

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Jūratė Garbaravičienė

**P-SELEKTINO KAIP BIOLOGINIO ŽYMENS TAIKYMAS
SERGANTIEMS ŽVYNELINE**

Daktaro disertacijos santrauka
Biomedicinos mokslai, medicina (06B)

Vilnius, 2014

Disertacija rengta 2008–2014 metais Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Infekcinių, krūtinės ligų, dermatovenerologijos ir alergologijos klinikoje bei Johano Volfgango Gėtės universiteto Dermatologijos, venerologijos ir alergologijos klinikoje, Frankfurte prie Maino (Vokietija)

Mokslinė vadovė

Prof. dr. Matilda Bylaitė-Bučinskienė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

Mokslinis konsultantas

Prof. dr. Wolf-Henning Boehncke (Dermatologijos ir venerologijos skyrius, Ženevos universiteto ligoninė, Ženeva, Šveicarija, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

Disertacija ginama Vilniaus universiteto Medicinos mokslo krypties taryboje.

Pirmininkas

Prof. habil. dr. Arvydas Ambrozaitis (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

Nariai:

Prof. habil. dr. Andris Rubins (Latvijos universitetas, Ryga, Latvija, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

Prof. dr. Arvydas Laurinavičius (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

Prof. dr. Jolanta Dadonienė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

Prof. dr. Brigita Šitkauskienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

Oponentai:

Prof. habil. dr. Vytautas Antanas Tamošiūnas (Valstybinis mokslinių tyrimų institutas Inovatyvios medicinos centras, biomedicinos mokslai, biologija – 01B)

Dr. Rūta Gancevičienė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

Disertacija bus ginama viešame Medicinos mokslo krypties posėdyje 2014 m. lapkričio 26 d. 12 val. Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų Raudonojoje salėje.

Adresas: Santariškių g. 2, LT-08661, Vilnius, Lietuva

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2014 m. spalio 25 d.

Su disertacija galima susipažinti Vilniaus universiteto bibliotekoje.

VILNIUS UNIVERSITY

Jūratė Garbaravičienė

P-SELECTIN AS A BIOMARKER IN PSORIASIS

Summary of doctoral dissertation
Biomedical Sciences, Medicine (06B)

Vilnius, 2014

The Doctoral Dissertation was prepared at the Clinic of Infectious, Chest diseases, Dermatovenereology and Allergology of Vilnius University, Faculty of Medicine, and Department of Dermatology, Venereology and Allergology of Johann Wolfgang Goethe University, Frankfurt am Main, Germany, in 2008-2014.

Scientific supervisor:

Prof. Dr. Matilda Bylaitė-Bučinskienė (Vilnius University, Biomedical sciences, Medicine – 06B)

Scientific consultant:

Prof. Dr. Wolf-Henning Boehncke (Department of Dermatology and Venereology, Geneva University Hospitals, Geneva, Switzerland, Biomedical sciences, Medicine – 06B)

The Doctoral Dissertation will be defended at the Medical Research Council of Vilnius University, Faculty of Medicine.

Chairman:

Prof. Habil. Dr. Arvydas Ambrozaitis (Vilnius University, Biomedical Sciences, Medicine – 06B)

Members:

Prof. Habil. Dr. Andris Rubins (University of Latvia, Riga, Latvia, Biomedical Sciences, Medicine – 06B)

Prof. Dr. Arvydas Laurinavičius (Vilnius University, Biomedical Sciences, Medicine – 06B)

Prof. Dr. Jolanta Dadonienė (Vilnius University, Biomedical Sciences, Medicine – 06B)

Prof. Dr. Brigita Šitkauskienė (Lithuanian University of Health Sciences, Biomedical Sciences, Medicine – 06B)

Opponents:

Prof. Habil. Dr. Vytas Antanas Tamošiūnas (The Centre for Innovative Medicine under the National Institute for Scientific Researches, Biomedical Sciences, Biology – 01B)

Dr. Rūta Gancevičienė (Vilnius University, Biomedical Sciences, Medicine – 06B)

The official defense of the Dissertation will be held at the open session of the Medical Research Council on 26th November, 2014 at 12.00 p.m. in the Red Hall of Vilnius University Hospital Santariškių Klinikos.

Address: Santariškių str. 2, LT-08661, Vilnius, Lithuania

The mailing date of the summary of the doctoral dissertation: 25th October, 2014.

The dissertation is available in the Vilnius University Library.

SANTRUMPOS

BSA – angl. *Body Surface Area*, - kūno paviršiaus plotas

CRB – C- reaktyvus baltymas

ELISA – angl. enzyme-linked immunosorbent assay,- fermentinis imunosorbentinis tyrimas

IFN- γ – interferonas- γ

IL – interleukinas

IQR – angl. *Interquartile range*, - tarpkvartilinis intervalas

MMP-1 – matrikso metaloproteinazė-1

NPF-PS – nacionalinio psoriazės fondo psoriazės indeksas

PASI – angl. *Psoriasis Area and Severity Index*, - psoriazės ploto ir sunkumo indeksas

TGF- β – transformuojantis augimo faktorius – β

Th – T-helperiai

TIMP-1 – audinių metaloproteinazių inhibitorius-1

TNF- α – tumoro nekrozės faktorius – α

tP-Selektinas – tirpusis P-selektinas

UVB – ultravioletiniai B (spinduliai)

1. ĮVADAS

Žvynelinė – tai lėtinė odos, nagų ir sąnarių liga, kuri išsivysto bet kuriame amžiuje, nors dažniausiai ja serga suaugusieji (Nestle et al., 2009). Apie 2 proc. populiacijos varginanti žvynelinė yra ne vien tik dermatologinis susirgimas, tai didelė sveikatos problema, daranti neigiamą įtaką paciento gyvenimo kokybei (Augustin et al., 2008).

Žvynelinės imunopatogenezės teorija aiškinama poliarizuotu Th1 ir Th17 ląstelių atsaku (Hong et al., 1999), (Powrie et al., 1994), (Martin et al., 2013), kuris apibūdinamas pakitusia svarbių citokinių, pavyzdžiui, IL-1, IL-2, IL-6, IL-17, IL-21, IL-22, IL-23, IFN- γ ir TNF- α , sekrecija (Mak et al., 2009), (Pietrzak et al., 2008). Dėl transformuotos citokinių pusiausvyros įtakos kyla specifinių odos pokyčių: sutrinka keratinocitų diferenciacija, suintensyvėja epidermio proliferacija, ir tuo pat metu paveikiamas sisteminis uždegiminis atsakas. Ilgą laiką žvynelinė laikyta izoliuota odos liga. Neseniai įrodyta, kad žvynelinei būdingas nedidelio laipsnio sisteminis uždegimas (Griffiths and Barker, 2007). Be to, kliniškai odos paraudimu ir pleiskanojimu pasireiškianti liga yra susijusi su rimtomis gretutinėmis ligomis, pavyzdžiui, koronarine širdies liga, rezistencija insulinui, vėžiu, depresija ir kitomis būklėmis (Brauchli et al., 2009b), (Ludwig et al., 2007), (Boehncke et al., 2007), (Brauchli et al., 2009a), (Kurd et al., 2010). Lėtinėms uždegiminėms ligoms būdingas padidėjęs uždegiminių mediatorių lygis (Chung, 2005), (Nielsen and Rask-Madsen, 1996). Žvyneline sergančių pacientų sisteminio uždegimo būklė gali būti įvertinta ištyrus ir radus padidėjusį C-reaktyvaus baltymo (CRP) kiekį (Strober et al., 2008), padidėjusį uždegiminių citokinių kiekį (Nickoloff, 2007), (Lowes et al., 2007), taip pat aptikus suaktyvintų trombocitų (Tamagawa-Mineoka et al., 2008). Pažymėtina, kad suaktyvinti trombocitai randami ir rūkalių organizme (Pernerstorfer et al., 1998), sergant uždegimine žarnyno liga (Fagerstam et al., 2000), (Collins et al., 1994), atopiniu dermatitu (Kasperska-Zajac et al., 2004), bronchų astma (Moritani et al., 1998), alerginiu kontaktiniu dermatitu (Ludwig et al., 2010), cukriniu diabetu (Tschoepe et al., 1993), (Kopp et al., 1998) ir koronarine širdies liga (Gawaz et al., 1997), (Mathur et al., 2001), (Furman et al., 1998), (Chung et al., 2009).

Auksinis standartas, vertinant klinikinį psoriazės sunkumą, šiuo metu yra PASI (angl. *Psoriasis Area and Severity Index*, psoriazės ploto ir sunkumo indeksas), kuris apibūdina bėrimų išplitimo mastą ir bėrimų sunkumą, charakterizuojamą eritema, infiltracija ir pleiskanojimu. Deja, šis metodas turi trūkumų. PASI naudojamos skalės yra siauros ir mažo jautrumo, todėl maži pokyčiai nėra gerai apibūdinami (Ashcroft et al., 1999). Be to, PASI vertinimas užima nemažai laiko ir pritaikomas daugiausia plokštelinei žvynelinės formai vertinti. Galiausiai, PASI skaičiavimas yra gana komplikotas kasdieną praktikuojantiems gydytojams, kurie nedalyvauja klinikinėse studijose. Taigi, žvynelinės sunkumui nustatyti naudojamų klinikinų priemonių trūkumai skatina ieškoti naujų ir objektyvių metodų.

