

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛОВДИВ

КАТЕДРА ПО НЕВРОЛОГИЯ

Д-р Георги Светославов Славов

**КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНО ПРОУЧВАНЕ НА СЕРУМНИ НИВА НА
ВИТАМИН Д И ЦИТОКИНИ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ПРИСТЪПНО-РЕМИТЕНТНА
МНОЖЕСТВЕНА СКЛЕРОЗА**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен

„ДОКТОР“

Пловдив, 2016 г.

Дисертационният труд съдържа 166 страници и е онагледен с 27 таблици и 11 фигури в текста. Библиографията включва 225 литературни източника, от които 11 на кирилица и 214 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден, одобрен и насочен за публична защита от Разширен Катедрен съвет на Катедрата по Неврология при Медицински Университет – Пловдив, състоял се на 05.04.2016г.

Публичната защита ще се състои на от ... часа в
..... Материалите по защитата са на разположение на интересувашите се в
Научен отдел на МУ – Пловдив.

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛОВДИВ

КАТЕДРА ПО НЕВРОЛОГИЯ

Д-р Георги Светославов Славов

**КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНО ПРОУЧВАНЕ НА СЕРУМНИ НИВА НА
ВИТАМИН Д И ЦИТОКИНИ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ПРИСТЪПНО-РЕМИТЕНТНА
МНОЖЕСТВЕНА СКЛЕРОЗА**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен

„ДОКТОР“

Научна специалност: 03.01.19

Научен ръководител: проф. д – р Захари И. Захариев, д.м.н.

Пловдив, 2016 г.

Използвани съкращения

АПК – антиген представяща клетка

ВПМС – вторично-прогресивна Множествена склероза

ЕАЕ – експериментален алергичен енцефаломиелит

КИС – клинично изолиран синдром

КМБ – кръвно-мозъчна бариера

ЛФ – лимфоцити

МС – Множествена склероза

ПРМС – пристъпно-ремитентна Множествена склероза

ППМС – първично-прогресивна Множествена склероза

РПМС – ремитентно-прогресивна Множествена склероза

УВ – ултравиолетово огряване

ЦНС – централна нервна система

ВМР – базичен протеин на миелина

ССL20 – хемокинов лиганд

ССР6 – хемокинов рецептор

СТLА-4 – цитотоксичен Т- лимфоцитен антиген

EDSS – Expanded Disability Status Scale

ICAM – вътреклетъчна адхезионна молекула

Ig – имуноглобулини

IL – интерлевкини

IFN β – интерферон бета

IFN γ – интерферон гама

LFA-1 – лимфоцит-специфичен антиген

MAG – миелин свързващ гликопротеин

MMP – матриксни металопротеинази

MHC – главен комплекс на тъканната съвместимост

MOG – миелинолигодендроцитен гликопротеин

MRI – магнитно-резонансна томография

NAA – N ацетил- аспартат киселина

NK – естествени килъри

PBMC – периферни кръвни мононуклеарни клетки

PLP – протеолипиден протеин

PTH – паратхормон

SZA – слънчев зенитен ъгъл

TGF β – трансформиращ растежен фактор бета

Th1 – Т хелперни лимфоцити от първи клас

Th2 – Т хелперни лимфоцити от втори клас

TIMP – тъканни инхибитори

TNF α – тумор некротизиращ фактор алфа

Tr – Т регулаторни

VCAM – съдова адхезионна молекула

VDR – витамин Д рецептор

VLA-4 – много късен антиген

ВЪВЕДЕНИЕ

Множествената склероза е един от научните проблеми в съвременната неврология поради социалната значимост, неизвестната етиология и лечението с ограничена ефективност. Днес МС се разглежда като прогресираща имунна болест със следните особености: особености в етиологията, включващи предполагаем вирусен агент, генетични фактори и фактори от околната среда; специфичност на автоантигените в ЦНС; нарушен имунен толеранс, причина за имунообусловена реактивност в периферията и в ЦНС.

Данни получени при ЕАЕ обосновават теза за CD4+ Т клетъчно медирана деструкция на миелина с дисбаланс в цитокинната секреция от Th1, Th2, Th17 и регулаторната CD4+CD25+Foxp3 субпопулации. Клинични наблюдения установяват нееднопосочни резултати за профила на цитокинната продукция в серума и ликвора на пациентите през периодите на пристъп и ремисия и в сравнение с контролите. Концепцията за зависимост между образаца на миелинната деструкция, клиничните прояви и потенциала на терапевтичен отговор е основание да се проучва ролята на различни фактори в имунообусловения процес – генетични, хормонални, от околната среда. Витамин Д, фактор от околната среда, предотвратява развитието на ЕАЕ, ако се приложи преди индукцията с миелинов протеин и задържа прогресивното развитие при третиране след първите клинични признаци. При МС голяма част от доказателствата за имунния потенциал на витамин Д са получени от експериментални наблюдения и по – малък брой от проучвания при МС пациенти. Откриват се противоречиви клинични резултати за връзка между динамиката на витамин Д нивата в серума и промените на имунни параметри, тежестта на неврологичен дефицит, Gd усилените лезии. Дискуссионни са въпросите за субгрупа МС пациенти, подходящи за лечение с витамин

Д, за дозите на приложение и продължителност на курса, за нивата постигащи супресия на имунната реакция.

Обект на настоящото проучване са пациенти с най – често срещаната ПРМС. Проучва се нов аспект от патогенезата на болестта – участието на витамин Д в имунообусловения процес. Индикатор за статуса на витамин Д в организма е серумната концентрация на 25(OH)D, която корелира с биологично активния метаболит 1.25(OH)2D. Серумната концентрация е резултат от: синтез на cholecalciferol (Д3) от 7-dehydrocholesterol в кожата след ултравиолетово огряване, 70-80 % от общото количество; синтез на ergocalciferol (Д2) от растителен sterolergosterol в храната, 10-20 % от общото количество. При българската популация, приетите нива за достатъчност (≥ 50 nmol/l), недостатъчност (25 – 49.99 nmol/l) и дефицит (< 25 nmol/l) в серума са идентични с посочените на Консенсусната конференция в Германия, 2012 г., което позволява сравнително да се анализират данни от изследвания в страната и от чужди колективи. Установяването на убедителни научни факти за причинно – следствена зависимост на промени в серумните концентрации на витамин Д с имунни и клинични показатели за болестна активност е предпоставка за оптимизиране на терапевтичните подходи чрез лечение с витамин Д. В нашата страна болестността от МС е двукратно повишена за срок от 17 години. От такъв аспект проучвания за участието на фактори от околната среда в патогенезата на болестта са обосновани и необходими.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ПРОУЧВАНЕТО

ЦЕЛ:

Да се оценят промените в серумните концентрации на 25(OH)D, IL4, IL10, TGFβ1, IL17, IFNγ, TNFα, връзката им с фазите на пристъп и ремисия и с тежестта на неврологичен дефицит през двата периода.

ЗАДАЧИ:

1. Анкетно регистриране на всеки участник в проучването /по анкетна карта на проучването/.
2. Да се определи клинически тежестта на неврологичен дефицит в пристъп и ремисия.
3. Да се изследват и сравнят:
 - серумните концентрации на 25(OH)D през периодите на пристъп и ремисия;
 - серумните концентрации на IL4, IL10, TGFβ1, IL17, IFNγ, TNFα през периодите на пристъп и ремисия;
 - да се сравнят данните от изследваните показатели с тези при контролната група от здрави лица;
 - да се оцени причинно-следствената връзка между промените в концентрациите на 25(OH)D, IL4, IL10, TGFβ1, IL17, IFNγ, TNFα и тежестта на неврологичен дефицит през периодите на пристъп и ремисия.

КЛИНИЧЕН КОНТИНГЕНТ И МЕТОДИ НА ПРОУЧВАНЕТО

А. КЛИНИЧЕН КОНТИНГЕНТ

1. Обект на наблюдение е серумната концентрация на 25(OH)D и цитокинната секреция при пациенти с пристъпно-ремитентна множествена склероза.

