

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
КАТЕДРА ПО ВЪТРЕШНИ БОЛЕСТИ

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

д-р Добромир Иванов Танев

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

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

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

София, 2015

Съдържание:

СЪДЪРЖАНИЕ	2
ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	4
УВОД	5
ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	7
1. Системен лупус еритематозус – патофизиология и клинична картина.....	7
2. Хормонални фактори и системни автоимунни болести.....	9
3. Хормони, хормонални рецептори и системен лупус еритематозус.....	12
3.1. Нуклеарни стероидни рецептори.....	12
3.1.1. Андрогени, андрогенен рецептор и СЛЕ.....	14
3.1.2. Естрогени, естрогенен рецептор и СЛЕ.....	18
3.1.3. Прогестерон, прогестеронов рецептор и СЛЕ.....	21
3.1.4. Глюкокортикоиди, глюкокортикоиден рецептор и СЛЕ.....	23
3.1.5. Витамин D, VDR и СЛЕ.....	24
3.2. Мембранни хормонални рецептори.....	30
4. СЛЕ и експериментални терапевтични стратегии, свързани с хормоналния дисбаланс.....	31
ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ	37
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	39
РЕЗУЛТАТИ	53
1. Определяне на полиморфизма на андрогенния рецептор и серумните андрогени при жени с лупус.....	54
2. Определяне на RvuII T/C и XbaI A/G полиморфизмите на естрогенния рецептор алфа при пациентки със СЛЕ и здрави контроли.....	64
3. Определяне на PROGINS полиморфизма на прогестероновия рецептор при пациентки със СЛЕ и здрави контроли.....	66
4. Определяне на ER22/23EK и VclI полиморфизмите на глюкокортикоидния рецептор при здрави жени и болни с лупус.....	68
5. Определяне на BsmI и FokI полиморфизмите на VDR при здрави жени и болни с лупус.....	74
6. Определяне на rs1562444, rs10830962 и rs10830963 полиморфизмите на мелатониновия рецептор 1B при здрави жени и болни с лупус.....	80

7. Определяне на нивата на хормона мелатонин при жени с лупус и здрави контроли.....	89
ОБСЪЖДАНЕ.....	92
1. Определяне на полиморфизма на андрогенния рецептор и серумните андрогени при жени с лупус.....	92
2. Определяне на PvuII T/C и XbaI A/G полиморфизмите на естрогенния рецептор алфа при пациентки със СЛЕ и здрави контроли.....	98
3. Определяне на PROGINS полиморфизма на прогестероновия рецептор при пациентки със СЛЕ и здрави контроли.....	103
4. Определяне на ER22/23ЕК и BclII полиморфизмите на глюкокортикоидния рецептор при здрави жени и болни с лупус.....	104
5. Определяне на BsmI и FokI полиморфизмите на VDR при здрави жени и болни с лупус.....	108
6. Определяне на rs1562444, rs10830962 и rs10830963 полиморфизмите на мелатониновия рецептор 1Б при здрави жени и болни с лупус.....	112
7. Определяне на нивата на хормона мелатонин при жени с лупус и здрави контроли.....	115
ОБОБЩЕНИЕ.....	120
1. Генни полиморфизми на стероидните рецептори и СЛЕ.....	120
2. Мелатонин и полиморфизъм на мелатониновия рецептор при СЛЕ.....	123
ИЗВОДИ.....	126
ПРИНОСИ.....	128
ПУБЛИКАЦИИ.....	130
БЛАГОДАРНОСТИ.....	134
КНИГОПИС.....	135

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

АСR - американски колеж по ревматология

IL-1 - интерлевкин-1

IL-10 - интерлевкин 10

IL-12 - интерлевкин-12

IL-13 - интерлевкин-13

IL-17 - интерлевкин-17

IL-21 - интерлевкин-21

IL-22 - интерлевкин-22

IL-4 - интерлевкин 4

IL-5 - интерлевкин-5

IL-6 - интерлевкин-6

SLEDAI - индекс за активност на СЛЕ

SLICC – индекс на хроничните увреди при СЛЕ

Th - Т-хелпер

VDR – рецептор за витамин D

УВОД

Системният лупус еритематозус е най-често срещаната системна ревматична болест. Характерен белег на болестта е вариабилността в клиничната картина, която може да протече както с леки кожно-ставни прояви, така и с ангажиране на множество вътрешни органи и да има животозастрашаващ ход при липса на агресивна терапия. Известна е много по-голямата честота на СЛЕ при жените, особено в детородна възраст, в сравнение с мъжете – 7-10:1. Предполага се, че хормоналният терен, наред с генетичните фактори, модулира склонността към проява на автоимунни заболявания и по-специално на лупусни синдроми (Рашков Р., 1999). Стероидните хормони влияят върху имунния отговор - естрогените усилват хуморалния имунитет, а андрогените и прогестеронът са естествени имуносупресори (Cutolo et al., 2004). Различното съотношение между стероидните хормони, което обуславя характерните за всеки пол белези, вероятно има отношение към хода, изявата и тежестта на СЛЕ. Не по-малко важна е ролята на хипоталамо-хипофизно-адреналната система, която реагира на стресови ситуации и взаимодейства с имунната система при нормални и патологични условия (Cutolo et al., 2008). Особен интерес представлява също хормонът мелатонин, който в експериментални проучвания повлиява функцията на имунните клетки. Наличието на все повече експериментални данни, които показват асоциация между имунната система и различни хормонални фактори, дава възможност за развитието на невроимуноендокринологията като нов и изключително интересен клон на съвременната наука.

Хормоните осъществяват своите ефекти чрез съответни рецептори. За разлика от хормоналните въздействия, ролята на хормоналните рецептори, както и влиянието на техните генетични полиморфизми за възникването и развитието на автоимунните заболявания е много слабо проучено. За да се

разкрие значението на ендокринните фактори за хроничните автоимунни ревматологични заболявания и по-специално за СЛЕ, трябва да се проучи не само действието на отделните хормони, но и вариантите на техните рецептори, които биха могли да модулират хормоналната среда.

За разлика от ендокринните фактори, генните полиморфизми на хормоналните рецептори са постоянни и специфични за всеки индивид. Те не се влияят от възрастта, съпътстващите заболявания или начина на живот на пациентите. Възможността да се предвиждат клиничните прояви, тежестта и терапевтичният ефект от лечението при болните в зависимост от техните индивидуални генетични особености е една от основните цели на съвременната фармакогеномика.

Настоящото проучване не може да обхване дори малка част от многобройните взаимодействия между хормоналните фактори, хормоналните рецептори и автоимунните заболявания, но има за цел да направи малка стъпка в изключително интересния свят на имуногенетиката на системния лупус.

ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Системният лупус еритематозус (СЛЕ) е системно заболяване на съединителната тъкан, при което предимно антинуклеарни и фосфолипидни антитела реагират кръстосано с кожата и вътрешните органи и обуславят разнообразна клинична картина. Болестта рядко започва преди пубертета или след 60 години. Най-често началото ѝ е по време на половото съзряване, след неговото приключване и във възрастта до 40 години. Заболелите в този възрастов интервал имат и най-тежка клинична изява на болестта (Рашков Р., 1999).

1. Системен лупус еритематозус – патофизиология и клинична картина

Колагенозите са група от болести на съединителната тъкан, които се характеризират със ставни симптоми и различни имунни феномени. Засягането на опорно-двигателния апарат и често срещаните тежки нарушения в различни вътрешни органи определят огромната социална и финансова значимост на тези заболявания и показват нуждата от допълнителни изследвания в тази област (Николов и съавт., 2011; Manger B, 2005). Колагенозите включват заболявания като СЛЕ, прогресивна системна склеродермия, дерматомиозит и полимиозит, смесена съединително тъканна болест, синдром на Съогрен. Общото между тях е наличието на автоимунни нарушения, припокриването на клиничните, серологичните и патологичните особености между отделните болести и непредсказуемостта им протичане. Прогнозата зависи от органните увреждания, които са различни при всеки отделен случай (Manger B, 2005).

Етиологията на колагенозите не е известна. Счита се, че вирусни инфекции, някои медикаменти, ваксини и излагането на ултравиолетови лъчи може да предизвика отклонения в имунитета и отключване на СЛЕ (Рашков Р., 1999). При болните с лупус се наблюдават промени в цитокиновия профил, които отразяват дисбаланса между различните лимфоцитни субпопулации, като Th1/Th2 и Th17/Treg (Иванова и съавт., 2014). За разлика от лекарствено-индуцирания лупус, при който е ясно установена връзката между медикамента и лупусния синдром, при СЛЕ няма известна причина за имунния дисбаланс (Рашков и Калинова, 2011). Генетичната предиспозиция е изключително важна, като някои генетични полиморфизми са с доказано влияние върху изявата на СЛЕ (Манолова и съавт., 2012).

Клиничните прояви на СЛЕ се предопределят от засегнатите органи. Наблюдават се симптоми на лупусен нефрит, миокардит, перикардит, клапна деструкция, пулмонит, гастроинтестинални промени, хематологични нарушения, неспецифични оплаквания като фебрилитет, лимфаденопатия и алопеция. Около 90% от болните страдат от артралгии, чести са съпътстващите мускулни и кожни прояви. Диагнозата се поставя след анализ на симптомите, оценка на състоянието на всички органи и системи, определяне на имунологичните показатели. Най-голяма честота в българската популация имат антителата: anti-Ro, anti-Ro52, следвани от anti-RNP/Sm, anti-dsDNA и anti-Nucleosomes, както и хипокомplementемията C4 (Рашков и съавт., 2014). Критериите на Американския колеж по ревматология (ACR) са класификационни. Възможно е болният да развие лупусен миокардит или нефрит, без да покрива нужните четири ACR критерия (Cervera et al., 2009). Целта на лечението е да индуцира ремисия, да я поддържа и да повлияе съпътстващите усложнения. Поради това терапията е комплексна и

включва комбинация от медикаменти според симптомите при всеки конкретен болен (Mosca et al., 2009).

Жените боледуват 7 до 10 пъти по-често от СЛЕ в сравнение с мъжете. Предполага се, че хормоналният терен се отразява на склонността към проява на лупусни синдроми (Рашков Р., 1999). До момента не са известни причините за този изразен полов диморфизъм. Високата честота на СЛЕ при жените в репродуктивна възраст налага по-подробно изучаване на връзката между хормоналния баланс и автоимунитета.

2. Хормонални фактори и системни автоимунни болести

Ревматичните болести с автоимунна генеза като ревматоиден артрит (РА) и СЛЕ са резултат от комплексното влияние на различни фактори. Промените във взаимодействията между вирусните антигени и имунната система, нарушенията в хипоталамо-хипофизно-адреналната система, която реагира на стресови ситуации, хиперактивацията на симпатиковата нервна система са сред основните причини за развитие на автоимунни болести (Cutolo et al., 2008). При нормална реактивност на организма стресовите и възпалителните въздействия активират имунната система и хипоталамо-хипофизно-адреналната ос чрез проинфламаторни цитокини. Болни с РА имат сходни кортизолови концентрации в сравнение със здрави контроли, въпреки значително повишените нива на цитокини. След умерена стресова стимулация кортизоловите им нива намаляват, вместо да се покачват, поради нарушения в регулацията на невроендокринната система (Capellino et Straub, 2008). При РА се наблюдават понижени концентрации на дехидроепиандростерона (ДХЕА), дехидроепиандростеронсулфата (ДХЕАС) и андростендиона, поради инхибиращия

ефект на тумор-некротичния фактор върху ензимите на стероидогенезата (Herrmann et al., 2002; Capellino et Straub, 2008). Освен това хроничните ревматични заболявания се свързват със значителни промени на съотношението между естрогените, които усилват хуморалния имуен отговор и андрогените и прогестерона, които са ендогенни имуносупресори (Cutolo et al., 2008). Инфламаторните цитокини като тумор-некротичния фактор, интерлевкин 1 и интерлевкин 6 повишават ароматазната активност и увеличават локалния синтез на естрогени в синовиалната течност. Това стимулира клетъчната пролиферация и повишения синтез на цитокини (Cutolo et al., 2008; Capellino et Straub, 2008).

Други важни хормонални фактори също благоприятстват развитието на системни ревматологични заболявания. Пинеалната жлеза произвежда хормона мелатонин, който синхронизира циркадните ритми на организма. При ревматоиден артрит се наблюдава значителна промяна в мелатониновия ритъм, като сутрешните му нива са значително по-високи при болните в сравнение със здравите (Cutolo et al., 2005; Afkhamizadeh et al., 2014). Лимфоцитите синтезират различни възпалителни цитокини като IL-1, IL-6 и интерферон-гама след стимулация с мелатонин. От друга страна мелатонинът потиска матриксните металопротеинази, които опосредстват ставната деструкция при ревматоиден артрит (Yoshida et al., 2014).

В последните години се обръща внимание на още един представител на стероидното семейство с имуномодулиращи свойства – витамин D3. Освен добре познатата му роля в регулацията на калциево-фосфорната хомеостаза, той има и съществени имуносупресорни свойства. Той може да потисне синтеза на автоантитела и пролиферацията на макрофагите (Arnson et al., 2008). Посредством специфичния си рецептор (VDR),

витамин D3 може да повлияе генната експресия и съответно секрецията на голям брой цитокини (Arnson et al., 2008).

Въз основа на представените имуно-ендокринологични взаимоотношения може да направим извод, че съществено значение за автоимунитета имат хормони като мелатонин, кортизол и витамин D3. Не трябва да се подценява ролята на хормоните, свързани с репродукцията, които обуславят различната склонност на двата пола към развитие на автоимунни болести (прогестерон, андрогени, естрогени).

Хормоните осъществяват ефектите си върху прицелните органи чрез съответни рецептори. За разлика от хормоналните въздействия, ролята на хормоналните рецептори, както и влиянието на техните полиморфизми за възникването и развитието на автоимунните заболявания е слабо проучено. За да се разкрие влиянието на ендокринните фактори върху хроничните автоимунни ревматологични заболявания и СЛЕ, трябва да проучи ролята на хормоналните рецептори в контекста на съответните ендокринни нарушения.

Хормоналните рецептори са протеинни макромолекули, които са разположени във вътрешността на клетките и по клетъчните мембрани. Вътреклетъчните рецептори, към които принадлежат рецепторите за стероидни хормони, функционират като нуклеарни транскрипционни фактори, които се активират от различни лиганди (естрогени, кортизол, прогестерон и т.н.).

Мембранните рецептори, сред които и мелатониновият рецептор, се свързат със съответния лиганд, след което претърпяват структурни промени. В резултат на това се активират други протеини, които предават сигнала до вътрешността на клетките (вторични посредници) и променят клетъчните функции (Huhtaniemi et Martini, 2015).

3. Хормони, хормонални рецептори и системен лупус еритематозус

3.1. Нуклеарни стероидни рецептори

Суперфамилията на нуклеарните рецептори включва над 30 рецептора за различни хидрофобни лиганди като стероиди, витамин D3, ретиноева киселина, тиреоидни хормони, а също и т. нар. рецептори–сираци, чиито лиганди не са установени (Laudet et al., 1992). Нуклеарните рецептори имат общ филогенетичен произход и се групират в три подсемейства на базата на консервативния ДНК свързващ участък:

- (I) рецептори за тиреоидни хормони и ретиноева киселина;
- (II) рецептори сираци (orphan receptors);
- (III) рецептори за стероидни хормони и витамин D (Tuohimaa et al., 1996).

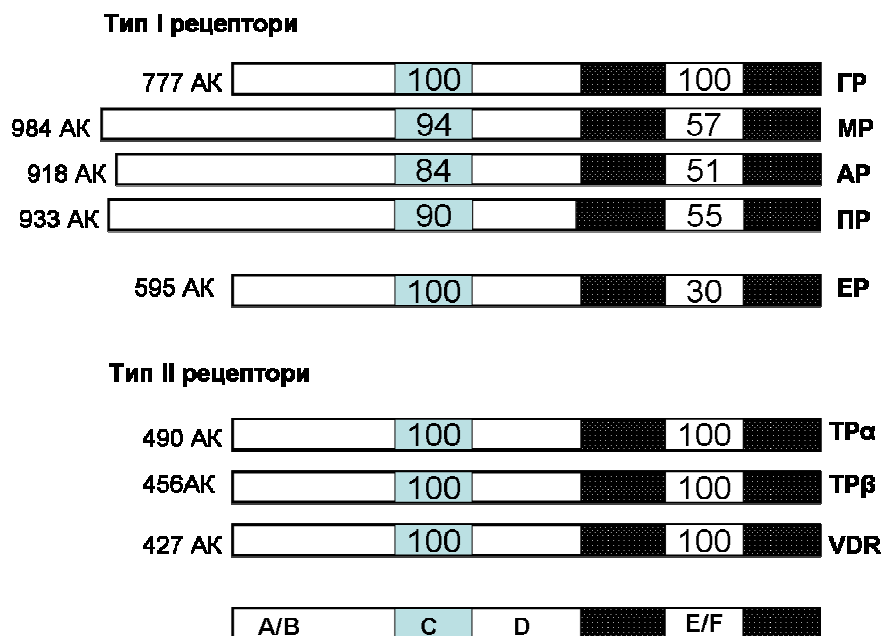
В зависимост от функционалното свързване с ДНК нуклеарните рецептори се подразделят в четири групи:

Група I: рецептори за глюкокортикоиди, минералкортикоиди, прогестерон и андрогени. При липса на лиганд те са свързани с протеините на топлинния шок. При наличие на специфичния хормон рецепторите се дисоциират и образуват хомодимери, които се свързват със съответни ДНК елементи и модулират генната транскрипция. Рецепторите за естрогени често се включват в тази група, макар че според някои автори те принадлежат към отделна подгрупа.

Група II: ядрени рецептори, които формират хетеродимери с други рецептори, най-често с рецептора за ретиноева киселина RXR, свързан с ДНК елементите в ядрото. Към тази група спадат рецепторите за тиреоидни хормони и витамин D.

Рецепторите от група III и група IV са рецептори-сираци. Срещат се в цитоплазмата или ядрото на клетките и съществуват под форма на мономери или димери (Jiang et al., 1995).

Структурата на стероид-тиреоидното семейство на нуклеарните фактори (групи I и II) е представена на фигура 1. Тя включва няколко участъка: домейн A/B – трансактивационна зона с регулаторна функция; домейн C – ДНК свързваща зона; домейн D - шарнирен „hinge” участък; E/F – терминален лиганд-свързващ участък. Броят на аминокиселините (АК) в структурата на съответния протеин е обозначена до участък A/B.



Фигура 1. ГР – глюкокортикоиден рецептор, МР – минералкортикоиден рецептор, АР – андрогенен рецептор, ПР – прогестеронов рецептор, ЕР – естрогенен рецептор, ТР α – тиреоиден рецептор алфа, ТР β – тиреоиден рецептор бета, VDR – рецептор за витамин D. Хомоложната аминокиселинна последователност за ДНК-свързващия домейн C и лиганд-свързващия участък E/F е означена с проценти (модифицирано по Williams et Franklyn, 1994).

3.1.1. Андрогени, андрогенен рецептор и СЛЕ

Голям брой експериментални проучвания доказват комплексното влияние на андрогените върху имунната система, осъществявано посредством андрогенния рецептор. В клетъчни култури от лимфоцити на болни от СЛЕ тестостеронът директно потиска синтеза на антитела чрез намаляване на В-клетъчната свръхактивност (Kanda et al., 1997). При NZB/W мишки, които представляват модел за СЛЕ, женските индивиди умират преждевременно, докато мъжките развиват по-късно болестта. Предполага се, че тестостеронът протектира животните от бърза прогресия на СЛЕ. Механизмът на андрогенната супресия върху имунната система не е ясен. За да изяснят значението на тестостерона, Walker et al. прилагат блокер на андрогенния рецептор (flutamide) върху NZB/W мишки на 24-седмична възраст. При женските индивиди препаратът значително усилва смъртността и намалява преживяемостта до 30 седмици в сравнение с 37 седмици при животните, които не приемат flutamide. При мъжките смъртността е сходна в третираната и контролната група в ранните етапи на проучването, но в по-късен стадий се проявяват негативни ефекти. Авторите стигат до извода, че действието на андрогените върху автоимунното заболяване се осъществява чрез андрогенния рецептор, зависи от пола и се проявява по-рано при женските, в сравнение с мъжките животни (Walker et al., 1994).

Андрогенният рецептор (AR) е лиганд-активируем транскрипционен фактор, отговорен за андрогенната чувствителност в прицелните клетки. Андрогенната чувствителност при различните индивиди не е еднаква. Поради това все повече изследвания се фокусират върху генетичните различия, които обуславят индивидуалните фенотипни особености (Робева и Куманов, 2013).

Генетичен полиморфизъм е наличие на два или повече варианта в определена ДНК последователност. Най-честите полиморфизми са т.нар. единични генетични полиморфизми (single nucleotide polymorphism или SNP). Те възникват поради промяна на един нуклеотид (например замяна на тимин с цитозин) в ДНК веригата на съответния ген. Промените в ДНК могат да бъдат и по-обширни. За разлика от редките мутации, които предизвикват моногенни заболявания, SNP са значително по-чести и засягат поне 1% от съответната популация. Някои от генетичните полиморфизми нямат клинично значение, а други обуславят повишена склонност към редица заболявания, както и променена толерантност към определени лекарствени средства (<http://ghr.nlm.nih.gov/glossary=polymorphism>; Робева и Куманов, 2013). Най-пълно проученият генетичен полиморфизъм в гена за андрогенния рецептор, разположен в X хромозомата, е повторемостта (триплет, мотив) на нуклеотидите цитозин-аденозин-гуанин (CAG) n в екзон 1 (Робева и Куманов, 2013). Триплетът цитозин-аденозин-гуанин кодира аминокиселината глутамин в протеина на андрогенния рецептор. Броят на триплетите определя дължината на полиглутаминовата верига в N-терминалната регулаторна област на протеина (Palazzolo et al., 2008). Полиморфната верига на синтезирания рецепторен протеин определя *in vivo* андрогенната чувствителност, като повлиява отрицателната обратна връзка в хипоталамуса и подпомага трофичните андрогенни ефекти в таргетните органи (Simanainen et al., 2011). Броят на CAG повторенията варира от 8 до 33 в нормалната популация. Патологичното им увеличаване над 38-40 причинява болестта на Кенеди (рядко неврологично дегенеративно заболяване) (Simanainen et al., 2011; La Spada et al., 1997). Вариациите в (CAG) n при AP рецепторния полиморфизъм се свързват с различни ендокринни промени. Намаленият брой (CAG) n триплети се асоциира с хиперандрогенни нарушения. Увеличеният, но в рамките на нормата, брой (CAG) n триплети намалява

чувствителността на организма към андрогени (Palazzolo et al., 2008; Робева и Куманов, 2013).

Ролята на тринуклеотидната (CAG)_n последователност при мъже е подробно проучена, докато изследването на AP полиморфизма при жените е по-трудно, тъй като всяка жена разполага с две X хромозоми и съответно с два, най-често различни по отношение на този полиморфизъм, алела (т.е. два алела с различен брой (CAG)_n триплети). Значението на полиморфизма на андрогенния рецептор при опитни животински модели и пациентки със СЛЕ до момента не е изяснена.

От 80-те години на XX век промените в серумните андрогени при мъже и жени със СЛЕ се разискват широко. Подробно е изучавана ролята на тестостерон, ДХЕАС и андростендион. Интересно изследване от 80-те години сравнява нивата на тестостерона, при няколко групи болни (от СЛЕ, ревматоиден артрит, болни с бъбречна недостатъчност на хемодиализа) със здрави доброволци. Както се очаква, средните тестостеронови нива са понижени значително при всички болни, без съществено различие между болните от СЛЕ и другите хронични болести. Според авторите понижените тестостеронови нива при СЛЕ са логичен резултат от продължително хронично заболяване и е малко вероятно те да бъдат рисков фактор за развитието на СЛЕ при мъже (Maskworth-Young et al., 1983). В противоречие на това, други автори не намират значима разлика между общия и свободния тестостерон при мъже със СЛЕ в сравнение със здравите, макар че нивата на ДХЕАС и андростендиона са по-ниски при болните. Според тях хипоталамо-хипофизно-гонадната ос е нормална при СЛЕ, а намаленият отговор на свободния тестостерон след стимулация с човешки хорионгонадотропин вероятно се дължи на кортикостероидното лечение (Vilarinho et Costallat, 1998). От друга страна при болни с нелекуван хипогонадизъм и много ниски нива на серумния тестостерон се установява неочаквано висока честота на ревматични и

автоимунни болести като СЛЕ, дерматомиозит, хроничен ювенилен артрит, анкилозиращ спондилит, РА. Наличието на ревматични и автоимунни болести при тези болни е независимо от етиологията на техния хипогонадизъм (първичен или вторичен), но се свързва с изразената гонадна недостатъчност и много ниските тестостеронови нива (Jiménez-Balderas et al., 2001).

Повечето проучвания при жени със СЛЕ установяват хипоандрогенемия, като причините са неизвестни. Мета-анализ на проведени между 1978 и 2000 година проучвания върху андрогени и СЛЕ доказва значимо понижени нива на серумния тестостерон при жените, но не и при мъжете със СЛЕ (McMurray et May, 2003). При сравнение на пациентки с РА, СЛЕ, мултиплена склероза и хронично болни жени без автоимунни болести със здрави жени се установява статистически значима редукция на андрогените само при жените със СЛЕ. Авторите заключават, че хипоандрогенията не е последица на хроничното заболяване, нито предразполагащ фактор за автоимуен процес, а е специфична за СЛЕ. Въпреки това, не всички проучвания подкрепят тези изводи (Dougados et al., 1984; Navarro et al., 2002).

Слабите андрогени дехидроепиандростерон (ДХЕА) и андростендион също повлияват имунната система. ДХЕА се произвежда предимно в надбъбречните жлези. Неговият сулфатен естер дехидроепиандростерон – сулфат (ДХЕАС) представлява основен прекурсорен резервоар за андрогени и естрогени, до които може да се метаболизира. С възрастта концентрацията на ДХЕАС намалява. Предполага се, че хормонът оказва протективен ефект при хронични възпалителни заболявания, костна загуба и атеросклероза (Schiechl et Straub, 2008).

При болни със СЛЕ се установяват значителни промени в концентрациите на серумните ДХЕА и ДХЕАС. Те не са само отражение на продължителното кортикостероидно лечение, тъй като при болни без

такова концентрациите им също са понижени. В допълнение - екзогенният ДХЕА възстановява нарушената продукция на интерлевкин-2 от Т-лимфоцитите на болни със СЛЕ *in vitro* (Suzuki et al., 1995).

3.1.2. Естрогени, естрогенен рецептор и СЛЕ

Експерименталните проучвания показват пряк ефект на естрогените върху В-лимфоцитната функция при животински модели на лупус. Естрадиолът (Е2) нарушава В-клетъчния толеранс и индуцира лупусоподобен фенотип при някои видове мишки. Естрогенното лечение води до увеличение на титрите на серумните антитела и до натрупване на имуноглобулини в бъбречните гломерули. (Вупое et al., 2000). Увеличаването на Е2 предизвиква разрастване и активиране на популация от автореактивни В-лимфоцити в маргиналната зона на лимфните възли и съответно повлиява автоимунитета (Grimaldi et al. 2001).

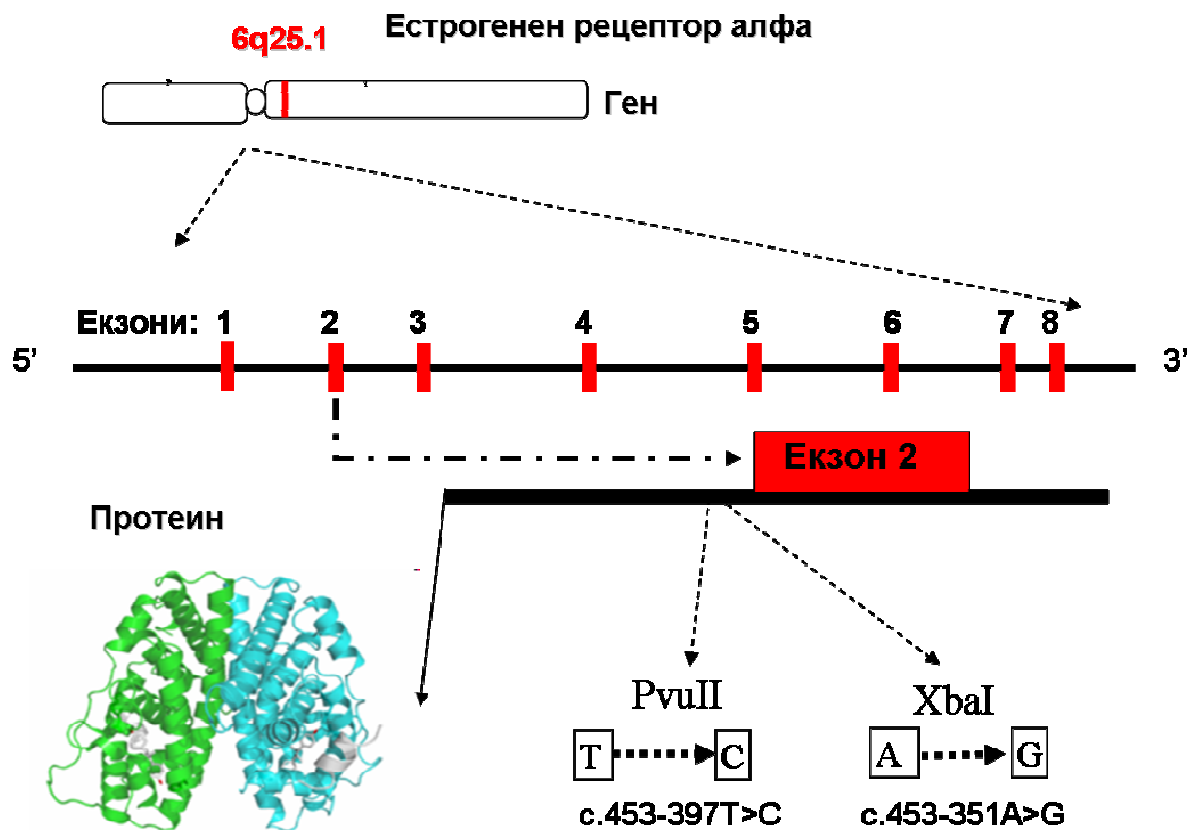
В последните години има повишен интерес не само към двата основни естрогена – естрадиол и естрон, но и към групата от хидроксилираните им метаболити, които са важни модулатори на клетъчния растеж (Capelino et Straub, 2008). Отделеният в плазмата естрадиол бързо се конвертира в черния дроб до естрон. Част от него се връща отново в циркулацията. Естронът може да се метаболизира до 16-алфа-хидроксиестрон, който от своя страна се превръща в естриол или до 2-хидроксиестрон, който се метаболизира впоследствие до 2-метоксиестрон (Goldfien et Mongro, 1994). Изследванията върху карциноми разкриват митогенната роля на 16-алфа хидроксилираните естрогени по отношение на туморния растеж – находка, която подкрепя вероятната им стимулираща пролиферативна активност, докато 2-хидроксиестронът най-вероятно проявява антипролиферативни

ефекти. В последните година бе установено, че при болните със СЛЕ е нарушен балансът на тези метаболити (Capelino et Straub, 2008).

Освен ролята на естрогените, широко дискутирана е и ролята на естрогенния рецептор. Основните биологични ефекти на естрадиола се опосредстват чрез два различни вътреклетъчни рецептори - естрогенен рецептор-алфа (ER- α) и естрогенен рецептор-бета (ER- β). Те принадлежат към суперсемејството на нуклеарните рецептори за стероидни и тиреоидни хормони (Jiang et al., 1995). ER- α се експресира в гърдите, матката, яйчниците, кожата и други прицелни органи, докато ER- β има по-ограничено разпространение и се намира в яйчниците, тестисите, слезката и тимуса (Brandenberger et al., 1997; Couse et al., 1997). И двата рецептора са широко разпространени в различни отдели на мозъка (Stanić et al., 2014). Биологичната функция на естрогенните рецептори се разкрива най-пълно чрез контрастния фенотип на опитни мишки, при които е постигната вродена липса на съответния рецептор (Hall et al., 2001). Чрез същата опитна постановка са наблюдавани и проявите на лупус при линията NZM мишки с дефицит на ER- α . Женските, но не и мъжките животни, са със значително удължена преживяемост, намалена протеинурия, по-слабо изразена бъбречна патология и намалени серумни азотни тела в сравнение с контролите, въпреки по-високите нива на антитела. Другият тип мишки - MRL/lpr, използвани като опитна постановка за лупус, също демонстрират значението на ER- α . Женските, но не и мъжките мишки с дефицит на ER- α и лупус имат значително по-слаба протеинурия и по-слабо бъбречно засягане без съществено влияние върху нивата на антителата. Дефицитът на ER- β няма ефект върху болестта. Това дава основание на авторите на проучването да предположат, че ключова роля при развитието на лупусоподобно заболяване показват ER- α , но не и ER- β (Svenson et al., 2008). Тази теза се подкрепя и от други изследвания. Прилагането на селективен ER- α агонист при овариектомизирани NZ-мишки води до по-

кратка преживяемост, по-ранно развитие на албинурия, по-висока серумна концентрация на общ IgG и пролактин в сравнение с контролната група. Обратно, прилагането на ER- β селективен агонист значително намалява серумните анти-ДНК Ат IgG2b, но не засяга останалите показатели (Li et McMurray, 2007). Следователно, активирането на ER- α има доминираща и имуностимулаторна роля в естроген-медираната модулация на лупуса, докато активирането на ER- β оказва само лек имуносупресивен ефект. В допълнение, активирането на ER- α увеличава серумните нива на пролактина, което също може да има отношение към лупусната активност (Li et McMurray, 2007). На базата на посочените данни може да се заключи, че нивата на естрогените значимо повлияват фенотипната изява на системния лупус при опитни модели, като ефектът се опосредства от ER- α . Този извод се подкрепя от проучва върху опитни животни със СЛЕ, при които лечението с tamoxifene (селективен модулатор на естрогенните рецептори) намалява симптомите на лупусния нефрит и увеличава преживяемостта в сравнение с контролите (Wu et al., 2000).

Възниква въпросът, какво е влиянието на естроген-рецепторната активност и естроген рецепторните полиморфизми при СЛЕ. Най-широко проучваните SNP полиморфизми в гена за ER- α са тясно свързаните точковите нуклеотидни замени rs2234693 и rs9340799 в екзон 2, означавани още съответно като - с. 453-397 T>C (PvuII) и с. 453-351 A>G (XbaI) (Фигура 2). Счита се, че полиморфизмът PvuII може да предизвиква промени в регулацията на транскрипцията, които да доведат до усилване на някои от естрогенните ефекти (Herrington et al., 2002; Johansson et al., 2005). Не е изяснено обаче влиянието на тези полиморфизми върху имунната система и автоимунитета.



Фигура 2. Схематично представяне на естрогенния рецептор и неговите полиморфизми PvuII и XbaI (Andonova et al., 2011).