Keletas objektyvių laboratorinių rodiklių jau buvo pasiūlyti pastaruoju metu kaip alternatyvūs žvynelinės klinikinio sunkumo žymenys, siekiant pakeisti kliniskus metodus PASI, BSA (angl. *Body Surface Area*, kūno paviršiaus plotas) ar NPF-PS (angl. *National Psoriasis Foundation Psoriasis Score*, nacionalinio žvynelinės fondo žvynelinės indeksas). Nors daugybės patofiziologiškai žvynelinei svarbių citokinių, tokių kaip TNF- α , IL-6, IL-8 ar IL-17, koncentracija serume yra padidėjusi, pasirodė, kad tik kelių iš tokių mediatorių, pvz., IFN- α , IL-12 ir IL-18, koncentracija koreliuoja su klinikiu žvynelinės aktyvumu ir sunkumu (Arican et al., 2005). Remdamasi tokiais rezultatais, Flisiak mokslinė grupė pasiūlė sudėtinę formulę, apimančią TGF- β 1, TIMP-1, MMP-1 ir IL-18 lygius plazmoje, ir atskleidė patikimą šio rodiklio koreliaciją su PASI rodikliu, skirtu klinikiniam žvynelinės sunkumui vertinti (Flisiak et al., 2008). Šis metodas praktiniu požiūriu, deja, nėra optimalus, nes tokiam rodikliui apskaičiuoti reikia laiko, be to, daugelio rodiklių laboratorinės matavimo sąnaudos gana nemažos. Didėjantis susidomėjimas ieškant objektyvesnių standartizuotų biologinių žymenų psoriazei skatino atlikti tyrimus, kurie padėtų rasti vertingą priemonę, leidžiančią įvertinti ir ligos sunkumą, ir sisteminio uždegiminio proceso lygmenį (Prey et al., 2010).

Uždegiminių ląstelių migracija ir infiltracija į odą yra sudėtingas procesas, kurį reguliuoja daug mediatorių. Leukocitų transmigracijos procesas iš kraujo tėkmės į uždegimo pažeistą odą skirstomas į etapus: cheminio pritraukimo, slinkimo, sustabdymo ir adhezijos prie kraujagyslių endotelio (Butcher and Picker, 1996), (von Andrian and

Mackay, 2000). Šiam nuosekliai tam tikra tvarka vykstančiam ikiuždegiminiam procesui ir veiksmingai leukocitų ir endotelio ląstelių tarpusavio sąveikai reikalingas trombocitų ekspresuojamas P-selektinas (Schon et al., 2004), (Vestweber and Blanks, 1999). Moksliniais tyrimais buvo atskleista, kad P-selektinui būdingas platus biologinių funkcijų diapazonas: jis dalyvauja trombozės, aterosklerozės, taip pat uždegimo procesuose (Burger and Wagner, 2003), (Kansas, 1996).

P-selektinas, dar vadinamas CD62P, granulių membranos baltymu-140, yra sintetinamas ir kaupiamas specifinėse granulėse, t.y. α -granulėse trombocituose ir Weibel-Palade kūneliuose endotelio ląstelėse. P-selektinas - svarbi ląstelių adhezijos molekulė, dalyvaujanti ląstelių tarpusavio sąveikoje, ir todėl labai svarbi uždegimo procesuose. Tyrimuose buvo parodyta, kad suaktyvinti P-selektiną ekspresuojantys trombocitai dėl jų pačių sekretuojamų mediatorių bei ekspresuojamų adhezinių molekulių suaktyvina leukocitus ir endotelį, ir padidina palei odos mikrokraujagyslių endotelį slenkančių leukocitų kiekį (Ludwig et al., 2004). Eksperimentuose su gyvūnais atskleista, kad nokautuotų (*knock-out*) pelių (Mayadas et al., 1993), (Robinson et al., 1999), kurių organizme nėra P-selektino, palyginti su kontroliniais gyvūnais, organizmuose leukocitų slinkimas palei endotelį ir ekstravazacija į audinius sutrinka, pvz., susilpnėja eksperimentiškai sukulto alerginio kontaktinio dermatito atsakas (Ludwig et al., 2010).

Moksliniais tyrimais atskleista, kad odos uždegimo metu P-selektino vaidmuo leukocitų ekstravazacijoje – esminiame uždegiminio infiltrato vystymosi etape – yra labai svarbus. Trombocitų ekspresuojamo P-selektino reikšmė T-limfocitų sukeltamų ligų metu, pvz., sergant žvyneline (Christophers, 2001), buvo įrodyta eksperimentiniais tyrimais, taip pat patvirtinta studijose, kuriose naudoti specifiniai antiselektininiai junginiai. Šio pobūdžio tyrimai atskleidė naudingą prieš selektinus nukreiptą poveikį uždegiminių būklių metu, pavyzdžiui, sergantiems lėtine obstrukcine plaučių liga arba bronchų astma (Beeh et al., 2006), (Watz et al., 2013). Taigi, bendrų patofiziologinių uždegiminių mechanizmų supratimas ir biologinio žymens sisteminiam uždegimui aptikimas padėtų tiksliau įvertinti ligos sunkumą ir užkirsti kelią nepageidaujamoms komplikacijoms sergantiems žvyneline.

Šio tyrimo metu dėmesys buvo sutelktas į trombocitų ekspresuojamo P-selektino, kaip galimo sisteminio uždegimo biologinio žymens, vertę sergantiems uždegiminėmis odos ligomis, t. y. žvyneline, bakterinėmis odos infekcijomis, kojų opomis, dilgėlinė, lokalizuota egzema ir eritrodermija, kartu vertinant ir tradicinius biologinius uždegimo žymenis. Be to, buvo tiriama sergančių žvyneline trombocitų ekspresuojamo P-selektino koreliacija su klinikiniu šios lėtinės uždegiminės ligos sunkumu.

Žvynelinė iš tiesų yra sudėtinga būklė – ja sergant odos uždegimas yra tik dalis ligos sukeltų pokyčių (Mehta et al., 2011). Žvynelinę lydi lėtinis nedidelio laipsnio sisteminis uždegimas, kuris šiuo metu yra pripažintas ir kaip vienas iš širdies ir kraujagyslių ligų rizikos veiksnių (Maseri, 1997). Šis pastaraisiais metais nustatytas ryšys atskleidžia, kad žvynelinės pacientų, ypač sergančių vidutinio sunkumo ar sunkia forma, priežiūra, besiremianti sisteminį uždegimą atspindinčiu žymeniu, galėtų būti labai svarbi vertinant gydymo veiksmingumą, sisteminio uždegimo mastą ir ateityje gresiančių gretutinių ligų ar mirties riziką. Norint įvertinti šiuos paminėtus parametrus, vien tik PASI vertės nepakanka, todėl siekėme sužinoti, koks P-selektino lygis randamas sergant žvyneline, ar šis žymuo gali atskleisti ligos sunkumą ir atspindėti sisteminio uždegimo mastą, taip pat nustatyti, ar ši priemonė yra specifinis rodiklis sergant tam tikromis odos uždegiminėmis ligomis.

Mokslinio darbo tikslas:

Įvertinti ląstelių adhezijos molekulę P-selektiną kaip galimą biologinį žymenį sergantiems žvyneline.

Mokslinio darbo uždaviniai:

1. Įvertinti trombocitų P-selektino ekspresijos lygį žvyneline ir dažniausiomis odos uždegiminėmis ligomis sergančių pacientų kraujyje ligai paūmėjus ir remisijos metu.

2. Palyginti žvyneline sergančių pacientų trombocitų P-selektino ekspresijos lygio, matuoto ligai paūmėjus ir remisijos metu, pokytį su tuo pačiu metu matuotais PASI ir atskirų PASI komponentų pokyčiais.

3. Ištirti žvyneline ir dažniausiomis uždegiminėmis odos ligomis sergančių pacientų koreliaciją tarp trombocitų P-selektino lygio ir uždegimo žymenų CRB bei leukocitų kiekio kraujyje.

4. Įvertinti koreliaciją tarp trombocitų P-selektino lygio ir tirpiojo P-selektino kiekio, matuotų tam pačiam uždegimine odos liga sergančiam pacientui.

1.1. Mokslinio darbo naujumas

Tai pirmas disertacinis darbas, kuriame tyrinėjama trombocitų P-selektino ekspresija didesnėje žvyneline ir dažniausiomis uždegiminėmis odos ligomis (bakterinėmis odos infekcijomis, kojų opomis, dilgėline, lokalizuota egzema, mazgeliniu niežuliu ir eritrodermija) sergančių pacientų kohortoje.

Uždegiminėmis odos ligomis sergantiems pacientams nustatytos trombocitų ekspresuojamo P-selektino vertės buvo palygintos su tradiciniais uždegimo žymenimis – CRB ir leukocitų kiekiu.

Be to, šiame tyrime pirmą kartą buvo atliktos analizės, nagrinėjant ryšį tarp žvyneline sergančių asmenų trombocitų P-selektino lygio ir PASI bei atskirų PASI komponentų.

1.2. Mokslinio darbo praktinė reikšmė

Pirmiausia, atlikto bandomojo tyrimo rezultatai parodė, kad trombocitai yra suaktyvinti esant uždegiminei būklei: paūmėjus žvynelinei ir dažniausioms uždegiminėms odos ligoms, nustatyta padidėjusi trombocitų P-selektino ekspresija. Taigi, gautieji rezultatai patvirtino ląstelių adhezijos molekulės P-selektino vaidmenį sisteminio uždegimo procese, vykstančiame sergančiųjų uždegiminėmis odos ligomis organizmuose.

