повишена честота на имунологични нарушения при лупус.*
- 4. За първи път е сравнена дневната мелатонинова секреция при пациентки с лупус и здрави жени. Резултатите показват понижени серумни нива на мелатонина при болните в сравнение с контролната група. Нивата на серумния мелатонин са обратно пропорционални на активността на болестта.*

5. За първи път са изследвани полиморфизмите *rs1562444*, *rs10830962* и *rs10830963* в гена за мелатониновия рецептор тип 1B при лупус, като те не са рискови фактори за развитие на болестта. Изследваните полиморфизми влияят върху клиничната картина на болестта и по-специално върху склонността към левкопения при изследваните пациентки.

С потвърдителен характер

1. Изследвани са полиморфизмите *RvuII* и *XbaI* в гена на естрогенния рецептор-алфа при пациентки със системен лупус. Установено е, че полиморфизмите *RvuII* и *XbaI* не са рисков фактор за поява на СЛЕ, но могат да модулират клиничните прояви на болестта и по-специално неврологично ангажиране.
2. Изследвани са полиморфизмите *BsmI* и *FokI* на рецептора за витамин D при българки със системен лупус. Установява се, че те не са значими рискови фактори за поява на СЛЕ. Двата полиморфизма се асоциират с някои кожно-лигавични прояви на заболяването, но не и с други органни прояви на болестта или с нейната активност.

ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА

- публикации в български списания

1. **Танев Д**, Робева Р, Куманов Ф, Рашков Р, Коларов Зл. Systemic lupus erythematosus и естрогени. *Ревматология* 2010, 18, 4, 31-37.
2. **Танев Д**, Робева Р, Андонова С, Николова М, Стойчева М, Томова А, Куманов Ф, Савов А, Рашков Р, Коларов Зл. Системен лупус и естроген-рецепторен полиморфизъм у българки. *Ревматология* 2011, 19, 3, 59-64.
3. **Танев Д**, Робева Р, Томова А, Куманов Ф, Рашков Р, Коларов Зл. Systemic lupus erythematosus и андрогени. *Ревматология* 2011, 19, 2, 14-19.
4. Робева Р, **Танев Д**, Куманов Ф, Рашков Р, Коларов Зл. Отклонение в секрецията на репродуктивните хормони при системен лупус. *Ендокринология* 2011, 16, 3, 149-156.
5. **Tanev D**, Andonova S, Savov A, Robeva R, Nikolova M, Tomova A, Kumanov Ph, Rashkov R, Kolarov Zl. PROGINS progesterone receptor polymorphism in healthy women and patients with systemic lupus erythematosus. *Bulgarian Medicine* 2013, 3, 4, 4-9.
6. **Танев Д**, Андонова С, Робева Р, Томова А, Куманов Ф, Савов А, Рашков Р, Коларов Зл. Витамин D-рецепторен BsmI полиморфизъм при жени със системен лупус еритематозус. *Ревматология* 2015 /под печат/.

- публикации в чуждестранни списания

1. Robeva R, **Tanev D**, Andonova S, Kirilov G, Savov A, Stoycheva M, Tomova A, Kumanov P, Rashkov R, Kolarov Z. Androgen receptor (CAG)_n polymorphism and androgen levels in women with systemic lupus erythematosus and healthy controls. *Rheumatology International* 2013, 33, 8, 2031-2038. (IF 1.627; citations 4)
2. Robeva R, **Tanev D**, Kirilov G, Stoycheva M, Tomova A, Kumanov Ph, Rashkov R, Kolarov Zl. Decreased daily melatonin levels in women with systemic lupus erythematosus – a short report. *Balkan Medical Journal* 2013, 30, 273-276. (IF 0.169)
3. **Tanev D**, Robeva R, Andonova S, Decheva V, Tomova A, Kumanov P, Savov A, Rashkov R, Kolarov Zl. Melatonin receptor 1B polymorphisms in women with systemic lupus erythematosus. *Acta Reumatológica Portuguesa*. 2015, accepted. (IF 0.286)