3.1.3. Прогестерон, прогестеронов рецептор и СЛЕ

Съвременни проучвания показват, че прогестеронът и синтетичните прогестини повлияват автоимунните процеси по различен начин в зависимост от тяхната концентрация и експресията на прогестеронови рецептори в клетките, свързани с имунната система (Hughes GC, 2012). Прогестеронът модулира Т-клетъчната пролиферация, секрецията на цитокини, синтезът на антитела и макрофагеалната функция (Zen et al., 2010). Намалени прогестеронови нива са описани при болни с ювенилен лупус. Причините за лутеалната дисфункция за клиничната изява на

болестта остава неясна (Medeiros et al., 2009). Счита се, че един от основните ефекти на естрогените е увеличаването на рецепторите за прогестерон и съответно потенцирането на неговото действие. В опитни животински модели с лупус е установено увреждане на този процес в матката и вероятно в тимуса. (Dhafer Y, 2000).

Ролята на прогестерона е най-голяма по време на бременност и нарушенията в синтеза и действието на този хормон може да има неблагоприятни последици за фертилитета при жени с лупус. Бременността индуцира преминаване от Th1 към Th2 имуен отговор и съответно увеличава противовъзпалителните цитокини – интерлевкин 4 и интерлевкин 10. Проспективни проучвания показват, че при около 50% от жените със СЛЕ бременността се свързва с обостряне на клиничната картина. Лупусният нефрит, наличието на антифосфолипидни антитела и анамнезата за предходни спонтанни аборти увеличава риска от усложнения по време на бременността и загуба на плода. Предполага се, че увеличението на E2 и прогестерона по време на бременност усилва проявите на СЛЕ. Преходът към Th2 имуен отговор вероятно отключва прояви, зависими от хуморалния имунитет, като лупусен нефрит (Ostensen M., 1999).

При изследване на 17 бременни пациентки със СЛЕ и 8 здрави контроли са определени нивата на тестостерона, E2, кортизола, ДХЕАС и прогестерона. При лупусно болните бременни нивата на E2, прогестерона и ДХЕАС са значително по-ниски, отколкото при контролите. Авторите стигат до извода, че учудващо основната хормонална промяна при бременните със СЛЕ е недостатъчното покачване на серумните естрогени и в по-слаба степен на прогестерона във втория и дори в третия триместър на бременността. Липсата на това повишаване вероятно се дължи на плацентарна дисфункция (Doria et al., 2002). Следователно значение може да има не само абсолютното покачване на стероидните нива, но и

промяната в тяхното съотношение. При бременност често се установява обостряне на СЛЕ, но тласъците на болестта обикновено са умерени, предимно с кожно-ставни прояви. Въпреки това, при някои бременни предшестващите органни засягания (например лупусният нефрит) се влошават значително (Handa et al., 2006).

Прогестеронът влияе върху тъканите посредством прогестеронов рецептор (ПР). ПР е транскрипционен фактор, който съществува в две изоформи- А и В, като резултат от избор на алтернативен промоторен участък (Stenzig et al., 2012). В гена за ПР у хора са идентифицирани повече от 670 полиморфизма, като някои от тях се асоциират с повишен риск от овариален и ендометриален карцином, неоплазми на млечните жлези, рецидивиращи спонтанни аборти и преждевременно раждане (Tait et al., 2008). Най-значимият полиморфен вариант на прогестероновия рецептор е известен като PROGINS и се състои от интронна 320-bp Alu инсерция и три полиморфни участъка, които винаги се унаследяват свързано (пълнен linkage disequilibrium) (Stenzig et al., 2012). Алелната им честота сред бялата раса варира от 9 до 19% (Stenzig et al., 2012). До момента ролята на полиморфизмите на ПР при СЛЕ не е изследвана.

3.1.4. Глюкокортикоиди, глюकोкортикоиден рецептор и СЛЕ

Глюкокортикоидите оказват противовъзпалително и имуносупресивно действие върху различни клетки и тъкани посредством глюкокортикоидния рецептор (ГР) (Dvorkina et Ginzler, 2011). Комплексното взаимодействие между глюкокортикоидите и полиморфните глюкокортикоидни рецептори повлиява процесите на транскрипция и трансляция, както и съответно стероидните ефекти. Следователно, рецепторните полиморфизми влияят върху физиологичните и

патологичните процеси, свързани с имунната система и автоимунитета (Nikolaides et al., 2010).

Описани са множество варианти и полиморфизми в гена за ГР с различно биологично значение (подробно разгледани от DeRijk et al., 2002 и van Rossum et al., 2004). Интересен е полиморфизмът ER22/23ЕК, който се състои от две свързани мутации в кодони 22 и 23 на екзон 2 в гена за ГР (van Rossum et al., 2004). При прилагане на малък блокаж с дексаметазон носителите на рядко срещания ER22/23ЕК алел реагират различно от останалите, тъй като ER22/23ЕК алелът обуславя намалена чувствителност към кортикостероидите (van Rossum et al., 2002). Обратно - друг широко проучван полиморфизъм - *Bcl I*, разположен в интрон 2 на гена за ГК, се свързва с повишена чувствителност към кортикостероиди (van Rossum et al., 2004).

СЛЕ е болест, при която са налице значителни промени в хипоталамо-хипофизно-адреналната ос (Härle et al., 2006). Нивата на серумния кортизол са понижени при болни със СЛЕ, независимо от прилагането на лечение с кортикостероиди (Straub et al., 2004). Същевременно ролята на кортикостероидния рецептор и неговите полиморфизми при системни автоимунни болести е слабо проучена. До момента подобни изследвания има само сред азиатци, като значението на ГР полиморфизмите при болни със СЛЕ от бялата раса не е известно (Lee et al., 2004; Zou et al., 2013).

3.1.5. Витамин D, VDR и СЛЕ

Витамин D е основен фактор в регулацията на калциевата обмяна, като участва и в други метаболитни пътища, които имат отношение към имунитета и канцерогенезата (Valdivielso et al., 2006). Той може да постъпи в организма чрез диетата или да се синтезира в кожата от 7-

дехидрохолестерол при наличие на ултравиолетово облъчване. Впоследствие чрез ензима 25-хидроксилаза черният дроб конвертира витамин D до 25-хидрокси витамин D, който представлява основната форма на витамин D в циркулацията. В бъбреците 25-хидрокси витамин D се преобразува в активен 1, 25 – дихидроксивитамин D (калцитриол) под действието на ензима 1-алфа хидроксилаза (Борисова АМ, 2012). Активният метаболит 1, 25 – дихидроксивитамин D (D3) осъществява повечето от ефектите си чрез рецептора за витамин D (VDR) (Борисова АМ, 2012). Хормонът е абсолютно необходим за поддържане на нормалната калциево-фосфорна обмяна. Установяват се и други негови ефекти. Интересни са данните за въздействие на хормона върху имунната система, а също и при автоимунни болести.

Витамин D3 стимулира неспецифичния имуен отговор, като усилва антимикробните свойства на моноцитите и макрофагите. Той повишава хемотаксичните и фагоцитните им свойства, активира генната експресия на някои антибактериални пептиди. Витамин D3 модулира и специфичния имуен отговор, осъществяван от Т и В лимфоцитите. Съществено е влиянието му върху Т-хелперите (Th) (Battault et al., 2013). CD4⁺ Th популацията се подразделя на два типа клетки - Th1 и Th2, съобразно профила на произвежданите цитокини. Th1 се свързва с клетъчния имунитет, а Th2 - с хуморалния. След антигенна стимулация Th1 субпопулацията синтезира интерферон-гама, IL-2 и тумор-некротичен фактор-β, с което се осигурява защита срещу вътреклетъчни патогени. Експесивният Th1 отговор предразполага към развитието на автоимунни заболявания. Th2 клетките синтезират IL-4, IL-5 и IL-13, като въздействат върху екстрацелуларните патогени, но същевременно участват и в развитието на някои алергични състояния (Abbas et al., 1996, Boonstra et al., 2002). Витамин D3 променя баланса между Th1 и Th2 отговора, като

едновременно потиска Th1 и усилва Th2 клетъчното развитие (Boonstra et al., 2002).

Сега се отделя голямо внимание на лимфоцитната субпопулация Th17. След активиране, наивната CD4⁺ Т-клетка може да се диференцира по посока на Th1 в присъствие на IL-12 и в посока на Th2 в отговор на IL-4. Th17 клетъчната субпопулация се развива при наличието на IL-6 и трансформиращ растежен фактор-бета (Stockinger et al., 2007). Субпопулацията Th17 е свързана със синтеза на IL-17A, IL-17F, IL-21 и IL-22. Тя има отношение към защитните механизми спрямо някои бактериални инфекции. Свързва се с патогенезата и на много аутоимунни заболявания (Ouyang et al., 2008). Витамин D3 балансира синтеза не само на Th1, но и на Th17 – цитокини, като понижава концентрациите на интерлевкин-2, IL-17 и IL-21. В резултат отслабва както Th1, така и Th17 - свързания клетъчен отговор (Battault et al., 2013). Витамин D3 проявява имуномодулаторните си свойства не само чрез влияние върху Т-клетките, но и като въздейства върху В-клетките. Той потиска началната пролиферация на активираните В-клетки, като предизвиква клетъчна апоптоза. Образоването на плазмоцити, съответно антитела, както и на В-клетки на паметта също се потиска под действието на витамин D3 (Chen et al., 2007; Hewison M., 2010). Тези резултати показват комплексното влияние на D3 върху имунитета и обясняват множеството проучвания в последните години върху ролята на този хормон при аутоимунни болести. Хиповитаминоза D3 се очаква при болните със СЛЕ, тъй като слънчевата експозиция при тях е минимална поради наличието на фоточувствителност. По-сложен е въпросът, дали ниските нива на витамин D3 (и съответно пониженият имуномодулиращ ефект на този хормон) имат отношение към патогенезата на болестта. Голямо проучване върху болни със СЛЕ действително установява по-ниски нива на 25–хидрокси витамин D при болните в сравнение с контролите. Най-тежък витамин D дефицит

показват афро-американците и болните с фоточувствителност (Kamen et al., 2006). Болните с лупус имат по-ниски нива на 25-хидрокси витамин D в сравнение със здрави контроли и болни с артроза. Нивата на 1, 25 дихидрокси витамин D са сравними в трите групи (Muller et al., 1995). Според испанско проучване различно изразен дефицит на витамин D3 се среща често при болни със СЛЕ. Авторите го свързват най-вече с липсата на слънчева експозиция. Дефицитът обуславя по-голяма степен на уморяемост при болните, но не определя тежестта на състоянието (Ruiz-Irastorza et al., 2008). Според друго проучване нивата на 25-хидрокси D3 са обратно пропорционални на клиничната активност на лупуса, както и на титъра на anti-dsDNA антителата (Mok et al., 2012). В допълнение, при ANA-позитивни здрави лица по-често се установява дефицит на витамин D3 в сравнение с ANA-негативни контроли (Ritterhouse et al., 2012). Авторите заключават, че витамин D3 има отношение към антиялообразуването, а следователно и към патогенезата на СЛЕ (Ritterhouse et al., 2012; Cutolo et al., 2011). С оглед на тези данни френски колектив проучва безопасността и имунологичните ефекти на суплементацията с високи дози витамин D при 20 лупусно болни с D3 хиповитаминоза. В резултат на лечението се установява повишение на нивата на 25-хидрокси D, повишение на регулаторните T клетки, намаление на популациите на Th1 и Th17 клетките и понижаване на количеството на B клетките на паметта, наред с намаляване на anti-dsDNA антителата (Terrier et al., 2012). Тези данни ясно показват необходимостта от допълнителни проучвания относно връзката между витамин D3 и СЛЕ, както и по-подробно изследване на генетичните полиморфизми, които имат отношение към обмяната на витамин D и неговото действие при болни с автоимунни заболявания.

Рецепторът за витамин D3 (VDR) е лиганд-зависим транскрипционен фактор, който принадлежи към суперфамилията на стероидните и

тиреоидните рецептори и се свързва традиционно с регулацията на калциевата хомеостаза. По-задълбочените проучвания показват, че VDR има отношение към клетъчната пролиферация, диференциация и имуномодулация (Nagpal et al., 2005). VDR се експресира в повечето клетки на имунната система, включително в антиген-представящите клетки, NK клетките, Т- и В-клетките. Свързването на активния метаболит D3 с VDR променя експресията на повече от 900 гена. Особено важно значение има способността на комплекса да активира неспецифичния имунен отговор (Nagpal et al., 2005; Waterhouse et al., 2009).

Повече информация за ролята на VDR може да се получи от експерименталните модели на животни, при които е отстранен генът за витамин D3. Мишките, които не експресират VDR са фенотипно нормални при раждането, но впоследствие развиват хипокалцемиа, рахит и алопеция. При тях се наблюдават и някои промени в имунната система - дефекти във функцията на макрофагите и в Т-клетъчната пролиферация (Bouillon et al. 2008). Промените в гена за VDR, разположен в 12 хромозома (12q12-q14), предизвикват нарушения в генната активация с последващо засягане на калциево-фосфорната обмяна, клетъчната пролиферация и имунитета поради промяна в кодиращия протеин (Valdivielso et al., 2006). Описани са няколко мутации в гена, които обуславят развитието на витамин D3 резистентен рахит – рядко автозомно рецесивно заболяване, характеризиращо се с хипокалцемиа, вторичен хиперпаратиреоидизъм и тежък рахит (Malloy et al., 2010).

За разлика от моногенните заболявания, клиничното значение на генетичните полиморфизми във VDR е много по-слабо проучено. В гена за VDR са установени няколко полиморфизма, като най-често в литературата се дискутира т. нар. *Fok I* (rs2228570), тъй като единствено той променя кодиращия VDR протеин. *Fok I* полиморфизмът представлява T→C мутация, при която тиминът се заменя с цитозин в нуклеотидната поредица

на втори екзон, с което се променя процеса на трансляция и по-специално инициращия кодон. В резултат възникват два варианта на VDR протеина – „удължена” форма, кодирана от обичайния T-алел (“f” форма) и „скъсена” форма, кодирана от C алела, при която полипептидната верига има три аминокиселинни остатъка по-малко (“F” форма) (Uitterlinden et al., 2004). Въпреки че обичайно полиморфизмите на VDR се изучават в контекста на остеопорозата и фрактурния риск, *Fok I* има съществено отношение и към имунната система (Mencej-Bedrac et al., 2009; van Etten et al., 2007). В човешки моноцити и дендритни клетки с хомозиготен VDR FF генотип се установява по-висока експресия на IL-12 в сравнение с ff носителите. В допълнение FF лимфоцитите пролиферират по-активно след стимулация с фитохемаглутинин. Следователно *Fok I* полиморфизмът е в състояние да модулира поведението на имунокомпетентните клетки, което вероятно има отношение към имуно-медираните заболявания (van Etten et al., 2007). FF *Fok I* VDR полиморфизмът се свързва с повишена склонност към развитие на захарен диабет тип 1, болест на Behçet и ревматоиден артрит (Kocabaş et al., 2010; Karray et al., 2012; Maalej et al., 2005). От друга страна *Fok I* ff хомозиготите страдат по-често от носителите на други генотипове от туберкулоза, рак на гърдата и рак на простатата (в условия на хиповитаминоза D) (Cao et al., 2012; Sinotte et al., 2008; Li et al., 2007). Това показва твърде сложната и нееднозначна роля на генетичните полиморфизми за човешкото здраве.

Други често изследвани полиморфизми в гена за VDR са тясно свързаните BsmI A/G (rs1544410), ApaI G/T (rs7976091) и TaqI T/C (rs731236) в интрон 8 и екзон 9 в 3' края на VDR гена, който се свързва с регулацията на генната експресия (Uitterlinden et al., 2004). Наличието на един или два BsmI B алела намалява значимо общата заболеваемост от рак сред бялата раса, докато bb генотипа е протективен по отношение на риска от развитие

на остеопороза и се свързва с по-леко протичане на ревматоидния артрит (Raimondi et al., 2009; Jia et al., 2013; Gómez-Vaquero et al., 2007).

Няколко проучвания са изследвали ролята на VDR полиморфизмите за развитието и клинични характеристики на СЛЕ, но резултатите са противоречиви (Ozaki et al., 2000; Abbasi et al., 2012; Luo et al., 2012). Въпреки че връзката между VDR полиморфизмите и системния лупус зависи от етническите особености, до момента липсва подробно проучване по този проблем сред българските болни.

3.2. Мембранни хормонални рецептори

Най-голямата група хормонални мембранни рецептори е семейството на G - протеин свързаните рецептори. То включва над 800 рецептора, които се отличават със сходна структура. Типично за тези рецептори е наличието на трансмембранен участък със седем хидрофобни трансмембранни сегмента. Допълнително се наблюдава екстрацелуларен аминотерминален участък, който реагира със съответни лиганди и интрацелуларен карбокситерминален участък, който предава сигнали до вътрешността на клетките (Kobilka BK et al., 2007).

Мелатонин, мелатонинов рецептор и СЛЕ

Нервноендокринно-имунната система е основна мрежа за поддържане на здравето на организма, която вероятно играе важна роля в развитието на автоимунни нарушения. Освен стероидните хормони като кортизол, андрогени и естрогени друг ключов участник в нервноендокринно-имунните пътища е неврохормонът мелатонин (Cutolo et Straub, 2009). Той

се възприема като модулатор на имунните клетки. Стимулира синтеза на цитокини, фагоцитозата и активността на НК клетките (Szczepanik M., 2007). Може да действа и като противовъзпалителен агент (Szczepanik M., 2007). Поради тази причина концентрациите на мелатонина са били изследвани при различни аутоимунни, алергични и инфекциозни болести (Sulli et al., 2002; Fei et al., 2004; Carrillo-Vico et al., 2005). Комплексната роля на хормона по отношение на имунната система остава неясна.

Влиянието на мелатонина върху таргетните органи се осъществява както пряко поради липофилните му свойства, така и посредством мелатонинови рецептори. Известни са два типа мелатонинови рецептори с висок афинитет за свързване с хормона: мелатонинов рецептор тип 1 А (MTNR1A, известен още като MT1) и мелатонинов рецептор тип 1 Б (MTNR1B, известен още като MT2). MTNR1B (11q21-22) вероятно опосредства влиянието на мелатонина върху имунитета, тъй като е изолиран в редица клетки на имунната система. Рецепторът се среща още в ретината, главния мозък, хипофизата, сърдечно-съдовата система, яйчниците и др. (Dubocovich et Markowska, 2005; Pandi-Perumal et al., 2008). Ролята на мелатониновия рецептор тип 1Б, както и на неговите полиморфизми, не е изследвана при СЛЕ.

4. СЛЕ и експериментални терапевтични стратегии, свързани с хормоналния дисбаланс

Литературните данни показват съществуването на голям брой хормонални промени при болните от СЛЕ (Таблица 1).

Таблица 1. Хормонални нарушения при болни със СЛЕ. Модифицирано по (McMurray et May, 2003; Straub et al., 2004).

Хормони	Жени със СЛЕ	Мъже със СЛЕ
Тестостерон	↓	N
ДХЕАС/ДХЕА	↓	↓
Естрадиол	↑	N
Прогестерон	↓	?
Кортизол	↓	↓
Мелатонин	?	?

↓ - понижени в сравнение със здрави контроли. ↑ - повишени в сравнение със здрави контроли. N – подобни в сравнение със здрави контроли. ? – липсват данни.

Различни научни колективи предполагат, че приложението на хормонални препарати или селективни хормон-рецепторни модулатори може да има положителен ефект при лечението на болни от СЛЕ.

Наскоро проведено проучване изучава ролята на fulvestrant в терапията на жени със СЛЕ. Препаратът е селективен естрогенен рецепторен регулатор, който се конкурира за рецепторно свързване *in vitro* и потиска естрогенното действие в прицелните клетки. Двойно-сляпо плацебо-контролирано проучване върху 20 жени изследва влиянието на fulvestrant върху клиничните прояви на СЛЕ. Резултатите показват значително намаляване на активността на болестта без промяна в серологичните

маркери или рутинните лабораторни тестове. Медикаментозната терапия на СЛЕ в лекуваната с fulvestrant група е редуцирана, докато в плацебо-групата е непроменена или се е увеличила. Значително са се понижили и Т-клетъчните маркери за активност - CD154 и калциневрин в рамото с fulvestrant. Авторите правят извода, че блокирането на ER in vivo от естрогенен селективен рецепторен down-регулатор може да се разглежда като нова и относително безопасна терапевтична възможност в лечението на лупусно болни с умерена активност на болестта за едногодишен период (Abdou et al., 2008).

В лонгитудинално проучване върху 50 жени със СЛЕ, лекувани с ДХЕА, се установява повишение на серумните нива на ДХЕА, ДХЕАС и тестостерона и намаляване на активността на заболяването в сравнение с изходната. Основният страничен ефект от терапията е появата на леко акне. Авторите заключават, че ДХЕА има клинични ползи, които се запазват в течение на минимум една година при тези, които продължават лечението, а то като цяло се понася добре (van Vollenhoven et al., 1998). В друго голямо проучване се изследва ефектът на хранителната добавка prasterone върху хода на СЛЕ. Препаратът е синтетичен ДХЕА, одобрен от Американската агенция по храни и лекарства за допълнително лечение на СЛЕ в САЩ. Сред пациентките с клинично активно заболяване, които са получавали prasterone 58.5% показват подобрене или стабилизация без клинично влошаване в сравнение с 44.5% от плацебо-групата. Акне (33% срещу 14%) и хирзутизъм (16% срещу 2%) са наблюдавани значително по-често при лекуваните с prasterone в сравнение с плацебо-групата. В повечето случаи тези странични ефекти са били леки и не са наложили спиране на лечението. Според авторите при жени с активен СЛЕ приложението на prasterone в доза 200мг/дн подобрява или стабилизира симптомите на болестта, а поносимостта е относително добра (Petri et al., 2004).

Друго проучване изучава ролята на пластири с testosterone в сравнение с плацебо при жени със СЛЕ с лека до умерена активност на болестта. Пациентките са получавали по 150 мкг testosterone или плацебо чрез трансдермални пластири. След 12 седмици не се установява значима разлика в активността на болестта между двете групи. Авторите заключават, че тестостероновите пластири не са подобрили активността на заболяването, качеството на живот или сексуалната функция. В плацебо-групата обаче е увеличена употребата на кортикостероиди, което влияе на резултатите (Gordon et al., 2008).

Тъй като хиперпролактинемията е характерна за жените със СЛЕ, няколко проучвания изследват влиянието на допаминови агонисти върху болни с лупус. Проспективно двойно-сляпо рандомизирано проучване сравнява приложението на bromocriptine в доза 2.5 мг срещу плацебо към терапията с кортикостероиди и имunosупресори при болни от СЛЕ. Общо 66 болни са проследени за период от средно 12.5 месеца. В третираната с допаминовия агонист група е установена значимо понижаване на нивата на пролактина за разлика от контролната. Индексът на активност SLEDAI показва значително намаление в групата с bromocriptine в сравнение с контролната, а средният брой обостряния на пациент на месец е намален. Авторите заключават, че дълготрайното лечение с ниски дози bromocriptine е безопасен и ефективен способ за ограничаване на обострянията на СЛЕ при някои болни (Alvarez-Nemegyei et al., 1998). Подобни резултати са получени и от други автори (McMurray et al., 1995).

Тези експериментални данни показват потенциални терапевтични стратегии и подчертават необходимостта от допълнително проучване на ролята на ендокринните фактори при автоимунни болести и в частност при СЛЕ.

Системният лупус се развива най-често при жени след пубертета. Това подсказва неблагоприятен ефект на естрогените върху имунната система. Влиянието на естроген-рецепторния полиморфизъм при СЛЕ не е изяснено. Ролята на полиморфизмите в андрогенния, прогестероновия и кортикостероидния рецептор не е проучена, въпреки отклоненията в съответните хормони при болните със СЛЕ. Полиморфизмите на рецептора за витамин D са изследвани при болни с лупус, но резултатите са противоречиви и показват значителни етнически различия. Изключително важно е да се изследва влиянието на генетичните фактори именно в българската популация, тъй като някои генетични полиморфизми са свързани с повишен риск от СЛЕ в други етнически групи, но не и сред българи (Митева и съавт., 2010; Zhou et al., 2013).

Ролята на мелатонина и неговите рецептори при болните със СЛЕ е неизвестна, въпреки че влиянието на хормона върху имунната система е познато отдавна. Изясняването на връзката между ендокринната система, генетичните полиморфизми и автоимунните болести има смисъл за разработване на нови терапевтични стратегии. Те биха могли да повлияят протичането на СЛЕ и да облекчат състоянието на болните. Освен това допълнителните проучвания може да спомогнат за изясняването на взаимоотношенията между генетичните фактори, ендокринната и имунната система.

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

- *каква е ролята на рецепторните полиморфизми в гените за андрогенния и естрогенните рецептори върху 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 глюкокортикоидния рецептор и рецептора за витамин D върху аутоимунитета и развитието на СЛЕ;
- какъв е ефектът 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.

ЦЕЛТА НА НАСТОЯЩИЯ ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД Е:

- да се изясни влиянието на някои хормон-рецепторни полиморфизми в гените за андрогенния, естрогенния, прогестероновия, кортикостероидния и витамин D - рецептора 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 BclII 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 1Б при здрави жени и болни от СЛЕ;
7. Да се проучи ролята на полиморфизмите на мелатониновия рецептор 1Б - 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.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

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

- 1. Определяне на полиморфизма на андрогенния рецептор и андрогените при жени с лупус;*
- 2. Определяне на PvuII T/C и XbaI A/G полиморфизмите на естрогенния рецептор алфа при пациентки със СЛЕ и здрави контроли;*
- 3. Определяне на PROGINS полиморфизма на прогестероновия рецептор при пациентки със СЛЕ и здрави контроли;*
- 4. Определяне на BclI и ER22/23EK полиморфизмите на глюкокортикоидния рецептор при здрави жени и болни с лупус;*
- 5. Определяне на BsmI и FokI полиморфизмите на VDR при здрави жени и болни с лупус;*
- 6. Определяне на rs1562444, rs10830962 и rs10830963 полиморфизмите на мелатониновия рецептор 1B при здрави жени и болни с лупус;*
- 7. Определяне на нивата на мелатонина при жени с лупус и здрави контроли.*

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

Участници

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 класификационни критерии от 1997 г. на Американския колеж по ревматология (ACR) за болестта (Hochberg MC, 1997). При всички жени беше снета подробна анамнеза, както и общ физикален статус. От наличната медицинска документация бяха събрани данните относно клиничните прояви при всяка болна и имунологичния статус, включващ изследваните антитела. С помощта на конкретен въпросник беше подробно описано предходното и настоящо лечение с кортикостероиди, имunosупресори, антималярии и други специфични за болестта медикаменти. Настоящата доза на пероралния кортикостероид също беше регистрирана. Девет пациентки бяха новодиагностицирани или в дълга ремисия и не провеждаха терапия с кортикостероиди. При всички болни бяха определени индекс за активност на СЛЕ (SLEDAI), както и индекс за хронични промени (SLICC) (Stoll et al., 1996, Gladman et al., 1996, Bombardier et al., 1992). Индексът SLEDAI представя болестната активност в последните 10 дни до оценката, докато SLICC/ACR е критерий за необратимите промени, несвързани с активно възпаление, настъпили от проявата на СЛЕ, потвърдени при клиничен преглед и задържащи се за период от поне 6 месеца (Gladman et al., 1996, Bombardier et al., 1992).

Четиридесет и четири контроли бяха набрани сред медицинския персонал или студентки по медицина - клинично здрави жени без системни заболявания на съединителната тъкан или фамилна анамнеза за такива

болести. Като хиперандрогения се отбелязва наличието на стойности на общия тестостерон над горната граница за нехирзутидни овулиращи жени в същата лаборатория (3.6 нмол/л). Никоя от изследваните жени не беше приемала перорални контрацептиви или хормонозаместително 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. Отлагането на кръвните проби (както и на лечението) с цел съобразяване с менструалния цикъл, както и спирането на ежедневното лечение с кортикостероиди не беше възможно поради етични съображения и с оглед активността на болестта. 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 /протокол № 49/29.06.2010/.

Хормонални изследвания

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). За тестостерона коефициентът на грешка на вътрешния анализ (intraassay) бе 5.6%, на междуаналитичната грешка (interassay) – 6.8%, а чувствителността на метода – 0.3 nmol/L. За ГСПХ тези показатели бяха съответно 1.4%; 8.2% и 0.5 nmol/L. Съобразно общоприетите препоръки (Bhasin et al., 2006) свободният тестостерон беше определен от общия тестостерон, ГСПХ и албумина по формулата на Vermeulen (Vermeulen et al., 1999). Нивата на ДХЕАС бяха измерени по метода на радиоимунологичния анализ със стандартен кит на фирмата Immunotech, Marseille, France, като коефициентът на грешка на вътрешния анализ бе 7.4%, на междуаналитичната грешка – 10.6%, а чувствителността на

метода – 0.6 μ mol/ml. Хормоналните изследвания бяха извършени в Университетската болница по ендокринология “Акад. Иван Пенчев” със съдействието на З. Абаджиева и проф. Г. Кирилов по утвърдена методика.

Генетични изследвания

Генетичен анализ беше осъществен за 137 жени (36 здрави контроли и 101 пациентки). Характеристиките на болните и здравите контроли са описани в т. А. ДНК се екстрахира от венозна кръв по метода на изсолване на белтъците според стандартната процедура. Извърши се PCR амплификация на САГ триплетите в екзон 1 на андрогенния рецептор, като се използваха праймерите, описани от La Spada и сътрудници (La Spada et al., 1991) по вече утвърдена от Национална генетична лаборатория методика. Амплифицираните продукти бяха анализирани чрез Fragment Manager V1.2 software (Pharmacia). За коректно определяне на алелната дължина се използва външен стандартен микс при всяко отчитане на гела. Шест ДНК проби от жени с различна алелна дължина бяха секвенирани за определяне на броя на САГ триплетите, след което се използваха за определяне на алелната големина в изследваната група. Всяка контролна проба от външния стандартен микс беше анализирана чрез капилярна електрофореза посредством ABI Prism 3130xl ABiosystems® автоматичен секвенатор и продуктите бяха анализирани чрез софтуера ABI Prism Data Collection, Sequencing Analysis v5.3.1 и FinchTV (Geospiza, Inc. USA). PCR продуктите бяха смесени и общо 11 алела бяха установени във външния стандартен микс. Броят САГ триплети във всяка проба беше определен чрез сравнение с известните алелни дължини във външния стандарт. Генетичният анализ беше осъществен благодарение на доц. Алексей Савов и Силвия Андонова от Национална Генетична Лаборатория, СБАЛАГ «Майчин дом», София.

Анализ на генетичните данни

Генът за AP е локализиран върху X-хромозомата и всяка жена носи два обикновено различни (CAG) 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 (CAG-short) беше означен алелът, носещ по-малък брой CAG триплети, а като „по-дълъг“ (CAG-long) – този с по-голям брой CAG мотиви. Беше определено влиянието на всеки от двата алела върху клиничната изява на системния лупус.

При жени анализът на (CAG) n полиморфизма е сложен поради локализацията на андрогенния рецептор върху X хромозомата и феномена на X – инактивация: във всяка отделна клетка на женския организъм едната X-хромосома (и съответно (CAG) n алел) се деактивира (Lyon MF, 1988; Hickey et al., 2002). За да се установи влиянието на андроген-рецепторния полиморфизъм независимо от случайната инактивация на X-хромозомата ние допълнително разделихме всички изследвани алели на две групи – къси (S) и дълги (L), използвайки 50-я перцентил (брой на CAG триплетите - 22) като граница. 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), както в предишни проучвания (Westberg et al., 2001).

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

Участници

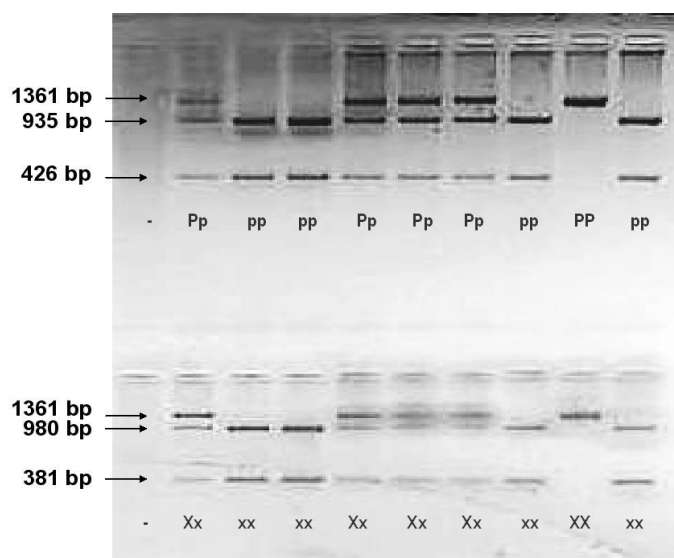
В проучването бяха включени 162 жени - 112 с лупус и 50 здрави контроли. При всички пациентки бяха регистрирани възрастта към момента на изследването, възрастта на поява на болестта, формите на болестта, проявени от началото на заболяването (кожна, ставна, хематологична, бъбречна, сърдечна, белодробна, неврологична, имунологична, позитивирани автоантитела (подробности, отразени в т. А). Контролната група беше набрана сред медицински персонал и студентки. Всички болни и здрави жени дадоха информирано съгласие за участие в проучването.

Генетичен анализ

Генетичният анализ беше извършен с високомолекулна ДНК, изолирана от ядрени кръвни клетки посредством изсолване на белтъците. Съгласно международните изисквания венозната кръв беше взета в пластмасова епруветка с обем 3–10 ml, съдържаща K_3 EDTA (етилен диамин тетраацетат), като антикогулант. Пациентките и здравите контроли бяха генотипизирани за ER α полиморфизмите PvuII T/C и XbaI A/G чрез RFLP анализ, по метода на Jakimiuk et al. (Jakimiuk et al., 2007). Липсата на PvuII и XbaI рестрикционни участъци бе обозначена като "P" и "X", а наличието съответно като "p" и "x". На таблица 2 са представени основните характеристики на ER α и информация за полиморфизмите PvuII и XbaI, които бяха обект на изследване в настоящото проучване, за използваните праймерни последователности и рестрикционни профили. Електрофоретограмата е представена на Фигура 3.

Таблица 2. Общи характеристики на полиморфизмите *PvuII* и *XbaI*.

Естрогенен рецептор α	Характеристики
Локализация	6q25.1
Протеин	595 аминокиселини
Праймерна двойка за <i>PvuII</i>	(F) 5'-CTG CCA CCC TAT CTG TAT CTT TTC СТА TTC TCC-3'
Праймерна двойка за <i>XbaI</i>	(R) 5'-TCT TTC TCT GCC ACC CTG GCG TCG ATT ATC TGA-3'
Дължина на PCR продукта	1361 bp
Детекция на полиморфизмите	чрез рестрикционен (RFLP) анализ – върху 2.5% агарозен гел
<i>PvuII</i> полиморфизъм	с.453-397 C > T
<i>XbaI</i> полиморфизъм	с.453-351 G > A



Фигура 3. Електрофоретограма на 2.5% агарозен гел за определяне на полиморфизмите *PvuII* T/C и *XbaI* A/G в гена за естрогенния рецептор α .