Antra, tyrimo rezultatai atskleidė, kad sergant uždegiminėmis odos ligomis, padidėjęs trombocitų P-selektino ekspresijos lygis remisijos metu sumažėja. Sergantiems žvyneline taip pat nustatyta, kad P-selektinas sumažėja remisijos metu, be to, patvirtinta patikima koreliacija tarp PASI ir P-selektino. Taigi, ląstelių adhezijos molekulė P-selektinas galėtų būti objektyviu biologiniu žymeniu vertinant klinikinį žvynelinės sunkumą ir gydymo veiksmingumą.

Galiausiai, uždegiminėmis odos ligomis sergančių pacientų kraujyje nustatyta patikima koreliacija tarp P-selektino lygio, tirta skirtingais metodais, t.y. trombocitų ekspresuojamo P-selektino, tirta tėkmės citometrijos būdu, ir plazmos tirpiojo P-selektino, tirta fermentiniu imunosorbentiniu (ELISA) metodu. Remiantis gautų rezultatų duomenimis, P-selektinui nustatyti galima būtų taikyti paprastesnį ir patogesnį ELISA tyrimo metodą.

1.3. Ginamieji disertacijos teiginiai

1. Paūmėjus žvynelinei ir dažniausioms uždegiminėms odos ligoms, kraujyje esantys trombocitai yra suaktyvinti.
2. Trombocitų P-selektino ekspresija yra glaudžiai susijusi su žvynelinės klinikiu sunkumu.
3. Žvyneline sergančių pacientų trombocitų ekspresuojamo P-selektino lygis yra susijęs su sisteminio uždegimo žymenimis.

2. TIRIAMOJI MEDŽIAGA IR TYRIMO METODIKA

2.1. Tiriamųjų charakteristika ir tyrimo eiga

Šiam tyrimui pritarė vietinė Vokietijos etikos komisija. Per vienerius metus į tyrimą buvo įtraukti 147 dėl paūmėjusių dažniausių uždegiminių dermatizių hospitalizuoti pacientai: 47 sergantys žvyneline, 13 – bakterinėmis odos infekcijomis, 10 – kojų opomis, 13 – dilgeline, 28 – lokalizuota egzema, 11 – mazgeliniu niežuliu ir 25 –

eritrodermija (1 lentelė). Pacientų vidutinis amžius buvo 46 metai (18 iki 95), jie buvo hospitalizuoti dėl paūmėjusios dermatozės ligoninėje vidutiniškai 7 ± 3 dienas. 47 žvyneline sergančių pacientų grupėje 41 asmeniui buvo diagnozuota paprastoji žvynelinė, 3 – lašelinė žvynelinė, 1 – pustulinė žvynelinė, 1 – raukšlių žvynelinė ir 1 – delnų ir padų žvynelinė.

1 lentelė. Odos ligomis sirgusių pacientų, kuriems buvo tirtas P-selektino kiekis, charakteristika

Odos liga	Tirtų asmenų skaičius	Vidutinis amžius, metais	Vidutinė hospitalizacijos trukmė, dienomis
Žvynelinė	47	59	9
Bakterinės odos ligos	13	45	7
Kojų opos	10	63	10
Dilgėlinė	13	35	7
Lokaluota egzema	28	59	9
Mazgelinis niežulys	11	58	5
Eritrodermija	25	58	8

Kontrolinę grupę sudarė 41 sveikas savanoris, kurių vidutinis amžius buvo 52 metai (nuo 18 iki 78), ir tarp jų nebuvo sergančių odos ligomis.

Pacientų įtraukimo į tyrimą kriterijai:

- (i) pacientai, kuriems naujai diagnozuota ūmi dermatozė ar kurie kreipėsi dėl lėtinės dermatozės atkryčio;
- (ii) vyresni nei 18 metų amžiaus;
- (iii) pageidavimas dalyvauti tyrime ir rašytinis informuoto asmens sutikimas.

Pacientų neįtraukimo į tyrimą kriterijai:

- (i) per pastarąsias dvi savaites buvo vartoti vitamino K antagonistai arba mažos molekulinės masės heparinai;
- (ii) per pastarąsias dvi savaites buvęs aiškus susirgimas bakterinėmis ar virusinėmis infekcijomis;
- (iii) per pastaruosius tris mėnesius įvykusi veninė ar arterijų tromboembolija;
- (iv) per pastarąsias dvi savaites turėję chirurginių intervencijų asmenys.

Pacientams buvo leidžiama vartoti aspiriną, tiklopidiną ar klopidoarelį.

Odos uždegimo sunkumas sergantiesiems odos ligomis paūmėjimo ir remisijos periodais buvo vertintas remiantis:

- (i) klinikiu vaizdu, t.y. odos bėrimų, paraudimo, ar opos pokyčiais;
- (ii) laboratoriniais testais t.y CRB, leukocitų kiekiu, P-selektino lygiu.

Lėtinės uždegiminės ligos žvynelinės klinikinis sunkumas buvo vertintas remiantis psoriazės ploto ir sunkumo indekso (angl. *Psoriasis Area and Severity Index-PASI*) balu, kuris, be to, buvo analizuotas ir nuodugniau, t. y. atskirai vertinti eritemos, infiltracijos ir pleiskanojimo PASI.

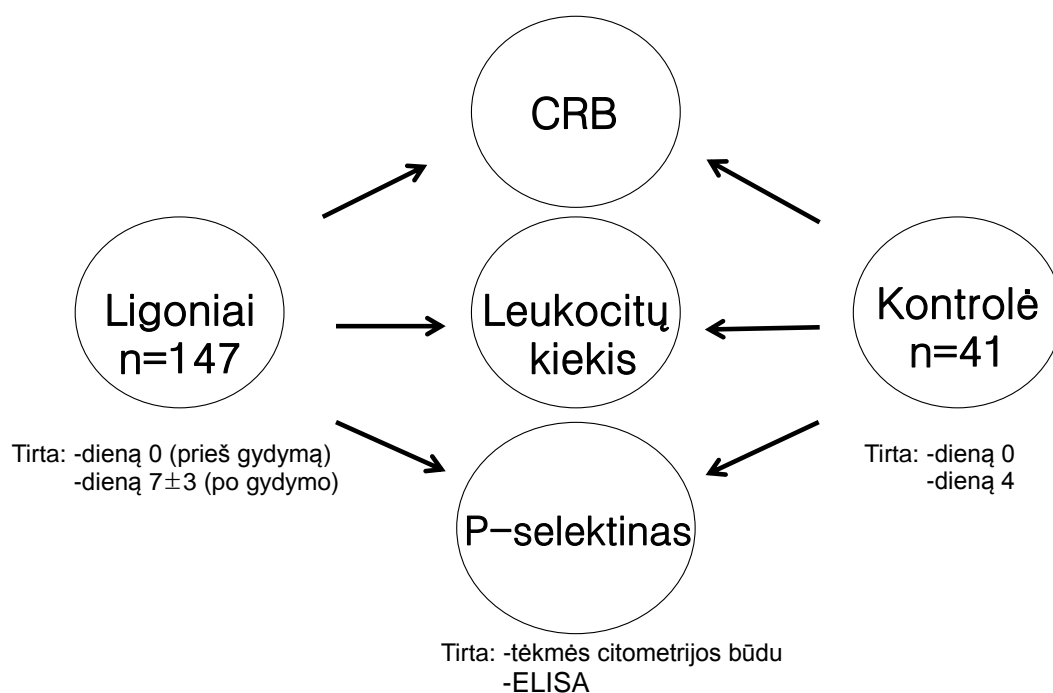
Ligoninėje gydytų žvyneline sirgusių pacientų ligos remisija buvo pasiekta taikant įvairius gydymo metodus: vietškai veikiančius vaistus, UVB-311 fototerapiją (31 pacientas), sistemiškai veikiančius retinoidus (2 pacientai), kremo-PUVA fototerapiją (8-metoksipsoraleno kremas + ultravioletiniai spinduliai A, 2 pacientai), metotreksatą (5 pacientai) ir ciklosporiną A (2 pacientai).

Siekiant pagerinti kitomis uždegiminėmis dermatozėmis sirgusių pacientų odos būklę, priklausomai nuo ligos, buvo gydoma sisteminiais ar vietiniais antibiotikais ar steroidais, UVB-311/UVA fototerapija ar kitais metodais.

2.2. Kraujo mėginių paėmimas

Kraujo mėginiai iš dermatologinėmis ligomis sergančių pacientų ($n = 147$) buvo imami du kartus: paūmėjimo metu prieš pradėdant gydymą, ir vidutiniškai septintą dieną, kliniškai pasveikus ar pasiekus uždegiminės odos ligos remisiją. Iš kiekvieno paciento vienu metu paimtuose trijuose kraujo mėginiuose buvo tiriami uždegimo žymenys: CRB, leukocitų kiekis bei P-selektinas (1 pav.). Tie patys parametrai buvo tiriami kontroliniams asmenims du kartus: pirmąją ir penktąją dienomis, norint atmesti „diena nuo dienos“ priklausantį uždegiminių žymenų ir P-selektino reikšmių svyravimą asmenims, kurie nesiskundžia sveikatos sutrikimais.

Citruota kraujo plazma tirpiojo P-selektino nustatymui buvo renkama iš tų uždegiminėmis odos ligomis sergančių pacientų, kurie sutiko duoti kraujo mėginius papildomiems tyrimams ($n=17$).



1 paveikslas. Bandomojo tyrimo schema: tiriamieji ir jų kraujyje analizuojami uždegimo žymenys bei P-selektino lygis.

2.3. Tyrimo metodika

2.3.1. Leukocitų kiekio ir CRB nustatymas

Leukocitų kiekio kraujyje matavimas buvo atliekamas centralizuotoje laboratorijoje, naudojant automatinį hematologinį analizatorių. CRB kiekybinis tyrimas taip pat buvo atliekamas centralizuotoje laboratorijoje, taikant imuninį – turbidimetrinį metodą, naudojant automatinius analizatorius. Visų automatinių metodų metu buvo naudojamas automatinis kalibravimas.