2. Логическа единица на наблюдение:

- Всеки пациент с диагноза МС , насочен от общопрактикуващ лекар или специалист - невролог към Клиниката по Нервни болести или към Центъра за диагностика и лечение на МС, УМБАЛ „Свети Георги“- гр. Пловдив.
Пациентите с пристъп са хоспитализирани в Клиниката по Нервни болести, УМБАЛ „Св. Георги” гр. Пловдив. Проведено е лечение с Methylprednisolone /Sopharma/ 500 mg и.в сутрин, курсова доза 2500 mg.
- Здрави лица, които са приети като база за сравнение (контроли).

3. Техническа единица на наблюдение: клиничното изследване на пациентите е проведено в Катедрата по Нервни болести, Медицински университет – Пловдив.

Определянето на серумните нива на 25(OH)D и на IL4, IL10, TGFβ1, IL17, IFNγ, TNFα е осъществено в Катедрата по Клинична лаборатория, МУ-Пловдив.

4. Орган на наблюдението: първичната информация е събирана от автора на проучването през периода м.октомври 2012 год./м.май 2013 год., м.октомври 2013 год./м.май 2014 год. – астрономическите зимни периоди в страната.

5. Признаци на наблюдение

- Анамнестични данни за началото на заболяването, начало и развитие на поредния пристъп, остатъчни симптоми по време на последващата ремисия.
- Данни от клиничното изследване: неврологичен статус с оценка степента на неврологичния дефицит по EDSS в пристъп и ремисия.
- Резултати от проведените хормонални изследвания: серумни концентрации на 25(OH)D.
- Показатели от проведените имунологични изследвания: серумни концентрации на IL4, IL10, TGFβ1, IL17, IFNγ, TNFα.

Проведено е изследване случай-контрола. За определяне на необходимия брой единици на наблюдение при неравен брой на случаите в двете групи е използвана формулата:

$$n_2 = \frac{t^2 \sigma_2^2}{(\bar{X}_1 - X_2) - \frac{t^2 \sigma_1^2}{n_1}}$$

при гаранционна вероятност 0.95, при което се приема, че разликата между двете средни величини е статистически значима.

За да се регистрира достоверност на получените резултати необходимият брой пациенти е най – малко 20, за клинично здравите лица е най – малко 16 лица.

Регистрирани са 49 пациенти с МС, от които отпадат 3-ма, поради неявяване за повторна оценка и изследване. Проучването е проведено при 46 болни, от които 33-ма са жени, 13 са мъже. Разликата в броя на болните жени и този на мъжете произтича от подбора на пациентите с пристъп, отговарящи на критериите на проучването и от

факта, че оценките за промените на показателите в зависимост от половата принадлежност не са основна цел на нашето изследване.

Контролната група се състои от 40 клинично здрави лица, 20 жени и 20 мъже. Двете сравнявани групи (случаи и контроли) са съпоставими по възраст.

Доброволното участие на лицата за целите на проучването е удостоверено с писмено информирано съгласие.

Проученият контингент отговаря на следните критерии:

Включващи критерии

1. Лица от бялата раса с местообитаване между 41⁰⁵ северна ширина и 25⁰⁷ източна ширина, на възраст от 18 до 50 години.
2. Пациенти с пристъпно-ремитентна МС според критериите на Mc`Donald (2010) със степен на неврологичен дефицит 1.5-5.0 по EDSS.
3. Пациенти с пореден пристъп и ремисия, регистрирани през астрономическите зимни периоди в страната – м.октомври 2012 год./м.май 2013 год., м.октомври 2013 год./м.май 2014 год.

Изключващи критерии

1. Първично и вторично прогресивен ход.
2. Лечение с медикаменти, модифициращи болестния ход през предходната година от датата на регистрация.

3. Лечение с витамин Д и медикаменти, повлияващи метаболизма на витамин Д /орални контрацептиви, хормонално-заместително лечение, антиепилептични средства, лаксативни препарати, тиазидни диуретици/.

4. Придружаващи аутоимунни заболявания, остри и хронични инфекции, чернодробни, бъбречни, неопластични заболявания, хиперпаратиреозидизъм, диабет, хиперкалциемия.

Пациентите са изследвани двукратно:

- По време на пристъп, който се дефинира като поява на нови симптоми или утежняване на съществуващите с продължителност над 24 часа, след период на 30 дневно подобрене или стабилно състояние, при липса на фебрилитет. Клиничните и лабораторните показатели по времето на пристъп са изследвани преди да се приложи лечението с Methylprednisolone, i.v, курсова доза 2500 mg.
- По време на ремисия – най-малко два месеца след пореден пристъп.

Лицата, съставляващи контролната група са 40, изследвани са през описаните периоди и отговарят на следните критерии:

Включващи критерии

1. Клинично здрави лица, съпоставими по пол и възраст, които не приемат орални контрацептиви, хормонално-заместително лечение, антиепилептични средства, лаксативни препарати, поливитамици.

Изключващи критерии

1. Лечение с витамин Д и медикаменти, повлияващи метаболизма на витамин Д /орални контрацептиви, хормонално-заместително лечение, антиепилептични средства, лаксативни препарати, тиазидни диуретици/.

2. Придружаващи автоимунни заболявания, остри и хронични инфекции, чернодробни , бъбречни, неопластични заболявания, хиперпаратиреозидизъм, диабет, хиперкалциемия.

Оценка за промените на изследваните показатели е направена при контингента от 46 болни и 40 здрави, регистрирани през описаните зимни периоди, въз основа на Справка, изготвена от Института по Метеорология и Хидрология при БАН. Анализът на броя на ясните и слънчевите дни показва, че и двата показателя, през двата периода са разположени в зоната на нормалното разсейване около средната многогодишна стойност.

Б. МЕТОДИ

1. КЛИНИЧЕН МЕТОД

Клиничното изследване включва:

- Анамнестични данни за начало и продължителност на заболяването; начало, развитие и времетраене на пристъпа; съпътстващи заболявания; провеждано лечение;
- Диагностични критерии на McDonald (2010);
- Неврологичен статус с оценка тежестта на неврологичния дефицит по EDSS

2. АНКЕТЕН МЕТОД

Извличане на първична информация от „Лична амбулаторна карта“, „История на заболяването“ и Клиничен фиш за лабораторно изследване на пациентите с Множествена склероза.

Анкетна карта на проучването

Фиш за проследяване на пациентите

3. КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНИ МЕТОДИ

3.1. Метод за определяне на концентрацията на 25(OH)D в кръвен серум:

количественото определяне на 25(OH)D в човешки серум е извършено чрез директен ензимосвързан имуносорбентен анализ с оригинални ELISA-kits, Immundiagnostik AG, Германия.

3.2. Метод за определяне на концентрацията на цитокинитев кръвен серум

Количественото определяне на изследваните цитокини е извършено чрез ензимно свързан имуносорбентен анализ с оригинални ELISA-kits, eBioscience, Австрия.

4. ЕПИДЕМИОЛОГИЧЕН МЕТОД

Проведено е изследване, случай-контрола за сравняване на клинично-лабораторните показатели на пациентите с МС и здравите лица (контроли).

5. ДОКУМЕНТАЛЕН МЕТОД

Подробен ретроспективен анализ на наличната медицинска документация (лична амбулаторна карта, епикризи) по отношение на анамнестични и клинични данни, клинично-лабораторни изследвания, магнитно-резонансно изследване и др.

6. СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ

Събраната първична информация е проверена, кодирана и въведена в компютърна база данни за по-нататъшна статистическа групировка и анализ. Данните са въведени и обработени с помощта на статистически софтуерен пакет SPSS версия 19.0. Използвани са следните статистически методи за анализ и обработка:

- Алтернативен анализ – за изчисляване на относителни дялове за качествени показатели;
- Вариационен анализ – за изчисляване на средни величини и показатели на разсейване; резултатите са представени като $\text{mean} \pm \text{SEM}$;
- t – тест на Student за съпоставка на средни величини на изследваните показатели.
- Тест на Колмогоров – Смирнов за анализ на нормалността на разпределението;
- Непараметричен анализ :

- критерия χ^2 – за установяване на връзка между изследваните фактори;
- критерий на Mann-Whitney – за установяване на различие при несвързани извадки;
- критерий на Wilcoxon – за установяване на различие при свързани извадки;
- Корелационен анализ – анализ за силата на връзката между изследваните показатели; изчислени са коефициент на корелация на Pearson и коефициент на рангова корелация на Spearman;
- Регресионен анализ – използвана е еднофакторна и многофакторна линейна регресия;

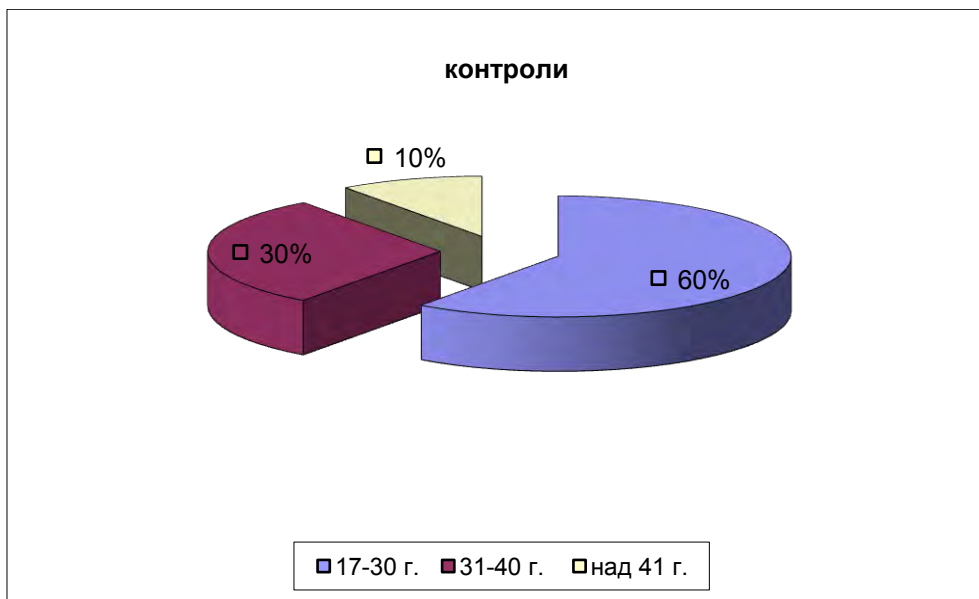
За онагледяване на процесите и явленията са използвани възможностите на графичния анализ.

РЕЗУЛТАТИ

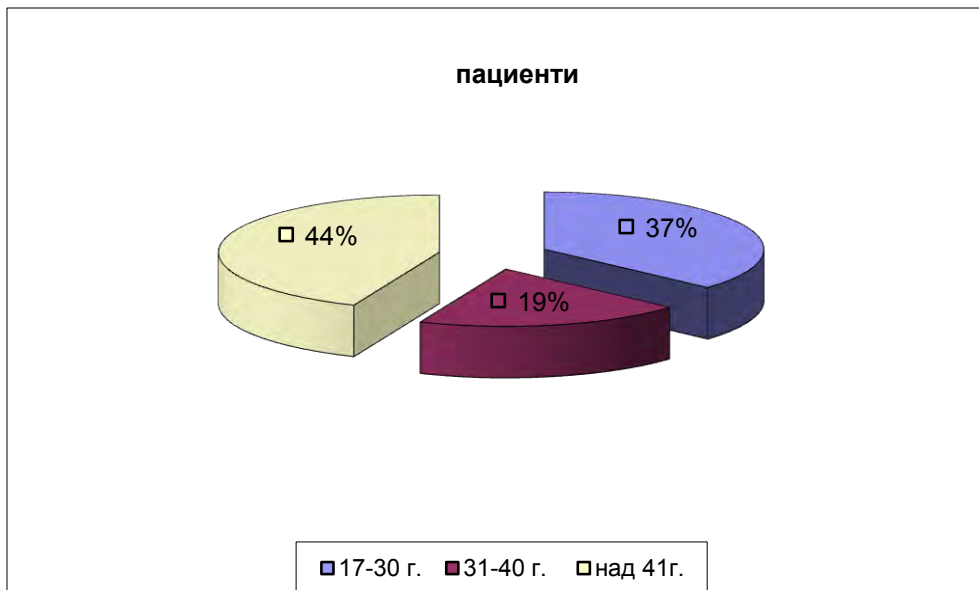
1. АНКЕТНО РЕГИСТРИРАНЕ И КЛИНИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА КОНТИНГЕНТА

1.1. ОПИСАНИЕ НА КОНТИНГЕНТА

Проучени са 46 пациенти с ПРМС на средна възраст 37 ± 1.83 години, най-висок е относителният дял на болните над 41 г. (44%). Следващ по честота е относителният дял във възрастовия диапазон 17 – 30 г. (37%). Контролната група включва 40 клинично здрави лица на средна възраст 31.67 ± 1.15 години. Най – висок е относителният дял на здравите на възраст между 17 – 30 г (60%). Двете групи са съпоставими по възраст ($t=2.38$, $p=0.02$). Данните са представени на Фиг. 1 и Фиг. 2.

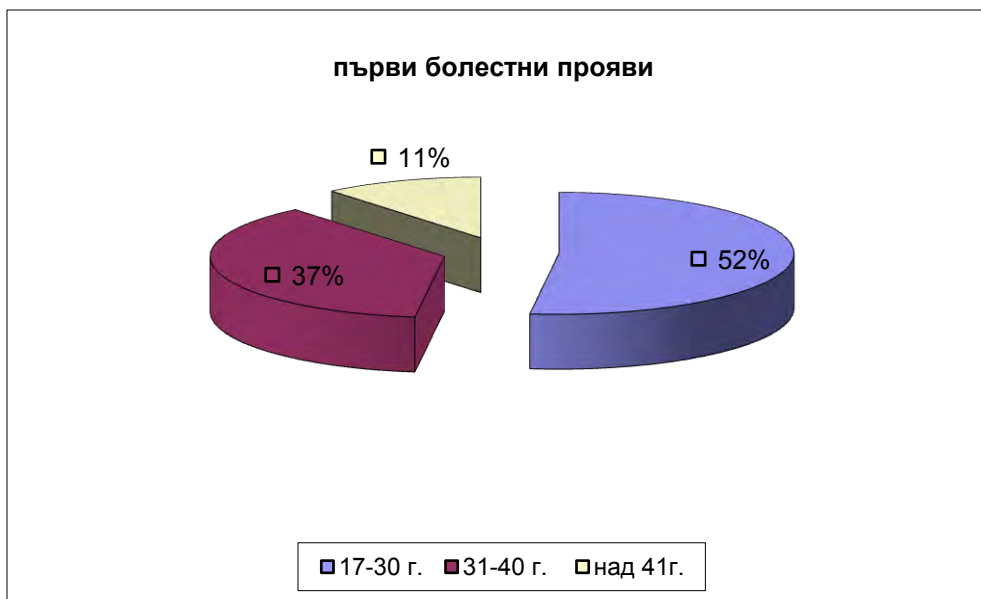


Фиг. 1. Възрастово разпределение на клинично здравите лица.