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

Участници

Двеста и двадесет жени на средна възраст (41.13 ± 11.87 години /20-68/) бяха включени в проучването. Сто и петнадесет пациентки, изпълняващи модифицираните ACR критерии бяха набрани сред пациентките на Ревматологична клиника – УМБАЛ «Ив. Рилски» (Hochberg, 1997). Бяха регистрирани клиничните прояви включително индексите за активност и хронични усложнения при всички жени, както и медикаментозната терапия за СЛЕ (отразени в т. А) (Stoll et al. 1996). Наличието на синдром на Raynaud и синдром на Sjögren също беше отбелязано. 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.

Генетичен анализ

Всички жени предоставиха кръв за изолиране на ДНК чрез стандартен солеви метод. Генотипирането за PROGINS полиморфизма беше извършено чрез определяне на Alu инсерцията в прогестероновия рецептор. Беше използван рестрикционен (RFLP) анализ по разработена от С. Андонова и доц. А. Савов методика в Национална генетична лаборатория. 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.

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

Участници

Сто и единадесет пациентки на средна възраст 42.63 ± 11.91 години, изпълняващи модифицираните ACR критерии, бяха набрани сред пациентките на Ревматологична клиника – УМБАЛ «Ив. Рилски». Бяха регистрирани клиничните прояви включително индексите за активност и хронични усложнения при всички жени, както и медикаментозната терапия за СЛЕ (отразени в т. А). Наличието на синдром на Raynaud и синдром на Sjogren също беше отбелязано. Разширен профил на автоантитела от клас IgG срещу екстрахируеми нуклеарни антигени (ENA), определен чрез стандартни ELISA методи беше наличен при 80 пациентки (anti-dsDNA, anti-Smith, anti-RNP, anti-Ro, anti-La антители). Нямаше значима разлика по отношение на възрастта, клиничните признаци или тежестта на заболяването между болните с и без актуални имунологични данни. Сто и една клинично здрави жени без системни ревматологични заболявания на средна възраст 39.88 ± 11.35 години бяха набрани сред медицински персонал и студенти. Всички болни и здрави жени дадоха информирано съгласие за участие в проучването.

Генетичен анализ

Всички включени жени предоставиха кръв за изолиране на ДНК чрез стандартен солеви метод. Полиморфизмите в гена за кортикостероидния рецептор VcII (rs41423247) и ER22/23ЕК (rs6189 and rs6190) бяха определени чрез RFLP анализ по метода на Szabo et al., 2007 в Национална генетична лаборатория. Всички изследвани генотипи при контролната група бяха в съответствие със закона на Hardy-Weinberg.

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

VDR FokI (rs2228570) полиморфизъм

Сто и шест жени със СЛЕ бяха събрани сред пациентките на Катедрата по ревматология, Медицински университет – София. Заболяването беше диагностицирано според модифицираните критерии на ACR от 1997. При всички болни беше отбелязано наличието на пеперудообразен обрив, дискоиден обрив, фоточувствителност, язви в устната кухина, артрит, серозит, бъбречни нарушения, неврологично заболяване, хематологични нарушения, имунологични нарушения, антинуклеарни антитела и др. (отразени 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 (rs1544410) полиморфизъм

Деветдесет и пет жени със системен лупус бяха събрани сред пациентките на Катедрата по ревматология, Медицински университет – София. Заболяването беше диагностицирано според модифицираните критерии на ACR от 1997. При всички болни беше отбелязано наличието на различни клинични симптоми (отразени в т.А).

Контролната група се състоеше от сто 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.

Генетичен анализ

Всички жени, предоставиха кръвни проби за ДНК анализ. Геномната ДНК се екстрахира от венозната плазма чрез стандартен солеви метод. 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.

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

Участници

В проучването бяха включени 210 жени. Група от 109 жени на възраст 41.72 ± 11.71 години (20-67) отговаряше на критериите за СЛЕ, а 101 клинично здрави жени (39.36 ± 11.97 години /22-68/), 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.

Генетичен анализ

Всички участнички дадоха кръв за ДНК анализ. Геномната ДНК беше екстрахирана чрез стандартен солеви метод. Генотипирането беше осъществено чрез PCR-RFLP анализ. Трите различни полиморфизма rs1562444, rs10830962 и rs10830963 бяха амплифицирани чрез PCR.

Използваните праймери бяха съответно:

rs10830962: F 5'–TACTAGATATTAGCTGTGTGCTAGTGACT–3'/

R 5'–TCTGGGCAACTCAGTGAAACC–3';

rs10830963: F 5'–ATGCTAAGAATTCACACCAGCT–3'/

R 5'–CACAGTGCAGACTGTTTTCTAATC–3';

rs1562444: F 5'–GAAAACACTCTTGGTGGTGTCTT–3'/

R 5'–GATGTGGTGGCTATGTGTGTGTGTA–3'.

Нуклеоидните 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 алеле 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 благодарение на доц. Алексей Савов, Силвия Андонова и Велислава Дечева от Национална Генетична Лаборатория, СБАЛАГ «Майчин дом», София.

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

Участници и хормонални изследвания

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.

Кръвните проби бяха събирани сутрин между 8 и 10 ч. Кръвните серуми за хормоналния анализ бяха съхранявани на – 20°C до изследването им. 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%.

Статистически методи

А. Описателни методи и методи за оценка

1. Обобщени статистически характеристики на количествени променливи (вариационен анализ) – средна стойност, стандартно отклонение, стандартна грешка на средната, медиана.
2. Честотен анализ на качествени променливи (номинални и рангови), който включва абсолютни честоти, относителни честоти (в проценти), кумулативни относителни честоти (в проценти).

Б. Методи за проверка на хипотези

1. Параметрични методи

1.1. Т-тест за две независими извадки (Independent Samples T-Test) – проверка за равенство на две средни.

1.2. Еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA – независими извадки) – проверка за равенство на повече от две средни стойности с използване Post Hoc Tests за множествени сравнения. При равенство на дисперсиите бяха използвани методите на Bonferroni или LSD за множествени сравнения. При неравенство на дисперсиите беше използван методът на Tamhane's T2.

2. Непараметрични методи

2.1 Методи на Колмогоров-Смирнов (Kolmogorov-Smirnov) – проверка за нормалност на разпределението на количествена променлива.

2.2 Метод на Mann-Whitney – сравняване на средни стойности в две групи на една количествена променлива, когато разпределението не е нормално.

2.3 Метод на Kruskal-Wallis - проверка за равенство на повече от две средни стойности на променливи, които не показват нормално разпределение.

2.4 Метод хи-квадрат (Chi-square test) и точен тест на Фишер (Fisher's exact test) – търсене на връзка между две качествени променливи.

В. Корелационен и регресионен анализ

1. Коефициент на линейна корелация – параметричен (Pearson) и непараметричен (Spearman).

2. Логистичен регресионен анализ (logistic regression analysis) – зависимост между дихотомна променлива и една или повече независими променливи (качествени и/или количествени).

При проверка на хипотези, използваното от нас критично ниво на значимост беше 0.05.

РЕЗУЛТАТИ

Резултатите са обособени в следните групи:

- 1. Определяне на полиморфизма на андрогенния рецептор и серумните андрогени при жени с лупус;*
- 2. Определяне на PvuII T/C и XbaI A/G полиморфизмите на естрогенния рецептор алфа при пациентки със СЛЕ и здрави контроли;*
- 3. Определяне на PROGINS полиморфизма на прогестероновия рецептор при пациентки със СЛЕ и здрави контроли;*
- 4. Определяне на ER22/23EK и VcII полиморфизмите на глюкокортикоидния рецептор при здрави жени и болни с лупус;*
- 5. Определяне на BsmI и FokI полиморфизмите на VDR при здрави жени и болни с лупус;*
- 6. Определяне на rs1562444, rs10830962 и rs10830963 полиморфизмите на мелатониновия рецептор 1Б при здрави жени и болни с лупус;*
- 7. Определяне на нивата на хормона мелатонин при жени с лупус и здрави контроли.*

1. Определяне на полиморфизма на андрогенния рецептор и серумни андрогени при жени с лупус

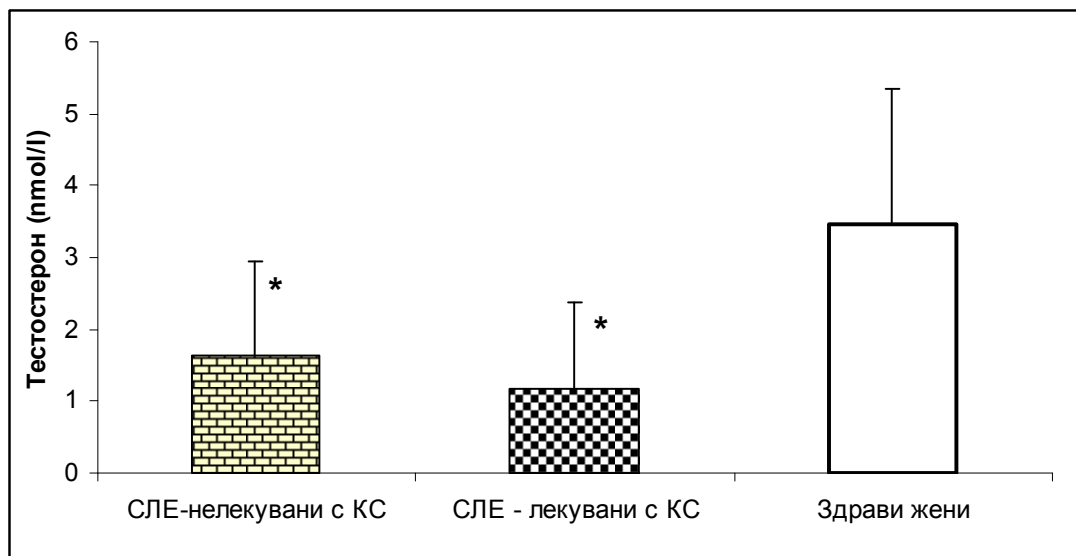
Главните характеристики на изследваните болни са представени на таблица 3. Липсва разлика във възрастта на здравите контроли и болните (40.34 ± 10.17 (40) срещу 40.36 ± 10.81 (39.5) години, $p=0.991$).

Таблица 3. Общи характеристики и най-важни клинични показатели при изследваните болни със СЛЕ.

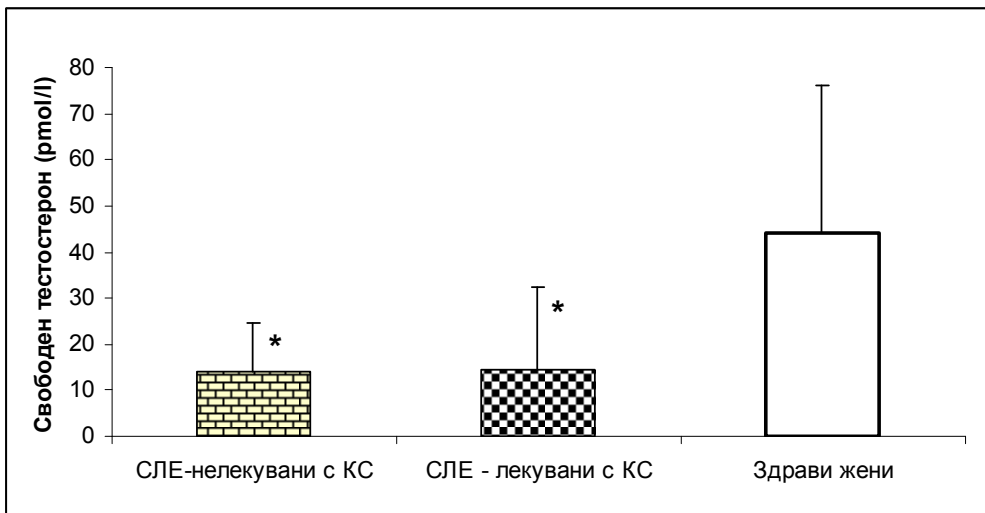
Общи характеристики	Пациентки със СЛЕ
Възраст (години)	40.36 ± 10.81 (39.5)
Възраст на изява (години)	33.27 ± 11.15 (33)
Продължителност на болестта (години)	7.09 ± 6.90 (4)
АСР критерии	
<i>Пеперудообразен обрив</i>	40.5%
<i>Дискоиден обрив</i>	9.5%
<i>Фоточувствителност</i>	73.3%
<i>Орална афтоза</i>	24.1%
<i>Артрит/артралгии</i>	99.1%
<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)

Сравнихме концентрациите на общия (Т) и свободния тестостерон (сТ), глобулина, свързващ половите хормони (ГСПХ) и дехидроепиандростеронсулфата (ДХЕАС) между болните с лупус и здравите жени. 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 DHEAS (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. Концентрациите на ГСПХ са сходни (77.34 ± 59.75 (56.23) срещу 71.66 ± 44.93 (57.64) nmol/l, $p = 0.781$).

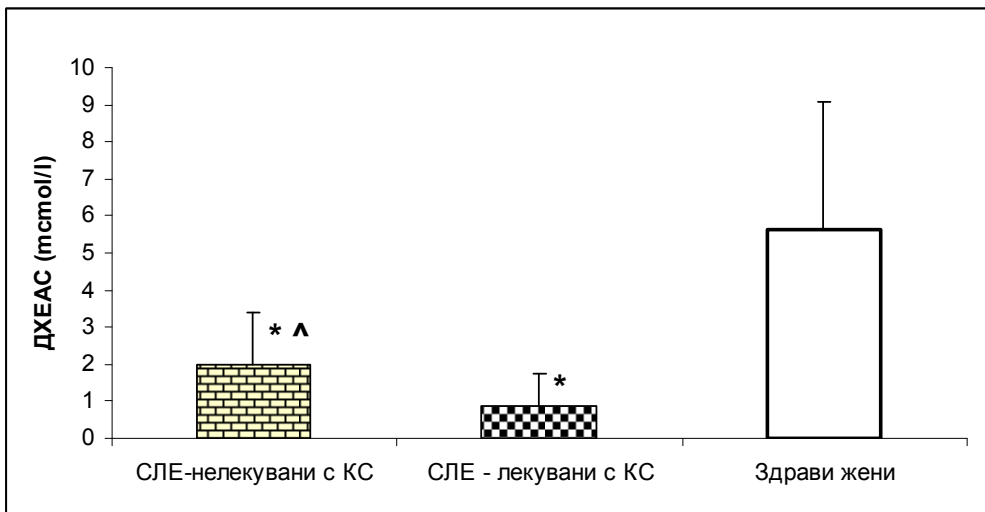
Жените със СЛЕ, които не провеждат лечение с кортикостероиди са със сигнификантно по-ниски нива на общ тестостерон, свободен тестостерон и DHEAS в сравнение със здравите контроли (Фигури 4-6).



Фигура 4. Концентрации на общия тестостерон при здравите жени, болните с и без кортикостероидно лечение. (* $p < 0.05$ - разлика спрямо здравите контроли).

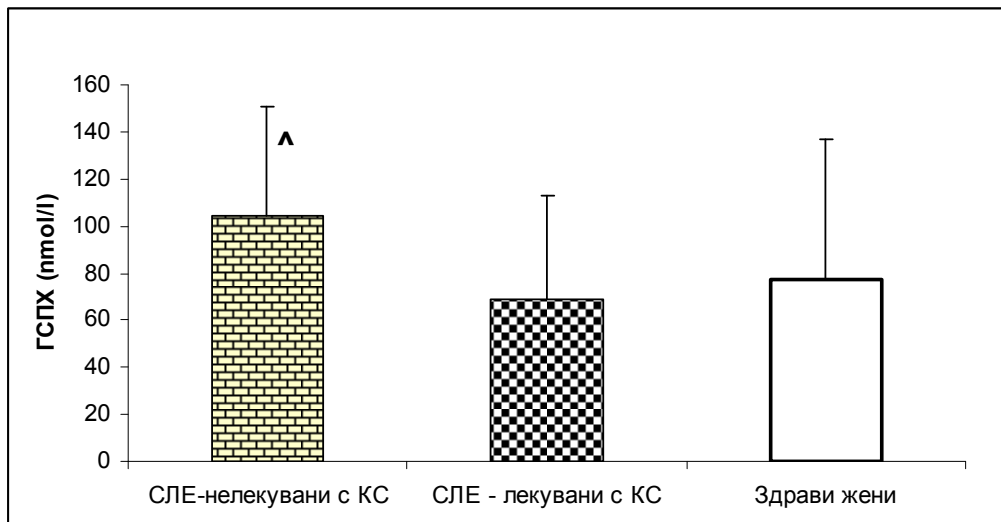


Фигура 5. Концентрации на свободния тестостерон при здравите жени, и болните с и без кортикостероидно лечение; (* $p < 0.05$ - разлика спрямо здравите контроли).



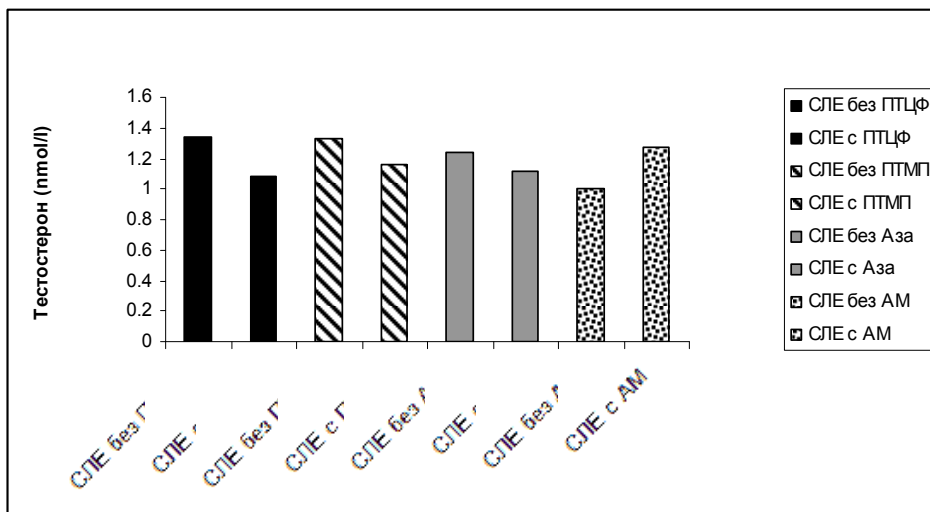
Фигура 6. Концентрации на ДХЕАС при здравите жени и болните с и без кортикостероидно лечение. (* $p < 0.05$ - разлика спрямо здравите контроли; ^ $p < 0.05$ – разлика между лекувани и нелекувани пациентки със СЛЕ).

Серумните нива на ДХЕАС са по-високи при нелекуваните пациентки в сравнение с лекуваните с кортикостероиди. Нивата на общия и свободния тестостерон не се различават при двете групи (Фигури 4-6). ГСПХ е значимо по-висок при нелекуваните с кортикостероиди пациентки в сравнение с лекуваните (Фигура 7).

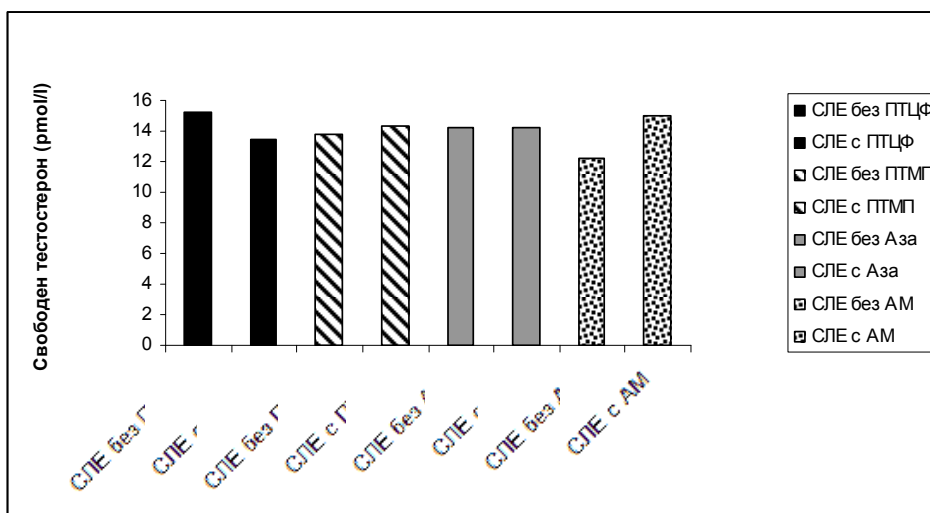


Фигура 7. Концентрации на ГСПХ при здравите жени и болните с и без кортикостероидно лечение. (^ $p < 0.05$ – разлика между лекувани и нелекувани пациентки със СЛЕ).

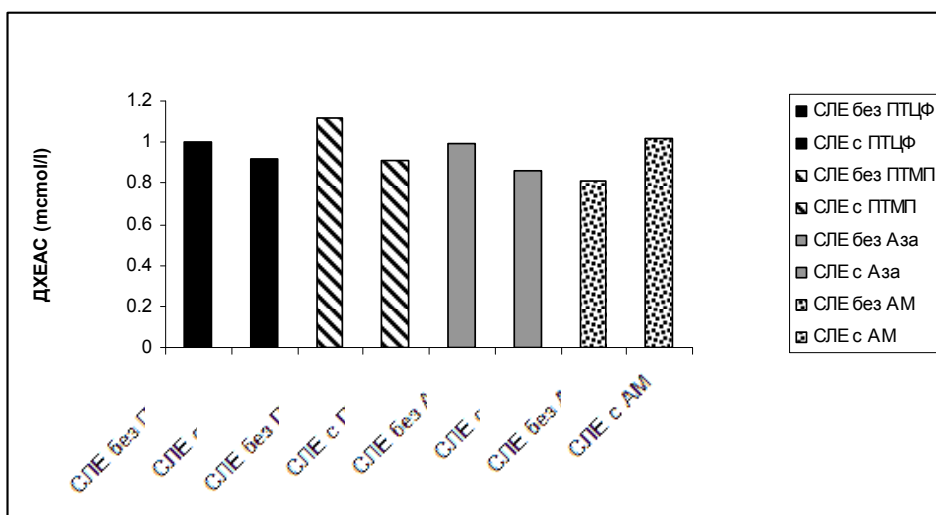
За разлика от хроничното лечение с кортикостероиди, приложението на антималярици, azathioprine, както и на пулсове с methylprednisolone, не е свързано със значими промени в нивата на андрогените (Фигури 8-10). Общият тестостерон е по-нисък при пациентките, провеждали пусова терапия с cyclophosphamide, отколкото при останалите, но разликата не достига статистическа значимост ($p = 0.067$). Хроничното лечение с azathioprine е свързано с понижаване на глобулина, свързващ половите хормони, но не и с нивата на серумните андрогени (Фигура 11).



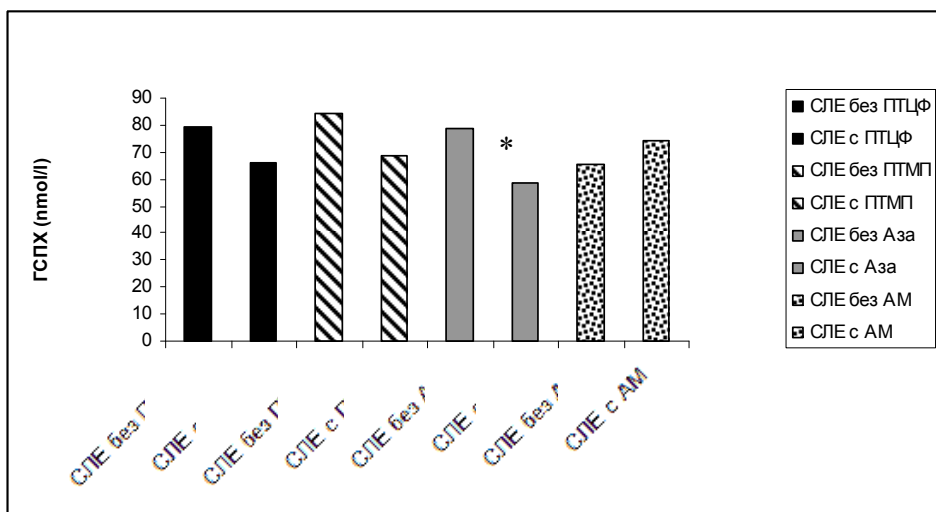
Фигура 8. Концентрации на общия тестостерон при жени, с и без пулсова терапия с cyclophosphamide (ПТЦФ), пулсова терапия с methylprednisolone (ПТМП), azathioprine (Аза) и антимальарици (АМ).



Фигура 9. Концентрации на свободния тестостерон при жени лекувани с пулсова терапия с cyclophosphamide (ПТЦФ), пулсова терапия с methylprednisolone (ПТМП), azathioprine (Аза) и антимальарици (АМ) в сравнение с жените, които не са провеждали такава лечение.

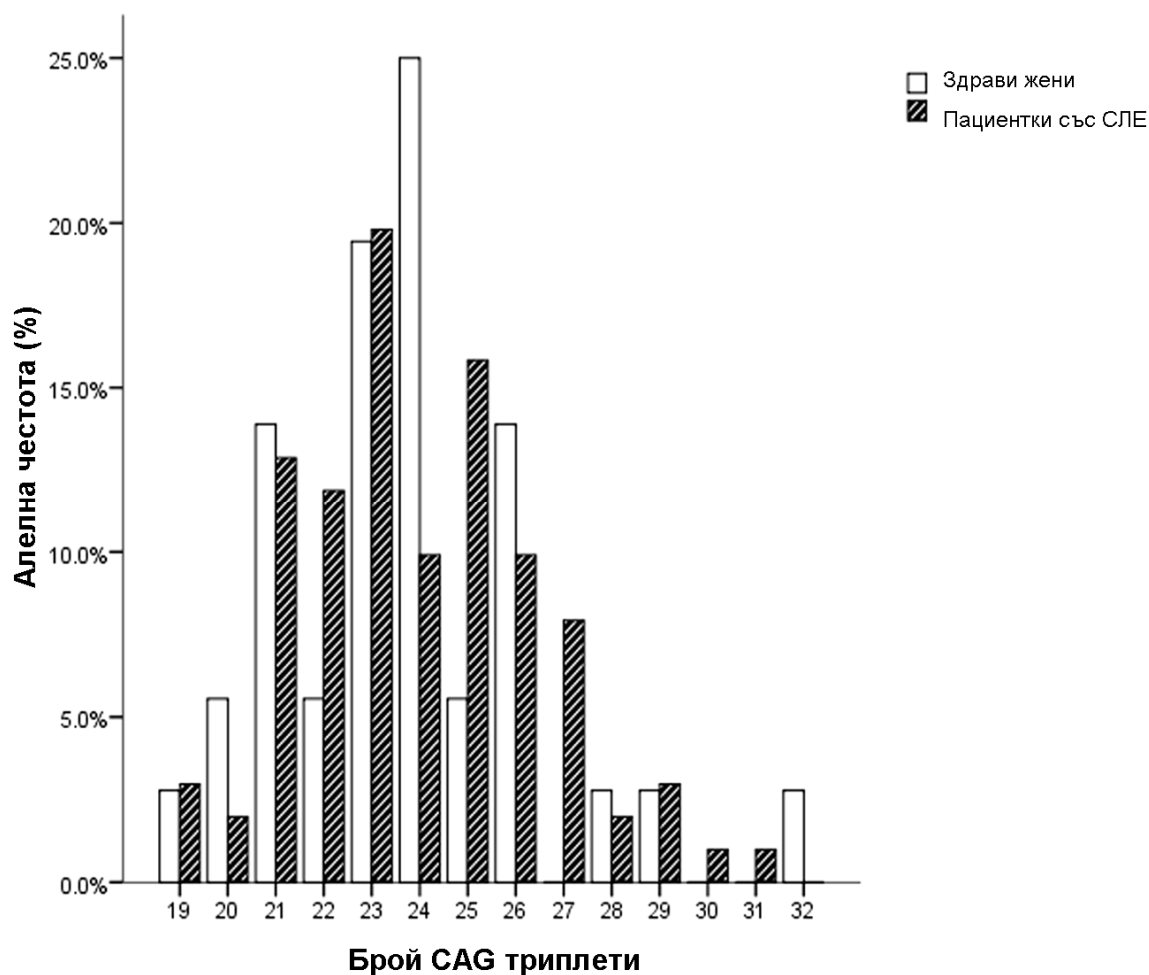


Фигура 10. Концентрации на дехидроепиандростеронсулфата (ДХЕАС) при жени с и без пулсова терапия с cyclophosphamide (ПТЦФ), пулсова терапия с methylprednisolone (ПТМП), azathioprine (Аза) и антимальариици (АМ).



Фигура 11. Концентрации на глобулина, свързващ половите хормони при жени с и без пулсова терапия с cyclophosphamide (ПТЦФ), пулсова терапия с methylprednisolone (ПТМП), azathioprine (Аза) и антимальариици (АМ), * $p < 0.05$.

Не съществува 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 12. Броят на CAG триплетите беше 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 4).



Фигура 12. Алелно разпределение на (CAG)_n полиморфизма при здрави жени и пациентки с лупус ($p > 0.05$).

Таблица 4. Връзка между отделните генотипи и някои клинични прояви на системния лупус. Показан е процентът на пациентите със съответното органно засягане според генотипа. *SS* – генотип с два алела, съдържащи 22 или по-малък брой *CAG* триплети; *LL* - генотип с два алела, съдържащи 23 или повече *CAG* триплети; *SL* – смесен генотип.

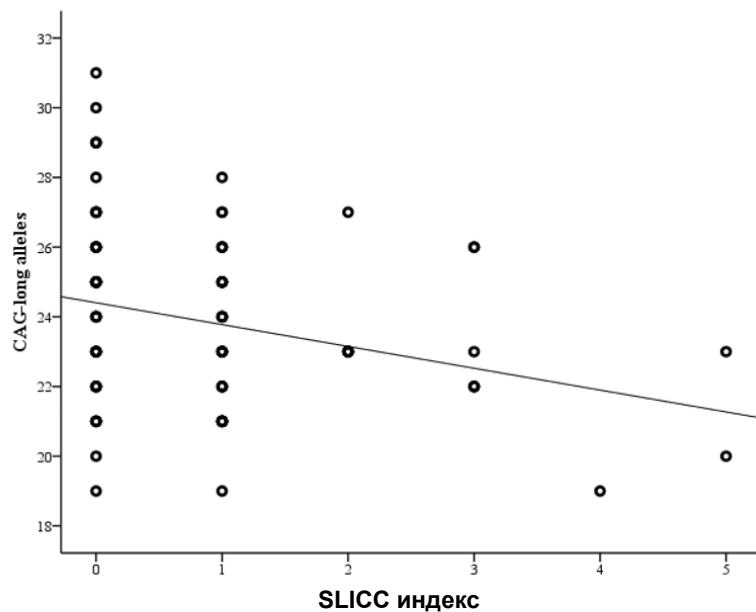
	<i>SS</i>	<i>SL</i>	<i>LL</i>	<i>p</i>
<i>Пепрудообразен обрив</i>	36.7%	37.5%	46.7%	0.784
<i>Дискоиден обрив</i>	3.3%	14.3%	6.7%	0.243
<i>Фоточувствителност</i>	80%	71.4%	73.3%	0.684
<i>Орална афтоза</i>	23.3%	14.3%	40.0%	0.086
<i>Артрит/артралгии</i>	100%	100%	93.3%	0.055
<i>Серозит</i>	16.7%	12.5%	20.0%	0.727
<i>Бъбречно засягане</i>	26.7%	23.2%	26.7%	0.923
<i>Неврологично засягане</i>	43.3%	25.0%	53.3%	0.060
<i>Хематологично засягане</i>	70.0%	62.5%	53.3%	0.539
<i>Имунологично засягане</i>	76.7%	82.1%	73.3%	0.696

В изследваната група жените, носители на два алела с повече от 22 *CAG* триплети (*LL* генотип) имаха 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) $\mu\text{mol/l}$, $p=0.007$), и тенденция към по-високи нива на тестостерона (2.35 ± 2.10 (1.79) срещу

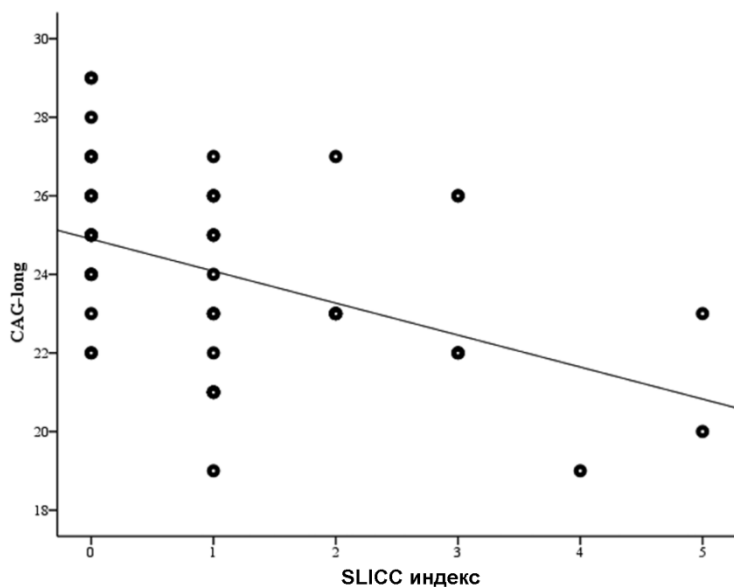
1.71±1.70 (0.97) nmol/l, p=0.056) в сравнение с другите жени. Не се установиха разлики в хормоналните нива при жените с генотипове SS и SL.

Корелационният анализ показва, че SLICC индексът е обратно пропорционален на броя на триплетите в CAG long ($r = -0.258$, $p=0.009$) (Фигура 13), както и на серумните нива на тестостерона и свободния тестостерон ($r = -0.188$, $p=0.044$ и $r = -0.183$, $p=0.049$ респективно), докато SLEDAI не показва корелация със същите показатели. Както може да се очаква, възрастта е в обратна зависимост спрямо нивата на общия тестостерон ($r = -0.273$, $p<0.001$), свободния тестостерон ($r = -0.171$, $p=0.031$), ГСПХ ($r = -0.210$, $p=0.008$) и ДХЕАС ($r = -0.169$, $p=0.032$), но показва положителна асоциация с индексите SLICC ($r = +0.365$, $p<0.001$) и SLEDAI ($r = +0.240$, $p=0.009$). Дозите на кортикостероидната терапия корелират слабо с концентрациите на ГСПХ ($r = -0.184$, $p=0.048$).

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. Нивата на общия тестостерон и ДХЕАС са значимо по-ниски при по-възрастните пациентки в сравнение с по-младите със СЛЕ (съответно 1.03±1.14 [0.47] срещу 1.40±1.26 [0.97] nmol/l, $p=0.013$ и 0.75±0.70 [0.53] срещу 1.16±1.16 [0.86] μmol/l, $p=0.032$), докато стойностите на SLEDAI и SLICC са значимо по-високи (9.10±5.71 [10] срещу 5.83±4.64 [4], $p=0.001$ и 1.12±1.26 [1] срещу 0.40±0.59 [0], $p<0.001$ респективно). 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 14).



Фигура 13. Връзка между CAG - long при пациентките с лупус и индекса SLICC (обясненията са дадени в текста).



Фигура 14. Връзка между CAG - long и индекса SLICC при пациентките с лупус на възраст над 40 години (обясненията са дадени в текста).