УЧАСТИЯ В КОНГРЕСИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. **Танев Д**, Робева Р, Андонова С, Кирилов Г, Савов Ал, Томова А, Куманов Ф, Рашков Р, Коларов Зл. Андрогени и андроген-рецепторен полиморфизъм у българки със системен лупус. Национална конференция по ревматология с международно участие. Правец, 19-22.10. 2011. Резюме в Ревматология, XIX, 2011, 3, стр. 32.
2. **Танев Д**, Робева Р, Кирилов Г, Стойчева М, Томова А, Куманов Ф, Рашков Р, Коларов Зл. Секреция на мелатонин и пролактин при жени със системен лупус еритематозус. Научна конференция по ревматология (XII кръгли маси). 20-23. 09. 2012. Мелиа Гранд Ермитаж Златни пясъци, п. 4.
3. Andonova S, **Tanev D**, Robeva R, Nikolova M, Tomova A, Rashkov R, Savov A, Kolarov Zl. Estrogen receptor α and androgen receptor gene polymorphisms in patients with systemic lupus erythematosus and healthy controls. European Human Genetics Conference 2011, May 28-31, 2011, Amsterdam, The Netherlands, Abstract in European Journal of Human Genetics, 19, suppl. 2, 2011, S322, P09.225. **IF4.400**
4. **Tanev D**, Andonova S, Robeva R, Savov A, Nikolova M, Tomova A, Rashkov R, Kolarov Zl. Estrogen receptor α gene polymorphisms in Bulgarian women with systemic lupus erythematosus. Balkanic Congress of Medical Genetics 2011, September 15-17, Romania, Timisoara.
5. Robeva R, Andonova S, **Tanev D**, Decheva V, Savov A, Kumanov Ph, Rashkov R, Kolarov Z. MTNR1B polymorphism rs10830962 in healthy women and patients with SLE. The European Human Genetics Conference 2013; June 8-11, 2013, Paris, France, Abstract in European Journal of Human Genetics, 2013, 21, suppl. 2, P09.22. **IF4.225**
6. Andonova S, Tanev D, Savov A, Robeva R, Nikolova M, Tomova A, Kumanov Ph, Rashkov R, Kolarov Zl. PROGINS progesterone receptor polymorphism in systemic lupus erythematosus. The European Human Genetics Conference, Milan, Italy, May 31 - June 3, 2014, Abstract in European Journal of Human Genetics, 2014, 22, suppl. 1, J04.35. **IF4.225**

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторът изказва искрената си благодарност към хора и институции, с помощта на които е осъществена настоящата работа:

- ✓ Благодарност към научния ми консултант проф. д-р Ф. Куманов за изключителното съдействие в създаването на този труд;
- ✓ Благодарност към С. Андонова и доц. А. Савов, които осъществиха всички генетични изследвания в Национална генетична лаборатория, СБАЛАГ “Майчин дом”;
- ✓ Благодарност към проф. д-р Г. Кирилов, ръководител на Радиоимунологична лаборатория към УСБАЛЕ “Акад. Ив. Пенчев”, където бяха извършени всички хормонални изследвания;
- ✓ Благодарност към доц. М. Вуков и доц. М. Стойчева, които осъществиха статистическата обработка на данните;
- ✓ Изследванията бяха проведени благодарение на финансовата подкрепа на МУ-София и Клиника по ревматология, УМБАЛ “Св. Ив. Рилски”;
- ✓ Благодарност на всички работещи в Клиника по ревматология към УМБАЛ “Св. Ив. Рилски” лекари, медицински сестри и лаборанти;
- ✓ Благодарност на проф. д-р Р. Рашков за безценната подкрепа при разработването на дисертацията;
- ✓ Благодарност към научния ми ръководител проф. д-р Зл. Коларов, без чието ръководство и мотивация тази дисертация не би била възможна.