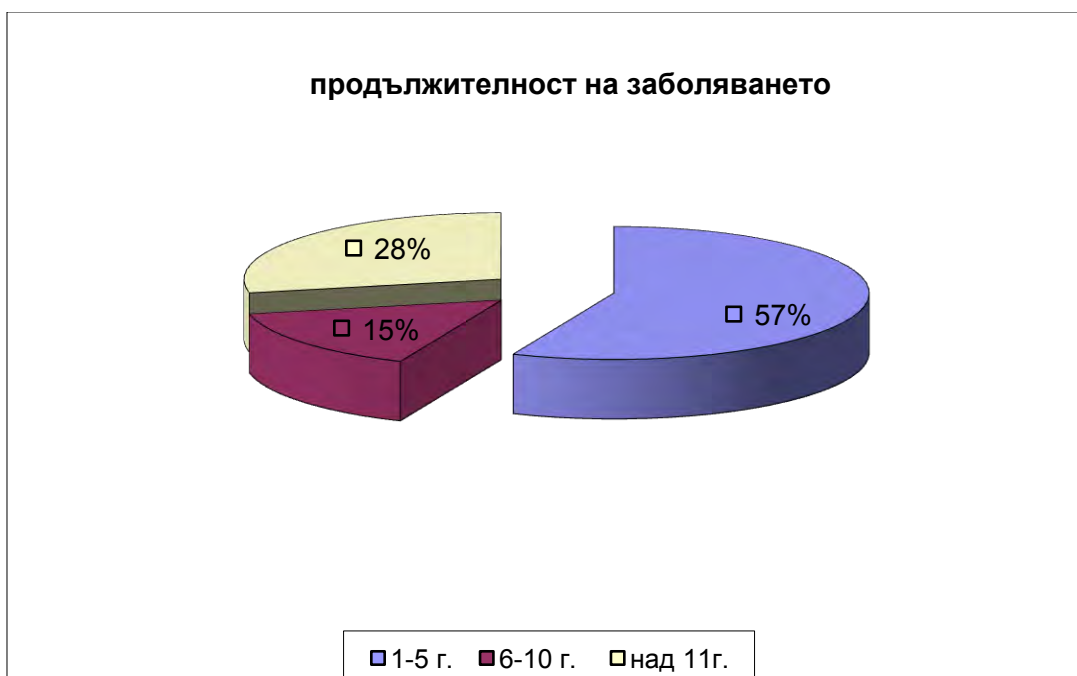
Фиг. 2. Възрастово разпределение на пациентите.

От регистрираните 46 пациенти, 13 са мъже на средна възраст 36.48 ± 3.52 , 33 жени на средна възраст 37.21 ± 2.18 . Контролната група включва 40 клинично здрави лица, 20 мъже на средна възраст 30.70 ± 1.78 , 20 жени на средна възраст 32.65 ± 1.97 . Средната възраст на първите болестни прояви е 30.00 ± 1.29 години. Най – малката регистрирана възраст е 17 години, а най – голямата е 49 години. Най – висок е относителният дял на болните с изява на МС в границите на възрастта 17 – 30 години (52%). Разпределението на пациентите според възрастта, на която се регистрират първите болестни прояви е представено на Фиг 3.



Фиг. 3. Разпределение на пациентите според възрастта на първите болестни прояви.

Продължителността на заболяването до времето на регистрацията в проучването е от 1 до 30 години, средно $7,17 \pm 1,17$ години. По – голямата част от болните (57%) са с продължителност на МС до 5 години. Данните са представени на Фиг 4.



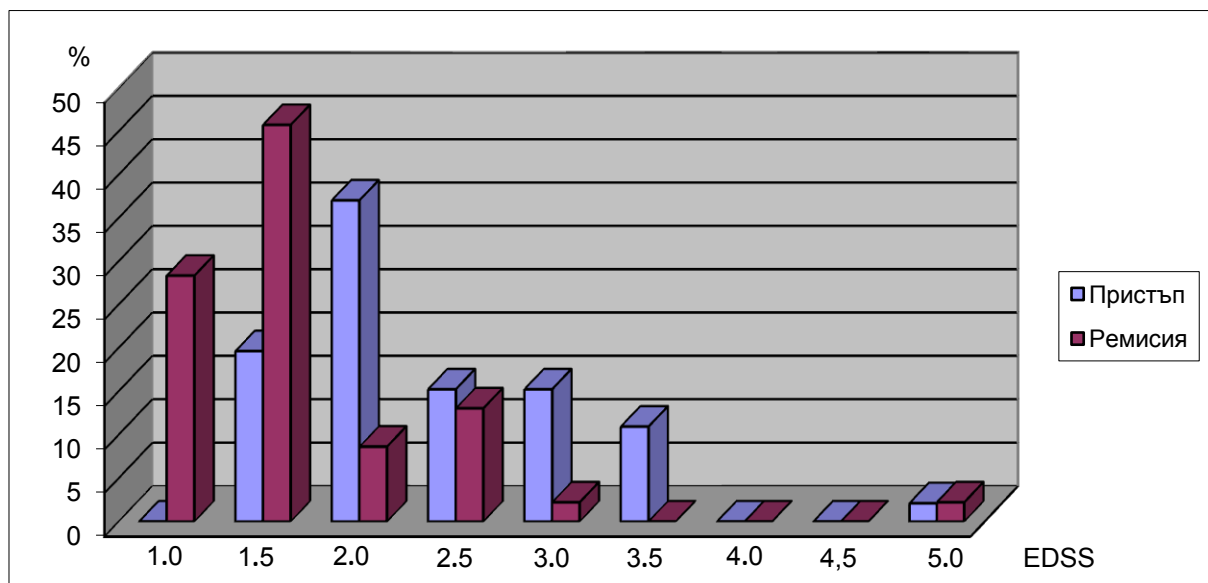
Фиг. 4. Разпределение на пациентите според продължителността на заболяването.

Всички пациенти са регистрирани до края на първия месец от пореден пристъп (между 1 и 29 ден), най-висок е относителният дял на регистрираните до края на 3-та седмица(76.08%, n=35).

1.2. ОЦЕНКА НА НЕВРОЛОГИЧНИЯ ДЕФИЦИТ ПОСРЕДСТВОМ СКАЛАТА EDSS

Тежестта на неврологичен дефицит, оценена чрез EDSS в пристъп е в границите от 1.5 до 5.0 степен, средно 2.36 ± 0.11 . От разпределението според тежестта на инвалидизация при регистриране в проучването (в пристъп), оценена по EDSS, се установява висок относителен дял на болните в диапазона 1.5 – 2.0 степен(56.6%). В ремисия по – голямата част от пациентите са с EDSS 1.0 до 1.5 (74%)

Данните са представени на Фиг. 5



Фиг. 5. Разпределение на пациентите според степента на EDSS в пристъп и ремисия.

При всички пациенти средната степен на EDSS в пристъп е сигнификантно по – висока в сравнение с ремисията ($p < 0.001$) Получените резултати от промените на EDSS през двата клинични периода са представени на Табл. 1.

Табл. 1. Промени в тежестта на неврологичен дефицит /EDSS/ през периодите на пристъп и ремисия.

Показатели	Брой	Mean \pm SEM	SD	Z	P
EDSS пристъп	46	2.36 \pm 0.11	0.75	5.95	0.0001
EDSS ремисия	46	1.64 \pm 0.11	0.73		

При изследване на връзката между тежестта на дефицит, възрастта на първите прояви, продължителността на болестта се регистрира средна по сила, права връзка между възрастта на първите прояви и степента на неврологичен дефицит в пристъп (0.448; $P < 0.01$). През същия клиничен период се установява средна по сила, права връзка между продължителността на болестта и степента на неврологичен дефицит (0.541; $P < 0.001$).

През периода на клинично подобрение (ремисия), аналогичната съпоставка регистрира сигнификантна връзка на степента на неврологичен дефицит с възрастта и продължителността на болестта. Данните са представени на Табл. 2 и 3.

Табл. 2. Корелация между средната степен на неврологичен дефицит /EDSS/ в пристъп с възрастта и продължителността на заболяването.