2. 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 бяха определени при болните жени със СЛЕ, както и в контролната група. Не се установиха съществени различия в алелното разпределение между двете групи (Таблица 5). Разпределението на алелните честоти на двата полиморфизма спрямо клиничните признаци е показано на таблици 6-7.

Таблица 5. Разпределение на алелните честоти на полиморфизмите XbaI и PvuII в гена за ERα при болните и здравите жени.

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

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).

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

<i>XbaI</i>	XX	Xx	xx
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 7. Алелни честоти на *RvuII* полиморфизма спрямо някои клинични прояви ($p > 0.05$ за всички клинични характеристики)

<i>RvuII</i>	PP	Pp	pp
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%

Честотата на останалите ACR критерии беше 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.

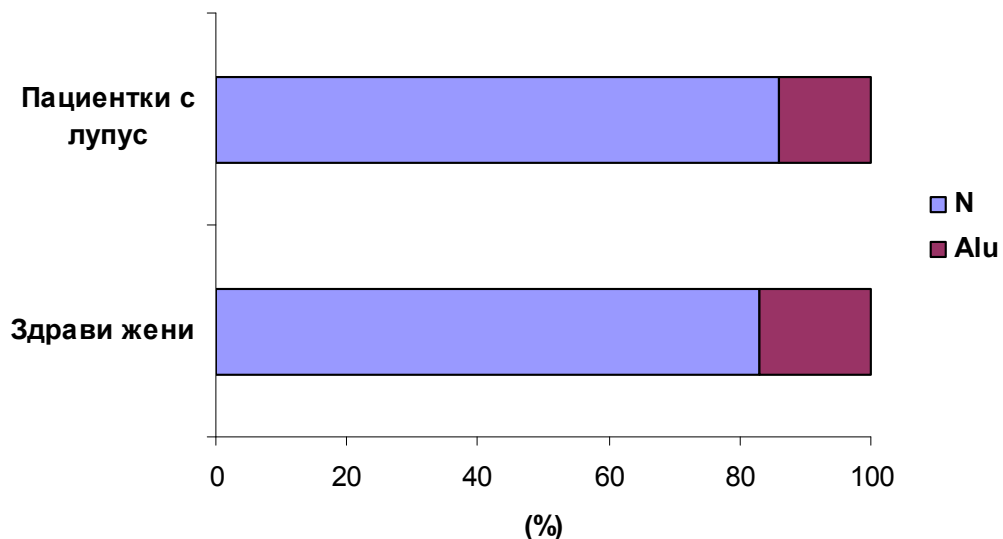
Не се установиха значими различия между възрастта на изява или давността на болестта от една страна и полиморфизмите на ER α от друга страна ($p>0.05$).

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

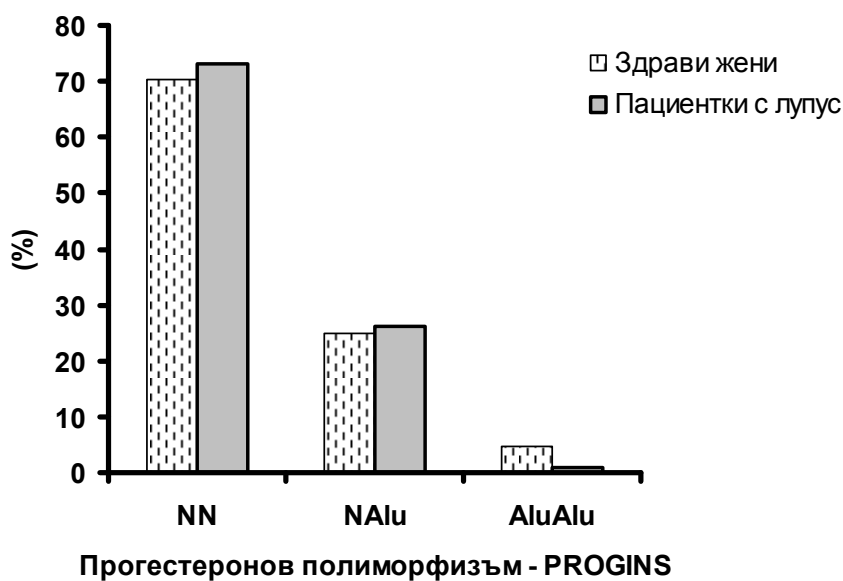
Полиморфният PROGINS (Alu) алел установихме при 15.45% от изследваните жени, а обичайният алел се срещаше при 84.55% от участничките. Не установихме разлика в алелните (Фигура 15) или генотипните честоти между пациентките и контролите, въпреки че хомозиготният AluAlu генотип беше по-чест сред здравите жени (4.76% vs. 0.87%, $p=0.208$) отколкото при болните (Фигура 16).

Полиморфизмът на прогестероновия рецептор не е свързан значимо с клиничните прояви на болестта (Фигура 17), активността ѝ, тежестта на хроничните усложнения, наличието на вторични синдроми на Raynaud или Sjögren ($p>0.05$).

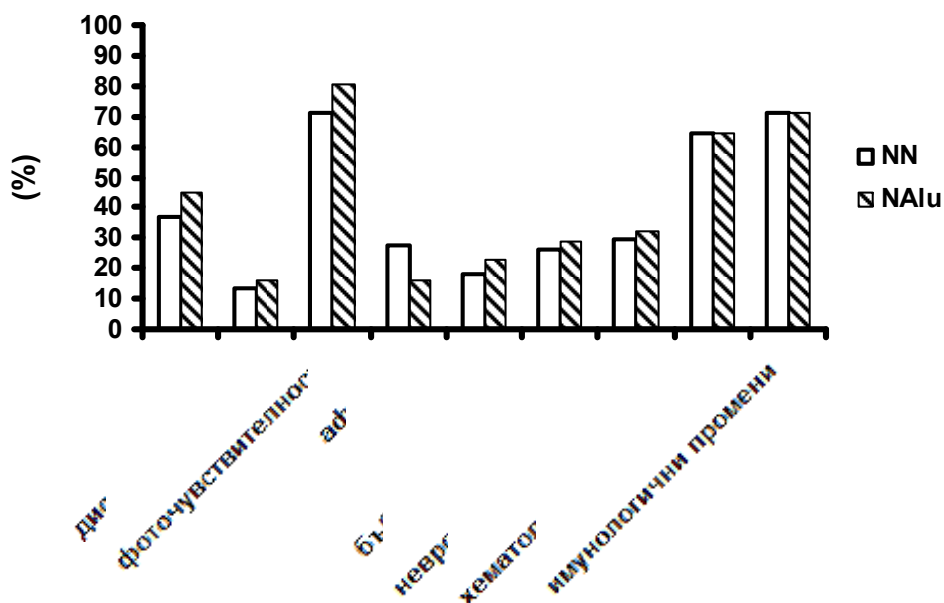
PROGINS също така не е свързан значимо с провежданата имunosупресивна терапия за СЛЕ ($p>0.05$ за всички).



Фигура 15. Алелни честоти на прогестероновия рецепторен PROGINS полиморфизъм при болни с лупус и здрави жени ($p > 0.05$). Alu - PROGINS (Alu) полиморфен алел. N – обичаен алел.



Фигура 16. PROGINS генотипни честоти при болните с лупус и здравите жени ($p > 0.05$). Alu - PROGINS (Alu) полиморфен алел. N – обичаен алел.



Фигура 17. PROGINs генотипни честоти при болните с лупус с различни органни изяви ($p > 0.05$ за всички). Alu - PROGINs (Alu) полиморфен алел. N – обичаен алел.

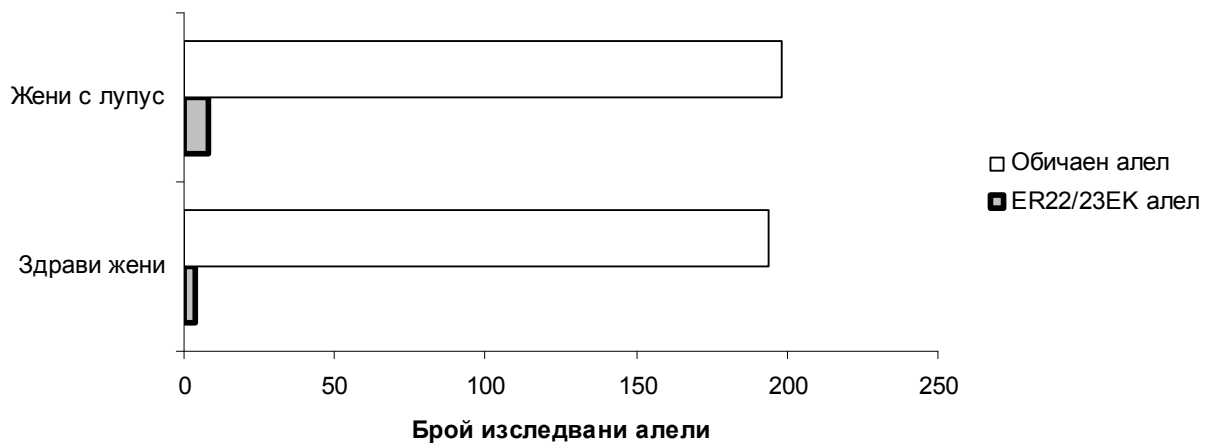
4. Определяне на ER22/23EK и VcII полиморфизмите на глюкокортикоидния рецептор при здрави жени и болни с лупус

Полиморфният ER22/23EK алел установихме при 5.9% от изследваните жени, като се срещаше само в хетерозиготно състояние. Не установихме хомозиготни носители на два ER22/23EK алела.

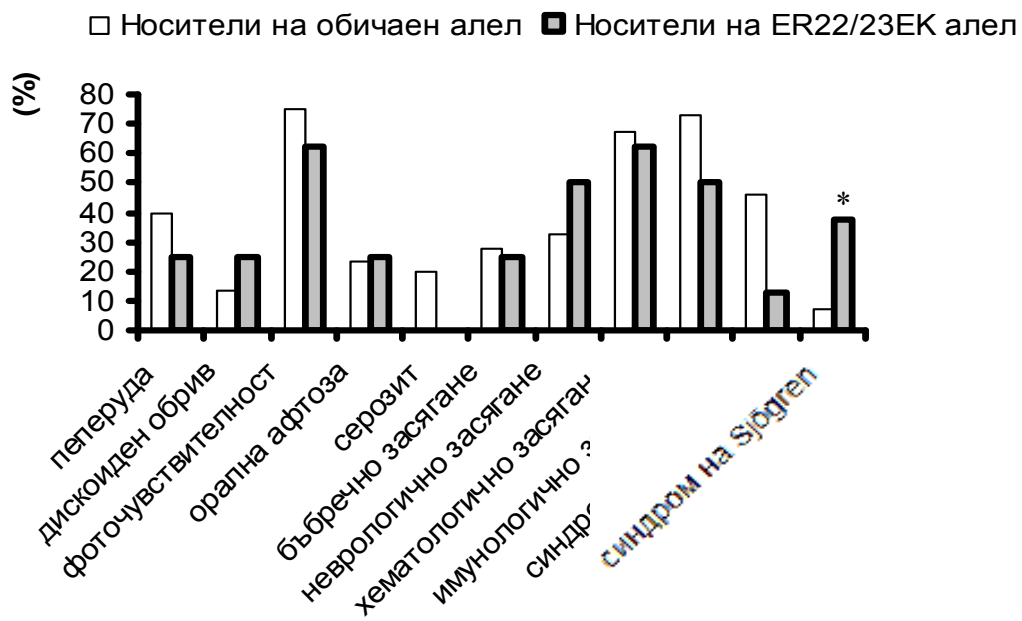
Не установихме значима разлика в алелната или генотипната честота на ER22/23EK между пациентките с лупус и здравите контроли (Фигура 18), въпреки че хетерозиготният ER22/23EK генотип е по-чест сред болните жени, отколкото сред здравите (7.8% срещу 4.0%, $p = 0.374$).

ER22/23EK полиморфизмът на глюкокортикоидния рецептор не е свързан значимо с никой от критериите на ACR, с 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 19).

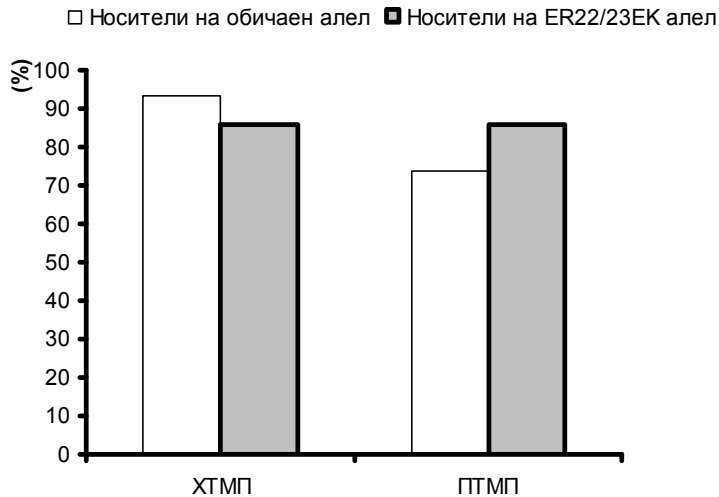


Фигура 18. Алелни честоти на глюкокортикоидния рецепторен ER22/23EK полиморфизъм при болни с лупус и здрави жени ($p>0.05$).



Фигура 19. Генотипна честота на ER22/23EK полиморфизма при болни с лупус в зависимост от някои критерии на ACR, наличието на синдром на Raynaud и синдром на Sjögren. * $p=0.028$.

Наличието на полиморфен ER22/23ЕК алел не е свързано с различия в дозовите режими на кортикостероидната терапия (Фигура 20).

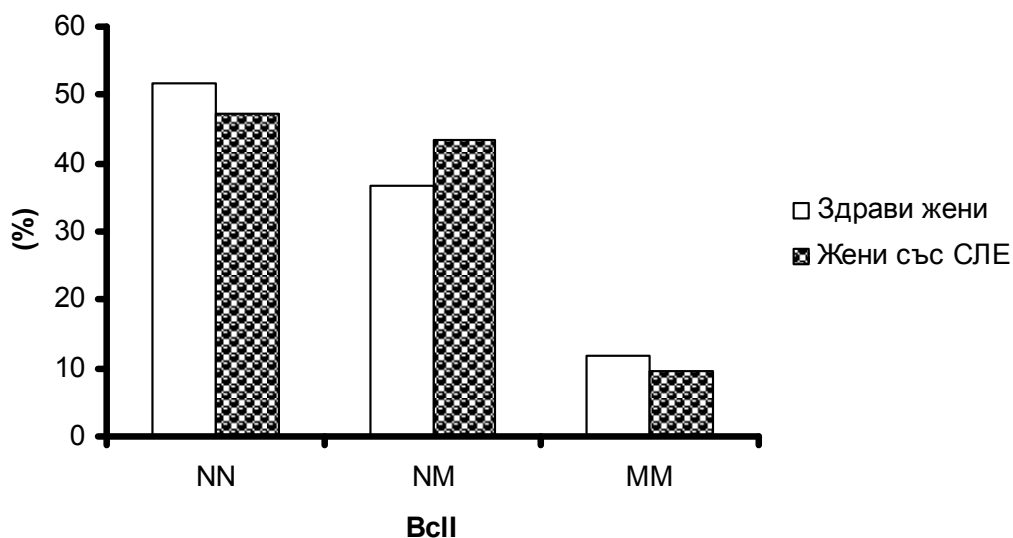


Фигура 20. Болни на хронична терапия с метилпреднизолон (ХТМП) и пулсова терапия с метилпреднизолон (ПТМП) в зависимост от ER22/23ЕК полиморфизма на глюкокортикоидния рецептор ($p > 0.05$).

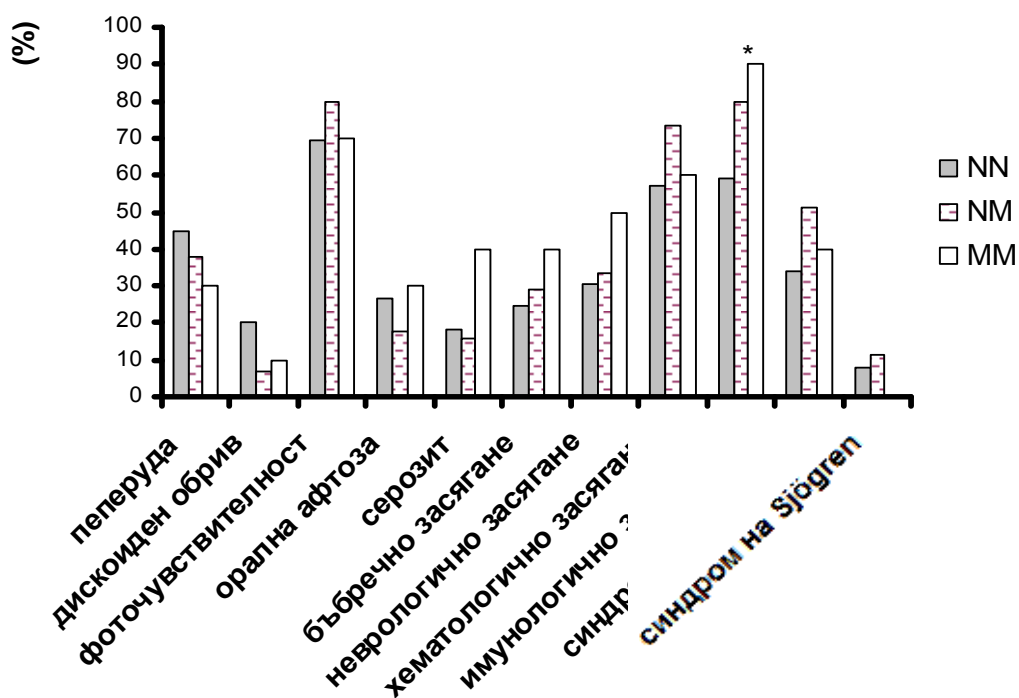
Алелната и генотипната честота на глюкокортикоидния VcII рецепторен полиморфизъм е сходна при жените с лупус и здравите контроли (Фигура 21).

Носителите на полиморфния М алел са със значително по-голям брой имунологични нарушения в сравнение с носителите на обичайния NN генотип (Фигура 22).

По отношение на другите изследвани клинични прояви на системния лупус не установихме статистически значими различия ($p > 0.05$). VcII рецепторният полиморфизъм не показва асоциация с възрастта на изява на болестта, нейната активност или тежест ($p > 0.05$). Също така не беше свързан с повишена честота на синдром на Raynaud или със съпътстващ синдром на Sjögren ($p > 0.05$) (Фигура 22).



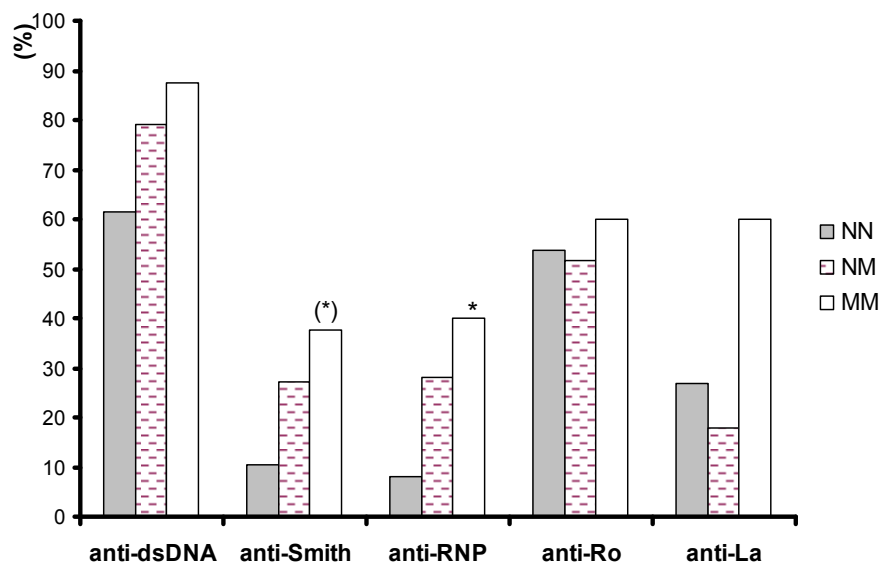
Фигура 21. Генотипни честоти на *BclI* рецепторния полиморфизъм при болни с лупус и здрави жени ($p > 0.05$). *M* - *BclI* полиморфен алел. *N* – обичаен алел.



Фигура 22. Генотипна честота на *BclI* полиморфизма при болни с лупус в зависимост от някои клинични прояви, наличието на синдром на Raynaud и синдром на Sjögren. *M* - *BclI* полиморфен алел. *N* – обичаен алел.* $p = 0.034$.

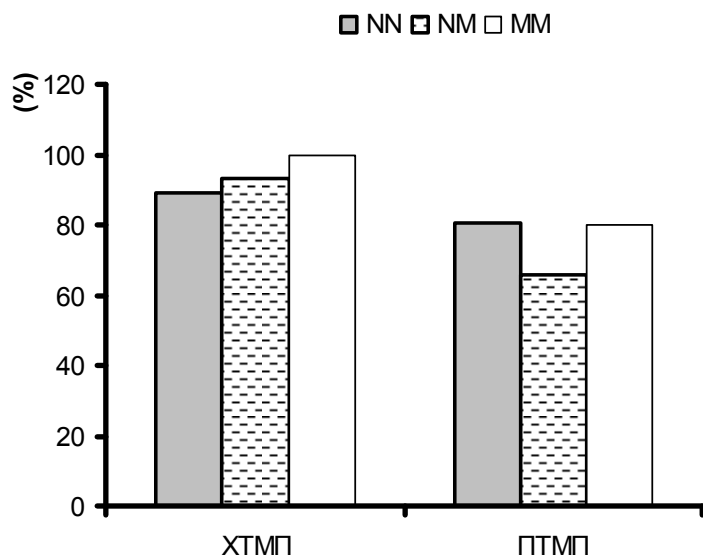
Поради установената връзка между наличието на М алел и развитието на имунологични нарушения при лупус, изследвахме връзката между VcII полиморфизма и отделните антитела от разширения ENA профил. Установи се значима връзка с anti-RNP антителата (Фигура 23).

VcII полиморфизмът не е значимо свързан с различните дозови режими на кортикостероидното лечение на болните (Фигура 24).



Фигура 23. Генотипна честота на VcII полиморфизма при болни с лупус в зависимост от ENA профила. М - VcII полиморфен алел. N – обичаен алел.
* $p=0.033$; (*) $p=0.070$.

Зависимостта между VcII полиморфизма и имунологичните нарушения при лупус в зависимост от терапията с кортикостероиди е показана на таблица 8. Аналогични са резултатите при корекция за другите използвани медикаменти (циклофосфамид, имуран, резохин, метотрексат).



Фигура 24. Болни на хронична терапия с метилпреднизолон (ХТМП) и пулсова терапия с метилпреднизолон (ПТМП) в зависимост от BclII полиморфизма на глюкокортикоидния рецептор ($p > 0.05$).

Таблица 8. BclII полиморфизъм и имунологичните нарушения при лупус.

Имунологични нарушения	p	OR	95% CI
BclII (NM+MM) срещу NN	0.013	3.103	(1.273 - 7.566)
Възраст	0.016	3.204	(1.239 - 8.285)
ХТМП	0.016	3.052	(1.230 - 7.575)
ПТМП	0.006	3.738	(1.452 - 9.624)
Възраст, ХТМП, ПТМП	0.009	3.928	(1.405 - 10.978)

Наличието на M алел повишава три пъти риска от развитие на имуногични нарушения при жени със СЛЕ като зависимостта се запазва след корекция за възраст, хронично лечение с метилпреднизолон (ХТМП), пулс-терапия с метилпреднизолон и корекция за всички тези фактори.

5. 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 9. Не се установиха значими различия в алелните честоти между болните жени и здравите контроли.

VDR FokI полиморфизмът не е свързан значимо с клиничните признаци на болестта ($p>0.05$) (Таблица 10).

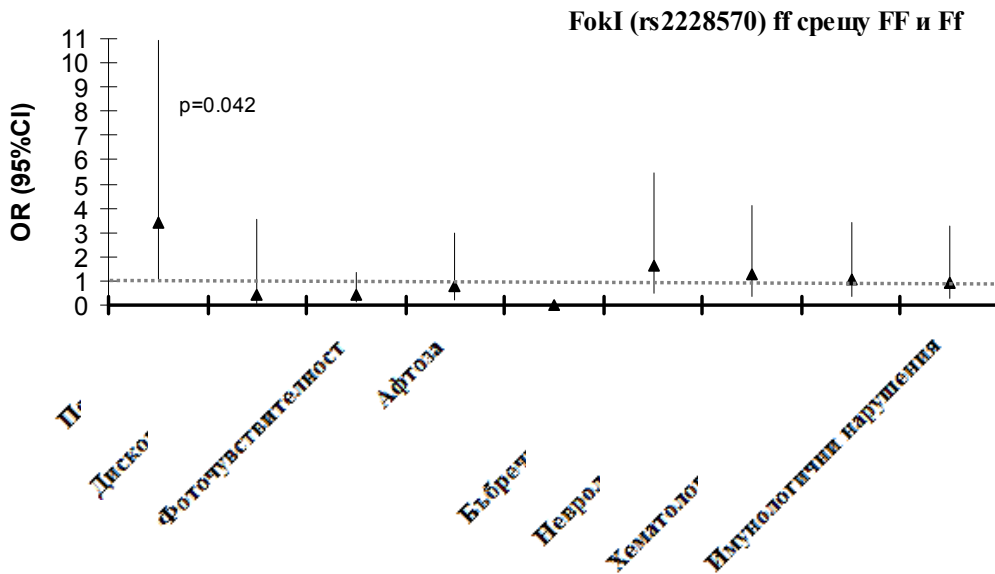
Взаимоотношенията между отделните генотипи FF и ff и симптомите на лупуса са представени на фигури 25 и 26. Установихме значима връзка само между наличието на ff генотип и повишен риск от пеперудообразен обрив при болните с лупус. Болните с различни FokI генотипи са със сходна активност на болестта ($p>0.05$).

Таблица 9. VDR FokI (rs2228570) полиморфизъм при болни с лупус (n=106) и здрави контроли (n=114).

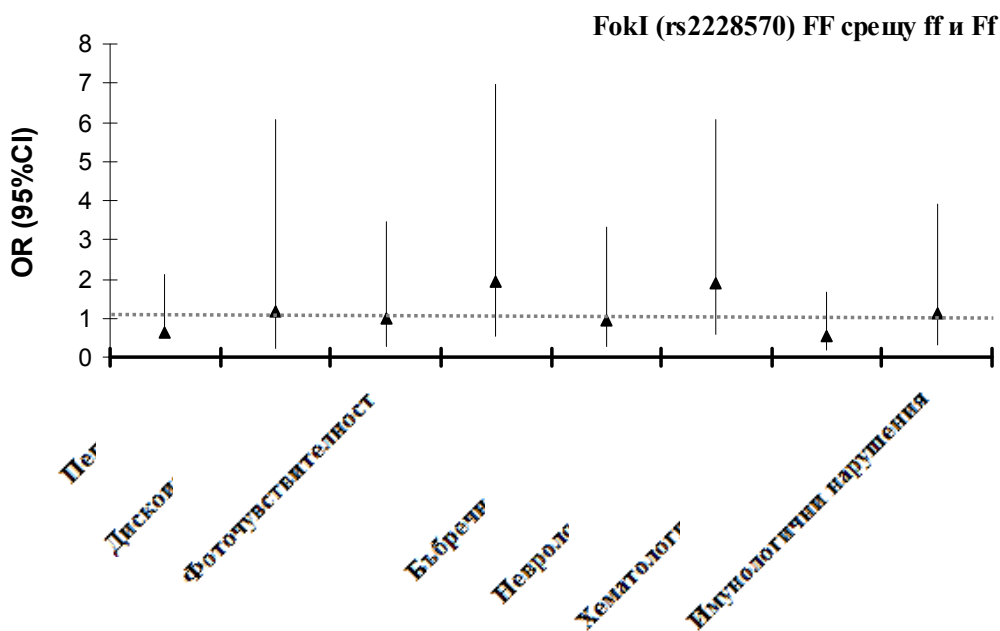
VDR FokI	Здрави жени n (%)	Пациентки с лупус n (%)	p
FF	54 (47.4)	38 (35.8)	0.215
Ff	47 (41.2)	54 (50.9)	
ff	13 (11.4)	14 (13.2)	
F алел	155 (67.98)	130 (61.32)	0.162

Таблица 10. VDR FokI генотипно разпределение при болни с лупус и различни клинични прояви. Данните са представени като брой (%) или като средна±SD (медиана).

VDR FokI	ff (n=14)	Ff (n=54)	FF (n=38)	P
Възраст (години)	40.71±10.84 (43.5)	42.28±11.28 (42.0)	43.61±12.28 (41.5)	0.707
Пеперуда	9 (64.3%)	21 (38.9%)	11 (28.9%)	0.071
Дискоиден обрив	1 (7.1%)	6 (11.1%)	8 (21.1%)	0.390
Фоточувствителност	8 (57.1%)	42 (77.8%)	28 (73.7%)	0.295
Афтоза	3 (21.4%)	15 (27.8%)	9 (23.7%)	0.863
Серозит	0 (0%)	9 (16.7%)	10 (26.3%)	0.069
Бъбречно увреждане	5 (35.7%)	17 (31.5%)	6 (15.8%)	0.162
Неврологично засягане	5 (35.7%)	18 (33.3%)	10 (26.3%)	0.706
Хематологично увреждане	9 (64.3%)	33 (61.1%)	25 (65.8%)	0.923
Имунологични нарушения	10 (71.4%)	41 (75.9%)	26 (68.4%)	0.719
Брой ACR критерии	5.71±1.27 (6)	5.37±1.25 (5)	5.24±1.46 (5)	0.325
SLEDAI	6.79±3.85 (6)	7.09±5.31 (6)	6.11±5.38 (4)	0.428
SLICC	0.79±1.37 (0)	0.59±0.79 (0)	0.86±1.21 (0)	0.810



Фигура 25. VDR FokI (rs2228570) f/f срещу F/F + F/f генотипи според клиничните прояви при болните с лупус. (Отношението на шансовете (OR) е означено с триъгълник, а отвесната линия изобразява 95 % доверителен интервал (95 % CI)).



Фигура 26. VDR FokI (rs2228570) F/F срещу F/f+f/f генотипи според по-важните клинични признаци у болните с лупус. (Отношението на шансовете (OR) е означено с триъгълник, а отвесната линия изобразява 95 % доверителен интервал (95 % CI)).

Генотипното разпределение на VDR BsmI полиморфизма е представено на таблица 11. Не установихме значими разлики в алелното и генотипното разпределение между болните и здравите, въпреки че при болните установихме по-малко ВВ хомозиготни носители.

VDR BsmI полиморфизмът не е свързан значимо с никой от симптомите на болестта, с изключение на оралната афтоза (Таблица 12). Болните с различни BsmI генотипи са със сходна активност и хронични усложнения от болестта (SLEDAI и SLICC индекси), и със сходен брой ACR критерии (Таблица 12).

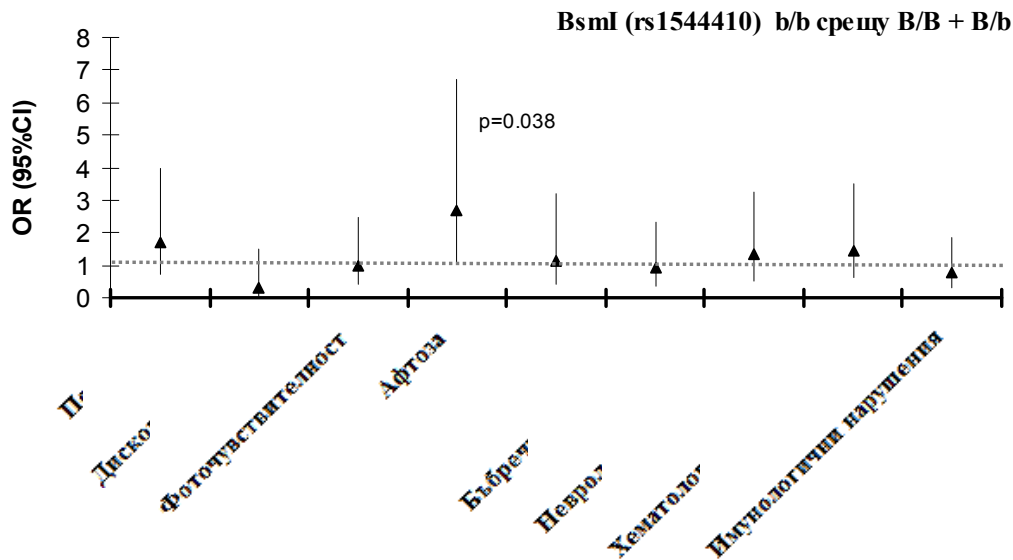
Взаимоотношенията между отделните генотипи ВВ и bb и симптомите на болестта са представени на фигури 27 и 28, като не установихме значими асоциации.

Таблица 11. VDR BsmI (rs1544410) полиморфизъм при болни с лупус (n=95) и здрави контроли (n=100).

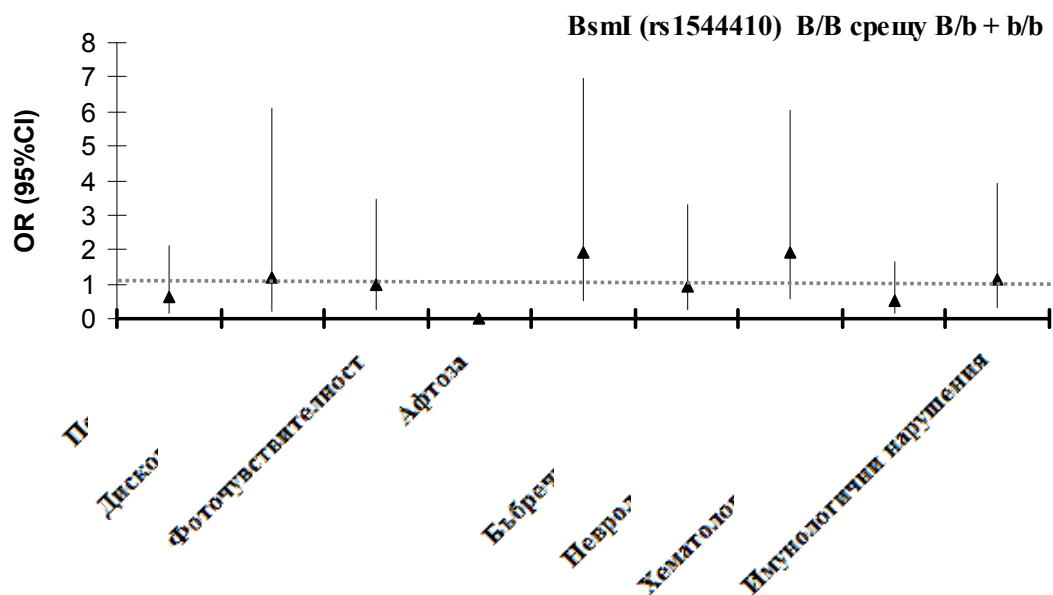
VDR BsmI	Здрави жени n (%)	Пациентки с лупус n (%)	p
ВВ	24 (24.0)	14 (14.7)	0.244
Вb	41 (41.0)	46 (48.4)	
bb	35 (35.0)	35 (36.8)	
В алел	89/200 (44.50)	74/190 (38.94)	0.305

Таблица 12. VDR BsmI (rs1544410) генотипно разпределение при болни с лупус и различни клинични прояви. Данните са представени като брой (%) или като средна±SD (медиана).