2.3.2. Trombocitų suaktyvinimo žymens P-selektino (CD62P) lygio nustatymas tēkmės citometrijos metodu

Norint nustatyti trombocitų suaktyvinimą (P-selektino lygį), į vakuuminius mėgintuvėlius (S-Monovette, Sarstedt, Nuembrecht, Vokietija), kuriuose buvo viena dešimtoji tūrio 0,106 Mol natrio citrato tirpalo, iš paciento vidurinės alkūnės venos, nestipriai užspaudus timpą, buvo imama 3 ml kraujo ir nedelsiant sumaišoma su antikoagulantu, vengiant mėginio kratymo ir putų susidarymo. Tēkmės citometrijos tyrimas buvo atliekamas per 30 min. paėmus kraujo mėginį, taip siekiant išvengti dirbtinai padidėjusio P-selektino lygio dėl trombocitų suaktyvinimo mėgintuvėlyje.

5 μl citruoto neapdoroto kraujo buvo dažoma 10 μl fluorescuojančiu izotiocianidu (FITC) paženklintais anti-CD41a (Becton Dickinson) antikūnais ir 10 μl fikoeritriu paženklintais anti-CD62P (Becton Dickinson) monokloniniais antikūnais, ir praskiestas 50 μl trombocitų buferiu (145 mM natrio chlorido, 5 mM kalio chlorido, 2 mM magnio chlorido, 10 mM gliukozės, 0,2 mM dinatrio vandenilio fosfato ir 10 mM HEPES tirpalu, pH 7,4). Be to, 5 μl citruoto neapdoroto kraujo, nudažyto 10 μl pelės IgG1 monokloniniais antikūnais, konjuguotais su fikoeritriu, anti-CD41a konjuguotu su FITC ir praskiesto 50 μl trombocitų buferiu, buvo naudojama kaip izotipui neigiama kontrolė, norint nustatyti nespecifinį prisijungimą. Po 15 min. inkubacijos tamsoje kambario temperatūroje mėginiai buvo skiedžiami 500 μl CellWash (Becton Dickinson) tirpalu, ir

iš karto tiriami tėkmės citometru (FACSCalibur, Becton Dickinson). Trombocitų, ant kurių paviršiaus nustatytas ekspresuojamas P-selektinas, dalis procentais buvo apibrėžiama kaip specifiskai antikūnus prijungusi frakcija (t. y. CD62P teigiama), atimant nespecifinę medžiagą prisijungusių trombocitų (t. y. susijungusių su IgG1-fikoeritrino konjugatu) frakciją, iš 5000 tėkmės citometro tirtų trombocitų. Gauti rezultatai išreikšti kaip aktyvintų trombocitų dalis procentais.

2.3.3. Tirpiojo P-selektino (tP-selektino) kiekio nustatymas imunofermentiniu metodu (ELISA)

Tirpusis P-selektinas (tP-selektinas) buvo tiriamas citruotoje pacientų plazmoje ELISA metodu. Norint iširti tirpujį P-selektiną, buvo ruošiama mažai trombocitų turinti plazma: citruotas kraujas buvo centrifuguojamas Megafuge 1.0R (Kendro Laboratory Equipment, Osterode, Vokietija) 1600 g 10 minučių; toliau, siekiant gauti plazmą be trombocitų, antrasis centrifugavimo etapas buvo atliekamas 2880 g režimu 10 minučių. Gautos plazmos mėginiai buvo saugomi -80°C temperatūroje, o vėliau juose buvo tiriama tirpiojo P-selektino koncentracija.

Tirpiojo P-selektino koncentracija plazmoje buvo nustatyta 17 uždegiminėmis odos ligomis sergančių pacientų (10 – žvyneline, 2 – bakterinėmis odos infekcijomis, 2 – kojų opomis, 2 – lokalizuota egzema), naudojant komercinę imunofermentinę sistemą žmogaus tP-selektino kiekiui nustatyti (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), vadovaujantis gamintojo pateiktomis instrukcijomis. Mėginiai matuoti ELISA plokštelėje trimis egzemplioriais, kiekvienam jų sunaudojant po 100 μl plazmos tūrio; mėginiai buvo 20 kartų praskiesti ELISA rinkinyje esančiu mėginio skiedikliu ir mikroplokštelių skaitytuvu (MR5000; Dynex Technologies/Dynatech Laboratories, USA) buvo matuojama 650 nm ir 450 nm bangos absorbcija. Tirpiojo P-selektino koncentracija buvo nustatoma naudojant standartinę kreivę, gautą iš kiekvieno standartinio tirpalo vidutinės absorbcijos vertės y ašyje ir koncentracijos x ašyje, ir per gautus taškus grafike nubrėžiant atitinkančią kreivę. Kiekvieno mėginio koncentracija

buvo nustatoma apskaičiuojant tP-selektino koncentraciją, atitinkančią vidutinę absorbcijos vertę standartinėje kreivėje.

2.4. Statistinė analizė

Statistinė analizė buvo atlikta naudojant BIAS statistinę programinę įrangą, skirtą *Windows* operacinei sistemai, versija 8.4, www.bias-online.de. P vertės buvo apskaičiuotos taikant dvipusį *t* testą; statistiškai reikšminga buvo laikoma $p < 0,05$ vertė.

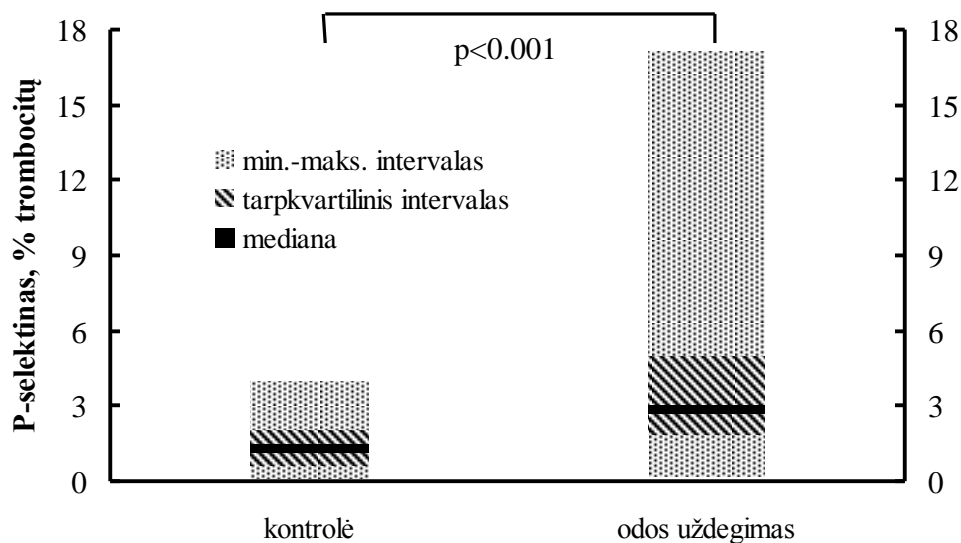
3. REZULTATAI

Trombocitų suaktyvinimas buvo nustatomas remiantis fiziologine trombocitų α -granulių degranuliacija ir P-selektino (CD62P antigeno) translokacija į trombocitų paviršių. Ši molekulės ekspresija buvo vertinta tėkmės citometrijos metodu 147 stacionariems pacientams, ir 41 kontroliniam asmeniui.

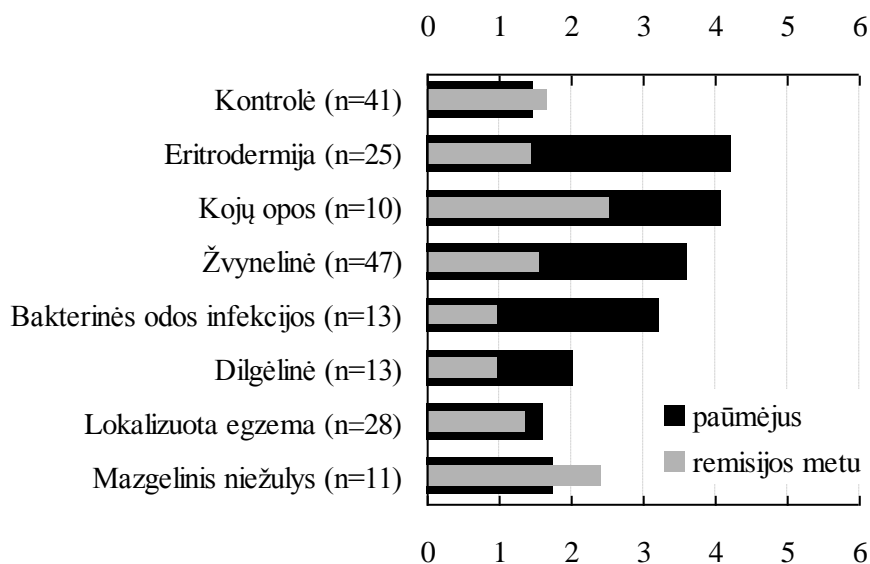
3.1. Trombocitų P-selektino ekspresija sergantiems žvyneline ir dažniausiomis uždegiminėmis odos ligomis

Paūmėjus uždegiminėms dermatozėms, sergančiųjų pacientų kraujyje prieš gydymą buvo nustatyta padidėjusi trombocitų P-selektino ekspresija, palyginti su sveikais savanoriais iš kontrolinės grupės (3,01 % [IQR 1,77–4,94] ir 1,46 % [IQR 0,57–2,01], $p < 0,001$) (2 pav.).