Показатели	EDSS при пациентите в пристъп	Възраст	Продължителност
Корелационен коефициент	1	0.44	0.54
P (2-tailed)		0.002	0.0001
Брой	46	46	46

Табл. 3. Корелация между средната степен на неврологичен дефицит /EDSS/ в ремисия с възрастта и продължителността на заболяването.

Показатели	EDSS при пациентите в ремисия	Възраст	Продължителност
Корелационен коефициент	1	0.41	0.49
P (2-tailed)		0.004	0.0001
Брой	46	46	46

ОБОБЩЕНИЕ

1. Установихме пик на първите болестни прояви (първи пристъп) до 30 – та годишна възраст, при 57% от пациентите продължителността на болестта до времето на регистрация е до 5 години.
2. Основната част от пациентите са с минимален неврологичен дефицит, при който подвижността е съхранена (1.5 – 2.0 ст. по EDSS) по времето на пристъп и с абнормни неврологични признаци, без функционален дефицит (1.0 – 1.5 ст. по EDSS) през ремисията.
3. Тежестта на неврологичен дефицит в пристъп, оценена по EDSS е сигнификантно по – висока от тази в ремисия.
4. Степента на неврологичен дефицит зависи от възрастта на първите прояви и продължителността на болестта, като тежестта на остатъчния дефицит нараства при повишение на двата показателя.

1.3. РЕЗУЛТАТИ ОТ ПРОМЕНИТЕ В СЕРУМНИТЕ КОНЦЕНТРАЦИИ НА 25(OH)D(nmol/l) И ВРЪЗКАТА ИМ СЪС СТЕПЕНТА НА НЕВРОЛОГИЧЕН ДЕФИЦИТ И С РИСКА ОТ ВЪЗНИКВАНЕ НА МС

От изследваните 40 клинично здрави лица, при 23 (57.5%) нивата на 25(OH)D са в прага приет за недостатъчност ≥ 26 nmol/l, 17 (42.5%) са с нива в границите на дефицит ≤ 25 nmol/l. Сред включените 46 пациенти, 13(28.3%) са със серумни концентрации на 25(OH)D в границите на недостатъчност ≥ 26 nmol/l, 33 (71.7 %) са с концентрация на 25(OH)D в границите на дефицит ≤ 25 nmol/l. При изследвания контингент от 86 лица се регистрира най – висок относителен дял на лицата с дефицит (58.1%) при (41.9 %) нивата на 25(OH)D са в диапазона на недостатъчност. Данните за средните серумни концентрации на 25(OH)D при контингента по времето на регистрацията са представени на Табл 4.

Табл. 4. Разпределение на проучения контингент в зависимост от серумните нива на 25(OH)D /nmol/l.

Показатели		25(OH)D nmol/l		Общо	
		>26	≤ 25		
Група	Контрола	Брой	23	17	40
		% здрави лица в групата	57.5%	42.5%	100.0%
		% здрави лица в групата спрямо нивото на 25(OH)D	63.9%	34.0%	46.5%
	Пациенти	Брой	13	33	46
		% пациенти в групата	28.3%	71.7%	100.0%
		% пациенти спрямо нивото на 25(OH)D	36.1%	66.0%	53.5%
Общо	Брой	36	50	86	
	% лица в групите	41.9%	58.1%	100.0%	
	% лица в групите спрямо нивото на 25(OH)D	100.0%	100.0%	100.0%	

Установяват се статистически значимо по – ниски концентрации на 25(OH)D при болните с пристъп в сравнение с контролите (P = 0.009); достоверно повишение на показателя през ремисията спрямо пристъпа (P = 0.024). През периода на клинично подобрене средните нива нарастват, но не достигат статистически значима разлика и остават по – ниски от тези при контролите. Резултатите от съпоставката между средните серумни концентрации на 25(OH)D през двата клинични периода и тези при контролите са представени на Табл. 5.

Табл.5. Средни серумни концентрации на 25(OH)D при пациентите в пристъп, ремисия и клинично здравите лица.

Група	n	mean ± SEM (nmol/L)	SD	t	P	t ₁	P ₁
<i>Контрола</i>	40	37.39 ± 5.56	35.15	-	-	-	-
<i>Пациенти в пристъп</i>	46	18.50 ± 2.42	16.38	2.60	0.009*	-	-
<i>Пациенти в ремисия</i>	46	27.05 ± 3.68	24.97	1.35	0.18	2.26	0.024*

t, P – при сравнение с контролата

t₁, P₁.- при сравнение на стойностите в пристъп и ремисия

*– резултатите са статистически значими

Регистрира се негативна, статистическа значима, средна по сила връзка между средните серумни концентрации на 25(OH)D и степента на неврологичен дефицит по времето на пристъп ($r = - 0.416$; $P=0.004$). През периода на клинично подобрене (ремисия) се отчита слаба по сила, незначима, негативна връзка между средните серумните нива на 25(OH)D и степента на инвалидизация ($r = - 0.267$; $P= 0.073$).

Установява се протективно действие на 25 (OH) D относно риска от развитие на МС. При проучения контингент дефицитът на витамин Д повишава общия риск 3.43 пъти. Оценката на риска от възникване на МС в зависимост от експозицията на изследвания фактор – серумни концентрации на 25(OH)D nmol/l е представена на Табл. 6.

Табл. 6. Серумни нива на 25 (OH)Dnmol/l и риск от възникване на Множествена склероза.

Показатели	Здрави контроли		Болни		Odds Ratio	95% CI	P
	Брой	%	Брой	%			
<i>Серумни нива на 25(OH)D>26 nmol/l</i>	23	57.5%	13	28.3%	1	-	-
<i>Серумни нива на 25(OH)D<=25nmol/l</i>	17	42.5%	33	71.7%	3.43	[1.40;8.42]	0.006

ОБОБЩЕНИЕ

1. При проучения контингент най – голям е относителният дял на лицата с дефицит на 25 (ОН) D.
2. При болните с пристъп и утежнен неврологичен дефицит 25 (ОН) D нивата са достоверно по – ниски спрямо тези на здравите лица. При настъпване на клинично подобрене 25 (ОН) D нивата се повишават статистически значимо, но не достигат тези на контролите.
3. Установява се протективно действие на 25 (ОН) D относно риска от възникване на МС.
4. Установява се негативна сигнификантна връзка между 25 (ОН) D нивата в пристъп и степента на неврологичен дефицит.

1.4 РЕЗУЛТАТИ ОТ ПРОМЕНИ В СЕРУМНИТЕ КОНЦЕНТРАЦИИ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ ИМУНОЛОГИЧНИ ПОКАЗАТЕЛИ, 25(OH)D НИВАТА И ВРЪЗКАТА ИМ СЪС СТЕПЕНТА НА НЕВРОЛОГИЧЕН ДЕФИЦИТ

При изследване на серумните концентрации на IL17, TNF α , IFN γ , IL4, TGF β 1, IL10 при здравите лица са получени следните резултати (Табл. 7).

Табл. 7. Средни серумни концентрации на цитокините (pg/ml) при здравите лица.

Показатели	Брой	Mean	SEM	SD
<i>Възраст</i>	40	31.67	1.15	7.28
<i>IL17</i>	40	44.90	3.12	19.76
<i>IL4</i>	40	15.14	3.03	19.20
<i>IL10</i>	40	2.63	0.23	1.46
<i>TNFα</i>	40	4.44	0.38	2.43
<i>TGFβ</i>	40	0.50	0.04	0.27
IFN γ	40	5.06	0.75	4.77

Средните серумни нива на цитокините при болните по времето на пристъп и ремисия са представени на Табл. 8 и 9.

Табл. 8. Средни серумни концентрации на цитокините (pg/ml) при пациентите в пристъп.