VDR BsmI	BB (n=14)	Bb (n=46)	bb (n=35)	p
Възраст (години)	44.79±10.15 (47.5)	42.50±13.06 (42.0)	42.26±11.45 (42.0)	0.725
Пеперуда	4 (28.6%)	16 (34.8%)	16 (45.7%)	0.446
Дискоиден обрив	2 (14.3%)	8 (17.4%)	2 (5.7%)	0.287
Фоточувствителност	10 (71.4%)	33 (71.7%)	25 (71.4%)	0.999
Афтоза	0 (0%)	12 (26.1%)	14 (40.0%)	0.017
Серозит	4 (28.6%)	7 (15.2%)	7 (20.0%)	0.526
Бъбречно увреждане	4 (28.6%)	14 (30.4%)	10 (28.6%)	0.980
Неврологично засягане	6 (42.9%)	11 (23.9%)	12 (34.3%)	0.335
Хематологично увреждане	7 (50.0%)	29 (63.0%)	24 (68.6%)	0.476
Имунологични нарушения	10 (71.4%)	33 (71.7%)	23 (65.7%)	0.831
Брой ACR критерии	4.93±1.33 (4)	5.39±1.34 (5)	5.48±1.20 (5)	0.240
SLEDAI	7.57±5.56 (6)	6.67±4.87 (6)	6.09±5.08 (4)	0.694
SLICC	0.79±1.12 (0)	0.83±0.99 (1)	0.57±1.06 (0)	0.180



Фигура 27. VDR BsmI (rs1544410) b/b срещу B/B + B/b генотипи според честите клинични признаци у болните с лупус. (Отношението на шансовете (OR) е означено с триъгълник, а отвесната линия изобразява 95 % доверителен интервал (95 % CI)).

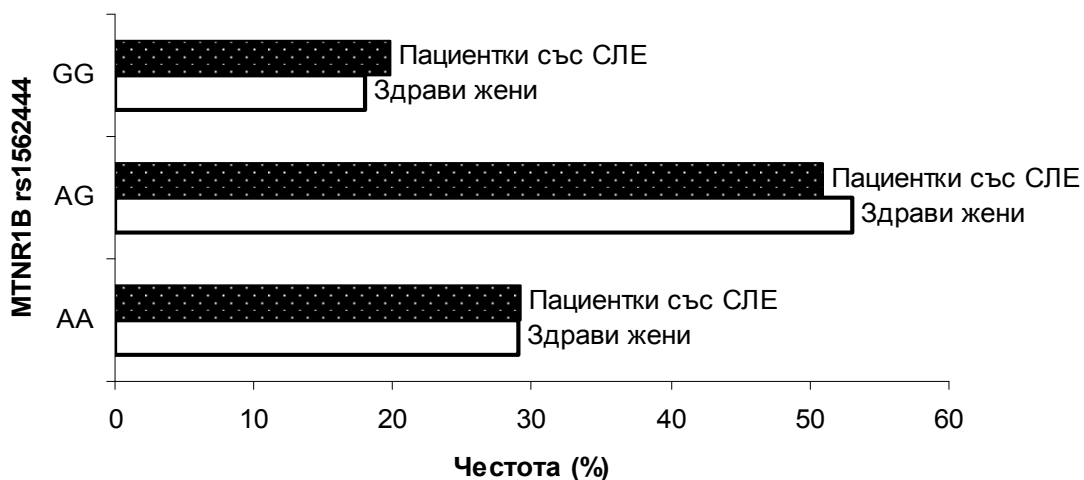


Фигура 28. VDR BsmI (rs1544410) B/B срещу B/b+b/b генотипи според честите клинични признаци у болните с лупус. (Отношението на шансовете (OR) е означено с триъгълник, а отвесната линия изобразява 95 % доверителен интервал (95 % CI)).

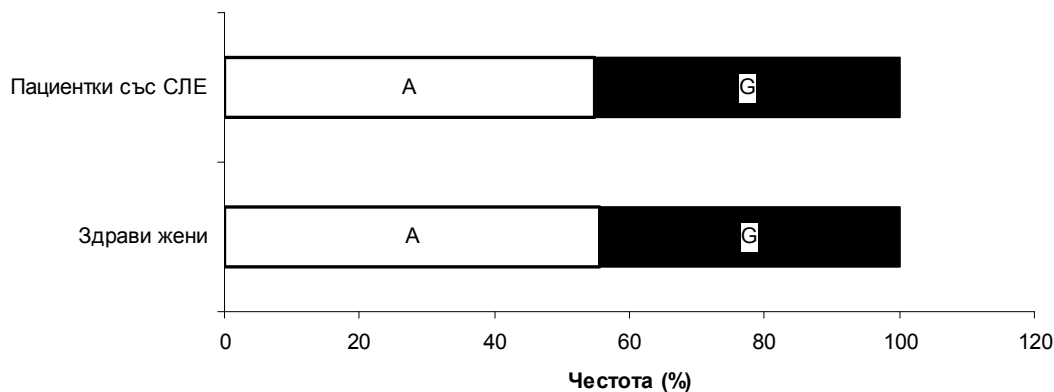
6. Определяне на rs1562444, rs10830962 и rs10830963 полиморфизмите на мелатониновия рецептор 1Б при здрави жени и болни с лупус

Сто здрави жени и 106 пациентки бяха генотипизирани за еднонуклеотидния полиморфизъм rs1562444 на гена за мелатониновия рецептор тип 1Б. Не се установи сигнификантна разлика в разпределението на генотипните и алелните честоти между пациентки и контроли (Фигури 29 и 30).

Проучихме връзката между клиничните прояви у болните със СЛЕ и полиморфизма rs1562444. Резултатите са отразени на фигура 31. Изследваният полиморфизъм е свързан значимо с развитието на левкопения. Не установихме връзка с останалите ACR критерии ($p > 0.05$).



Фигура 29. Генотипно разпределение на полиморфизма rs1562444 в гена за мелатониновия рецептор тип 1Б при здрави жени и пациентки с лупус ($p > 0.1$).



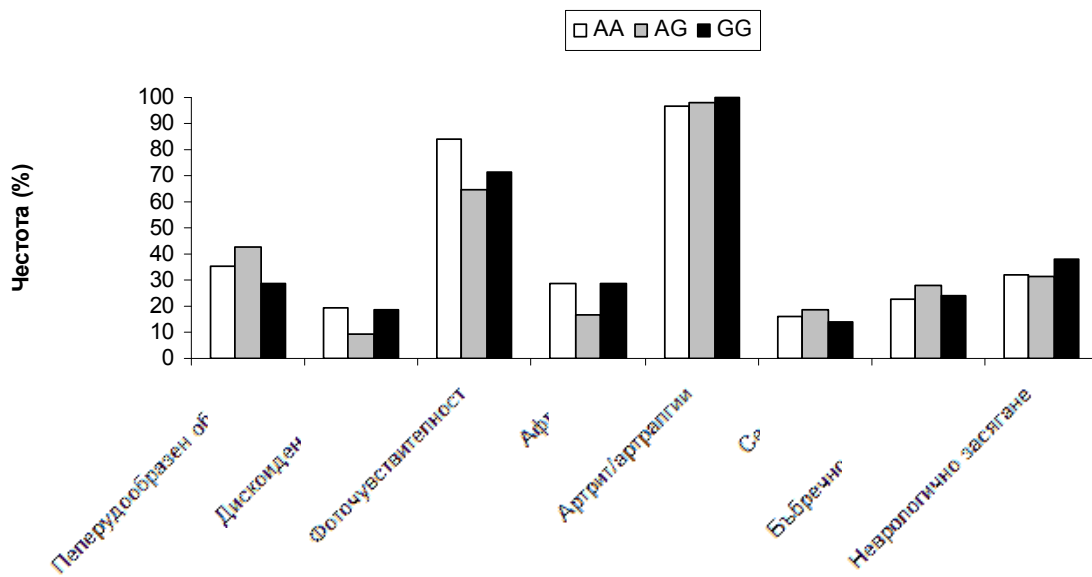
Фигура 30. Алелно разпределение на полиморфизма rs1562444 в гена за мелатониновия рецептор тип 1B при здрави жени и пациентки с лупус ($p>0.1$).

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], $p=0.030$). Отрицателното влияние на генотипа G/G остава значимо след контролиране за възраст и имуносупресивно лечение (данните не са показани).

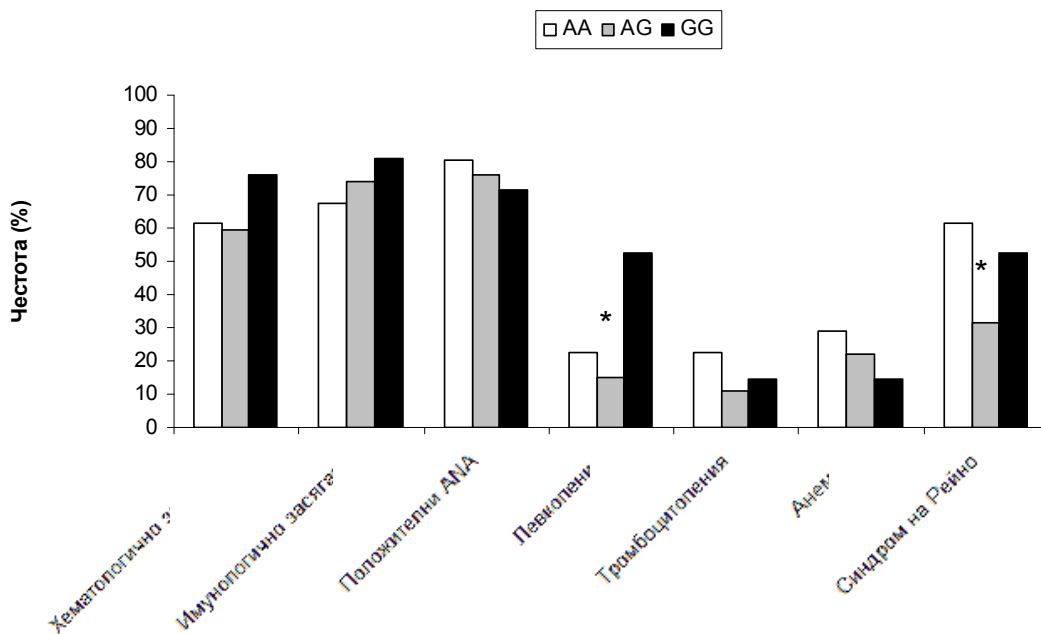
Наличието на A/G генотип е свързано със значимо по-нисък риск от развитие на синдром на Рейно в сравнение с носителството на A/A (OR 0.290; 95CI [0.115-0.730], $p=0.009$), докато генотипът G/G не показва значима протективна роля (Фигура 31).

Генотипът A/A също така беше свързан с по-напреднала възраст при диагностициране на болестта (38.52 ± 9.46 [37] срещу 32.60 ± 12.53 [31] години, $p=0.009$). Не се установи значима връзка между полиморфизма на мелатониновия рецептор и имунологичните показатели при пациентките ($p>0.05$ за всички антитела).

31A



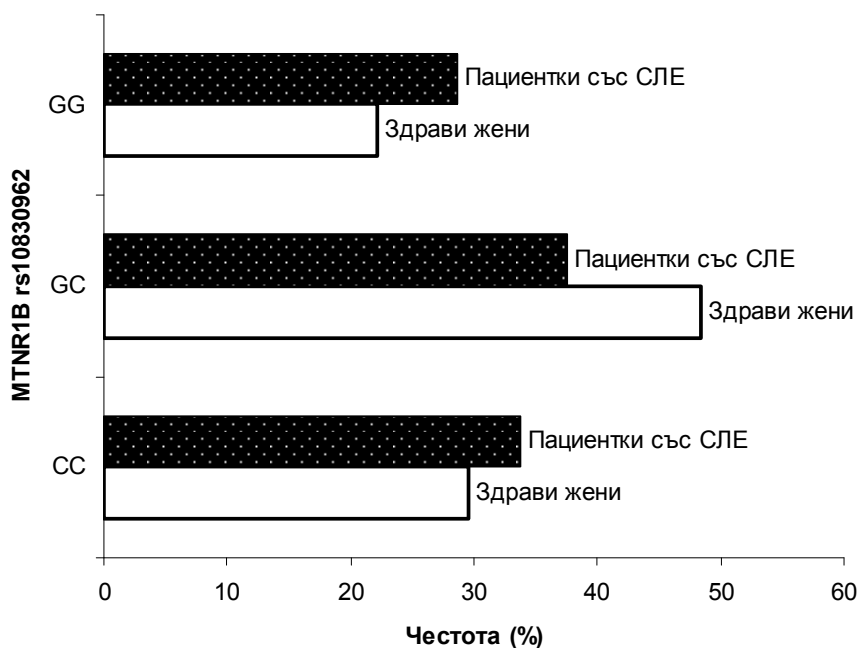
31B



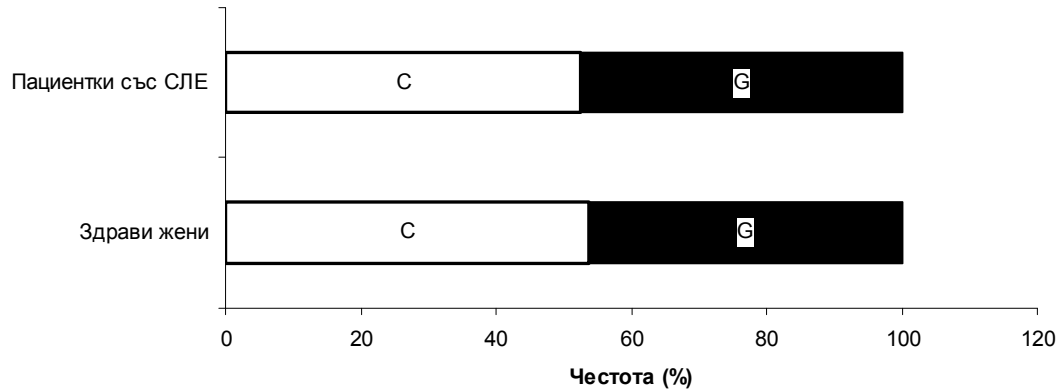
Фигура 31 (А, Б). Асоциация между rs1562444 полиморфизма в гена за мелатониновия рецептор тип 1Б и някои клинични показатели при болните (* $p < 0.05$).

Група от 95 здрави контроли и 101 пациентки генотипизирахме за rs10830962 полиморфизма на гена за мелатониновия рецептор тип 1Б. Не установихме сигнификантна разлика в разпределението на алелните и генотипните честоти между пациентки и контроли ($p>0.05$), въпреки че хетерозиготното състояние се срещаше по-рядко при пациентките със СЛЕ, отколкото при контролите (Фигури 32 и 33).

Връзката между клиничните особености у пациентките и изследвания полиморфизъм са отразени на Фигура 34. Пациентките с генотип GG са със значимо по-малко имунологични нарушения в сравнение с другите хетерозиготни и хомозиготни болни.



Фигура 32. Генотипно разпределение на полиморфизма rs10830962 в гена за мелатониновия рецептор тип 1Б при здрави жени и пациентки с лупус ($p>0.1$).

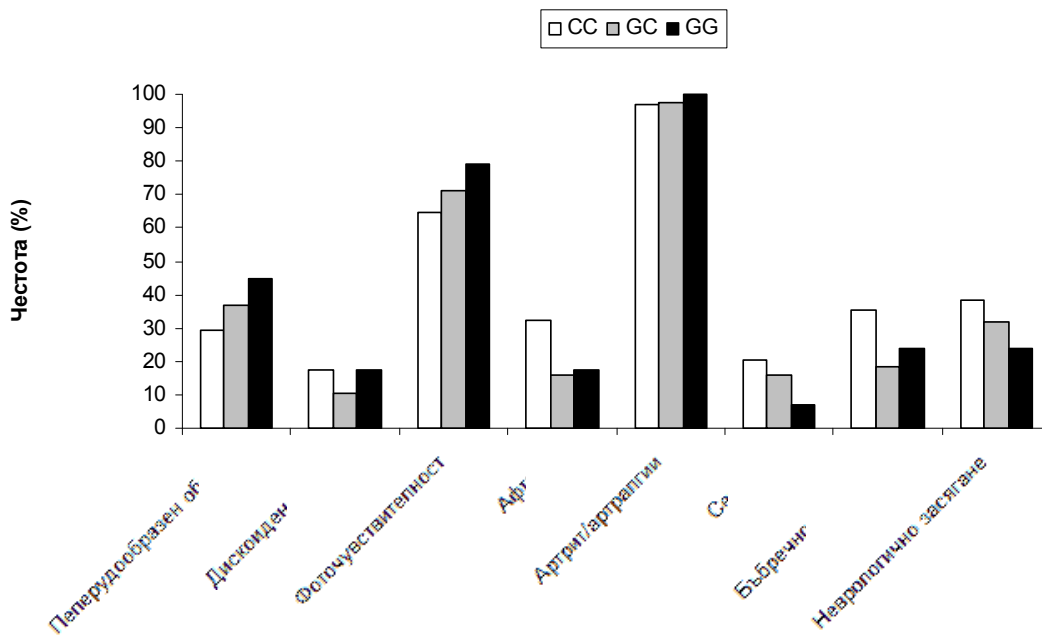


Фигура 33. Алелно разпределение на полиморфизма *rs10830962* в гена за мелатониновия рецептор тип 1Б при здрави жени и пациентки с лупус ($p>0.1$).

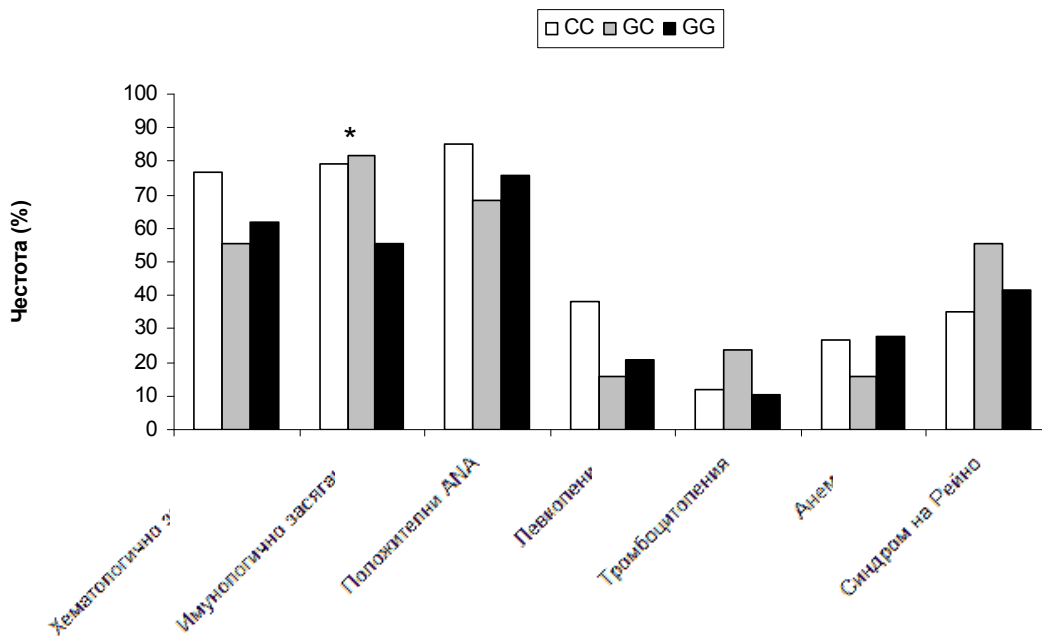
Логистичната регресия показва, че пациентките с генотип *rs10830962* C/C имаха значимо по-висок риск от развитие на имунологични нарушения (OR 3.134; 95CI [1.035 – 9.486], $p=0.043$) при съпоставка с болните с генотип G/G.

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 увеличаваше над два пъти риска от развитие на левкопения (OR 2.837; 95CI [1.117 – 7.205], $p=0.028$). Подобни резултати получихме и след контролиране за възраст и имunosупресивно лечение (данните не са показани). Носителките на генотипа C/C имаха по-голям брой ACR критерии в сравнение с носителките на алел G (5.79 ± 1.47 [5.5] срещу 5.07 ± 1.09 [5], $p=0.017$). Същевременно при тях се установи тенденция за изява на болестта в по-ранна възраст (31.53 ± 12.63 [25.5] срещу 35.91 ± 11.93 [35] години, $p=0.061$).

34A

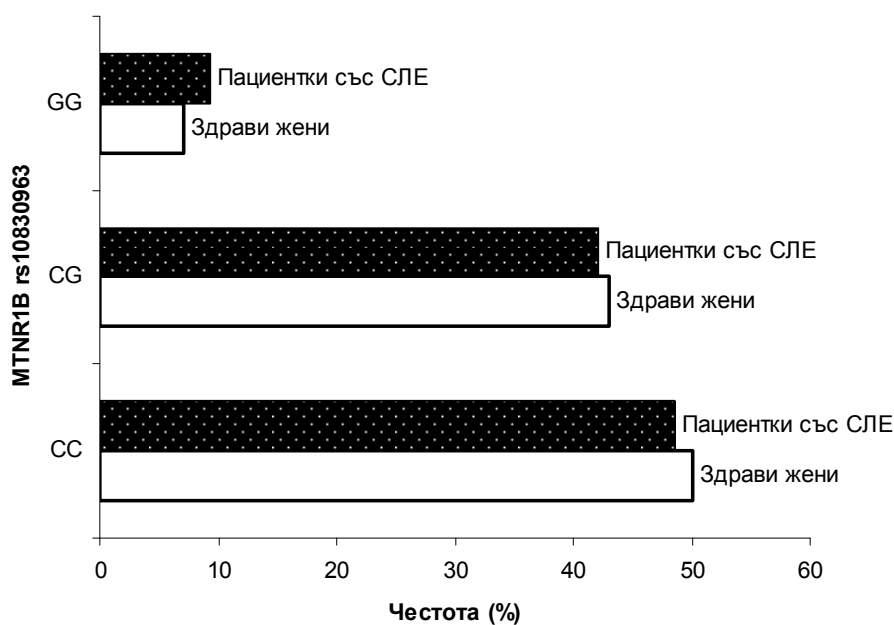


34Б

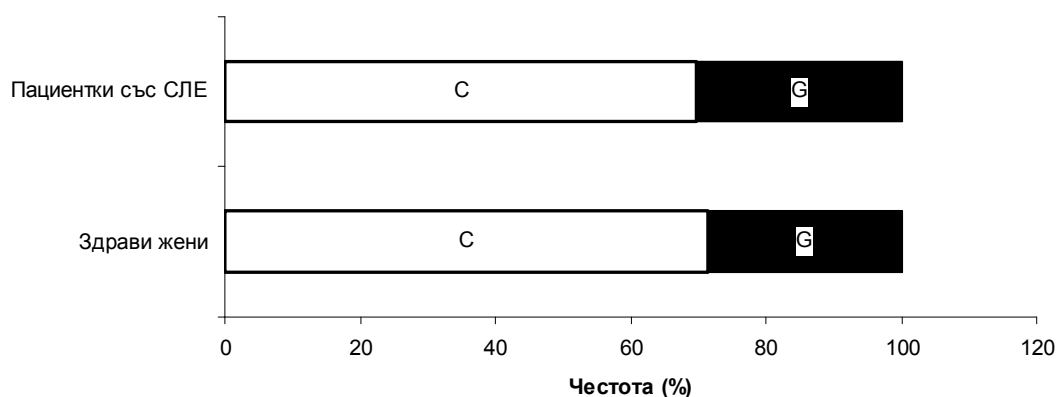


Фигура 34. Асоциация между *rs10830962* полиморфизма в гена за мелатониновия рецептор тип 1Б и клиничните прояви при пациентки с лупус (* $p < 0.05$).

Генотипизирахме група от 100 здрави контроли и 107 пациентки със СЛЕ за полиморфизма rs10830963 в гена за мелатониновия рецептор тип 1Б. Не установихме значима разлика в разпределението на алелните и генотипните честоти между болните и здравите контроли (Фигури 35 и 36). При анализа на връзката между клиничните особености у пациентките и изследвания полиморфизъм установихме, че той е свързан значимо с развитието на левкопения (Фигура 37). При пациентките с генотип G/G липсва неврологично засягане, както и серозит, но не се установиха 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%, $p=0.014$).



Фигура 35. Генотипно разпределение на полиморфизма rs10830963 в гена за мелатониновия рецептор тип 1Б при здрави жени и пациентки с лупус ($p>0.1$).



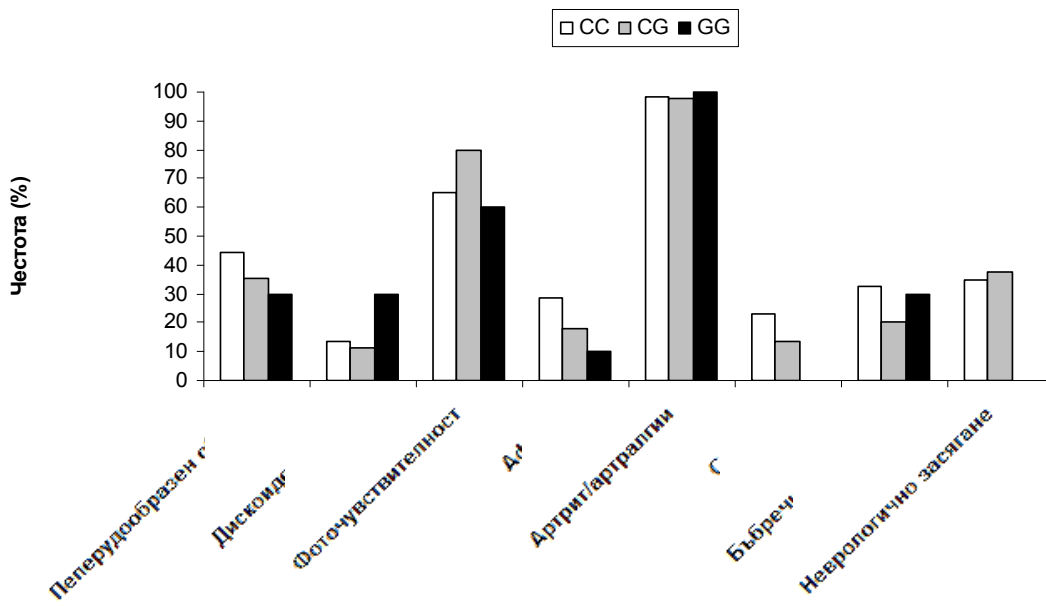
Фигура 36. Алелно разпределение на полиморфизма rs10830963 в гена за мелатониновия рецептор тип 1Б при здрави жени и пациентки с лупус ($p>0.1$).

Генотипът C/C е свързан с трикратно нарастване на риска от левкопения (OR 3.383; 95CI [1.324–8.645], $p=0.011$). Подобни резултати получихме и след контролиране за възраст и имunosупресивно лечение (данните не са показани). 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. Наличието на C/C генотип се асоциира с двукратно повишен риск от развитие на хематологични нарушения (OR 2.690; 95CI [1.183 – 6.114], $p=0.018$).

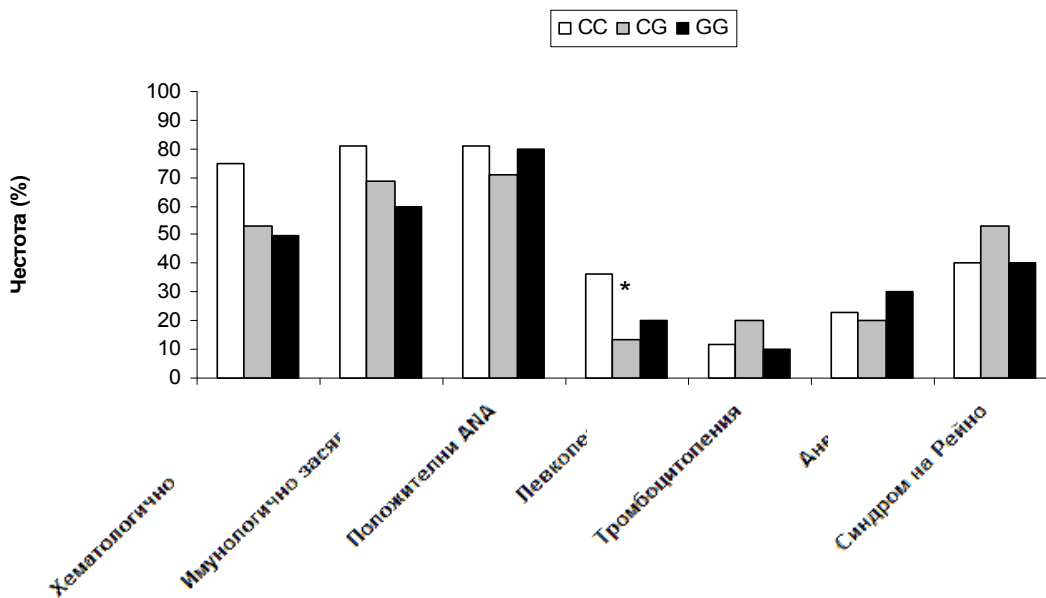
Броят на клиничните прояви, изразени чрез ACR критериите е свързан значимо с rs10830963 полиморфизма, вероятно поради описаните по-горе клинични различия. Средният общ брой (медиана) критерии е 5.79 ± 1.40 (6) при болните с генотип C/C, 5.09 ± 1.16 (5) при пациентките с генотип C/G и 4.60 ± 0.70 (4.5) 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 показаха значими зависимости с изследваните имунологични маркери, а също с индексите за активност и хронични увреждания.

37A



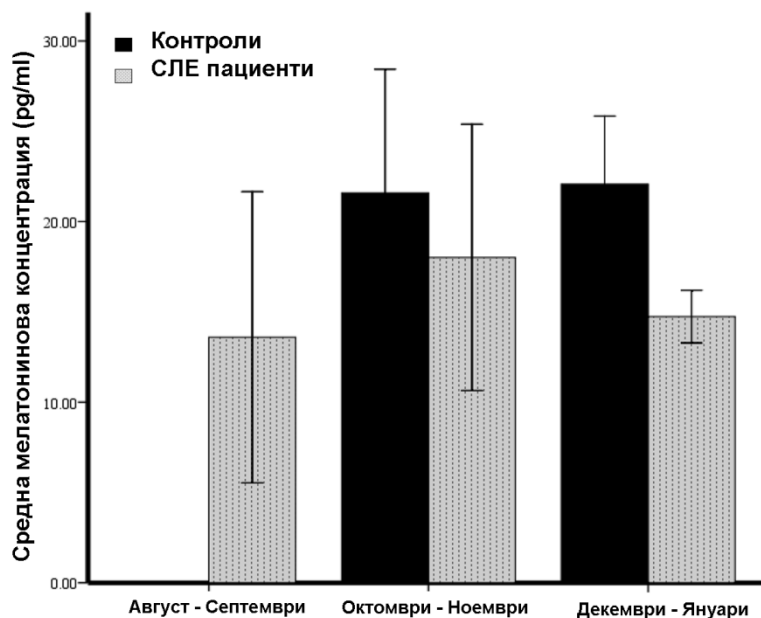
37Б



Фигура 37. Асоциация между rs10830963 полиморфизма на гена за мелатониновия рецептор тип 1Б и клиничните прояви при пациентки с лупус (* $p < 0.05$).

7. 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 38).

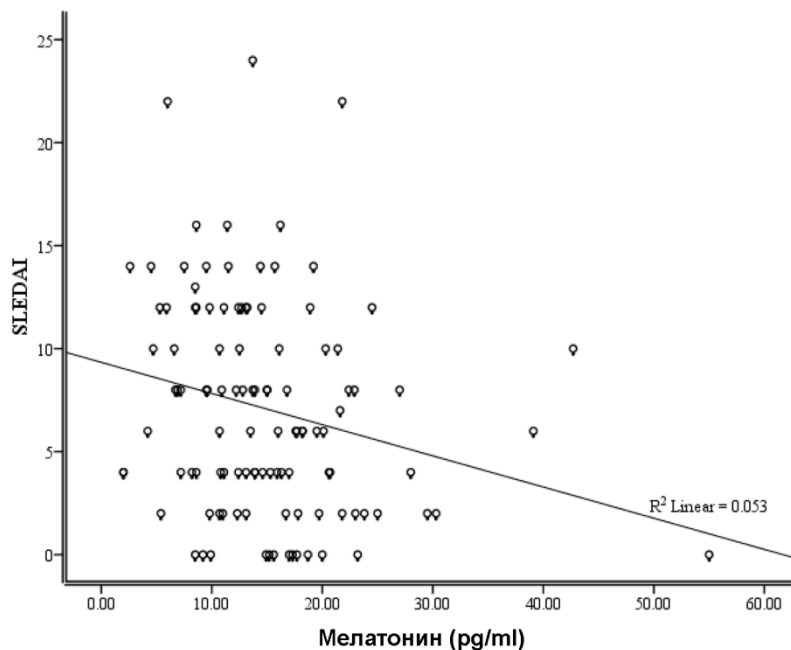


Фигура 38. Средни концентрации на мелатонина според месеците, в които са взети кръвните проби при болните с лупус и здравите жени.

Поради това концентрациите на пинеалния хормон бяха сравнени между контролите ($n=46$) и болните ($n=38$), чиито кръвни взехме през късия фотопериод (октомври - януари).

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 39). Връзката между мелатонина и активността на болестта е значима след съотнасяне за възраст, месец на вземане на пробата и кортикостероидна доза ($r = -0.215$, $p = 0.025$). Хормоналните нива не са свързани с определен ACR критерий, 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 ($p > 0.05$).



Фигура 39. Зависимост между концентрациите на мелатонина и индекса на активност SLEDAI при болните с лупус.

За да се установи значението на най-ниските дневни мелатонинови нива за органното увреждане при СЛЕ, сравнихме болните с концентрации на хормона под 25-тия персентил и тези със стойности над него. Много ниските нива на мелатонина не са свързани с повишена честота на

бъбречни, сърдечни или белодробни увреждания, серозит, васкулит или хематологични нарушения ($p>0.05$). Едновременно с това, болните с много ниски концентрации на хормона са с повишена склонност към неврологични увреждания (41.0% vs. 25.0%, $p=0.089$).

ОБСЪЖДАНЕ

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

Системният лупус еритематозус (SLE) е полисистемна аутоимунна болест с пик на изява сред млади жени (Cervera et al., 2009). Засягането предимно на слабия пол предполага влияние на половите хормони върху имунната система. Стероидните хормони модулират имунния отговор - естрогените усилват хуморалния имунитет, а андрогените и прогестеронът са естествени имуносупресори (Cutolo et al., 2004). При опитни животински модели с лупус тестостеронът оказва протективен ефект. Ефектите на андрогените върху хода на болестта зависят от пола и се опосредстват чрез класически рецепторно-зависими механизми (Walker et al., 1994). Тези резултати дават основание да предположим, че имуносупресивните ефекти на андрогените при животни зависят от андрогенния рецептор. С оглед на важното значение на мъжките полови хормони, ние си поставихме за цел да проучим ролята на андрогените и (CAG)_n полиморфизма на андрогенния рецептор за клиничните прояви на системния лупус при жени. Също така от съществено значение е изследването на хормон-рецепторното взаимодействие между серумните нива на андрогените и андроген-рецепторния полиморфизъм.