Sunkiomis odos ligomis sergantiems pacientams vidutinis suaktyvintų trombocitų kiekis buvo daugiau kaip du kartus didesnis, palyginti su kontrolinės grupės tiriamaisiais: sergantiems eritrodermija – 4,32 % [IQR 3,03–5,02], kojų opomis – 4,08 % [IQR 2,42–5,39], žvyneline – 3,66 % [IQR 2,59–6,7], bakterinėmis odos infekcijomis – 3,22 % [IQR 2,21–4,87], $p < 0,001$ (3 pav.). Statistiškai reikšmingai padidėjusi P-selektino ekspresija taip pat buvo nustatyta dilgėline (2,04 % [IQR 1,13–3,94, $p < 0,01$]) ir lokalizuota egzema (1,62 % [IQR 0,95–3,3, $p < 0,05$]) sergantiems pacientams, bet ne tiems, kurie sirgo mazgeliniu niežuliu (1,76 % [IQR 0,69–1,99]).



2 paveikslas. Trombocitų suaktyvinimas, vertintas matuojant P-selektino ekspresiją, buvo ryškiai padidėjęs paūmėjus odos uždegiminėms ligoms (3,01 % [IQR 1,77–4,94], $n = 147$), palyginti su kontroline grupe (1,46 % [IQR 0,57–2,01], $n = 41$), $p < 0,001$. Nurodytos medianos, 1-osios ir 3-osios kvartilės, taip pat mažiausios ir didžiausios vertės.

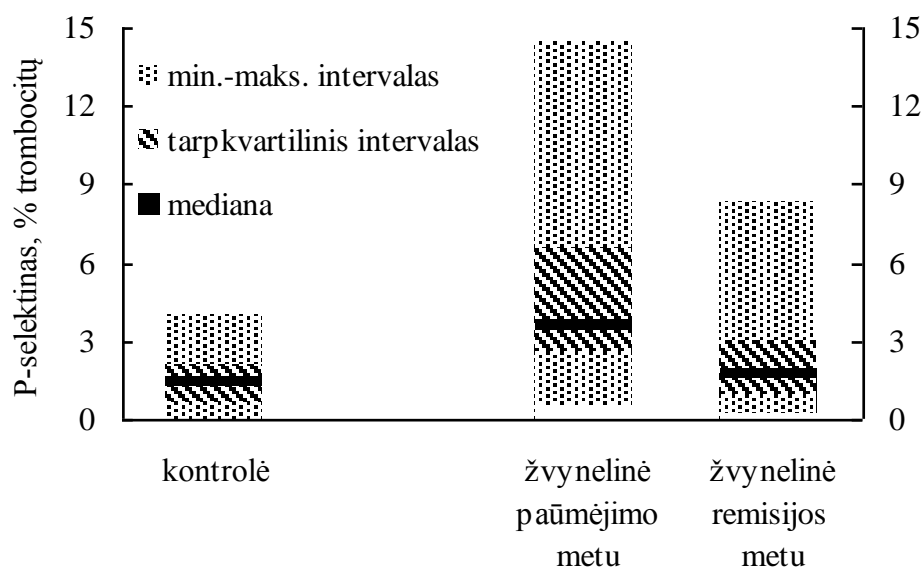


3 paveikslas. P-selektino ekspresija ant trombocitų paviršiaus, nustatyta tėkmės citometrijos metodu uždegiminėms odos ligoms paūmėjus ir remisijos metu.

P-selektiną ekspresuojančių trombocitų kiekį pakartotinai ištyrus uždegiminėmis odos ligomis sergančių pacientų kraujyje visišką ar dalinę klinikinę remisiją metu po sėkmingo gydymo, buvo rastas reikšmingas šių trombocitų medianos sumažėjimas nuo 3,01 % iki 1,5 % ($p < 0,000001$). Sėkmingas žvyneline sergančių pacientų gydymas lėmė reikšmingą P-selektino kiekio sumažėjimą – 52,2 %. Kitomis odos uždegiminėmis ligomis sergančių pacientų analizė atskleidė, kad per gydymo ligoninėje laikotarpį bakterinėmis odos infekcijomis sergančių pacientų aktyvintų trombocitų kiekis sumažėjo ypač daug, t. y. 70,2 %. Eritrodermija sergančių pacientų P-selektino kiekis sumažėjo 66,1 %. Lėtinės kojų opos užgijo tik iš dalies, atitinkamai P-selektino ekspresija sumažėjo 38,2 %. Dėl dilgėlinės ligoninėje gydytų pacientų P-selektino kiekis sumažėjo 52,9 %, o gydytų dėl lokalizotos egzemos – vos 16,4 %.

3.2. Trombocitų ekspresuojamo P-selektino koreliacija su PASI ir atskirais PASI komponentais sergantiems žvyneline

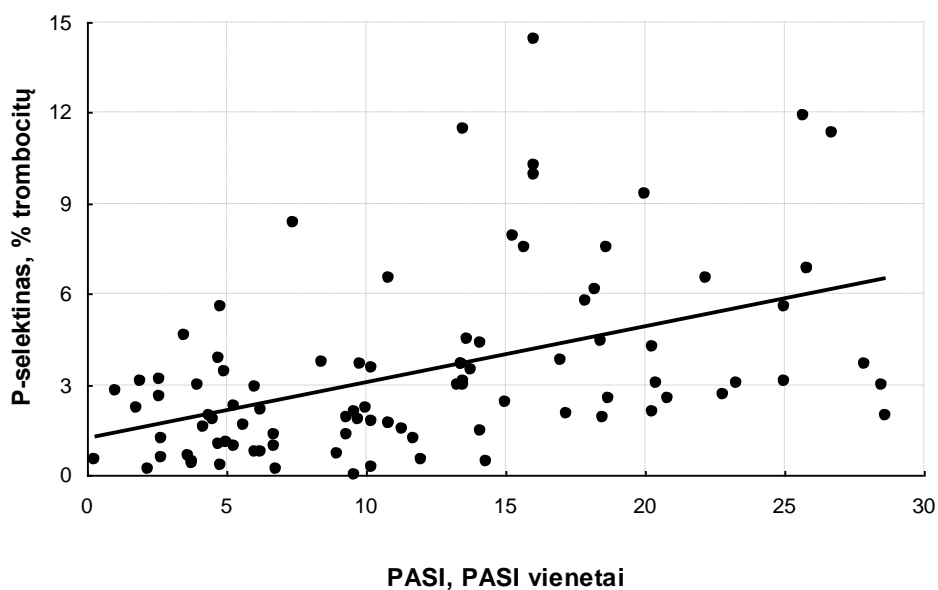
P-selektino ekspresija trombocituose taip pat buvo analizuota 47 žvyneline sergančių ir stacionare gydytų pacientų kohortoje. Ligai paūmėjus prieš pradėdant gydyti, P-selektiną ekspresuojančių trombocitų kiekio mediana žvyneline sergantiems pacientams buvo 3,66 % [IQR 2,59–6,5], skirtingai nuo sveikų asmenų kontrolinės grupės, kurioje P-selektiną ekspresuojančių trombocitų kiekio mediana buvo 1,46 % [IQR 0,57–2,01] ($p < 0,001$). Pagerėjus odos būklei po sėkmingo žvynelinės gydymo, PASI balo mediana sumažėjo nuo 17,2 [IQR 13,5–22,5] iki 6 [IQR 3,9–9,5], o P-selektiną ekspresuojančių trombocitų kiekio mediana sumažėjo nuo 3,66 % [IQR 2,59–6,5] iki 1,75 % [IQR 0,96–3,06], $p < 0,001$, nors liko didesnė, palyginti su kontrolinės grupės rodikliu (4 pav.).



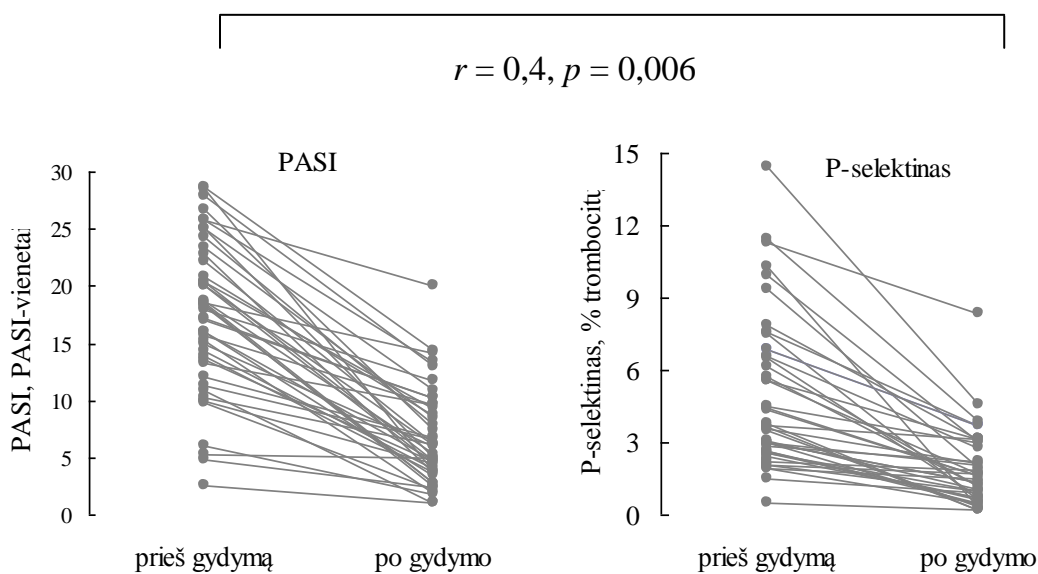
4 paveikslas. Trombocitų suaktyvinimas, vertinamas pagal P-selektino ekspresiją, paūmėjus ligai, prieš pradėdant gydyti žvyneline sergančius pacientus ($n = 47$), buvo gerokai padidėjęs, palyginti su kontroline grupe ($n = 41$), $p < 0,001$. Remisijos metu, po sėkmingo žvynelinės gydymo, P-selektiną ekspresuojančių trombocitų kiekis sumažėjo iki panašaus lygio, kuris buvo rastas kontrolinėje tiriamųjų grupėje, nors ir liko kiek didesnis.