Показатели	Брой	Mean	SEM	SD
<i>Възраст</i>	46	37.00	1.83	12.42
<i>IL17</i>	46	58.35	7.22	48.97
<i>IL4</i>	46	11.51	1.09	7.37
<i>IL10</i>	46	1.67	0.22	1.46
<i>TNFα</i>	46	3.49	0.38	2.55
<i>TGFβ</i>	46	0.54	0.028	0.13
<i>IFNγ</i>	46	1.97	0.31	2.12

Табл. 9. Средни серумни концентрации на цитокините (pg/ml) при пациентите в ремисия .

Показатели	Брой	Mean	SEM	SD
<i>IL17</i>	46	53.67	5.86	39.77
<i>IL4</i>	46	16.55	2.24	15.22
<i>IL10</i>	46	1.74	0.24	1.66
<i>TNFα</i>	46	3.32	0.28	1.92
<i>TGFβ</i>	46	0.71	0.059	0.40
<i>IFNγ</i>	46	1.14	0.16	1.14

От съпоставката между промените на изследваните цитокини при болните през двата клинични периода с тези при здравите лица се установяват: сигнификантно ниски нива на TNF α , IL10,IFN γ при пациентите и през двата периода; достоверно по – високи серумни нива на TGF β 1 през ремисията в сравнение с контролата. Данните са представени на Табл. 10 и 11.

Табл. 10. Съпоставка между нивата на провъзпалителните цитокини през двата клинични периода с тези на контролите.

Групи	Брой	IL17 (pg/ml) Mean Rank	t	P	TNF α (pg/ml) Mean Rank	t	P	IFN γ (pg/ml) Mean Rank	t	P
Контрола	40	41.28			50.44			54.13		
Пациенти в пристъп	46	45.43	-0.77	>0.05	34.47	-2.40	<0.05	34.26	-3.68	<0.001
Пациенти в ремисия	46	46.91	-1.361	>0.05	37.25	-2.49	<0.05	30.84	-5.04	<0.001

Табл. 11. Съпоставка между нивата на антивъзпалителните цитокини през двата клинични периода с тези на контролите.

Групи	Брой	IL4 (pg/ml) Mean Rank	t	P	IL10 (pg/ml) Mean Rank	t	P	TGF β (pg/ml) Mean Rank	t	P
Контрола	40	44.48			53.73			39.15		
Пациенти в пристъп	46	42.65	-0.33	>0.05	34.59	-3.55	<0.001	47.28	-1.50	>0.05
Пациенти в ремисия	46	46.15	-1.05	>0.05	36.02	-2.97	<0.01	48.76	-2.09	<0.05

През ремисията се установява сигнификантно повишение на концентрациите на IL4, TGFβ, като се отчита тенденция за повишение на IL10 спрямо нивата в пристъп. През периода на клинично подобрене статистически значимо намаляват средните нива на IFNγ. Регистрира се слабо изразена тенденция за понижение на IL17 и TNFα спрямо серумните концентрации в пристъп. Резултатите от съпоставката между промените на цитокините през двата периода са представени на Табл. 12.

Табл. 12. Промени в средните серумни концентрации на цитокините през периодите на пристъп и ремисия.

Цитокини (pg/ml)	Клиничен период	t	P
<i>IL17</i>	пристъп	0.53	>0.05
	ремисия		
<i>IL4</i>	пристъп	2.73	0.006
	ремисия		
<i>IL10</i>	пристъп	0.25	>0.05
	ремисия		
<i>TNFα</i>	пристъп	0.49	>0.05
	ремисия		
<i>TGFβ</i>	пристъп	2.74	0.009
	ремисия		
<i>IFNγ</i>	пристъп	2.39	0.017
	ремисия		

Анализът на данните за причинно – следствена зависимост между серумните концентрации на цитокините и 25(OH)D нивата през двата периода установяват умерена по сила, права връзка между IL17 и 25(OH)D по време на екзацербацията (0.343; P = 0.02)(Табл. 13)

Табл. 13. Корелация между средните серумни нива на 25 (ОН) D и средните серумни нива на IL17 при пациентите в пристъп.

Показатели	25(ОН)D (nmol/l)	IL17 (pg/ml)
Корелационен коефициент	1	0.343*
Sig. (2-tailed)		0.020
Брой	46	46

Оценката на връзката между промените на цитокините и тежестта на неврологичен дефицит по времето на пристъп и ремисия показва слаба по сила, статистически значима, права връзка между серумните нива на TNF α и степента на инвалидизация по време на екзацербацията (Табл. 14).

Табл. 14. Корелация между средните серумни нива на TNF α и средната степен на неврологичен дефицит по EDSS.

Показатели	EDSS при пациентите в пристъп	TNF α (pg/ml)
Корелационен коефициент	1	0.301*
Sig. (2-tailed)		0.042
Брой	46	46

Оценката на влиянието на всеки от изследваните показатели върху степента на неврологичен дефицит, чрез еднофакторна линейна регресия установи, че статистически значими са: 25(ОН)D, IL17, TNF α . Резултатите са представени на Таблица 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21.

Табл. 15. Еднофакторен регресионен линеен модел за EDSS в пристъп и 25(OH)D в пристъп.

Коефициенти								
Модел		Нестандартизиран и коефициенти		Стандартизирани коефициенти	t	P	95.0% Интервал на доверителност за B	
		B	Std. Error	Beta			Долна гр.	Горна гр.
1	(Constant)	2.678	0.157		17.025	0.000	2.361	2.995
	25(OH)D пристъп	-0.017	0.006	-0.376	-2.696	0.010	-0.030	-0.004
a. Dependent Variable: EDSS пристъп								

Табл. 16. Еднофакторен регресионен линеен модел за EDSS в пристъп и IL17 в пристъп.

Коефициенти								
Модел		Нестандартизирани коефициенти		Стандартизирани коефициенти	t	P	95.0% Интервал на доверителност за B	
		B	Std. Error	Beta			Долна гр.	Горна гр.
1	(Constant)	2.633	0.167		15.797	0.000	2.297	2.969
	IL17 пристъп	-0.005	0.002	-0.307	-2.140	0.038	-0.009	0.000
a. Dependent Variable: EDSS пристъп								

Табл. 17. Еднофакторен регресионен линеен модел за EDSS в пристъп и IL4 в пристъп.

Коефициенти								
Модел		Нестандартизирани коефициенти		Стандартизирани коефициенти	t	P	95.0% Интервал на доверителност за B	
		B	Std. Error	Beta			Долна гр.	Горна гр.
I	(Constant)	2.525	0.207		12,202	0.000	2.108	2.941
	IL4 пристъп	-0.014	0.015	-0.142	-0.949	0.348	-0.045	0.016
a. Dependent Variable: EDSS пристъп								

Табл. 18. Еднофакторен регресионен линеен модел за EDSS в пристъп и IL10 в пристъп.

Коефициенти								
Модел		Нестандартизирани коефициенти		Стандартизирани коефициенти	t	P	95.0% Интервал на доверителност за B	
		B	Std. Error	Beta			Долна гр.	Горна гр.
I	(Constant)	2.493	0.169		14.783	0.000	2.153	2.833
	IL10 пристъп	-0.081	0.076	-0.157	-1.053	0.298	-0.235	0.074
a. Dependent Variable: EDSS пристъп								

Табл. 19. Еднофакторен регресионен линеен модел за EDSS в пристъп и TNF α в пристъп.

Коефициенти								
Модел		Нестандартизирани коефициенти		Стандартизиран и коефициенти	t	P	95.0% Интервал на доверителност за B	
		B	Std. Error				Beta	Долна гр.
I	(Constant)	2.050	0.182		11.256	0.000	1.683	2.417
	TNF α пристъп	0.088	0.042	0.301	2.093	0.042	0.003	0.174
a. Dependent Variable: EDSS пристъп								

Табл. 20. Еднофакторен регресионен линеен модел за EDSS в пристъп и TGF β в пристъп.