Нашите резултати потвърдиха литературните данни, според които за жените със СЛЕ е характерна хипоандрогенемия. Проучването показва значимо по-ниски серумни нива на общия и свободния тестостерон, в сравнение със здравите контроли, независимо от лечението с кортикостероиди. Тези резултати подкрепят няколко предишни изследвания, които показват намалени нива на андрогените при жени със СЛЕ (Fehér et al., 1987; Lahita et al., 1987; Folomeev et al., 1992). Lahita et al.

наблюдават понижен тестостерон, андростендион, дехидроепиандростерон и дехидроепиандростерон сулфат при болни с лупус. Те установяват най-ниски серумни нива на андрогените при жените с най-висока активност на болестта (Lahita et al., 1987). В нашето проучване не се установява зависимост между активността на системния лупус и серумните андрогени. Според Navarro et al. нивата на слюнчения тестостерон са най-ниски при пациентките, лекувани с кортикостероиди в сравнение със здравите жени, но не се установяват разлики между нелекуваните болни и контролната група (Navarro et al., 1987). В друго подобно изследване не се установяват разлики между болни със СЛЕ и здрави контроли, въпреки че липсата на кортикостероидно лечение повишава нивата на андрогените при фертилни жени (Muñoz et al., 1994). В нашето проучване както лекуваните, така и нелекуваните с кортикостероиди пациентки със СЛЕ, са със значимо по-ниски серумни нива на общ и свободен тестостерон в сравнение със здравите контроли. Хипоандрогемията при пациентките със СЛЕ вероятно е по-скоро проява на болестта, отколкото следствие от терапията, тъй като различните медикаменти не оказват съществено влияние върху хормоналния статус на пациентките. Същевременно хроничното, но не и пулсовото кортикостероидно лечение, влияе върху андрогенните нива, по-специално върху тези с надбъбречен произход (върху дехидроепиандростеронсулфата).

Серумните нива на глобулина, свързващ половите хормони не се различават при лупусните болни и здравите контроли, въпреки че се наблюдава слаба обратна корелация между стойностите на ГСПХ и дозите на кортикостероидите. Следва да се отбележи, че стойностите на ГСПХ са относително по-високи при нелекуваните с кортикостероиди пациентки. Добре известно е, че андрогените, инсулинът и кортикостероидите намаляват концентрацията на ГСПХ (Speroff et Fritz, 2005). В проучване върху жени с хиперандрогения лечението с кортикостероиди намалява

значимо нивата на тестостерона, без да предизвиква спад в стойностите на ГСПХ. Авторите правят извода, че намалените стойности на тестостерона вероятно водят до отпадане на неговото супресивно действие върху производството на ГСПХ (Rizzo et al., 2007). По подобен начин ниските тестостероновы нива и последващата намалена супресия на чернодробната продукция на ГСПХ може да обясни високите нива на глобулина при нелекувани болни със СЛЕ, както и липсата на изразено намаление на концентрацията му след кортикостероидно лечение.

Връзката между андрогените и полиморфизма на андрогенния рецептор (AR) е широко проучвана при различни хипо- и хиперандрогенни състояния. При мъже броят САГ триплети е свързан значимо с нивата на серумния тестостерон и на естрадиола. По-слабата транскрипционна активност на андрогенния рецептор с по-дълга полиглютаминова верига (поради по-голям брой САГ триплети в съответния ген) се компенсира напълно или почти напълно от повишените тестостероновы нива (Huhtaniemi et al., 2009). При жени обаче връзката между серумните нива на андрогените и броя САГ триплети все още е обект на противоречия. Според някои проучвания по-големият брой САГ триплети е свързан с по-ниски андрогенни нива, докато според други жените с повече САГ мотиви са с по-високи концентрации на тестостерона (Hickey et al., 2002, Brum et al., 2005; Westberg et al., 2005; Jääskeläinen et al., 2008; Kim et al., 2008; Van Nieuwerburgh et al., 2008).

Асоциацията между андрогените и андроген-рецепторния полиморфизъм може да бъде модулирана от етническата принадлежност на изследваната група, както и от съпътстващите болести. Нашите данни показаха, че жените с два алела с по 23 или повече САГ триплета са с по-високи нива на ДХЕАС и ГСПХ, както и с тенденция към по-високи концентрации на тестостерона, в сравнение с носителките на алели с по-малко от 23

триплета. Нужни са по-обширни изследвания, за да се потвърдят тези наблюдения, особено при жени с хипоандрогенемия.

Резултатите показваха също, че по-големият брой CAG триплети в относително „по-дългия“ алел у всяка жена корелира обратно пропорционално с индекса за хронично увреждане SLICC. Полиморфизмът на андрогенния рецептор вероятно модулира не само рецепторно-медираната генна транскрипция, но и андрогенните серумни нива и съответно техните негеномни ефекти, които вероятно не зависят от взаимодействието между андрогените и андрогенния рецептор (Nenonen et al., 2010; Davis-Dao et al., 2012). Тестостеронът е способен да увеличи броя на Т-супресорните клетки и да намали броя на В-лимфоцитите. Влиянието му върху имунната система обаче се опосредства поне частично от негеномни механизми (Tanriverdi et al., 2003; Rahman et Christian, 2007). Следователно протективната роля на „по-дългия“ CAG алел по отношение на необратимите увреждания при СЛЕ може да се дължи на относително по-високите серумни нива на андрогените и ГСПХ.

При хипоандрогенните жени със СЛЕ дори и лекото повишение на нивата на андрогените, обусловено от по-ниска рецепторна чувствителност може да има клинично значение. Относително „по-късите“ CAG алели не са свързани с нивата на андрогените сред изследваните жени и те нямат значимо отношение към тежестта на болестта. За разлика от получените от нас резултати при жени, проучване върху мъже със СЛЕ установява, че по-ниската андрогенна чувствителност обуславя по-изразени прояви на автоимунния процес. Положителни проби за IgG автоантитела се установяват по-често при носителите на андрогенен рецептор с брой на CAG триплетите над 23, докато положителни проби за IgM автоантитела се наблюдават по-често при болните с по-малък брой CAG триплети в гена за AR (Tessnow et al., 2011). Андроген-рецепторният полиморфизъм вероятно модулира синтеза на автоантитела и тежестта на протичане на

системния лупус по различни начини при двата пола. Това вероятно е свързано с различията в андрогенните концентрации при мъже и жени. Съвременното американско проучване съобщава, че брой на САГ триплетите по-малък от 17 се свързва с повече хронични увреждания при жени със СЛЕ (Deng et al., 2011). Тази находка подкрепя нашите резултати въпреки различната расова структура на включените в проучването болни (само от кавказката раса в нашето изследване срещу няколко различни етнически групи в цитираното проучване). Друго скоро публикувано американско проучване също потвърждава нашите резултати, като установява обратна връзка между коригирания за активност среден брой САГ триплети и наличието на по-висока имунологична активност при жени със СЛЕ (повишена експресия на автоантитела, по-висок титър на антинуклеарни антитела, по-висок индекс на активност) (Olsen et al., 2014).

Друга хипотеза може да обясни протективния ефект на алелите с по-голям брой САГ триплети с неспецифично влияние върху множествените органични засягания. Проучване върху постменопаузални жени, при които е осъществена коронарография, показва, че хомозиготните пациентки (с два алела с повече от 22 САГ триплета във всеки) са с по-слабо изразено коронарно увреждане, значимо по-високи нива на ГСПХ, и по-рядък прием на липидо-понижаващо лечение в сравнение с хомозиготните пациентки с два алела, носещи по-малко от 22 САГ триплета (Saltiki et al., 2011). Освен това по-големият брой САГ триплети се свързва с по-добър липиден профил, по-ниско артериално кръвно налягане и по-ниска тромбоцитна агрегация (Zitzmann et al., 2001; Pausova et al., 2010; Kuliczowski et al., 2010). Възможно е полиморфизмът на андрогенния рецептор да модулира тежестта и прогресията на съдовите увреди при хронични болести, без да има специфично влияние при системен лупус еритематозус. Липсата на връзка между броя САГ триплети и определени АСР критерии поддържа това предположение.

Друг важен въпрос е дали и до каква степен установената връзка между индекса SLICC и AP алелите с по-голям брой CAG триплети би имала реална роля в клиничната практика. Връзката между тези показатели е по-изразена във възрастовата група над 40 год., където андрогенните нива са значимо по-ниски в сравнение с групата на младите жени със СЛЕ. Вероятно влиянието на андроген-рецепторния полиморфизъм става биологично значимо при по-възрастните пациентки, при които стойностите на андрогените са много ниски.

Настоящото изследване е първото комплексно проучване на полиморфизма на андрогенния рецептор (CAG)_n и на андрогените при жени със СЛЕ. Поради това резултатите ни не могат да бъдат генерализирани. Сериозно ограничение на нашето проучване е малкият брой болни, нелекувани с кортикостероиди. Въпреки това установихме значими разлики в серумните нива на андрогените. Не е сигурно дали и как лечението със стероиди влияе на нивата на андрогените при болните с различен брой CAG триплети в AP алелите. Бъдещи проучвания в тази насока биха имали важно клинично значение.

В заключение, настоящото проучване показва, че пациентките със СЛЕ са със значимо по-ниски нива на андрогените в сравнение със здравите жени. Не се установиха значими разлики в броя на CAG триплетите между общата популация и болните с лупус. Въпреки че андроген-рецепторният полиморфизъм не е свързан с развитието на СЛЕ, той може да повлияе степента на хроничните увреждания, особено при по-възрастните жени. Нужни са по-нататъшни изследвания, за да се прецизират взаимоотношения между андрогените, андроген-рецепторния полиморфизъм и аутоимунитета у жени.

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

СЛЕ се среща три пъти по-често при девойки, отколкото при момчета, а съотношението между жени и мъже в репродуктивна възраст е 10:1 (Kassi et Moutsatsou, 2010). Естрогените модулират растежа, диференциацията и пролиферацията на лимфоидните клетки, синтеза на цитокини и антитела и клетъчната преживяемост. При СЛЕ те могат да потискат Т-клетъчната апоптоза и съответно да стимулират развитието на автореактивни Т-клетки (Вуное et al., 2000; Kim et al., 2010; McMurray R., 2001).

Съвременното проучване установява, че при болни с лупус жени съществува повишен риск от овариална дисфункция (Shabanova et al., 2008). При болните със СЛЕ нивата на Е2 и естриол са значимо по-високи в сравнение със здравите жени. Серумните нива на Е2 са значително по-високи при пациентките с активно заболяване, отколкото при болните със стабилен СЛЕ (Jiang et al., 2005; Verthelyi et al., 2001). Други автори не намират разлика в нивата на естрогените между болните със СЛЕ и здравите контроли (Rastin et al., 2007; Silva et al., 2007). Обширен мета-анализ върху проучванията по темата показва, че естрадиолът е значително повишен при жените със СЛЕ в сравнение с контролната група, докато за мъжете подобна разлика не се установява (McMurray et May, 2003).

Трябва да се има предвид не само плазмената концентрация на различните видове естрогени, но и техният метаболизъм. Счита се, че Е2 оказва двойна про- или антиинфламаторна роля чрез хидроксилираните си метаболити (според конверсията до митогенния 16-алфа хидроксиестрон или до антиестрогени като 2-хидроксиестрон). При сравнение на тези два типа хидрокси-естрогени у здрави лица и болни със СЛЕ се установява 10 пъти по-голяма екскреция на 2-хидроксиестрогени в урината при здрави в сравнение с болни. Уринарната концентрация на 16-хидроксиестрон е

сходна в двете групи. Отношението между уринния 16-хидроксиестрон и 2-хидроксиестрогените е 20 пъти по-високо при болни със СЛЕ, отколкото при здрави, независимо от лечението с КС. Следователно при болните се установява изразен преход към синтез на митогенни естрогени за сметка на ендогенните антиестрогени. Увеличената конверсия към митогенния 16-хидроксиестрон вероятно допринася за поддържането на пролиферативното състояние при СЛЕ (Weidler et al., 2004).

В патогенезата и клиничните прояви на СЛЕ при хора се дискутира не само ролята на естрогените, но и на техните ефекторни механизми. Естрогените оказват биологично действие върху тъканите чрез естрогенните рецептори алфа (ER α) и бета (ER β), гените за които се намират в 6-та и 14-та хромозома. При болни със СЛЕ е установена повишена експресия на мРНК за ER- α и понижена експресия на мРНК за ER- β в сравнения с периферни мононуклеари от здрави хора (Inui et al., 2007). Затова най-широко проучвани при лупус са полиморфизмите в гена за ER α , като резултатите са противоречиви. Шведски колектив изследва ролята на ER- α генния полиморфизъм при 260 болни със СЛЕ. Определени са алелите на полиморфните PvuII T/C и XbaI A/G участъци в гена за ER- α , като е направено сравнение със 670 здрави индивиди. Носителите на PvuII C алела показват по-късно начало на лупуса, а носителите на XbaI G алела се отличават с по-нисък индекс на увреждане (Johansson et al., 2005). Други автори - обратно, не намират връзка между ER- α полиморфизма и възрастта, в която се отключва болестта. (Lee et al., 2004).

С оглед на противоречивите данни в литературата ние си поставихме за цел да определим значението на полиморфните PvuII T/C и XbaI A/G участъци в гена за ER- α при български пациентки с лупус, като проучим ролята на двата полиморфизми за фенотипната изява и тежестта на СЛЕ.

Резултатите от нашето проучване показаха идентично алелно разпределение на ER α полиморфизмите PvuII T/C и XbaI A/G при болните

с лупус и здравите жени. Аналогично, други европейски и азиатски проучвания също не намират разлика в алелните честоти при болни със СЛЕ и здрави контроли (Johansson et al., 2005; Lu et al., 2009). Обратно - американски автори съобщават за повишен риск от лупус при наличието на генотип PP или XX (Wang et al., 2010). Разликите вероятно се дължат на етнически различия. Следва да се отбележи и относително малкият брой изследвани болни в американското проучване – 46 жени със СЛЕ.

Друга цел на нашето изследване беше да се определи дали полиморфизмите на ER α влияят върху клиничните изяви на СЛЕ. Резултатите показаха, че болните с генотип rrxx страдат значително по-рядко от фоточувствителност в сравнение с останалите. Същевременно нито една от болните с генотип PPXX не показва симптоми на неврологично ангажиране, докато честотата на невролупуса сред пациентките с генотип PpXx и rrxx е 35.9%. Тъй като XbaI G (X) и PvuII C (P) алелите се срещат в свързани комбинации много по-често, отколкото може да се очаква теоретично (т. нар. linkage disequilibrium), изследването на комбинираните генотипи е по-важно, отколкото изолираното разглеждане на двата полиморфни участъка. Този факт не е изненадващ, като се има предвид, че двата полиморфизма са разделени само от 50 двойки бази в първи интрон на гена за ER α (Jakimiuk et al., 2007). Нашите резултати подкрепят изводите от единственото до момента европейско проучване върху PvuII T/C и XbaI A/G полиморфизмите в ER α . Шведски колектив изследва тяхната роля при болни със СЛЕ и здрави индивиди и установява връзка между по-честите rr и xx генотипи и когнитивното увреждане. Авторите правят извода, че XbaI G (X) и PvuII C (P) алелите са свързани с по-лека форма на СЛЕ, която се характеризира с кожни прояви, по-късно начало и по-слабо органно засягане (Johansson et al., 2009). Полски автори изследват само PvuII T/C полиморфизма на ER α и установяват по-ниска честота на неврологично засягане при болни с

ювенилен лупус и PvuII C (P) алели (Kisiel et al., 2011). Същевременно лонгитудинално проучване върху здрави жени над 65 годишна възраст установява, че алтернативните алели p и x се срещат по-често при жените, които развиват когнитивен дефицит, отколкото при останалите (Yaffe et al., 2002). Неизяснен е въпросът, дали протективните свойства на алелите P и X по отношение на неврологичните увреждания са специфични за пациентките с лупус. Възможно е те да предизвикват промени в естрогенния рецептор, които да предпазват нервната система от въздействието на ендогенни или екзогенни фактори.

Механизмите, чрез които двата полиморфизма променят активността или експресията на ER α , не са известни. Herrington et al. изследват полиморфизма PvuII и установяват, че наличието на алел P увеличава свързващите участъци за транскрипционния фактор B-myb в гена за ER α при експериментални условия. B-myb може да усилва транскрипцията на ER α или да предизвика синтез на рецепторни изоформи с променени свойства. Авторите допускат, че наличието на алел P може да доведе до по-изразен отговор към естрогените в клетки, които експресират B-myb или свързани транскрипционни фактори (Herrington et al., 2002). Алтернативна хипотеза предполага, че е възможно полиморфизмите в интрон 1 да са тясно свързани с други ключови полиморфни участъци в гена за ER α (linkage disequilibrium), които биха могли да модулират отговора към естрогени (Jakimiuk et al., 2007). Последни данни сочат, че полиморфните XbaI и PvuII участъци влияят върху синтеза на интерлевкини. Lu et al. установяват, че болните със СЛЕ и генотип PpXx са със значително по-висока експресия на мРНК за IL-10 и IL -2 в сравнение с контролите (Lu et al., 2009). Необходими са допълнителни проучвания, които да изяснят механизмите, чрез които генетичните полиморфизми повлияват функцията на ER α и имунологичните фактори при СЛЕ.

В нашето проучване не се установи зависимост между изследваните генотипи и възрастта на изява на системния лупус. Наличието на алел R се свързва с по-късно начало на СЛЕ при европейци и азиатци (Johansson et al., 2009; Lee et al., 2004). Различията между проучванията вероятно се дължат на етнически различия. Трябва да се подчертае и различната честота на болни с ювенилен лупус в отделните изследвания. Полиморфизмите на естрогенния рецептор вероятно оказват различно влияние при болните, развили СЛЕ в детска или в зряла възраст, като се имат предвид различията в нивата на половите хормони в тези периоди.

Нашето изследване е едно от малкото в света, които изследват връзката между полиморфизмите на естрогенния рецептор и клиничните прояви на СЛЕ. При интерпретиране на резултатите трябва да се има предвид относително малката група здрави контроли. Поради това в теоретичен план, липсата на разлика в алелното разпределение между здравите и болните жени може да се дължи на недостатъчна сила на изследването да установи дискретни различия между групите. Уместно е да се подчертае, че всички големи проучвания до момента не намират разлика в алелното разпределение на двата полиморфизма между болни със СЛЕ и здрави контроли. Това означава, че тази хипотеза е малко вероятна.

В заключение нашето проучване установи, че полиморфните XbaI и PvuII участъци в гена за ER α модулират клиничната изява на СЛЕ. Необходими са допълнителни изследвания, които да установят конкретните механизми, чрез които по-рядко срещаните алели R и X влияят върху функцията на естрогенните рецептори. Практическият смисъл на тези проучвания е свързан с възможността за индивидуализиране на терапията съобразно конкретния генотип на болните, което би довело до по-добри резултати при лечението на СЛЕ.

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

Полиморфизмът PROGINS е полиморфен вариант в гена за прогестероновия рецептор (ПР), който се състои от 306-bp Alu инсерция от субфамилията PV/HS-1 в интрон G на лиганд-свързващия участък на гена и две точкови мутации V660L в екзон 4 и H770H в екзон 5 (Rowe et al., 1995; Romano et al., 2007). Според Stenzig et al. вариантът PROGINS не се различава от нормалния прогестеронов рецептор по отношение на функцията си (Stenzig et al., 2012). Според друго проучване PROGINS вариантът на ПР може да доведе до намалено прогестиново действие (Romano et al., 2007). При експериментални изследвания е наблюдавана намалена стабилност на транскрипцията PROGINS, намалена трансактивационна активност на същия вариант и по-малко ефективно потискане на клетъчната пролиферация от гестагени в овариални клетки, експресиращи PROGINS рецептор (Romano et al., 2007).

Прогестеронът има протективен ефект по отношение на ендометриалната и овариалната карциногенеза, но стимулира клетъчната пролиферация в млечните жлези. Съответно, PROGINS вариантът на прогестероновия рецептор се свързва с повишен риск от развитие на овариален и ендометриален карцином, както и с намален риск от рак на гърдата (Giacomazzi et al., 2012).

Все повече доказателства сочат, че прогестеронът оказва важна роля при регулацията на имунната система дори и извън бременността. Нарушеното действие на този хормон може да усилва склонността към инфекциозни и възпалителни състояния (Tait et al., 2008). Полиморфизмът на прогестероновия рецептор е изследван най-вече в контекста на различни усложнения на бременността и болести на женската полова система, но не и при автоимунни болести. При мишки с лупус се наблюдава нарушение в

индукцията на прогестеронови рецептори под действие на естрогени (Dhaher et al., 2000). Редукцията на имunosупресивния ефект на прогестерона би могла да потенцира склонността към автоимунни заболявания при носителите на PROGINS, но проучвания, които да потвърдят или отхвърлят тази хипотеза все още липсват.

С оглед на етническите различия във функционалното значение на генетичните полиморфизми, в настоящото проучване първоначално беше определена PROGINS Alu инсерцията сред здрави българки. Алелното разпределение в нашата популация е сходно с това в други популации от бялата раса от САЩ, Бразилия и Австралия (Near et al., 2011; Giacomazzi et al., 2012). Впоследствие сравнихме и алелните и генотипните честоти на PROGINS полиморфизма при здрави жени и пациентки с лупус, като не установихме съществени различия.

Полиморфният PROGINS Alu алел не беше свързан значимо с клиничните прояви на системния лупус, с активността или тежестта на болестта. Резултатите показват, че PROGINS не влияе върху изявата и клиничните прояви на СЛЕ при българки.

Това е първото проучване в света по този проблем. Необходими са допълнителни проучвания с други етнически групи и при други автоимунни заболявания, за да се установи конкретното значение на полиморфизма на прогестероновия рецептор за автоимунитета.

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

Хипоталамо-хипофизно-надбъбречната ос е от съществено значение за регулацията на имунния отговор. Хормоналният дисбаланс може да доведе до повишена склонност към автоимунни болести (Ramos-Casals et al.,

2008). При болни с лупус са установени понижени нива на серумния кортизол, а също и резистентност към действието на глюкокортикоидните хормони (Straub et al., 2004; Melo et al., 2013). Намалената чувствителност спрямо кортикостероиди не се обуславя от промени в експресията на глюкокортикоидните рецептори (Melo et al., 2013). Това предполага промени в самите рецептори. Няколко полиморфизма на глюкокортикоидния рецептор се свързват с промени в чувствителността към кортизол. Най-широко проучвани са ER22/23ЕК (rs6189-6190) и BclII (rs41423247) вариантите на глюкокортикоидния рецептор.

ER22/23ЕК полиморфизмът се асоциира с относителна резистентност към глюкокортикоидите, а полиморфният BclII вариант се свързва по-често с повишена чувствителност към кортизол (van Rossum et Lamberts, 2004). До момента ролята на тези полиморфизми не е проучена сред болни с лупус. Настоящото изследване си постави за цел да сравни честотата на ER22/23ЕК рецепторния полиморфизъм между болни със СЛЕ и здрави контроли. Въпреки че редкият полиморфен ER22/23ЕК алел се срещаше два пъти по-често при болните, отколкото при здравите жени, разликата не достигна статистическа значимост, вероятно поради ниската честота на този алел в изследваната група. Независимо от това болните с ER22/23ЕК алел са с по-често съпътстващ синдром на Sjögren в сравнение с останалите. Възможно е наличието на ER22/23ЕК алел да предразполага към развитие на автоимунни болести без да е специфичен рисков фактор за СЛЕ.

Наличието на рядко срещан ER22/23ЕК алел се свързва с по-добро съотношение между мастна и немастна тъкан в организма, по-малка честота на артериална хипертония, по-ниски стойности на С-реактивния протеин и по-дълга продължителност на живота в сравнение с носителите на обичаен алел (van Rossum et al., 2004; Mora et al., 2012; van Rossum et al., 2004). Този полиморфизъм може да повлияе отрицателно върху

клиничната изява на някои автоимунни болести. ER22/23ЕК се свързва с повишена склонност към ревматоиден артрит и с по-агресивно протичане на болестта при болни с множествена склероза (van Oosten et al., 2004; van Winsen et al., 2009). Това показва неговата важна роля като модулиращ фактор при автоимунните болести.

Резултатите показват, че честотата на глюкокортикоидния рецепторен VcII полиморфизъм не се различава при болните със СЛЕ в сравнение със здравите жени. Същевременно, редкият полиморфен VcII алел е свързан с повишена честота на имунологични нарушения. При VcII носителите се срещат по-често положителни anti-dsDNA, anti-Smith и anti-RNP антитела, като разликата е статистически значима само за anti-RNP антителата.

Тези резултати са учудващи, тъй като VcII алелът се свързва с повишена чувствителност към кортикостероидите. Би трябвало той да оказва по-скоро протективно въздействие върху автоимунитета. Литературната справка обаче показва, че подобни резултати са установени и при болни с други автоимунни болести (Kostik et al., 2011; Maltese et al., 2009). Честотата на VcII полиморфизма не е повишена при момичета с ювенилен артрит при сравнение със здрави деца, но полиморфният VcII алел се свързва с развитие на болестта в по-ранна възраст, с по-високи концентрации на маркерите за възпаление и с повишена тежест на артритата (Kostik et al., 2011). При болни с болест на Crohn е наблюдавана повишена честота на VcII полиморфните алели в сравнение с контролна група (Maltese et al., 2009). Обратно - според van Oosten et al. VcII полиморфизмът определя по-нисък риск от развитие на ревматоиден артрит в сравнение с носителите на обичайни алели (van Oosten et al., 2010). Ефектите на този полиморфизъм може да зависят от етническата принадлежност на болните, както и от други фактори, тъй като други автори не намират никаква зависимост между VcII варианта на

глюкокортикоидния рецептор и развитието или тежестта на ревматоидния артрит (Donn et al., 2007; Lee et al., 2005; Aydeniz et al., 2011).

Изследванията върху функционалното значение на VcII варианта също са интересни. Полиморфният VcII алел обуславя повишена чувствителност към кортикостероиди при здрави хора, но при болните с множествена склероза той не влияе върху чувствителността към кортикостероиди (van Rossum et al., 2003; van Winsen et al., 2005). Вероятно променените нива на кортикостероидите, различни цитокини или други неизвестни фактори модулират чувствителността към глюкокортикоиди при хронични автоимунни болести, а съответно и функционалната активност на полиморфните глюкокортикоидни рецептори (van Winsen et al., 2005). В допълнение, ефектът на генните полиморфизми може да е тъканно специфичен, което затруднява определянето на тяхното функционално значение (Kumsta et al., 2008). VcII полиморфизмът се свързва с повишена чувствителност към кортикостероиди в субдермалните кръвоносни съдове, но същият полиморфизъм не повлиява или даже понижава кортикостероидната чувствителност при изследвания върху левкоцити (Kumsta et al., 2008; Panarelli et al., 1998). Необходими са нови проучвания, които да определят молекулярната основа на имунологичните промени при VcII носителите с лупус.

И двата изследвани полиморфизма на кортикостероидния рецептор не бяха свързани с дозовите режими на провежданото кортикостероидно лечение при изследваните болни. Вероятно полиморфизмите на глюкокортикоидния рецептор модулират чувствителността към кортикостероиди при физиологични концентрации на кортизола, но не и при употреба на фармакологични дози кортикостероиди, които многократно надвишават физиологичните.

В заключение, настоящото проучване установи, че ER22/23ЕК полиморфизмът на глюкокортикоидния рецептор се среща по-често при

пациентки със СЛЕ, отколкото при здрави жени и значимо по-често при болни с лупус и съпътстващ синдром на Sjögren в сравнение с останалите болни. Много ниската честота на полиморфния алел в изследваната група е основен лимитиращ фактор на изследването, въпреки че установената от нас честота сред здрави лица кореспондира с данните от други етнически групи.

VсII рецепторният полиморфизъм е свързан със значимо по-висока честота на имунологични нарушения при болните с лупус. Необходими са допълнителни изследвания, които да уточнят патофизиологичните механизми, чрез които полиморфизмите на кортикостероидния рецептор оказват влияние върху автоимунните болести.

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

Генетичната предиспозиция е важен рисков фактор за развитието на системен лупус. До момента са идентифицирани множество гени, свързани с повишен риск от тази болест (Chaichian et Utset, 2013; Flesher et al., 2010). Въпреки това много генетични локуси могат да предразполагат към лупус в една популация, но не и в друга (Liu et Davidson, 2012). Предвид силно изразените различия във функционалното значение на VDR полиморфизмите в различни етнически групи (Uiterlinden et al., 2004), ние си поставихме за цел да изследваме ролята на двата най-проучвани до момента полиморфизми в гена за рецептора за витамин D BsmI (rs1544410) и FokI (rs2228570) при същото заболяване сред българи.

При сравнение между здравите жени и пациентките с лупус е установена сходна честота на по-редкия BsmI В алел. Честотата на ВВ генотипа е по-малка сред болните в сравнение с контролите, но разликата не е

статистически значима. Нашите данни подкрепят резултатите, получени при изследвания сред иранци, поляци и бразилци (Abbasi et al., 2010; Kaleta et al., 2013; Mostowska et al., 2013; Monticielo et al., 2012). Противно на тях, повечето азиатски проучвания установяват значима връзка между този полиморфизъм и развитието на СЛЕ (Ozaki et al., 2000; Luo et al., 2012). Ozaki et al. намират значително повишена честота на ВВ генотипа сред японци с лупус в сравнение с контролна група от същата етническа група, докато според Luo et al. честотата на В алела, но не и на ВВ генотипа може да се свърже с наличието на лупус при китайци (Ozaki et al., 2000; Luo et al., 2012; Huang et al., 2002). Интересно, сред азиатци от тайландски произход подобна асоциация не е наблюдавана (Sakulpipatsin et al., 2006). В подкрепа на нашите резултати два метаанализа заключават, че *BsmI* полиморфизмът е свързан с развитието на лупус при азиатци, но не и при представители на бялата раса (Zhou et al., 2014; Mao et Huang, 2014). Авторите подчертават нуждата от допълнителни изследвания по този проблем поради множеството лимитиращи фактори като хетерогенност на включените клинични случаи, различен дизайн на проучванията и недостатъчен брой болни (Zhou et al., 2014).

Значението на *BsmI* полиморфизма за отделните клинични прояви на системния лупус също е недостатъчно проучено. Лупусен нефрит се среща по-често сред японци, носещи *bb* генотип, докато при китайци редкият В алел предразполага към развитие на бъбречно увреждане (Ozaki et al., 2000; Luo et al., 2012). В нашето проучване *BsmI* полиморфизмът не е свързан значимо с бъбречна патология. Тези данни подкрепят получените резултати сред европейци (Kaleta et al., 2013; Mostowska et al., 2013). ВВ генотипът е свързан с по-ниска честота на орална афтоза сред изследваните българки. Подобна връзка не е установена сред други етнически групи от бялата раса (Kaleta et al., 2013; Mostowska et al., 2013; Monticielo et al., 2012).

Функционалното значение на BsmI полиморфизма не е изяснено напълно. Според някои данни при носителите на BsmI В алел се установява по-голяма стабилност на матричната VDR РНК (Morrison et al., 1994). Uitterlinden et al. анализират противоречивите функционални изследвания върху BsmI полиморфизма и допускат, че по-добрата РНК стабилност при хаплотип, съдържащ В алел, може да се свърже с по-голям брой VDR рецептори и съответно с по-добър отговор към витамин D3 (Uitterlinden et al., 2004). Възможно е функционалното значение на генетичните VDR полиморфизми да се модулира от множество фактори - различни други генетични влияния, етнически особености, нарушения в хормоналния баланс и имунната система, хранителни навици и т.н., това затруднява извеждането на категорични заключения.

Сравнихме генотипното разпределение на VDR FokI полиморфизма сред пациентки с лупус и здрави жени, като не установихме различия в алелните или генотипните честоти у двете групи. Клиничните прояви, активността и тежестта на СЛЕ също не бяха повлияни от този полиморфизъм. Установихме значима връзка само между наличието на ff генотип и повишен риск от пеперудообразен обрив при болните с лупус. Въпреки че наблюдавахме серозит само при носителите на F алел, но не и при тези с ff генотип, разликата не беше статистически значима.

Проучванията, които изучават ролята на VDR FokI полиморфизма при лупус са изключително противоречиви. FokI генотипните и алелни честоти не се различават при сравнение между полски болни с лупус и здрави индивиди (Mostowska et al., 2013). F алел се установява значително по-често сред болните с бъбречно засягане отколкото при болните без ренални нарушения (Mostowska et al., 2013). Друго проучване в същата етническа група не открива връзка между FokI и клиничните прояви на системния лупус (Bogaczewicz et al., 2013). Monticielo et al. установяват значимо по-високи серумни концентрации на 25-ОН витамин D при

болните с f/f генотип в сравнение с тези с F/F генотип, но също не намират връзка между органното засягане при болестта и VDR полиморфизма сред бразилци (Monticielo et al., 2012). Според друго проучване F/F генотипът се свързва не само с по-ниски концентрации на 25-ОН витамин D, но и с развитие на лупусен нефрит и с по-висока активност на СЛЕ (Emerah et El-Shal, 2013). Още по-интригуващи са резултатите от португалско проучване, според които не F/F хомозиготите, а хетерозиготните F/f носители са с по-високи стойности на индекса за хронично увреждане SLICC, без връзка между отделните органни нарушения и VDR полиморфизма (Carvalho et al., 2015). Мащабен мета-анализ върху повече от 2000 болни и контроли установява, че FokI полиморфизмът е рисков фактор за развитие на лупус в общата популация. След анализ спрямо етническа принадлежност връзката се запазва само при азиатската група, но не и в другите популации (Xiong et al., 2014). Нашите резултати подкрепят данните за кавказката раса, според които VDR FokI полиморфизмът не е генетична предпоставка за развитие на СЛЕ. Не установихме също така връзка между FokI генотипите и развитието на лупусен нефрит при българки, подобно на резултатите сред португалци и бразилци (Monticielo et al., 2012; Carvalho et al., 2015). Следва да се отбележи, че значителните разлики в резултатите между отделните проучвания могат да произтичат не само от етническите различия, но и от други фактори като различна възраст и пол на включените участници, различна давност на болестта, както и значителна хетерогенност по отношение на клиничните прояви, соларната експозиция на болните и концентрациите на 25-ОН витамин D в изследваните групи.

В заключение, нашите резултати показват, че полиморфизмите на VDR BsmI и FokI не предразполагат към развитие на системен лупус при българки и не са свързани с повишен риск от лупусен нефрит. Установява се връзка между двата полиморфизма и кожно-лигавичните прояви на болестта (пеперудообразен обрив и орална афтоза), но не и асоциация с

други органни прояви, нейната активност или степен на хроничните увреждания. Необходими са допълнителни проучвания, които да установят възможните взаимодействия между полиморфизмите на VDR рецептора и автоимунните болести.