Siekiant įvertinti trombocitų ekspresuojamo P-selektino, kaip psoriazės klinikinio sunkumo biologinio žymens, naudojimą, šis parametras buvo lyginamas su PASI, kuris šiam tikslui laikomas auksiniu standartu. Atlikus analizę, pavyko atskleisti reikšmingą koreliaciją tarp PASI ir trombocitų ekspresuojamo P-selektino lygio ($r = 0,51$, $p < 0,000001$; 5 pav.).

Be to, buvo tirta koreliacija tarp šių abiejų parametru pokyčių ir nustatyta, kad gydymo stacionare metu PASI balo sumažėjimas reikšmingai koreliavo su P-selektiną ekspresuojančių trombocitų sumažėjimu ($r = 0,4$, $p = 0,006$, 6 pav.).

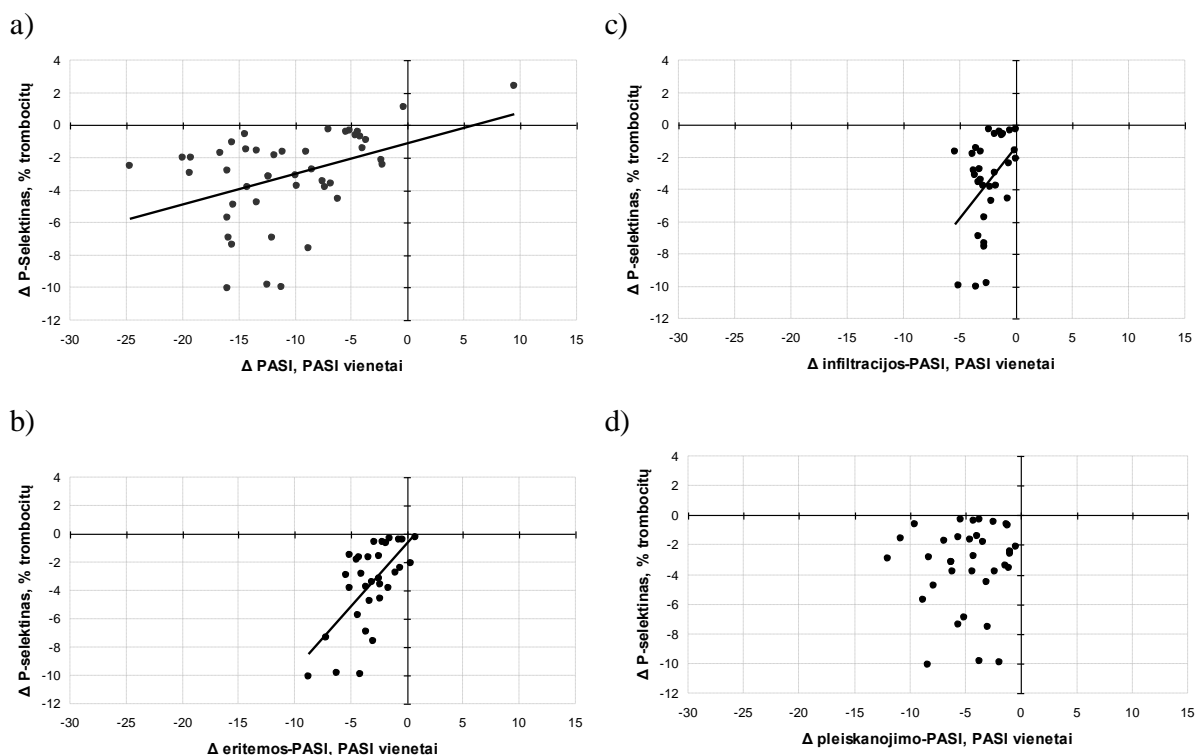


5 paveikslas. Trombocitų ekspresuojamo P-selektino koreliacija ($r = 0,51, p < 0,000001$) su klinikinio psoriazės sunkumu, vertinamu pagal PASI,- psoriazės ploto ir sunkumo indeksą.



6 paveikslas. Žvyneline sergantiems pacientams nustatyti PASI pokyčiai ligai paūmėjus ir remisijos metu koreliavo su trombocitų P-selektino ekspresijos pokyčiais. Šis poveikis buvo statistiškai reikšmingas ($r = 0,4, p = 0,006$).

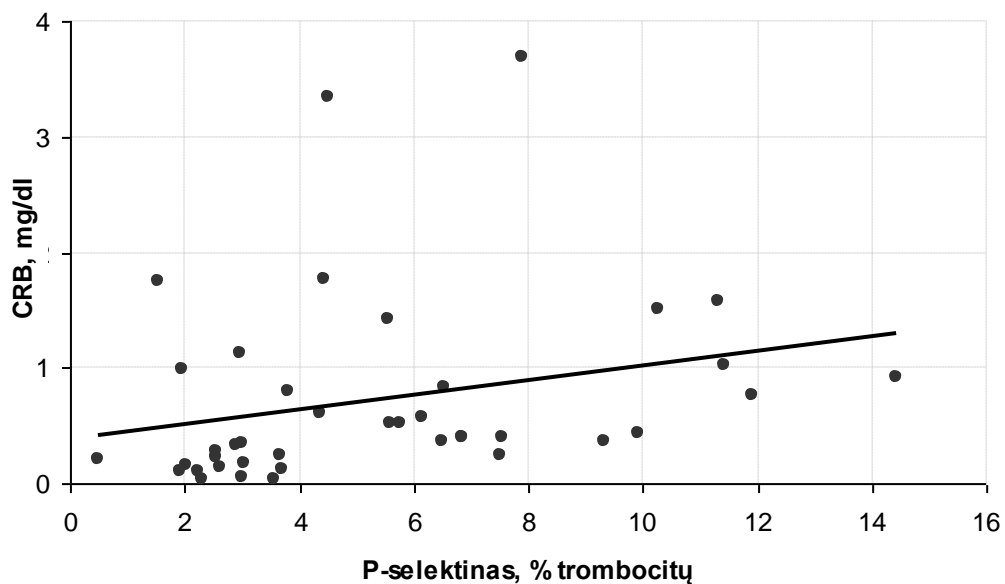
Be to, darant prielaidą, kad P-selektinas iš esmės turėtų atspindėti odos uždegimo sunkumą, t.y. eritemą ir infiltraciją, analizuota trombocitų P-selektino ekspresijos koreliacija su atskirais žvynelinės sunkumą vertinančio PASI komponentais. Atlikti tyrimai parodė, kad stipriausia statistiškai reikšminga koreliacija yra tarp trombocitų ekspresuojamo P-selektino lygio pokyčio ir PASI komponento, atspindinčio eritemą, balo pokyčio ($r = 0,6$, $p = 0,00009$; 7b pav.), toliau sekė infiltracijos – PASI pokytis ($r = 0,42$, $p = 0,009$; 7c pav.). Su pleiskanojimo – PASI pokyčiu, kuris atspindi netiesioginius su uždegimu susijusius odos pokyčius, koreliacijos nenustatyta ($r = 0,21$, $p = 0,2$; 7d pav.). Taigi trombocitų P-selektino ekspresija susijusi su tais PASI komponentais, kurie tiesiogiai atspindi odos uždegimą.



7 paveikslas. Koreliacijos tarp P-selektiną ekspresuojančių trombocitų lygio pokyčio ir atskirų PASI komponentų balų pokyčių. Buvo atskleista reikšminga koreliacija su bendro PASI balo pokyčiu (a) ($r = 0,4$, $p = 0,006$), taip pat su eritemos-PASI (b) ($r = 0,6$, $p = 0,00009$), infiltracijos-PASI pokyčiais (c) ($r = 0,42$, $p = 0,009$), o koreliacijos su pleiskanojimo – PASI nenustatyta (d) ($r = 0,21$, $p = 0,2$).