Коефициенти								
Модел		Нестандартизирани коефициенти		Стандартизирани коефициенти	t	P	95.0% Интервал на доверителност за B	
		B	Std. Error				Beta	Долна гр.
I	(Constant)	1.751	0.327		5.362	0.000	1.093	2.409
	TGF β пристъп	1.125	0.571	0.285	1.970	0.055	-0.026	2.277
a. Dependent Variable: EDSS пристъп								

Табл. 21. Еднофакторен регресионен линеен модел за EDSS в пристъп и IFN γ в пристъп.

Коефициенти								
Модел	Нестандартизирани коефициенти		Стандартизирани коефициенти	t	p	95.0% Интервал на доверителност за B		
	B	Std. Error	Beta			Долна гр.	Горна гр.	
1	(Constant)	2.399	0.153		15.645	0.000	2.090	2.708
	IFN γ пристъп	-0.020	0.053	-0.057	-0.381	0.705	-0.128	0.087
a. Dependent Variable: EDSS пристъп								

Анализирана е зависимостта на EDSS в пристъп от серумните нива на 25(OH)D и на изследваните цитокини с помощта на многофакторна линейна регресия. Стъпковата регресионна процедура установява, че статистически значими и независими фактори за степента на неврологичен дефицит в пристъп са: 25(OH)D, TNF α и IL17 (Табл. 22) .

Табл. 22. Многофакторен регресионен линеен модел за EDSS пристъп.

Коефициенти								
Модел		Нестандартизирани коефициенти		Стандартизирани коефициенти	t	P	95.0% Интервал на доверителност за B	
		B	Std. Error	Beta			Долна гр.	Горна гр.
1	(Constant)	2.678	0.157		17.025	0.000	2.361	2.995
	25(OH)D пристъп	-0.017	0.006	-0.376	-2.696	0.010	-0.030	-0.004
2	(Constant)	2.371	0.206		11.526	0.000	1.956	2.786
	25(OH)D пристъп	-0.017	0.006	-0.371	-2.765	0.008	-0.029	-0.005
	TNF α пристъп	0.086	0.039	0.293	2.190	0.034	0.007	0.166
3	(Constant)	2.476	0.203		12.176	0.000	2.066	2.887
	25(OH)D пристъп	-0.012	0.006	-0.264	-1.913	0.063	-0.025	0.001
	TNF α пристъп	0.109	0.039	0.371	2.776	0.008	0.030	0.188
	IL17 пристъп	-0.005	0.002	-0.307	-2.160	0.037	-0.009	0.000
a. Dependent Variable: EDSS пристъп								

(F= 6.145, df=3, P=0.001)

ОБОБЩЕНИЕ

1. При болните се регистрира персистиращ дисбаланс в профила на цитокинната секреция през двата клинични периода.
2. Промените в серумните концентрации на антивъзпалителните цитокини IL4, TGF β и провъзпалителния IFN γ през двата периода обективно отразяват клинично проявената активност на имунообусловения процес.
3. През пристъпа повишението на серумните нива на провъзпалителния TNF α се свързва с по – тежък дефицит.
4. През пристъпа повишените серумни нива на провъзпалителния IL17 са свързани с по – високи серумни концентрации на 25(OH)D.
5. Комплексният анализ на влиянието на изследваните показатели върху степента на EDSS в пристъп, показва зависимост между тежестта на дефицит и серумните нива на 25(OH)D, IL17 и TNF α през този период.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящото проучване е първото у нас, което изследва и сравнително анализира промените в серумните концентрации на 25(OH)D метаболита, Th1, Th17, Th2 медираната секреция на цитокини и тежестта на инвалидизация при МС пациенти с най – често срещаната пристъпно – ремитентна еволюция. Регулаторният имуен дисбаланс е с определящо значение за хронично - прогресивното развитие на имунообусловената деструкция на миелина и за ефекта от лечението. Съвременните методи за терапевтична интервенция не индуцират дефинитивен имуен толеранс към автоантигените и не прекратяват болестната еволюция. Днес се провеждат множество изследвания, за да се идентифицират нови фактори, участващи в аберантния имуен отговор с цел да се постигне оптимум супресия чрез съвместяване на подходящи имуоефективни препарати. Изпитванията за ролята на витамин Д в патогенезата на МС са аспект от съвременна концепция за комплексно контролиране на патологичния процес. Този възглед е причина да планираме и проведем настоящото проучване, в което е направен опит да се оцени ролята на 25(OH)D метаболита в патогенезата на болестта. За постигане на валидни доказателства и заключения са оформени две съпоставими групи – болни и контроли. Изследваните лабораторни показатели при пациентите през двата клинични периода – серумни концентрации на 25(OH)D, имунни показатели за интензивност на патологичния процес, са сравнени със стойностите при клинично здравите лица. Оценката на тези показатели се прави поотделно по времето на пристъп и ремисия в търсене на значими връзки между динамиката на 25(OH)D нивата, степента на неврологичен дефицит и цитокините през двете фази.

Анкетното регистриране характеризира контингента чрез данните за възрастта, през която е обективизиран първият МС пристъп, продължителността на болестната еволюция, развитие на последната екзацербация, степента на неврологичен дефицит.

Потвърждават се литературни данни от български и чужди автори за ранно начало на пристъпно – ремитиращата форма, до 30-та годишна възраст, за ниска степен на неврологичен дефицит при продължителност на болестта до 5 години, за връзка между възрастта, продължителността и кумулирането на инвалидизация. Всички участници в проучването са с хиповитаминоза Д – при здравите най – висок е относителният дял на лицата с недостатъчност, при пациентите най – висок е дялът на лицата с дефицит.

Хиповитаминоза Д е установена при голяма част от българската популация от проучването на А-М Борисова и съавт. 2012 г. Оценката на клинично значимите промени в зависимост от степента на нарушение в статуса на витамин Д – недостатъчност/дефицит, е определяща за профилактиката и лечението на заболявания с доказано участие на витамин Д в патологичния процес.

При пациентите от нашето проучване, през фазата на пристъп, се установи висока честота (71.7%) на лицата с дефицит в серумните концентрации на 25(OH)D. През този период средните нива на 25(OH)D са значимо понижени в сравнение с тези при контролите и въпреки достоверното им повишение през фазата на клинично подобрене, те не достигат стойността при здравите лица. Причинно – следствената връзка между дефицита на 25(OH)D в пристъп и степента на EDSS е негативна и значима, което е в съгласие с тезата за протективно действие на метаболита относно тежестта на инвалидизация. Нашето становище е подкрепено и от получените резултати за 3.43 пъти по – висок общ риск от възникване на МС при лицата с дефицит на 25(OH)D.

Персистиращият имунен дисбаланс при болните през двете фази свързваме с нарушен имунен толеранс, дължащ се на недостатъчно известни фактори вкл. от външната среда. През екзацербацията, период с утежнен неврологичен дефицит, доминират проинфламаторни имунни медиатори, 25(OH)D нивата са в прага приет за дефицит.

През периода на клинично подобрене значимо се увеличават серумните концентрации на 25(OH)D, IL4 и на CD4+CD25+FoxP3 обусловената секреция на TGFβ1. Получените резултати предполагат имуномодулираща активност, регистрирана при експерименталните модели: 1,25(OH)2D директно пренасочва Th1/Th2 баланса към Th2 медирана секреция на IL4; 1,25(OH)2D индуцира синтеза на Forkhead box protein 3, маркер на Т регулаторната CD4+CD25+ субпопулация. Анализът на резултатите от имунологичните изследвания определя антивъзпалителните IL4, TGFβ1 и провъзпалителния IFNγ, като обективни показатели за интензитета на имунообусловения процес през двата клинични периода. В литературата се откриват данни за корелация между имунната възпалителна активност в лезионните огнища и аксоналните увреди – основание да се обсъжда имунен механизъм на аксоналната трансекция, която е в пряка връзка с инвалидизацията. Ние установихме връзка между степента на дефицит в пристъп и серумните нива на 25(OH)D, TNFα и IL17.