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

Настоящото изследване показва, че полиморфизмите rs1562444, rs10830962 и rs10830963 на гена MTNR1B не са свързани с развитието на СЛЕ при жени, но те могат да повлияят клиничните прояви на болестта. Интересна находка е значимата връзка и на трите полиморфизма със склонността към развитие на левкопения. Пациентките с rs1562444 GG, rs10830962 CC и rs10830963 CC генотипове са с увеличен риск от понижаване на броя левкоцити при тласък на лупуса. Левкопенията при лупус може да се дължи на комбинация от фактори, например синтез на антилевкоцитни антитела, намалена костномозъчна продукция, хиперспленизъм или активиране на системата на комплемента (Servera et al., 2009). Резултатите предполагат, че мелатониновият рецептор тип 1B и неговите полиморфизми играят важна роля в човешката миелопоеза и левкоцитното преживяване *in vivo*. При животински модели приложението на мелатонин предпазва костния мозък от увреждащите ефекти на цитотоксичните медикаменти и стимулира митозата в костномозъчните клетки (Anwar et al., 1998; Ferreira et al., 2013). Съвременни изследвания показват, че мелатонинът може да намали процеса на апоптоза в човешките левкоцити (Espino et al., 2010; Espino et al., 2011; Espino et al., 2013). Espino et al. изучават подлежащите механизми и установяват, че извън антиоксидантната си функция, мелатонинът изисква взаимодействие на

мембранните си рецептори тип 1А и 1Б и извънклетъчна сигнално-регулирана киназна активация, за да противодейства на стимулираната от тумор некротичния фактор-алфа апоптоза на човешки левкоцити (Espino et al., 2013). Според Lissenko и сътр. носителите на rs10830963 G алел са с по-висока експресия на MTNR1B гена в панкреасни островни клетки в сравнение с носителите на С алел (Lyssenko et al., 2009). Потенциалното повишение на експресията на MNTR1B от човешки левкоцити и усилването на мелатониновото сигнализиране може да предпазва болните със СЛЕ, носители на rs10830963 G алел от левкопения. Нашите резултати показват, че полиморфизмите на мелатониновия рецептор 1Б влияят върху проявата на хематологични нарушения при жени със СЛЕ. Нужни са допълнителни изследвания, за да се установи дали същите зависимости са налице при болни със СЛЕ от други етнически групи.

Наличието на rs10830962 G алел в гена MTNR1B може да има протективна роля при болни със СЛЕ, тъй като генотипът G/G е свързан със значимо по-ниска честота на имунологични нарушения в сравнение с генотипа C/C. Още повече, G/C и G/G носителите се отличаваха с развитие на СЛЕ в по-късна възраст и с тенденция към по-малък брой ACR критерии. Същата тенденция се установи при генотипа G/G на MTNR1B rs10830963.

Полиморфизмите rs10830962 и rs10830963 на гена MTNR1B са проучвани и преди в контекста на метаболитни нарушения (Lyssenko et al., 2009; Staiger et al., 2008; Rönn et al., 2009; Tam et al., 2010; Vlassi et al., 2012; Huber et al., 2013). Алелите G на rs10830962 и rs10830963 са свързани с намалена инсулинова секреция, повишена гликемия на гладно и повишен риск от развитие на захарен диабет тип 2 в различни популации (Lyssenko et al., 2009; Staiger et al., 2008; Rönn et al., 2009; Tam et al., 2010; Vlassi et al., 2012). При жени със синдром на поликистозните яйчници алелът G на MTNR1B rs10830963 се свързва не само с нарушения в метаболизма на въглехидратите, но и с по-високи нива на тестостерона (Li et al., 2011).

Понижените нива на андрогените са специфична находка при жените, болни от СЛЕ и следователно естествените имunosупресивни ефекти на повишения тестостерон може да имат положително въздействие върху симптомите на СЛЕ (Dougados et al., 1984; Cutolo et al., 2004). Не е ясно дали алелът rs10830963 G може да се свърже с повишени андрогенни нива при жените с лупус.

Интересен е фактът, че при пациентките с генотип rs10830963 G/G не се наблюдаваха неврологични нарушения. Честотата на този генотип сред изследваните жени е много ниска и поради това не могат да се правят окончателни заключения. Мелатонинът е мощен невропротектор, но подлежащите механизми на въздействие върху нервната система остават противоречиви (Kilic et al., 2012; Lee et al., 2010; Chern et al., 2012). Според някои автори положителните ефекти на мелатонина при експериментални исхемични мозъчни увреди може да се обяснят с опосредстваното от MTNR1B потискане на оксидативния стрес, а също и със стимулирането на ендогенната невrogenеза (Chern et al., 2012). Приложението на рецепторни агонисти на MTNR1A/MTNR1B е ефективно при лечението на делири у възрастни болни с остри нарушения на мозъчното кръвообръщение и безсъние (Ohta et al., 20120). Според друго проучване - обратно, носителството на G алела на MTNR1B rs10830963 е рисков фактор за развитие на прогресивни форми на мултиплена склероза (Natarajan et al., 2012). Влиянието на полиморфизмите на гена MTNR1B върху неврологичните нарушения подлежи на допълнително уточняване.

В заключение, установихме, че полиморфизмите rs1562444, rs10830962 и rs10830963 на гена MTNR1B не са свързани с развитието на системен лупус при жени, но вероятно влияят на клиничните прояви на тази болест. Носителството на G алели при полиморфизмите rs10830962 и rs10830963 на гена MTNR1B обуславя по-леко протичане на болестта с по-късна изява и по-малък брой симптоми. И при трите проучвани полиморфизма

установихме специфични генотипни връзки със склонността към левкопения. Понижението на броя левкоцити при лупус може да се свърже не само с болестта *per se*, но и с имunosупресивното лечение (Cervera et al., 2009). Основното ограничение на настоящото изследване е фактът, че повечето болни са провеждали продължително лечение с имunosупресори и кортикостероиди, които повлияват костномозъчната функция. Въпреки това, връзката между левкопенията и полиморфизмите на гена MTNR1B остана статистически значима дори и след контролиране за различните видове имunosупресивно лечение.

Необходими са допълнителни изследвания, за да се установи значението на полиморфизмите на гена за рецептора MTNR1B върху костномозъчната функция при болни със СЛЕ от други етнически групи, както и при болни с потисната костномозъчна функция вследствие на други болести или медикаменти.

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

СЛЕ има широк спектър от клинични прояви, като до момента не е установена конкретна причина за развитието на болестта, въпреки че е налице комплексна генетична основа (Cervera et al., 2009). Вероятно автоимунното нарушение е резултат от комбинация от предразполагащи фактори, които могат да окажат своето негативно влияние само при наличие на променени механизми на имунния отговор. Последните са свързани със състояния на стрес, при които се развива дисфункция на симпатиковата нервна система, както и на ендокринния баланс (Cutolo et al., 2008).

Нервноендокринно-имунната система се разглежда като основна мрежа, която поддържа здравословното състояние на организма. Предполага се, че нейните нарушения играят важна роля в развитието на автоимунните болести. Ключови участници в нервноендокринно-имунните пътища са стероидните хормони и неврохормона мелатонин (Cutolo et Straub, 2009). Той се счита за модулатор на кръвотворенето и функцията на имунните клетки. Мелатонинът може да стимулира производството на цитокини, фагоцитозата и активността на НК клетките. Не по-малко важен е фактът, че той може да пренасочва имунния отговор към Т-хелперен тип 1 профил, като в същото време може и да действа и като противовъзпалителен агент (Szczepanik M., 2007). Поради тези причини концентрациите на мелатонина са били изследвани при различни автоимунни, алергични и инфекциозни болести (Sulli et al., 2002; Fei et al., 2004; Carrillo-Vico et al., 2005). Въпреки това, комплексната роля на хормона в регулацията на имунитета остава неясна. Поради липсата на проучвания, които да изследват концентрациите на пинеалния хормон при СЛЕ, ние си поставихме за цел да изследваме влиянието на дневните нива на хормона върху развитието и клиничните прояви на лупуса при жени.

Настоящото проучване показва, че дневните нива на мелатонина при жени със СЛЕ са значимо по-ниски, в сравнение с тези при здрави контроли. Нашите резултати не съвпадат с някои резултати, получени при опитни животни. Например, в проучване върху MRL/MP-fas^{lpr} мишки, които представляват експериментален модел на СЛЕ, се описва различен модел на секреция на мелатонина. Последният не зависи от цикъла светлина-мрак за разлика от този при здрави животни и се характеризира с парадоксално високи нива по време на светлия период (Lechner et al., 2000). Тъй като нощните гризачи и активните през деня представители на Homo sapiens имат твърде различни зрителни и циркадни системи, както и много различна реакция към светлина, резултатите, получени при наблюдение на

миши СЛЕ модели, не може да се прехвърлят директно върху хора, болни от СЛЕ (Bullough et al., 2006). Доколкото ни е известно, това е първото проучване, сравняващо мелатониновите нива при здрави контроли и жени, болни от СЛЕ, въпреки че в литературата е описан случай на пациент със СЛЕ и пинеална тератома (с последваща малигнена трансформация) (Shah et al., 1995). Поради това са нужни допълнителни проучвания, които да потвърдят нашите резултати в други популации.

Намалените серумни нива на мелатонина при жени със СЛЕ може да се дължат на хроничния автоимунен процес или на имunosупресивното лечение. Приемът на екзогенни кортикостероиди се свързва, както с повишени, така и с понижени нощни нива на мелатонин при здрави хора (Lang et al., 1986; Demisch et al., 1988). Повишени дневни мелатонинови нива са установени при пациентки със синдром на Кушинг независимо от причината за заболяването, като стойностите на пинеалния хормон са се нормализирали след корекция на хиперкортицизма (Tomova et al., 2008). Малко е вероятно намалението на дневните мелатонинови нива при болни със СЛЕ да е следствие от хроничното кортикостероидно лечение. Липсата на връзка между хормоналните нива и дозата на кортикостероидите подкрепя това твърдение.

Нивата на мелатонина бяха не само понижени при пациентките с лупус, но и показаха обратна корелация с индекса на болестна активност SLEDAI. Няколко изследвания подкрепят директно или индиректно връзката между пинеалния хормон и автоимунните процеси. Приемът на мелатонин от женски MRL/MP-fas^{lpr} мишки с лупус намалява нивата на автоантителата и подобрява хистологичната картина (Jimenez-Caliani et al., 2006). Тъй като хормонът е добавян към водата за пиене, точното време на прием на мелатонина не е уточнено, но то може да има важно клинично значение. В друго подобно изследване дневното приложение на мелатонин между 17:00 и 19:00 ч. не подобрява значимо преживяемостта на лупусните

NZB/W мишки, но когато хормонът се прилага между 08:00 и 10:00ч., преживяемостта на болните животни значимо се увеличава (Lenz et al., 1995). Тези проучвания показват, че приложението на мелатонин има положителен ефект върху протичането на болестта при женски миши модели на СЛЕ.

Единственото до момента проучване на мелатонинови нива при хора, страдащи от СЛЕ е проведено от Haga et al. Авторите изследват сезонните вариации на активността на лупуса и дневните мелатонинови нива при болни, живеещи в субарктичния регион (Haga et al., 1999). Нивата на мелатонина през деня при 14 болни с идентичен терапевтичен режим клонят към по-високи стойности през декември, отколкото през юни. Те не показват значима връзка с индекса SLEDAI, активността на артритата, обострянията на болестта, С-реактивния протеин, титъра на антителата срещу двойноверижната ДНК или на антинуклеарните антитела през юни и декември, но корелират обратнопропорционално със стойностите на СУЕ през декември. Авторите правят извода, че нивата на мелатонина не са свързани с клиничната активност на болестта или различните ѝ изяви, макар че корелацията със СУЕ показва връзка с активността на СЛЕ (Haga et al., 1999). Нашето изследване поддържа последните заключения, въпреки че двете проучвания не могат да бъдат сравнени директно: норвежките болни са набирани в субарктичен регион с минимално зимно слънцегреене, докато нашето изследване е проведено в област с умерен климат и средно слънцегреене между 80 и 100 часа месечно през зимата (<http://www.weather-and-climate.com>).

Циркадните и циркануалните флукуации на мелатониновите нива зависят от синтеза на хормона в епифизата, докато базалните дневни концентрации се влияят и от други фактори (Huether G., 1993). Например невроендокринните клетки от гастроинтестиналния тракт могат значимо да повлияят дневните серумни концентрации на мелатонина (Bubenik G.A.,

2002). Изследване, проведено върху пинеалектомизирани мишки показва доловими дневни концентрации на мелатонина в серума. Различни клетки и тъкани извън епифизита, които имат отношение към имунитета, могат да синтезират мелатонин (Gómez-Corvera et al., 2009). В нашето проучване са изследвани само дневните нива на мелатонина, подобно на други сходни изследвания (Naga et al., 1999; Caglayan et al., 2001). Поради тази причина липсва информация за евентуални нарушения в циркадните ритми. Въпреки това нашите резултати показват значима взаимовръзка между дневните мелатонинови концентрации и активността на СЛЕ. Нужни са по-нататъшни изследвания, които да изяснят подробно патофизиологичното и клиничното значение на пинеалната и екстрапинеалната секреция на мелатонин при болни със СЛЕ, както и взаимоотношенията между този хормон и автоимунитета като цяло.

ОБОБЩЕНИЕ

1. 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 13): (CAG) n полиморфизма на андрогенния рецептор, PvuII T/C и XbaI A/G полиморфизмите на естрогенния рецептор- α , PROGINS полиморфизма в прогестероновия рецептор, BclI и ER22/23EK полиморфизмите в кортикостероидния рецептор, BsmI и FokI полиморфизмите 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. Бяха подбрани чести и добре проучени 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.

Таблица 13. Функционално значение на генните полиморфизми на стероидните рецептори.

Рецептор (ген)	Генен полиморфизъм	Функционално значение
AP (Xq11-12)	(CAG)_n	модуляция на андрогенната чувствителност
EP (6q24-27)	PvuII T/C	промения 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

Както очаквахме, при широко разпространените в популацията полиморфизми генотипното и алелното разпределение при здравите жени и болните с лупус е сходно за всички изследвани варианти.

Същевременно установихме връзка между някои от полиморфизмите и клиничната изява на СЛЕ. Алелите с по-голям брой CAG триплетите 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 RvuII 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 (Johansson et al., 2009; Lee et al., 2004). Комбинираният генотип PPXX се асоциира с много по-малка честота на неврологично ангажиране в сравнение с тази при другите хетерозиготни и хомозиготни носители.

Полиморфният PROGINS Alu алел не е свързан значимо с клиничните прояви на системния лупус, нито с активността или тежестта на болестта. Нашите резултати показаха, че PROGINS не е рисков фактор за СЛЕ и не влияе върху неговите клинични прояви при българки.

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 срещаха по-често при болните със СЛЕ в сравнение със здравите, въпреки че разликата не достигна статистическа значимост. Същият полиморфизъм се срещаше 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 установихме 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 VsmI и FokI. Резултатите не показаха връзка между двата полиморфизма и склонността към развитие на СЛЕ при български. Не се установи повишен риск от лупусен нефрит при носителите на FokI и VsmI полиморфни алели. Двата полиморфизма се асоциираха само с някои кожно-лигавични прояви (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 40.

2. 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 (Szczepanik M., 2007). Нивата на мелатонина бяха значително пониски при болните с лупус в сравнение със здравите контроли. Те показаха 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 (Espino et al., 2010; Espino et al., 2011; Espino et al., 2013).

Полиморфизмите rs10830962 и rs10830963 в гена за мелатониновия рецептор 1Б са свързани още с възрастта на развитие на системния лупус, броя на наличните АСР критерии и развитието на имунологични нарушения. Въпреки че тези полиморфизми се изучават в последните пет години най-вече в контекста на захарния диабет, нашите резултати показват, че те имат отношение и към протичането на някои автоимунни заболявания. 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.



Фигура 40. Хормон-рецепторни полиморфизми и клинични особености на СЛЕ. AP–андрогенен рецептор; ER – естрогенен рецептор алфа; GR – глюкокортикоиден рецептор; MR–мелатонинов рецептор тип 1Б; ВДР – рецептор за витамин Д.

ИЗВОДИ

1. *(CAG)_n полиморфизмът в гена на андрогенния рецептор не предразполага към развитие на СЛЕ, но повлиява изявата 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 ER22/23ЕК полиморфизмите в кортикостероидния 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. Двама 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 1Б не са рискови фактори за развитие на СЛЕ.*

8. *Полиморфизмите rs1562444, rs10830962 и rs10830963 в гена за мелатониновия рецептор тип 1Б влияят върху склонността към развитие на левкопения при пациентките с лупус.*
9. *Полиморфизмите rs10830962 и rs10830963 в гена за мелатониновия рецептор 1Б 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 полиморфизма 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 изследвана дневната мелатонинова секреция при пациенти с лупус. Резултатите показват понижени серумни нива на мелатонина при пациентите в сравнение със здравите жени. 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 1Б, като те не са рискови фактори за развитие на СЛЕ. Изследваните полиморфизми влияят върху клиничната картина на болестта и по-специално върху склонността към левкопения при изследваните болни с лупус.*

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 болеста 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; Cit. 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**

* ЦИТАТИ

1. *Wilhelmson A. Sex steroid hormones - roles in adaptive immunity and vascular pathology. Sahlgrenska Academy at University of Gothenburg, Ineko AB, Kållerød, Sweden, 2014.*
2. *Olsen NJ, Benko AL, Kovacs WJ. Variation in the androgen receptor gene exon 1 CAG repeat correlates with manifestations of autoimmunity in women with lupus. Endocr Connect. 2014; 3(2):99-109.*
3. *Ito H, Langenhorst T, Ogden R, Inoue-Murayama M. Androgen receptor gene polymorphism in zebra species. Meta Gene 2015, 5, 120-123.*
4. *Yu-jun Sheng, Jian-hua Xu, Yong-gui Wu, et al. Association analyses confirm five susceptibility loci for systemic lupus erythematosus in the Han Chinese population. Arthritis Res Ther. 2015; 17(1): 85. IF 3.75*

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. Пранец, 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**

УЧАСТИЯ В ЗАВЪРШЕНИ ПРОЕКТИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Проект 26/2010г. Договор 55/2010. МУ-София на тема „Влияние на генетичните полиморфизми на андрогенния рецептор и естрогенния рецептор-алфа върху клиничната картина и протичането на системния лупус” с водещ изследовател проф. Златимир Коларов, дмн.
2. Проект 59/2011г. Договор 57/2011. МУ-София на тема „Роля на мелатонина, пролактина и мелатониновия рецептор 1Б за патогенезата и клиничната картина на системния лупус еритематозус” с водещ изследовател проф. Златимир Коларов, дмн.
3. Проект 55/2012г. Договор 16/2012. МУ-София на тема “Полиморфизми на кортикостероидния и прогестероновия рецептор при пациентки със системен лупус еритематозус” с водещ изследовател проф. Златимир Коларов, дмн.

БЛАГОДАРНОСТИ

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

- ✓ *Изследването на генетичните полиморфизми беше осъществено от С. Андонова и доц. А. Савов в Национална генетична лаборатория, СБАЛАГ “Майчин дом”;*
- ✓ *Хормоналните изследвания бяха извършени в Радиоимунологична лаборатория към УСБАЛЕ “Акад. Ив. Пенчев” с ръководител проф. д-р Г. Кирилов;*
- ✓ *Статистическата обработка на данните беше осъществена от доц. М. Вуков и гл. ас. М. Стойчева;*
- ✓ *Изследванията бяха проведени благодарение на финансовата подкрепа на МУ-София и Клиника по ревматология, УМБАЛ “Св. Ив. Рилски”;*
- ✓ *Те не биха били възможни без подкрепата на работещите в Клиника по ревматология към УМБАЛ “Св. Ив. Рилски” лекари, медицински сестри и лаборанти, както и без академичния дух, създаден от научното ръководство на клиниката;*
- ✓ *Благодарност към научния ми консултант проф. д-р Ф. Куманов за безценните съвети и подкрепа при разработването на дисертацията;*
- ✓ *Благодарност на проф. д-р Р. Рашков за изключителното съдействие в създаването на този труд;*
- ✓ *Благодарност към научния ми ръководител проф. д-р Зл. Коларов, без чиято подкрепа, ръководство и мотивация тази дисертация не би се осъществила.*

Книгопис:

1. Борисова АМ. Витамин D - продукция, метаболизъм и механизми на действие. В: Нарушения в минералната обмяна и костни метаболитни заболявания. Изд. Парадигма, София, 2012, 47-87.
2. Иванова М, Стоилов Р, Рашков Р, Станилова Сп, Манолова И. Системен цитокинов профил при болни със системен лупус еритематодес: повишена продукция на проинфламаторни (ТН1) и намалена продукция на имунорегулаторни (TREG) цитокини. Ревматология 2014, 22, 1, 7-15.
3. Манолова И, Иванова М, Александрова Е, Митева Л, Стоилов Р, Рашков Р, Станилова С, Гълъбова М. Асоциативно проучване на функционален полиморфизъм в гена за трансформиращия растежен фактор beta1 при системен лупус еритематодес в българската популация. Ревматология, 2012, 20, 1, 52-58.
4. Николов Н, Панчовска М, Коларов Зл. Икономически анализи в ревматологията. Ревматология 2011, 19, 4, 5-12.
5. Митева Л, Манолова И, Иванова М, Стоилов Р, Рашков Р, Станилова С. Липса на асоциация между промоторния полиморфизъм -1082A/G в гена за интерлевкин-10 и генетичното предразположение към системен lupus erythematosus. Ревматология 2010, 18, 3, 33-38.
6. Рашков Р. Системен лупус ериматозус. В: Системни заболявания на съединителната тъкан /колагенози/. Шейтанов Й., Рашков Р. Изд. ЦИМ София 1999, стр. 5-6.
7. Рашков Р, Калинова Д. Клинично протичане и имунологичен профил при болни с лекарствено индуциран лупус. Ревматология 2011, 19, 2, 31 - 36.
8. Рашков Р, Йонева Цв, Здравкова Я, Нейкова Ж, Ерменчева П. Клинични и имунологични характеристики на болните със системен лупус

и връзката им с клиничната активност по данни от регистъра на болните със СЛЕ в България. Ревматология 2014, 22, 3-4, 7-15.

9. Робева Р, Куманов Ф. Андрогенен рецептор. В: Ендокринология на мъжката репродуктивна система, Ред. Ф. Куманов. София. Акад. Изд. „Проф. Марин Дринов”, 2013, 48-70.

10. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 1996, 383(6603), 787-793.

11. Abbasi M, Rezaieyazdi Z, Afshari JT, Hatef M, Sahebari M, Saadati N. Lack of association of vitamin D receptor gene BsmI polymorphisms in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int*. 2010, 30(11), 1537-1539.

12. Abdou NI, Rider V, Greenwell C, Li X, Kimler BF. Fulvestrant (Faslodex), an estrogen selective receptor downregulator, in therapy of women with systemic lupus erythematosus. Clinical, serologic, bone density, and T cell activation marker studies: a double-blind placebo-controlled trial. *J Rheumatol*. 2008, 35(5):797.

13. Afkhamizadeh M, Sahebari M, Seyyed-Hoseini SR. Morning melatonin serum values do not correlate with disease activity in rheumatoid arthritis: a cross-sectional study. *Rheumatol Int*. 2014, 34(8), 1145-1151.

14. Alvarez-Nemegyei J, Cobarrubias-Cobos A, Escalante-Triay F, Sosa-Muñoz J, Miranda JM, Jara LJ. Bromocriptine in systemic lupus erythematosus: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Lupus*. 1998, 7(6), 414-419.

15. Anwar MM, Mahfouz HA, Sayed AS. Potential protective effects of melatonin on bone marrow of rats exposed to cytotoxic drugs. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 1998, 119(2), 493-501.

16. Arnalich F, Benito-Urbina S, Gonzalez-Gancedo P, Iglesias E, de Miguel E, Gijon-Baños J. Inadequate production of progesterone in women with systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol*. 1992, 31(4), 247-251.

17. Arnson Y, Amital H, Shoenfeld. The immunoendocrine role of vitamin D in autoimmunity. In: Handbook of systemic autoimmune diseases, vol 9. Endocrine manifestations of systemic autoimmune diseases. Eds: Walker SE, Jara LJ. Elsevier BV 2008, 293-299.
18. Aydeniz A, Sever T, Pehlivan S, Pehlivan M, Altindag Ö, Büdeyri S, Gürsoy S. Investigation of glucocorticoid receptor gene Bcl-1 polymorphism in rheumatoid arthritis. *Turc J Rheumatol* 2011, 26, 3, 199-203.
19. Battault S, Whiting SJ, Peltier SL et al. Vitamin D metabolism, functions and needs: from science to health claims. *Eur J Nutr.* 2013, 52(2):429-441.
20. Benito Urbina S, Huarte Loza E, Gijón Baños J, Arnalich-Fernández F. Hormonal changes in fertile women with quiescent systemic lupus erythematosus. *An Med Interna.* 1995, 12(5), 221-224.
21. Bhasin S, Cunningham GR, Hayes FJ, Matsumoto AM, Snyder PJ, Swerdloff RS, Montori VM. Testosterone therapy in adult men with androgen deficiency syndromes: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006, 91(6), 1995-2010.
22. Bogaczewicz J, Kaleta B, Sysa-Jedrzejowska A, Robak E, Lukaszkiwicz J, Sitkiewicz D, Wozniacka A. Vitamin D receptor gene polymorphism Fok I in the Polish population does not contribute to the risk of systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2013, 22(7), 750-751.
23. Boonstra A, Barrat F, Crain C et al. 1-alpha, 25-Dihydroxyvitamin D3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol.* 2001, 167, 4974–4980.
24. Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev.* 2008, 29(6), 726–776.
25. Brandenberger AW, Tee MK, Lee JY, Chao V, Jaffe RB. Tissue distribution of estrogen receptors alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the midgestational human fetus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997, 82, 3509-3512.

26. Bynoe MS, Grimaldi CM, Diamond B. Estrogen up-regulates Bcl-2 and blocks tolerance induction of naive B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000, 97(6), 2703-2708.
27. Cao S, Luo PF, Li W, Tang WQ, Cong XN, Wei PM. Vitamin D receptor genetic polymorphisms and tuberculosis among Chinese Han ethnic group. *Chin Med J (Engl)*. 2012, 125(5), 920-925.
28. Capelino S et Straub R. Neuroendocrine immune control mechanisms and their influence on autoimmune disease. In: *Handbook of systemic autoimmune diseases*, vol 9. Endocrine manifestations of systemic autoimmune diseases. Eds: Walker SE, Jara LJ. Elsevier BV 2008, 3-12.
29. Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Naji L, Fernández-Santos JM, Martín-Lacave I, Guerrero JM, et al. Beneficial pleiotropic actions of melatonin in an experimental model of septic shock in mice: regulation of pro-/anti-inflammatory cytokine network, protection against oxidative damage and anti-apoptotic effects. *J Pineal Res* 2005, 39, 400-408.
30. Carvalho C, Marinho A, Leal B, Bettencourt A, Boleixa D, Almeida I, Farinha F, Costa PP, Vasconcelos C, Silva BM. Association between vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus in Portuguese patients. *Lupus*. 2015, pii: 0961203314566636.
31. Cervera R, Espinosa G, D’Cruz D. Systemic lupus erythematosus: pathogenesis, clinical manifestations and diagnosis. In: Bijlsma JW (ed) *EULAR Compendium on Rheumatic Diseases*, BMJ Publishing Group and European League Against Rheumatism, 2009, 257-268.
32. Chaichian Y, Utset TO. Targeted therapies in systemic lupus erythematosus: a state-of-the-art. *J Clin Cell Immunol* 2013, S6:009
33. Chang DM, Chang CC, Kuo SY, Chu SJ, Chang ML. Hormonal profiles and immunological studies of male lupus in Taiwan. *Clin Rheumatol*. 1999, 18(2), 158-162.

34. Chen S, Sims GP, Chen XX et al. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation. *J Immunol*. 2007, 179, 1634–1647.
35. Chern CM, Liao JF, Wang YH, Shen YC. Melatonin ameliorates neural function by promoting endogenous neurogenesis through the MT2 melatonin receptor in ischemic-stroke mice. *Free Radic Biol Med*. 2012, 52(9), 1634-1647.
36. Choong CS, Kemppainen JA, Zhou Z, Wilson EM Reduced androgen receptor gene expression with first exon CAG repeat expansion. *Mol Endocrinol*. 1996, 10, 1527-1535.
37. Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson JA, Korach KS. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology*. 1997, 138, 4613-4621.
38. Cutolo M, Capelino S, Straub R. Sex hormones, the immune system and autoimmune diseases. In: *Handbook of systemic autoimmune diseases, vol 9. Endocrine manifestations of systemic autoimmune diseases*. Eds: Walker SE, Jara LJ. Elsevier BV 2008, 13-19.
39. Cutolo M, Maestroni GJM, Otsa K, et al. Circadian melatonin and cortisol levels in rheumatoid arthritis patients in winter time: a north and south Europe comparison. *Ann Rheumat Dis*. 2005, 64(2), 212–216.
40. Cutolo M, Pizzorni C, Sulli A. Vitamin D endocrine system involvement in autoimmune rheumatic diseases. *Autoimmun Rev*. 2011, 11(2), 84-87.
41. Cutolo M, Straub RH. Insights into endocrine-immunological disturbances in autoimmunity and their impact on treatment. *Arthritis Res Ther* 2009, 2:218.
42. Cutolo M, Sulli A, Capellino S, Villaggio B, Montagna P, Seriolo B, Straub RH. Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity. *Lupus*. 2004, 13(9), 635-638.

43. Cutolo M, Villaggio B, Otsa K, Aakre O, Sulli A, Serio B. Altered circadian rhythms in rheumatoid arthritis patients play a role in the disease's symptoms. *Autoimmun Rev.* 2005, 4(8), 497-502.
44. Cutolo, M., Sulli, A., Capellino, S., Villaggio, B., Montagna, P., Serio, B., Straub, R.H. Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity. *Lupus* 2004, 13, 9, 635-638.
45. De Bellis A, Bizzarro A, Bellastella A. Role of prolactin in autoimmune diseases. In: *Handbook of systemic autoimmune diseases, vol 9. Endocrine manifestations of systemic autoimmune diseases.* Eds: Walker SE, Jara LJ. Elsevier BV 2008, 29-43.
46. DeRijk RH, Schaaf M, de Kloet ER. Glucocorticoid receptor variants: clinical implications. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2002, 81(2), 103-122.
47. Dhaher YY, Chan K, Greenstein BD, de Fougères Nunn E, Khamashta MA, Hughes GR. Impaired estrogen priming of progesterone receptors in uterus of MRL/MP-lpr/lpr mice, a model of systemic lupus erythematosus (SLE). *Int J Immunopharmacol.* 2000, 22(7), 537-545.
48. Donn R, Payne D, Ray D. Glucocorticoid receptor gene polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007, 67(3), 342–345.
49. Doria A, Cutolo M, Ghirardello A, Zampieri S, Vescovi F, Sulli A, Giusti M, Piccoli A, Grella P, Gambari PF. Steroid hormones and disease activity during pregnancy in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2002, 47(2), 202-209.
50. Dougados M, Nahoul K, Benhamou L, Jungers P, Laplane D, Amor B. Study of plasma androgens in women with autoimmune diseases. *Rev Rhum Mal Osteoartic.* 1984, 51(3), 145-149.
51. Drazen DL, Nelson RJ. Melatonin receptor subtype MT2 (Mel 1b) and not MT1 (Mel 1a) is associated with melatonin-induced enhancement of cell-mediated and humoral immunity. *Neuroendocrinology* 2001, 74, 178–184.

52. Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*. 2005, 27, 101-110.
53. Dvorkina O, Ginzler E. Corticosteroid and nonsteroidal and anti-inflammatory drug use in systemic lupus erythematosus. In: *Systemic lupus erythematosus 5th Edition*, Lahita R (Ed.) 2011, Elsevier, London, UK, 1045-1060.
54. Eldar-Geva T, Milatiner D, Halle D. Androgen receptor and male infertility. *Harefuah*. 2004,143 (6), 432-439.
55. Emerah AA, El-Shal AS. Role of vitamin D receptor gene polymorphisms and serum 25-hydroxyvitamin D level in Egyptian female patients with systemic lupus erythematosus. *Mol Biol Rep*. 2013, 40(11), 6151-6162.
56. Espino J, Bejarano I, Paredes SD, Barriga C, Rodríguez AB, Pariente JA. Protective effect of melatonin against human leukocyte apoptosis induced by intracellular calcium overload: relation with its antioxidant actions. *J Pineal Res*. 2011, 51(2), 195-206.
57. Espino J, Bejarano I, Redondo PC, Rosado JA, Barriga C, Reiter RJ, Pariente JA, Rodríguez AB. Melatonin reduces apoptosis induced by calcium signaling in human leukocytes: Evidence for the involvement of mitochondria and Bax activation. *J Membr Biol*. 2010, 233(1-3), 105-118.
58. Espino J, Rodríguez AB, Pariente JA. The inhibition of TNF- α -induced leucocyte apoptosis by melatonin involves membrane receptor MT1/MT2 interaction. *J Pineal Res*. 2013, 54(4), 442-452.
59. Fei GH, Liu RY, Zhang ZH, Zhou JN. Alterations in circadian rhythms of melatonin and cortisol in patients with bronchial asthma. *Acta Pharmacol Sin* 2004, 25, 651-656.
60. Ferreira SG, Peliciari-Garcia RA, Takahashi-Hyodo SA, Rodrigues AC, Amaral FG, Berra CM, Bordin S, Curi R, Cipolla-Neto J. Effects of melatonin on DNA damage induced by cyclophosphamide in rats. *Braz J Med Biol Res*. 2013, 46(3), 278-286.

61. Flesher DL, Sun X, Behrens TW, Graham RR, Criswell LA. Recent advances in the genetics of systemic lupus erythematosus. *Expert Rev Clin Immunol.* 2010, 6(3), 461–479.
62. Folomeev M, Dougados M, Beaune J, Kouyoumdjian JC, Nahoul K, Amor B, Alekberova Z. Plasma sex hormones and aromatase activity in tissues of patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 1992, 1(3):191-195.
63. Funauchi M, Ikoma S, Enomoto H, Sugiyama M, Ohno M, Hamada K, Kanamaru A. Prolactin modulates the disease activity of systemic lupus erythematosus accompanied by prolactinoma. *Clin Exp Rheumatol.* 1998, 16, 4, 479-482.
64. Garcia-Gonzalez A, Gonzalez-Lopez L, Valera-Gonzalez IC, Cardona-Muñoz EG, Salazar-Paramo M, González-Ortiz M, Martínez-Abundis E, Gamez-Nava JI. Serum leptin levels in women with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int.* 2002, 22(4), 138-141.
65. Giacomazzi J, Aguiar E, Palmero EI, Schmidt A, Skonieski G, Filho D, Bock H, Saraiva-Pereira M, Ewald I, Schuler-Faccini L, Camey S, Caleffi M, Giugliani R, Ashton-Prolla P. Prevalence of ER α -397 PvuII C/T, ER α -351 XbaI A/G and PGR PROGINS polymorphisms in Brazilian breast cancer-unaffected women. *Braz J Med Biol Res.* 2012, 45, 10, 891–897.
66. Goldfien A et Monroe S. Ovaries. In: *Basic and clinical endocrinology.* Eds. Greenspan F et Baxter J. Prentice-Hall Int Inc., New Jersey 1994, 422.
67. Gómez-Corvera A, Cerrillo I, Molinero P, Naranjo MC, Lardone PJ, Sanchez-Hidalgo M, et al. Evidence of immune system melatonin production by two pineal melatonin deficient mice, C57BL/6 and Swiss strains. *J Pineal Res* 2009, 47, 15-22.
68. Gómez-Vaquero C, Fiter J, Enjuanes A, Nogués X, Díez-Pérez A, Nolla JM. Influence of the BsmI polymorphism of the vitamin D receptor gene on rheumatoid arthritis clinical activity. *J Rheumatol.* 2007, 34(9), 1823-1826.