3.3. Trombocitų ekspresuojamo P-selektino koreliacija su uždegimo žymenimis CRB ir leukocitų kiekiu kraujyje sergantiems žvyneline ir dažniausiomis uždegiminėmis dermatozėmis

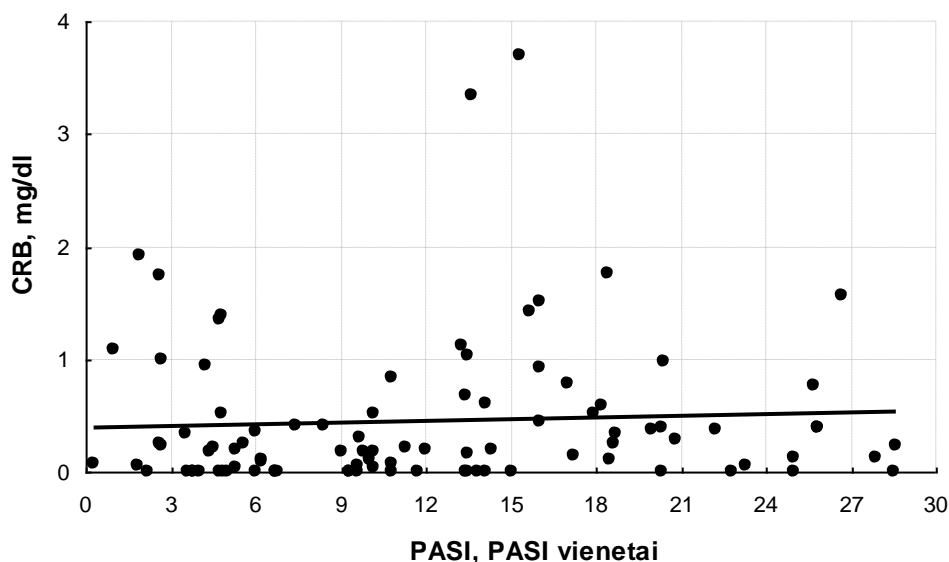
P-selektiną vertinant kaip odos uždegimo biologinį žymenį, buvo tirtas jo ryšys su tradiciniais uždegimo rodikliais CRB ir leukocitų kiekiu. Ligai paūmėjus, prieš pradėdant gydyti žvyneline sergančius ligonius, jų CRB mediana buvo 0,4 mg/dl [IQR 0,22–0,94], o kontrolinės grupės sveikų asmenų – 0,16 mg/dl [IQR 0,08–0,35]. Tyrimų duomenimis, koreliacija tarp trombocitų ekspresuojamo P-selektino ir tradicinio sisteminio uždegimo biologinio žymens CRB nustatyta sergantiems žvyneline ($r = 0,46$, $p = 0,00008$, 8 pav.), bet ne ligoniams, hospitalizuotiems dėl kitų uždegiminių dermatozių.



8 paveikslas. Žvyneline sergančių pacientų koreliacija tarp trombocitų ekspresuojamo P-selektino ir C-reaktyvaus baltymo ($r = 0,46$, $p = 0,00008$).

Koreliacijos tarp trombocitų ekspresuojamo P-selektino ir leukocitų kiekio nustatyti nepavyko. Be to, tiriant žvyneline sergančius pacientus, nebuvo rasta koreliacijos tarp CRB ir PASI ($r = 0,056$, 9 pav.). Po sėkmingo žvynelinės gydymo CRB

sumažėjo nuo 0,4 mg/dl [IQR 0,22–0,99] iki 0,24 mg/dl [IQR 0,17–0,6]; šis pokytis su PASI ar P-selektino kiekio pokyčiais nekoreliavo.



9 paveikslas. Koreliacijos tarp CRB ir PASI sergantiems žvyneline nebuvo nustatyta ($r = 0,056$).

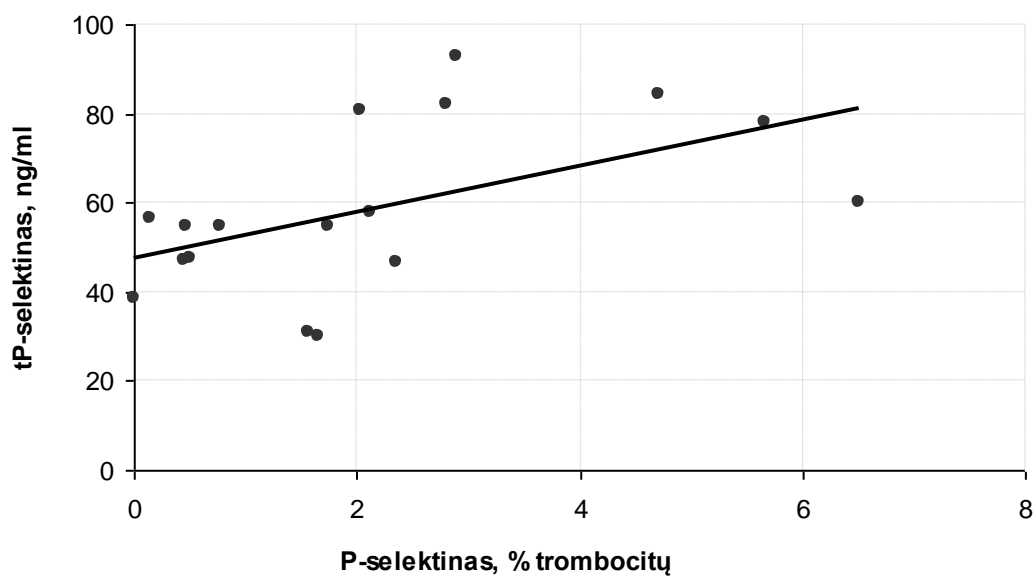
3.4. Trombocitų ekspresuojamo P-selektino lygio ir plazmos tirpiojo P-selektino kiekio palyginimas sergančiųjų uždegiminėmis odos ligomis kraujyje

Mūsų taikytas tėkmės citometrijos metodas trombocitų P-selektino ekspresijai įvertinti atliekamas naudojant šviežio kraujo mėginius, o tai riboja P-selektino tyrimo naudojimą kasdienėje praktikoje. Siekiant įvertinti praktiškesnius metodus, tyrėme tirpiojo P-selektino kiekį sergančiųjų uždegiminėmis odos ligomis plazmoje.

Siekiant įvertinti tirpiojo P-selektino pritaikomumą, buvo imtasi šių veiksmų. Pirma, buvo renkami kraujo mėginiai iš uždegiminėmis odos ligomis (žvyneline, bakterinėmis odos infekcijomis, kojų opomis, lokalizuota egzema ir eritrodermija) sergančių pacientų, kurie išreiškė norą papildomiems bandomiesiems tyrimams ($n = 17$). Tada buvo atlikti ELISA testai plazmos tirpiojo P-selektino kiekiui nustatyti. Galiausiai, gautieji kiekvieno paciento tirpiojo P-selektino rezultatai buvo palyginti su tų pačių

pacientų trombocitų ekspresuojamu P-selektino lygiu, įvertintu tėkmės citometrija, kaip aprašyta aukščiau.

Mūsų matavimai atskleidė, kad abiem metodais atliktų P-selektino tyrimų rezultatai reikšmingai koreliuoja tarpusavyje ($r = 0,63$, $p < 0,01$, 10 pav.).



10 paveikslas. Nustatyta patikima koreliacija tarp tam pačiam uždegimine odos liga sirgusiam pacientui kraujyje matuoto trombocitų ekspresuojamo P-selektino lygio ir plazmos tirpiojo P-selektino kiekio ($r = 0,63$, $p < 0,01$, $n = 17$).

4. IŠVADOS

1. Trombocitų P-selektino ekspresija padidėja paūmėjus žvynelinei ir dažniausioms odos uždegiminėms ligoms, o pasiekus ligos remisiją, sumažėja.
2. Trombocitų P-selektino ekspresijos pokytis patikimai koreliuoja su PASI ir uždegiminių PASI komponentų pokyčiais žvyneline sergantiems ligoniams ligai paūmėjus ir remisijos metu. Taigi, trombocitų P-selektinas galėtų būti objektyvus nespecifinis biologinis žvyneline sergančių pacientų žymuo.
3. Žvynelinės paūmėjimo metu nustatyta padidėjusių CRB kiekio ir trombocitų P-selektino koreliacija, tačiau ryšys su leukocitų kiekiu nenustatytas. Paūmėjus dažniausioms uždegiminėms dermatozėms, CRB ir leukocitų kiekis su trombocitų P-selektino ekspresija nekoreliavo.
4. Uždegiminėmis odos ligomis sergančių pacientų P-selektino ekspresija, tirta dviem skirtingais metodais, patikimai koreliavo: trombocitų ekspresuojamo P-selektino lygis susijęs su plazmos tirpiuoju P-selektinu.

Rekomendacijos

1. P-selektinas galėtų būti naudingas ir objektyvus biologinis žymuo, padedantis įvertinti klinikinį žvynelinės sunkumą ir gydymo veiksmingumą, todėl galėtų būti naudojamas kaip vertinga priemonė atliekant klinikinius tyrimus.
2. Rutiniam P-selektino lygio tyrimui galėtų būti taikomas imunofermentinis (ELISA) tyrimo metodas, kuris yra praktiškesnis, palyginti su tėkmės citometrijos metodu.
3. Atsižvelgiant į tyrimo rezultatus, remiantis duomenimis apie svarbų P-selektino vaidmenį aterosklerozės procesuose, būtų tikslingi tolesni tyrimai, nagrinėjantys žvyneline sergančių pacientų, kuriems randama padidėjusi P-selektino ekspresija, kardiovaskulinių sutrikimų riziką.

PUBLIKACIJOS IR PRANEŠIMAI DISERTACIJOS TEMA

PUBLIKACIJOS

1. **Garbaravičienė, J.**, Diehl, S., Varwig, D., Bylaite, M., Ackermann, H., Ludwig, R.J., Boehncke W.-H., Platelet P-selectin reflects a state of cutaneous inflammation: possible application to monitor treatment efficacy in psoriasis. *Exp Dermatol*, 2010. **19**(8): p. 736-41.

2. Ludwig, R.J., Bergmann, P., **Garbaravičienė, J.**, von Stebut, E., Radeke, H.H., Gille, J., Diehl, S., Hardt, K., Henschler, R., Kaufmann, R., Pfeilschifter, J.M., Boehncke W.-H., Platelet, not endothelial, P-selectin expression contributes to generation of immunity in cutaneous contact hypersensitivity. *Am J Pathol*, 2010. **176**(3): p. 1339-45.