Настоящото проучване предоставя обективни доказателства за участие на 25(OH)D, фактор от околната среда в патогенезата на Множествената склероза. Представените данни са основание да се проучва терапевтичния потенциал на метаболита да контролира разстроена имунна регулация и клинично проявената болестна активност. Установяването на научни доказателства за полза от прилагане на нови имуноефективни препарати в оптимална и безопасна доза, самостоятелно и в комбинация, ще подобри възможността на съвременните методи за терапевтична интервенция да модифицират болестния ход.

ИЗВОДИ

1. 71.1% от пациентите с МС в пристъп са с дефицит на 25(OH)D нивата в серума.
2. Серумните концентрации на 25(OH)D при болните са по – ниски от тези на здравите и през двата периода, като през екзацербацията разликата е сигнификантна.
3. При настъпване на клинично подобрене серумните концентрации на 25(OH)D са значимо по – високи в сравнение с тези от периода на утежнен неврологичен дефицит, но остават в прага приет за недостатъчност.
4. Серумните концентрации на 25(OH)D в пристъп негативно корелират с тежестта на дефицит по EDSS.
5. Установена е имуномодулираща активност на 25(OH)D върху риска от възникване на МС.
6. Серумните концентрации на IFN γ , IL4, TGF β 1 обективно отразяват активността на множествената склероза през двете фази – пристъп и ремисия.
7. Степента на неврологичен дефицит /EDSS/ в пристъп зависи от серумните нива на 25(OH)D, IL17 и TNF α през този период.

ПРИНОСИ

I. С научно – теоретично значение

1. За първи път у нас се проучват 25(OH)D нивата в серума при болни от Множествена склероза.
2. За първи път у нас се изследва причинно – следствената връзка между серумните концентрации на 25(OH)D, IFN γ , IL17, TNF α , IL4, TGF β 1, IL10 и тежестта на дефицит при МС пристъп и ремисия.

II. С научно – приложно значение

1. Високата честота на пациентите с дефицит на витамин Д е основание да се мониторира 25(OH)D нивата в серума с цел лечение и профилактика на болните с хиповитаминоза Д, чрез разработване на терапевтични и/или хранителни режими.
2. Установена е имуномодулираща активност на 25(OH)D върху риска от възникване на МС и тежестта на дефицит, което е основание да се проучва терапевтичния потенциал на витамин Д да модифицира болестния ход.
3. Мониторингът на TNF α , TGF β 1, IL4 концентрациите в серума през периодите на пристъп и ремисия е критерий за оценка на имунната възпалителна активност при МС пациенти.

СПИСЪК

на научните разработки свързани с темата на дисертацията

I. Публикации в научни списания

**1. G.S. Slavov, M.G. Manova, A.G. Trenova, I.I. Kostadinova, T.V. Vasileva, Z.I. Zahariev. Vitamin D Immunomodulatory Potential in Multiple Sclerosis. Folia Medica 2013;55(2):5-10.

- **покана за участие на първия автор** на Neurological Disorders Summit, Сан Франциско, 06-08 Юли, 2015 /участието е реализирано/

*2. G.S. Slavov, M.G. Manova, A.G. Trenova, I.I. Kostadinova, P.I. Pavlov, N.G. Mateva, Z.I. Zahariev. A prospective study on 25 hydroxyvitamin d serum levels in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. J Biomed Clin Res 2014;7(1):37-41.

- >**покана за участие на първия автор** в международен проект /участието е реализирано/

*3. G.S. Slavov, M.G. Manova, A.G. Trenova, S.V. Mantarova, V. Dosheva. Serum immune reactivity of IL17, IFN γ , TGF β 1 during relapse and remission in patient with Multiple Sclerosis. Научни трудове на съюза на учените, Пловдив, 2015;16:129-133.

**4. Георги Св. Славов, Мария Г. Манова, Анастасия Г. Тренова, Иванка И. Костадинова, Павел И. Павлов, Нонка Г. Матева, Захари И. Захариев. 25 hydroxyvitamin D и цитокини при Множествена склероза. Folia Medica, 2015 /под печат/.

5. A.Trenova,G.Slavov,M.Manova,I.Kostadinova.Cytokines and Disability in Interferon- β -1b Treated and Untreated Women with Multiple Sclerosis.Arch of Med Res 2014; 45:495-500.**IF 2.406.**

*6.A.Trenova, G. Slavov.Cytokines in Multiple Sclerosis – Possible Targets for Immune Therapies. J Neurol Exp Neurosci 2016; 1(2): 25-29.

*** - реферирано списание**

**** - списание с impact rang**

II. Съобщения на национални и международни научни форуми

1. Г. Славов, М. Манова, А. Тренова, И. Костадинова, П. Павлов, Н. Матева, З. Захариев. З. Проспективно проучване на серумни нива на 25 Hydroxyvitamin D при пациенти с Множествена склероза. Българска неврология 2014;15(1):113-114.
2. Г. Славов, М. Манова, А. Тренова, И. Костадинова, П. Павлов, Н. Матева, З. Захариев. Проспективно проучване на серумни нива на 25 Hydroxyvitamin D и цитокини при пациенти с Множествена склероза. Българска неврология 2014;15(1):113-114.
3. А. Trenova, G. Slavov, М. Manova, I. Kostadinova. Cytokines, disability and Betaferon treatment in women with Multiple sclerosis. 13th ESNI Course 2013,17-18, Porto, Portugal.
4. G. Slavov, А. Trenova, М. Manova, I. Kostadinova, V. Vasileva, Z. Zahariev. Vitamin D Immunomodulatory Potential in Multiple Sclerosis. Neurological Disorders Summit, San Francisco. 2015;1:80-81.

III. Цитирания

1. Georgi S. Slavov, Anastasiya G. Trenova, Mariya G. Manova, Ivanka I. Kostadinova, Tonka V. Vasileva, Zahari I. Zahariev. Vitamin D immunomodulatory potential in multiple sclerosis. *Folia Med* 2013;55(2): 5-9.

Цитирания – 3 автора

1.1. Gupta S, Ahsan I, Mahfooz N, Abdelhamid N, Ramanathan M, Weinstock-Guttman B. Osteoporosis and multiple sclerosis: risk factors, pathophysiology, and therapeutic intervention? *CNS Drugs* 2014; 28(8):731-42. doi: 10.1007/s40263-014-0173-3. **IF=4.376.**

1.2. Sintov AC, Yarmolinsky L, Dahan A, Ben-Shabat S. Pharmacological effects of vitamin D and its analogs: recent developments. *Drug Discov Today* 2014, Jun 16. pii: S1359-6446(14)00242-6. doi: 10.1016/j.drudis.2014.06.008. **IF=5.964.**

1.3. Lohse A. W. Expression of CD38, CD226, CD39, PD1 on T cells in chronic hepatitis B and their correlation with serum vitamin D levels. (dissertation):16-17, Hamburg 2014.

IV.Международен проект

1.Научно проучване на тема „Сезонно и географски зависима регулация на витамин Д klotho/fgf23 система при здрави лица“. Водещ изследовател от България, д-р Георги Славов. Проучването е съвместно с колективи от Дания, Литва, Финландия.

Ръководител на проекта: Alexandra Scholze, Assistant Professor, Dr. med., PhD, Clinical Research Unit,Department of Nephrology,Odense University Hospital, Klørvænget 6, 11th floor,5000Odense C,Denmark.

Одобрен от Етичната комисия към МУ- Пловдив, № Р – 7465 / 05.10.2015 г.

V. Наукометрични показатели:

Показател	Изисквания	Резултати на кандидата
Публикации, свързани с темата на дисертацията	3 в реферирани периодични списания*	6- 1 от тях е в списание с impact rang.
В международни списания	1	2
Под печат	1	1
Публикации с IF	Няма изисквания	1- IF 2.406
Научни съобщения	Няма изисквания	4- 2 от тях са в чуждестранно списание
Impact Factor	Няма изисквания	Общ от цитирания и публикации: 12,75 Индивидуален: 2,32