69. Gordon C, Wallace DJ, Shinada S, Kalunian KC, Forbess L, Braunstein GD, Weisman MH. Testosterone patches in the management of patients with mild/moderate systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 2008, 47(3), 334-338.
70. Grimaldi CM, Michael DJ, Diamond B. Cutting edge: expansion and activation of a population of autoreactive marginal zone B cells in a model of estrogen-induced lupus. *J Immunol*. 2001, 167(4), 1886-1890.
71. Ha E, Choe BK, Jung KH, Yoon SH, Park HJ, Park HK, Yim SV, Chung JH, Bae HS, Nam M, Baik HH, Hong SJ. Positive relationship between melatonin receptor type 1B polymorphism and rheumatoid factor in rheumatoid arthritis patients in the Korean population. *J Pineal Res*. 2005, 39(2), 201-205.
72. Hall JM, Couse J, Korach K. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem*. 2001, 276, 36869–36872.
73. Handa R, Kumar U, Wali JP. Systemic lupus erythematosus and pregnancy. *J Assoc Physicians India*. 2006, 54, 19-21.
74. Härle P, Pongratz G, Weidler C, Büttner R, Schölmerich J, Straub RH. Possible role of leptin in hypoandrogenicity in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2004, 63(7), 809-816.
75. Härle P, Straub R H, Wiest R, Mayer A, Schölmerich J, Atzeni F, Carrabba M, Cutolo M, Sarzi - Puttini P. Increase of sympathetic outflow measured by neuropeptide Y and decrease of the hypothalamic - pituitary - adrenal axis tone in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: another example of uncoupling of response systems. *Ann Rheum Dis*. 2006, 65(1), 51–56.
76. Herrmann M, Scholmerich J, Straub RH. Influence of cytokines and growth factors on distinct steroidogenic enzymes in vitro: a short tabular data collection. *Ann NY Acad Sci*. 2002, 966, 166–186.
77. Hewison M. Vitamin D and immune system: new perspectives on an old theme. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2010, 39(2), 365-379.

78. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997, 40, 1725.
79. Huang CM, Wu MC, Wu JY, Tsai FJ. Association of vitamin D receptor gene BsmI polymorphisms in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2002, 11(1), 31-34.
80. Huber M, Treszl A, Reibis R, Teichmann C, Zergibel I, Bolbrinker J, Scholze J, Wegscheider K, Völler H, Kreutz R. Genetics of melatonin receptor type 2 is associated with left ventricular function in hypertensive patients treated according to guidelines. *Eur J Intern Med*. 2013, 24(7), 650-655.
81. Hughes G. Progesterone and autoimmune disease. *Autoimmun. Rev*. 2012, 11, 502-514.
82. Huhtaniemi I, Martini L. Endocrinology – study of the hormonal regulation of the body. Reference Module in Biomedical Sciences, 2015, 1-4.
83. Huong DL, Amoura Z, Duhaut P, Sbai A, Costedoat N, Wechsler B, Piette JC Risk of ovarian failure and fertility after intravenous cyclophosphamide. A study in 84 patients. *J Rheumatol*. 2002, 29(12), 2571-2576.
84. Inui A, Ogasawara H, Naito T, Sekigawa I, Takasaki Y, Hayashida Y, Takamori K, Ogawa H. Estrogen receptor expression by peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 2007, 26(10), 1675-1678.
85. Jia F, Sun RF, Li QH, Wang DX, Zhao F, Li JM, Pu Q, Zhang ZZ, Jin Y, Liu BL, Xiong Y. Vitamin D Receptor BsmI Polymorphism and Osteoporosis Risk: A Meta-Analysis from 26 Studies. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2013, 17(1), 30-34.
86. Jiang G, Nepomuceno L, Hopkins K, Sladek FM. Exclusive homodimerization of the orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4 defines a new subclass of nuclear receptors. *Mol Cell Biol*. 1995, 15(9), 5131-5143.

87. Jiang JF, Liu YH, Zhang CX. Sex hormones in female patients with systemic lupus erythematosus. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2005, 30(3), 315-317.
88. Jiménez-Balderas FJ, Tápiá-Serrano R, Fonseca ME, Arellano J, Beltrán A, Yáñez P, Camargo-Coronel A, Fraga A. High frequency of association of rheumatic/ autoimmune diseases and untreated male hypogonadism with severe testicular dysfunction. *Arthritis Res*. 2001, 3(6), 362-367.
89. Johansson M, Arlestig L, Möller B, Smedby T, Rantapää-Dahlqvist S. Oestrogen receptor {alpha} gene polymorphisms in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2005, 64(11), 1611-1617.
90. Kaleta B, Bogaczewicz J, Robak E, Sysa-Jędrzejowska A, Wrzosek M, Szubierajska W, Mróz P, Lukaszewicz J, Woźniacka A. Vitamin D Receptor Gene BsmI Polymorphism in Polish Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *ISRN Endocrinol* 2013, 2013:427818.
91. Kamen DL, Cooper GS, Bouali H, Shaftman SR, Hollis BW, Gilkeson GS. Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev*. 2006, 5(2), 114-117.
92. Kanda N, Tsuchida T, Tamaki K. Testosterone suppresses anti-DNA antibody production in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1997, 40(9), 1703-1711.
93. Karray EF, Ben Dhifallah I, Ben Abdelghani K, Ben Ghorbel I, Khanfir M, Houman H, Hamzaoui K, Zakraoui L. Associations of vitamin D receptor gene polymorphisms FokI and BsmI with susceptibility to rheumatoid arthritis and Behçet's disease in Tunisians. *Joint Bone Spine* 2012, 79(2), 144-148.
94. Kazemi-Esfarjani P, Trifiro MA, Pinsky L. Evidence for a repressive function of the long polyglutamine tract in the human androgen receptor: possible pathogenetic relevance for the (CAG)_n expanded neuropathies. *Hum Mol Genet*. 1995, 4, 523-527.

95. Kilic U, Yilmaz B, Ugur M, Yüksel A, Reiter RJ, Hermann DM, Kilic E. Evidence that membrane-bound G protein-coupled melatonin receptors MT1 and MT2 are not involved in the neuroprotective effects of melatonin in focal cerebral ischemia. *J Pineal Res.* 2012, 52(2), 228-235.
96. Kobilka BK. G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta.* 2007, 1768(4), 794-807.
97. Kocabaş A, Karagüzel G, Imir N, Yavuzer U, Akçurin S. Effects of vitamin D receptor gene polymorphisms on susceptibility to disease and bone mineral density in Turkish patients with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2010, 23(12), 1289-1297.
98. Kostik MM, Klyushina AA, Moskalenko MV, Scheplyagina LA, Larionova VI. Glucocorticoid receptor gene polymorphism and juvenile idiopathic arthritis. *Pediatr Rheumatol Online J.* 2011, 9(1), 2.
99. Krithivas K, Yurgalevitch SM, Mohr B et al. Evidence that the CAG repeat in the androgen receptor gene is associated with the age-related decline in serum androgen levels in men. *J Endocrinol.* 1999, 162, 137-142.
100. Kumsta R, Entringer S, Koper JW, van Rossum EF, Hellhammer DH, Wüst S. Glucocorticoid receptor gene polymorphisms and glucocorticoid sensitivity of subdermal blood vessels and leukocytes. *Biol Psychol.* 2008, 79(2), 179-184.
101. Lahita R. The clinical presentation of systemic lupus erythematosus. In: *Systemic lupus erythematosus 5th Edition*, Lahita R (Ed.) 2011, Elsevier, London, UK, 525.
102. Laudet V, Hänni C, Coll J, Catzeflis F, Stéhelin D. Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J.* 1992, 11(3), 1003–1013.
103. Lee CH, Yoo KY, Choi JH, Park OK, Hwang IK, Kwon YG, Kim YM, Won MH. Melatonin's protective action against ischemic neuronal damage is associated with up-regulation of the MT2 melatonin receptor. *J Neurosci Res.* 2010, 88(12), 2630-2640.

104. Lee DK, Chang C. Expression and degradation of androgen receptor: mechanism and clinical implication. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003, 88(9), 4043-4054.
105. Lee EB, Kim JY, Lee YJ, Song YW. Glucocorticoid receptor polymorphisms in Korean patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005, 64, 503–504.
106. Lee YJ, Shin KS, Kang SW, Lee CK, Yoo B, Cha HS, Koh EM, Yoon SJ, Lee J. Association of the oestrogen receptor alpha gene polymorphisms with disease onset in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2004, 63(10), 1244-1249.
107. Lee YM, Fujiwara J, Munakata Y, Ishii T, Sugawara A, Kaku M, Kokubun S, Sasaki T, Funato T. A mutation of the glucocorticoid receptor gene in patients with systemic lupus erythematosus. *Tohoku J Exp Med.* 2004, 203(2), 69-76.
108. Li C, Shi Y, You L, Wang L, Chen ZJ. Association of rs10830963 and rs10830962 SNPs in the melatonin receptor (MTNR1B) gene among Han Chinese women with polycystic ovary syndrome. *Mol Hum Reprod.* 2011, 17(3), 193-198.
109. Li H, Stampfer MJ, Hollis JB, Mucci LA, Gaziano JM, Hunter D, Giovannucci EL, Ma J. A prospective study of plasma vitamin D metabolites, vitamin D receptor polymorphisms, and prostate cancer. *PLoS Med.* 2007, 4(3), e103.
110. Li J, McMurray RW. Effects of estrogen receptor subtype-selective agonists on autoimmune disease in lupus-prone NZB/NZW F1 mouse model. *Clin Immunol.* 2007, 123(2), 219-226.
111. Li M, Keiser HD, Peeva E. Prolactinoma and systemic lupus erythematosus: do serum prolactin levels matter? *Clin Rheumatol.* 2006, 42, 5, 602-605.

112. Lin GJ, Huang SH, Chen SJ, Wang CH, Chang DM, Sytwu HK. Modulation by melatonin of the pathogenesis of inflammatory autoimmune diseases. *Int J Mol Sci.* 2013, 31, 14(6), 11742-11766.
113. Liu Z, Davidson A. Taming lupus—a new understanding of pathogenesis is leading to clinical advances. *Nat. Med.* 2012, 18(6), 871–882.
114. Luo XY, Yang MH, Wu FX, Wu LJ, Chen L, Tang Z, Liu NT, Zeng XF, Guan JL, Yuan GH. Vitamin D receptor gene BsmI polymorphism B allele, but not BB genotype, is associated with systemic lupus erythematosus in a Han Chinese population. *Lupus.* 2012, 21(1), 53-59.
115. Lyssenko V, Nagorny CL, Erdos MR, Wierup N, Jonsson A, Spégel P, Bugliani M, Saxena R, Fex M, Pulizzi N, Isomaa B, Tuomi T, Nilsson P, Kuusisto J, Tuomilehto J, Boehnke M, Altshuler D, Sundler F, Eriksson JG, Jackson AU, Laakso M, Marchetti P, Watanabe RM, Mulder H, Groop L. Common variant in MTNR1B associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion. *Nat Genet.* 2009, 41(1), 82-88.
116. Maalej A, Petit-Teixeira E, Michou L, Rebai A, Cornelis F, Ayadi H. Association study of VDR gene with rheumatoid arthritis in the French population. *Genes Immun.* 2005, 6(8), 707-711.
117. Mackworth-Young CG, Parke AL, Morley KD, Fotherby K, Hughes GR. Sex hormones in male patients with systemic lupus erythematosus: a comparison with other disease groups. *Eur J Rheumatol Inflamm.* 1983, 6(3), 228-232.
118. Maestroni GJ, Cardinali DP, Esquifino AI, Pandi-Perumal SR. Does melatonin play a disease-promoting role in rheumatoid arthritis? *J Neuroimmunol.* 2005, 158 (1-2), 106-111.
119. Maestroni GJ. The immunoneuroendocrine role of melatonin. *J Pineal Res.* 1993, 14(1), 1-10.
120. Malloy PJ, Feldman D. Genetic disorders and defects in vitamin D action. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2010, 39(2), 333-346.

121. Maltese P, Canestrari E, Palma L, Ruzzo A, Corini F, Menotta M, Andreoni F, Latiano A, Annese V, Magnani M. High resolution melting (HRM) analysis for the detection of ER22/23EK, BclI, and N363S polymorphisms of the glucocorticoid receptor gene. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2009, 113(3-5), 269-274.
122. Manger B. Checkliste XXL - Rheumatologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 207-227.
123. Mao S, Huang S. Association between vitamin D receptor gene BsmI, FokI, ApaI and TaqI polymorphisms and the risk of systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Rheumatol Int.* 2014, 34(3), 381-388.
124. McMurray RW, May W. Sex hormones and systemic lupus erythematosus: review and meta-analysis. *Arthritis Rheum.* 2003, 48(8), 2100-2110.
125. McMurray RW, Weidensaul D, Allen SH, Walker SE. Efficacy of bromocriptine in an open label therapeutic trial for systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 1995, 22, 11, 2084-2091.
126. McMurray RW. Estrogen, prolactin, and autoimmunity: actions and interactions. *Int Immunopharmacol.* 2001, 1(6), 995-1008.
127. Medeiros P, Febrônio MV, Bonfá E, Borba E, Takiuti A, Silva CA. Menstrual and hormonal alterations in juvenile systemic lupus erythematosus. *Lupus,* 2009, 18, 1, 38-43.
128. Melamud L, Golan D, Luboshitzky R, Lavi I, Miller A. Melatonin dysregulation, sleep disturbances and fatigue in multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2012, 314(1-2), 37-40.
129. Melo AK, Melo MR, Saramago AB, Demartino G, Souza BD, Longui CA. Persistent glucocorticoid resistance in systemic lupus erythematosus patients during clinical remission. *Genet Mol Res.* 2013, 12(2), 2010-2019.
130. Mencej-Bedrac S, Prezelj J, Kocjan T, Teskac K, Ostanek B, Smelcer M, Marc J. The combinations of polymorphisms in vitamin D receptor,

osteoprotegerin and tumour necrosis factor superfamily member 11 genes are associated with bone mineral density. *J Mol Endocrinol.* 2009, 42(3), 239-247.

131. Mok CC, Birmingham DJ, Ho LY, Hebert LA, Song H, Rovin BH. Vitamin D deficiency as marker for disease activity and damage in systemic lupus erythematosus: a comparison with anti-dsDNA and anti-C1q. *Lupus.* 2012, 21(1), 36-42.

132. Monticielo OA, Brenol JC, Chies JA, Longo MG, Rucatti GG, Scalco R, Xavier RM. The role of BsmI and FokI vitamin D receptor gene polymorphisms and serum 25-hydroxyvitamin D in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2012, 21(1), 43-52.

133. Mora M, Sánchez L, Serra-Prat M, Palomera E, Blanco J, Aranda G, Falcón I, Cadenas I, Boquet X, Oriola J, Puig-Domingo M; Mataró Ageing Study Group. Hormonal determinants and effect of ER22/23EK glucocorticoid receptor gene polymorphism on health status deterioration in the participants of the Mataró Ageing Study. *Age (Dordr).* 2012, 34(3), 553-561.

134. Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen T, Sambrook PN, Eisman J. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 1994, 367, 284– 287.

135. Mosca M, Shoenfeld Y, Bombardieri S. Systemic lupus erythematosus: treatment. In: Bijlsma JW (ed) *EULAR Compendium on Rheumatic Diseases*, BMJ Publishing Group and European League Against Rheumatism, 2009, 269-279.

136. Mostowska A, Lianeri M, Wudarski M, Olesińska M, Jagodziński PP. Vitamin D receptor gene BsmI, FokI, ApaI and TaqI polymorphisms and the risk of systemic lupus erythematosus. *Mol Biol Rep* 2013, 40(2), 803-810.

137. Muller K, Kriegbaum NG, Baslund B, Sorensen OH, Thyman M, Bentzen K. Vitamin D3 metabolism in patients with rheumatic diseases: low serum levels of 25-hydroxyvitamin D3 in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol.* 1995, 14, 397–340.

138. Nagpal S, Na S, Rathnachalam R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr Rev.* 2005, 26(5), 662-687.
139. Natarajan R, Einarsdottir E, Riutta A, Hagman S, Raunio M, Mononen N, Lehtimäki T, Elovaara I. Melatonin pathway genes are associated with progressive subtypes and disability status in multiple sclerosis among Finnish patients. *J Neuroimmunol.* 2012, 250(1-2), 106-110.
140. Navarro MA, Vidaller A, Ortolá JB, Bonnín MR, Pac MV, Moga I. Salivary testosterone levels in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1992, 35(5), 557-559.
141. Near AM, Wu A, Templeman C, Van Den Berg DJ, Doherty JA et al. Ovarian Cancer Association Consortium; Australian Cancer Study (Ovarian Cancer) (ACS); Australian Ovarian Cancer Study Group (AOCS). Progesterone receptor gene polymorphisms and risk of endometriosis: results from an international collaborative effort. *Fertil. Steril.* 2011, 95, 1, 40-45.
142. Nicolaidis N, Galata Z, Kino T, Chrousos G, Charmandari E. The Human Glucocorticoid Receptor: Molecular Basis of Biologic Function. *Steroids.* 2010, 75(1), 1.
143. Ohta T, Muraio K, Miyake K, Takemoto K. Melatonin receptor agonists for treating delirium in elderly patients with acute stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2012, 22(7), 1107-1110
144. Olsen N, Benko A, Kovacs W. Variation in the androgen receptor gene exon 1 CAG repeat correlates with manifestations of autoimmunity in women with lupus. *Endocr Connect.* 2014, 3(2), 99–109.
145. Ostensen M. Sex hormones and pregnancy in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci.* 1999, 876, 131-143, discussion 144.
146. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 2008, 28(4), 454–467.

147. Ozaki Y, Nomura S, Nagahama M, Yoshimura C, Kagawa H, Fukuhara S. Vitamin-D receptor genotype and renal disorder in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Nephron*. 2000, 85(1), 86-91.
148. Panarelli M, Holloway CD, Fraser R, Connell JM, Ingram MC, Anderson NH, Kenyon CJ. Glucocorticoid receptor polymorphism, skin vasoconstriction, and other metabolic intermediate phenotypes in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998, 83(6), 1846-1852.
149. Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, Spence DW, Maestroni GJ, Zisapel N, Cardinali DP. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog. Neurobiol*. 2008, 85, 335–353.
150. Peeva E, Grimaldi C, Spatz L, Diamond B. Bromocriptine restores tolerance in estrogen-treated mice. *J Clin Invest*. 2000, 106, 11, 1373-1379.
151. Petri M, Kim MY, Kalunian KC, Grossman J, Hahn BH, Sammaritano LR, Lockshin M, Merrill JT, Belmont HM, Askanase AD, McCune WJ, Heath-Holmes M, Dooley MA, Von Feldt J, Friedman A, Tan M, Davis J, Cronin M, Diamond B, Mackay M, Sigler L, Fillius M, Rupel A, Licciardi F, Buyon JP; OC-SELENA Trial. Combined oral contraceptives in women with systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*. 2005, 353(24), 2550-2558.
152. Petri MA, Mease PJ, Merrill JT, Lahita RG, Iannini MJ, Yocum DE, et al. Effects of prasterone on disease activity and symptoms in women with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2004, 50(9), 2858-2868.
153. Quigley CA, De Bellis A, Marschke KB, El-Awady Mk, Wilson EM, French FS. Androgen receptor defects: historical, clinical and molecular perspectives. *Endocr Rev*. 1995, 16, 271-321.
154. Quigley Ch. The androgen receptor: physiology and pathophysiology. In: *Testosterone-action, deficiency, substitution*. Eds.: Nieschlag E., Behre H. Springer-Verlag Berlin, 1998, 33-106.

155. Raimondi S, Johansson H, Maisonneuve P, Gandini S. Review and meta-analysis on vitamin D receptor polymorphisms and cancer risk. *Carcinogenesis*. 2009, 30(7), 1170-1180.
156. Ramos-Casals M, Brito-Zeron P, Espinosa G, Cervera R. Adrenal Involvement in Systemic Autoimmune Diseases. In: *Handbook of Systemic Autoimmune Diseases* vol. 9. Endocrine Manifestations of Systemic Autoimmune Diseases. Walker S, Jara L, Asherson R (Eds.) 2008, Elsevier, Oxford, UK, 95-102.
157. Rastin M, Hatef MR, Tabasi N, Sheikh A, Morad Abbasi J, Mahmoudi M. Sex hormones and peripheral white blood cell subsets in systemic lupus erythematosus patients. *Iran J Immunol*. 2007, 4(2), 110-115.
158. Reuman PD. First reported pediatric case of systemic lupus erythematosus associated with prolactinoma. *Arthritis Rheum*. 2004, 50, 11, 3616-3618.
159. Rezaieyazdi Z, Hesamifard A. Correlation between serum prolactin levels and lupus activity. *Rheumatol Int*. 2006, 11, 26, 1036-1039.
160. Ritterhouse LL, Crowe SR, Niewold TB et al. Vitamin D deficiency is associated with an increased autoimmune response in healthy individuals and in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2011, 70(9), 1569-1574.
161. Romano A, Delvoux B, Fischer D, Groothuis P. The PROGINS polymorphism of the human progesterone receptor diminishes the response to progesterone. *J. Mol. Endocrinol*. 2007, 38, 1-2, 331-350.
162. Rönn T, Wen J, Yang Z, Lu B, Du Y, Groop L, Hu R, Ling C. A common variant in MTNR1B, encoding melatonin receptor 1B, is associated with type 2 diabetes and fasting plasma glucose in Han Chinese individuals. *Diabetologia*. 2009, 52(5), 830-830.
163. Rowe S, Coughlan S, McKenna N, Garrett E, Kieback DG, Carney DN, Headon DR. Ovarian carcinoma-associated TaqI restriction fragment length

polymorphism in intron G of the progesterone receptor gene is due to an Alu sequence insertion. *Cancer Res* 1995, 55, 2743–2745.

164. Ruiz-Irastorza G, Egurbide MV, Olivares N, Martinez-Berriotxoa A, Aguirre C. Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus: prevalence, predictors and clinical consequences. *Rheumatology (Oxford)*. 2008, 47(6), 920-923.

165. Saha S, Gonzalez J, Rosenfeld G, Keiser H, Peeva E. Prolactin alters the mechanisms of B cell tolerance induction. *Arthritis Rheum*. 2009, 60, 6, 1743-1752.

166. Schiechl G, Straub R. Dehydroepiandrosterone. In: *Handbook of systemic autoimmune diseases*, vol 9. Endocrine manifestations of systemic autoimmune diseases. Eds: Walker SE, Jara LJ. Elsevier BV 2008, 249-256.

167. Shabanova SS, Ananieva LP, Alekberova ZS, Guzov II. Ovarian function and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol*. 2008, 26(3), 436-441.

168. Silva CA, Hilário MO, Febrônio MV, Oliveira SK, Terreri MT, Sacchetti SB, Sztajn bok FR, Marini R, Quintero MV, Bica BE, Pereira RM, Bonfá E, Ferriani VP, Robazzi TC, Magalhães CS. Risk factors for amenorrhea in juvenile systemic lupus erythematosus (JSLE): a Brazilian multicentre cohort study. *Lupus*. 2007, 16(7), 531-536.

169. Sinotte M, Rousseau F, Ayotte P, Dewailly E, Diorio C, Giguère Y, Bérubé S, Brisson J. Vitamin D receptor polymorphisms (FokI, BsmI) and breast cancer risk: association replication in two case-control studies within French Canadian population. *Endocr Relat Cancer*. 2008, 15(4), 975-983.

170. Smiti Khanfir M, Ben Ghorbel I, Feki M, Lamloum M, Mebazaa A, Miled M, Houman MH. Hyperprolactinemia in systemic lupus erythematosus. A prospective study of 38 cases. *Tunis Med*. 2004, 82, 6, 512-515.

171. Staiger H, Machicao F, Schäfer SA, Kirchhoff K, Kantartzis K, Guthoff M, Silbernagel G, Stefan N, Häring HU, Fritsche A. Polymorphisms within the

novel type 2 diabetes risk locus MTNR1B determine beta-cell function. *PLoS One*. 2008, 3(12), e3962.

172. Stanić D, Dubois S, Chua HK, Tonge B, Rinehart N, Horne MK, Boon WC. Characterization of aromatase expression in the adult male and female mouse brain. I. Coexistence with oestrogen receptors α and β , and androgen receptors. *PLoS One*. 2014, 9(3), e90451.

173. Stenzig J, Schweikert A, Piasecki A, Höppner G, Eschenhagen T, Rau T. Progesterone receptor variants associated with the PROGINS haplotype exhibit functional properties similar to those of wild-type progesterone receptor. *Pharmacogenet. Genomics*. 2012, 22, 8, 629-641.

174. Stockinger B, Veldhoen M. Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol*. 2007, 19 (3), 281–286.

175. Stoll T, Seifert B, Isenberg DA SLICC/ACR Damage Index is valid, and renal and pulmonary organ scores are predictors of severe outcome in patients with systemic lupus erythematosus. *Br. J. Rheumatol*. 1996, 35, 248-254.

176. Straub R, Weidler C, Demmel B, Herrmann M, Kees F, Schmidt M, Scholmerich J, Schedel J. Renal clearance and daily excretion of cortisol and adrenal androgens in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2004, 63(8), 961–968.

177. Sulli A, Maestroni GJ, Villaggio B, Hertens E, Craviotto C, Pizzorni C, et al. Melatonin serum levels in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 2002, 966, 276-283.

178. Suzuki T, Suzuki N, Engleman EG, Mizushima Y, Sakane T. Low serum levels of dehydroepiandrosterone may cause deficient IL-2 production by lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Immunol*. 1995, 99(2), 251-255.

179. Svenson JL, EuDaly J, Ruiz P, Korach KS, Gilkeson GS. Impact of estrogen receptor deficiency on disease expression in the NZM2410 lupus prone mouse. *Clin Immunol*. 2008, 128(2), 259-268.

180. Szabó V, Borgulya G, Filkorn T, Majnik J, Bányász I, Zsolt Nagy Z. The variant N363S of glucocorticoid receptor in steroid-induced ocular hypertension in Hungarian patients treated with photorefractive keratectomy. *Mol Vis*. 2007, 13: 659–666.
181. Szczepanik M. Melatonin and its influence on immune system. *J Physiol Pharmacol* 2007, 58, 115-124.
182. Tait A, Butts C, Sternberg EM. The role of glucocorticoids and progestins in inflammatory, autoimmune, and infectious disease. *J. Leukoc. Biol.* 2008, 84, 4, 924-931.
183. Tam CH, Ho JS, Wang Y, Lee HM, Lam VK, Germer S, Martin M, So WY, Ma RC, Chan JC, Ng MC. Common polymorphisms in MTNR1B, G6PC2 and GCK are associated with increased fasting plasma glucose and impaired beta-cell function in Chinese subjects. *PLoS One*. 2010, 5(7), e11428.
184. Terrier B, Derian N, Schoindre Y et al. Restoration of regulatory and effector T cell balance and B cell homeostasis in systemic lupus erythematosus patients through vitamin D supplementation. *Arthritis Res Ther*. 2012, 17, 14(5), 221.
185. Tuohimaa P, Bläuer M, Pasanen S, Passinen S, Pekki A, Punnonen R, Syvälä H, Valkila J, Wallén M, Väliäho J, Zhuang YH, Ylikomi T. Mechanisms of action of sex steroid hormones: basic concepts and clinical correlations. *Maturitas*. 1996, 23, S3-12.
186. Uitterlinden A, Fang Y, van Meurs J, Pols H, van Leeuwen J. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* 2004, 338, 143-156.
187. Vadacca M, Margiotta D, Rigon A, Cacciapaglia F, Coppolino G, Amoroso A, Afeltra A. Adipokines and systemic lupus erythematosus: relationship with metabolic syndrome and cardiovascular disease risk factors. *J Rheumatol*. 2009, 36(2), 295-297.
188. Valdivielso JM, Fernandez E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clin Chim Acta*. 2006, 371, 1-12.

189. van Etten E, Verlinden L, Giulietti A, Ramos-Lopez E, Branisteanu DD, Ferreira GB, Overbergh L, Verstuyf A, Bouillon R, Roep BO, Badenhoop K, Mathieu C. The vitamin D receptor gene FokI polymorphism: functional impact on the immune system. *Eur J Immunol.* 2007, 37(2), 395-405.
190. van Oosten MJ, Dolhain RJ, Koper JW, van Rossum EF, Emonts M, Han KH, Wouters JM, Hazes JM, Lamberts SW, Feelders RA. Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene that modulate glucocorticoid sensitivity are associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2010, 12(4), R159.
191. van Rossum EF, Feelders RA, van den Beld AW, Uitterlinden AG, Janssen JA, Ester W, Brinkmann AO, Grobbee DE, de Jong FH, Pols HA, Koper JW, Lamberts SW. Association of the ER22/23EK polymorphism in the glucocorticoid receptor gene with survival and C-reactive protein levels in elderly men. *Am J Med.* 2004, 117(3), 158-62.
192. van Rossum EF, Koper JW, Huizenga NA, Uitterlinden AG, Janssen JA, Brinkmann AO, Grobbee DE, de Jong FH, van Duyn CM, Pols HA, Lamberts SW. A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene, which decreases sensitivity to glucocorticoids in vivo, is associated with low insulin and cholesterol levels. *Diabetes.* 2002, 51(10), 3128-3134.
193. van Rossum EF, Koper JW, van den Beld AW, Uitterlinden AG, Arp P, Ester W, Janssen JA, Brinkmann AO, de Jong FH, Grobbee DE, Pols HA, Lamberts SW. Identification of the BclI polymorphism in the glucocorticoid receptor gene: association with sensitivity to glucocorticoids in vivo and body mass index. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2003, 59(5), 585-592.
194. van Rossum EF, Lamberts SW. Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and their associations with metabolic parameters and body composition. *Recent Prog Horm Res.* 2004, 59, 333-357.
195. van Rossum EF, Voorhoeve PG, te Velde SJ, Koper JW, Delemarre-van de Waal HA, Kemper HC, Lamberts SW. The ER22/23EK polymorphism in the glucocorticoid receptor gene is associated with a beneficial body composition

and muscle strength in young adults. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004, 89(8), 4004-4009.

196. van Winsen LL, Hooper-van Veen T, van Rossum EF, Polman CH, van den Berg TK, Koper JW, Uitdehaag BM. The impact of glucocorticoid receptor gene polymorphisms on glucocorticoid sensitivity is outweighed in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2005, 167(1-2), 150-156.

197. van Winsen LM, Manenschijn L, van Rossum EF, Crusius JB, Koper JW, Polman CH, Uitdehaag BM. A glucocorticoid receptor gene haplotype (TthIII1/ER22/23EK/9beta) is associated with a more aggressive disease course in multiple sclerosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009, 94(6), 2110-2114.

198. Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM. A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999, 84 (10), 3666-3672.

199. Verthelyi D, Petri M, Ylamus M, Klinman DM. Disassociation of sex hormone levels and cytokine production in SLE patients. *Lupus.* 2001, 10(5), 352-358.

200. Vilarinho ST, Costallat LT. Evaluation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in males with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 1998, 25(6), 1097-1103.

201. Vlassi M, Gazouli M, Paltoglou G, Christopoulos P, Florentin L, Kassi G, Mastorakos G. The rs10830963 variant of melatonin receptor MTNR1B is associated with increased risk for gestational diabetes mellitus in a Greek population. *Hormones (Athens).* 2012, 11(1), 70-76.

202. Vollenhoven RF, Morabito LM, Engleman EG, McGuire JL. Treatment of systemic lupus erythematosus with dehydroepiandrosterone: 50 patients treated up to 12 months. *J Rheumatol.* 1998, 25(2), 285-289.

203. Walker SE, Besch-Williford CL, Keisler DH. Accelerated deaths from systemic lupus erythematosus in NZB x NZW F1 mice treated with the testosterone-blocking drug flutamide. *J Lab Clin Med.* 1994, 124(3), 401-407.

204. Waterhouse JC, Perez TH, Albert PJ. Reversing bacteria-induced vitamin D receptor dysfunction is key to autoimmune disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2009, 1173, 757-765.
205. Weckerle CE, Niewold TB. The unexplained female predominance of systemic lupus erythematosus: clues from genetic and cytokine studies. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2011, 40, 1, 42-49.
206. Weidler C, Härle P, Schedel J, Schmidt M, Schölmerich J, Straub RH. Patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus have increased renal excretion of mitogenic estrogens in relation to endogenous antiestrogens. *J Rheumatol.* 2004, 31(3), 489-494.
207. Williams GR, Franklyn JA. Physiology of the steroid-thyroid hormone nuclear receptor superfamily. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1994, 8(2), 241-266.
208. Wisłowska M, Rok M, Stepień K, Kuklo-Kowalska A. Serum leptin in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int.* 2008, 28(5), 467-473.
209. Wu WM, Lin BF, Su YC, Suen JL, Chiang BL. Tamoxifen decreases renal inflammation and alleviates disease severity in autoimmune NZB/W F1 mice. *Scand J Immunol.* 2000, 52, 4, 393-400.
210. Xiong J, He Z, Zeng X, Zhang Y, Hu Z. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Clin Exp Rheumatol.* 2014, 32(2), 174-181.
211. Yoshida K, Hashimoto T, Sakai Y, Hashiramoto A. Involvement of the circadian rhythm and inflammatory cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Immunol Res.* 2014, 2014:282495.
212. Zen M, Ghirardello A, Iaccarino L, Tonon M, Campana C, Arienti S, Rampudda M, Canova M, Doria A. Hormones, immune response, and pregnancy in healthy women and SLE patients. *Swiss. Med. Wkly.* 2010, 140, 13-14, 187-201.

213. Zhou M, Ding L, Peng H, Wang B, Huang F, Xu WD, Li JH, Ye XR, Pan HF, Ye DQ. Association of the interleukin-10 gene polymorphism (-1082A/G) with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Lupus* 2013, 22, 128-135.
214. Zhou TB, Jiang ZP, Lin ZJ, Su N. Association of vitamin D receptor gene polymorphism with the risk of systemic lupus erythematosus. *J Recept Signal Transduct Res.* 2014, 1-7.
215. Zou YF, Xu JH, Wang F, Liu S, Tao JH, Cai J, Lian L, Xiao H, Chen PL, Tian G, Wu M, Wang DG, Liu SX, Liang CM, Pan FM, Su H, Pan HF, Ye DQ. Association study of glucocorticoid receptor genetic polymorphisms with efficacy of glucocorticoids in systemic lupus erythematosus: a prospective cohort study. *Autoimmunity.* 2013, 46(8), 531-536.