PRANEŠIMAI

Stendinis pranešimas

Platelet P-selectin is a valid biomarker in psoriasis. J. Garbaravičienė, S. Diehl, R.J. Ludwig, W.-H. Boehncke. 8th Congress of the Baltic Association of Dermatovenereologists, Vilnius, Lietuva (2009); **Apdovanojimas už geriausią stendinį pranešimą.**

Žodiniai pranešimai

2014.10. „P-selektino kaip biologinio žymens taikymas sergantiems žvyneline“; Respublikinė Dermatovenerologų konferencija, Kaunas, Lietuva

2009.05. „Trombocitų aktyvacija odos uždegimo metu“, Electus Seminaras, Hamburgas, Vokietija

2008.08. „Trombocitų aktyvacija lėtinio uždegimo metu“, Frankfurtas, Vokietija

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju:

Prof. dr. Matildai Bylaitei-Bučinskienei, šio mokslinio tyrimo vadovei, Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų Dermatovenerologijos centro vadovei, už pastovią paramą, palaikymą, naudingas pasiūlymus ir pastabas.

Prof. med. dr. Woff-Henning Boehncke, Ženevos universiteto ligoninės ir medicinos mokyklos Dermatologijos, patologijos ir imunologijos klinikos vadovui (Ženeva, Šveicarija), šio tyrimo moksliniam konsultantui, už galimybę atlikti šį tyrimą, už mokslinio tyrimo idėjas, konstruktyvias diskusijas ir padrąsinančią paramą.

Prof. med. dr. Ralf Ludwig iš Liubeko universiteto ligoninės Dermatologijos klinikos (Liubekas, Vokietija) už nuolatinę pagalbą, naudingas, atviras ir įdomias mokslines diskusijas bei mokslinio tyrimo idėjas.

Dr. rer. nat. Simone Rubant ir Dr. med. Domenica Varwig iš Johano Volfgango Gėtės universiteto ligoninės Dermatologijos klinikos (Frankfurtas, Vokietija) už vertingą bendradarbiavimą, praktinę ir techninę pagalbą.

Sandra Diehl ir Katja Steinhorst iš Johano Volfgango Gėtės universiteto ligoninės Dermatologijos klinikos (Frankfurtas, Vokietija) už supažindinimą su bendraisiais laboratorinio darbo principais, už kvalifikuotą pagalbą ir paramą atliekant tėkmės citometrijos analizes, imunofermentinį ELISA tyrimą.

Ir galiausiai, visiems tyrimo dalyviams, už jų geranoriškumą, supratimą ir domėjimąsi tyrimo rezultatais.

INFORMACIJA APIE AUTORE

Jūratė Garbaravičienė gimė 1977 m. vasario 11 d. Vilniuje, Lietuvoje. Baigusi Vilniaus licėjų studijavo Vilniaus universiteto Medicinos fakultete. 2002 m. jai suteiktas medicinos gydytojo diplomai. Po vienerių metų internatūros ir dvejų metų vidaus ligų rezidentūros studijų ji pradėjo dermatovenerologijos rezidentūrą. J. Garbaravičienė buvo Vilniaus universiteto Santariškių klinikų ir Wuerzburgo universiteto ligoninės (Vokietija) dermatovenerologijos specialybės gydytoja rezidente. 2007 m. baigus rezidentūrą, J. Garbaravičienei buvo išduota gydytojo dermatovenerologo licencija. Nuo 2007 m. ji dirbo Vilniaus universiteto Santariškių klinikų Dermatovenerologijos centre, vėliau J. W. Gėtės universiteto ligoninės Dermatologijos klinikoje (Frankfurte, Vokietijoje) ir Alexakis ambulatorinėje dermatovenerologijos klinikoje (Darmstadtas, Vokietija). J. Garbaravičienė daktaro disertaciją nuo 2008 iki 2014 m. rengė Vilniaus universiteto Medicinos fakultete ir J. W. Gėtės universiteto Dermatologijos klinikoje Frankfurte (Vokietija). Pagrindinė jos mokslinių interesų sritis – citokinų vaidmuo psoriazės patogenezėje ir jų, kaip biologinių žymenų, naudojimas nustatant klinikinį psoriazės sunkumo mastą.

J. Garbaravičienė yra Lietuvos dermatovenerologų draugijos narė. Kartu su bendraautoriais tarptautiniuose žurnaluose paskelbė devynis mokslinius straipsnius.

SUMMARY

Introduction. Psoriasis manifests as a skin, nail and joint disease, and occurs at any age, although most commonly in adults (Nestle et al., 2009). About 2 percent of the population suffers from psoriasis, which is not just a skin disorder but a major health problem with a negative impact on patients' quality of life (Augustin et al., 2008).

Psoriasis immuno-pathogenesis is explained by a polarized Th1 and Th17 cells inflammatory response (Hong et al., 1999), (Powrie et al., 1994), (Martin et al., 2013), which is characterized by altered secretion of critical cytokines, such as IL-1, IL-2, IL-6, IL-17, IL-21, IL-22, IL-23, IFN- γ and TNF- α (Mak et al., 2009), (Pietrzak et al., 2008). The shifted balance of cytokine liberation leads to specific changes in the skin with disturbed keratinocyte differentiation, increased epidermal growth, and at the same time impacts systemic inflammation.

The recent studies suggest that psoriasis, which has been long time believed to be an isolated skin condition, is a status with low grade systemic inflammation (Griffiths and Barker, 2007). In addition, clinically with redness and scaling presenting skin disease has been demonstrated to be significantly associated with co-morbidities such as cardiovascular disease, insulin resistance, cancer, depression, and also other conditions (Brauchli et al., 2009b), (Ludwig et al., 2007), (Boehncke et al., 2007), (Brauchli et al., 2009a), (Kurd et al., 2010). Persistent inflammation that accompanies chronic inflammatory disorders is characterised by higher levels of inflammatory mediators (Chung, 2005), (Nielsen and Rask-Madsen, 1996). A status of systemic inflammation in psoriasis patients can be verified by elevated levels of C-reactive protein (CRP) (Strober et al., 2008), overexpression of pro-inflammatory cytokines (Nickoloff, 2007), (Lowe et al., 2007), as well as by activation of platelets (Tamagawa-Mineoka et al., 2008). Of note, the activated platelets have been already demonstrated in smokers (Pernerstorfer et al., 1998), in conditions like inflammatory bowel disease (Fagerstam et al., 2000), (Collins et al., 1994) atopic eczema/dermatitis syndrome (Kasperska-Zajac et al., 2004), bronchial asthma (Moritani et al., 1998), allergic contact dermatitis (Ludwig et al., 2010), diabetes mellitus (Tschoepe et al., 1993), (Kopp et al., 1998) and coronary artery

disease (Gawaz et al., 1997), (Mathur et al., 2001), (Furman et al., 1998), (Chung et al., 2009).

The current gold standard tool for assessment of psoriasis severity is PASI (Psoriasis Area and Severity Index) score, which describes involved skin's extent and severity as characterised by erythema, infiltration and scaling. However, this method was shown to have its shortcomings. The scales used in the PASI are small and of poor sensitivity. Therefore, small changes are not well characterized, as demonstrated in some validation studies (Ashcroft et al., 1999). In addition, the measurement of the PASI is time-consuming and applicable mainly in plaque psoriasis. Finally, calculation of the PASI is relatively complicated for clinicians, who are not routinely involved in clinical trials. As a result, the acknowledged limitations of clinical instruments, used for the assessment of skin disease severity, represent nowadays a great challenge and call for better alternatives.

As shown by a number of studies, P-selectin is an adhesion molecule with a broad range of biological functions: it takes part in thrombosis, atherosclerosis and also in the inflammation (Burger and Wagner, 2003), (Kansas, 1996). P-selectin is an important adhesion molecule implicated in cell-cell interactions and playing a crucial role in inflammation. Activated P-selectin expressing platelets, possessing an ability to activate leukocytes and endothelium through adhesion molecules and derived substances, were lately revealed to be capable to increase the overall rolling of leukocytes in the microvasculature of the skin (Ludwig et al., 2004). As demonstrated in animal experiments, P-selectin-knockout mice are defective in leukocyte rolling, extravasation (Mayadas et al., 1993), (Robinson et al., 1999) and show a decreased ability to elicitation of allergic contact dermatitis, compared to control animals (Ludwig et al., 2010).

In this study we focused on evaluation of platelet P-selectin level as a possible biomarker for systemic inflammation and disease severity in patients with inflammatory conditions, i.e. psoriasis, bacterial skin infections, leg ulcers, urticaria, localised eczema, erythrodermic eczemas, along with an assessment of traditionally used inflammation markers. In addition, we investigated platelet P-selectin correlation with the clinical severity of psoriasis.

Psoriasis is a complex condition in which skin inflammation is only a part of the disease (Mehta et al., 2011). Psoriasis accompanying chronic low-grade systemic inflammation is now acknowledged as a risk factor for adverse cardiovascular events (Maseri, 1997), thereby a careful managing of psoriasis patients, especially those with moderate and severe psoriasis, might be of great importance when evaluating effectiveness of therapy, the level of systemic inflammation, the future risk for co-morbidities and mortality. The value of the PASI score is not sufficient to assess the later parameters, hence, we were eager to know the levels of P-selectin in patients with psoriasis, whether this marker might indicate the severity of the disease and reflect the level of systematic inflammation, and also if this tool is specific in certain inflammatory skin disorders.

Aim of the study

To evaluate cell adhesion molecule P-selectin as a possible biomarker for psoriasis.

Objectives of the study

1. To assess the expression of platelet P-selectin in the blood of patients with psoriasis and common inflammatory dermatoses during exacerbation and remission periods.
2. To compare changes of platelet P-selectin expression with the changes of PASI and separate PASI components, measured in psoriasis patients in exacerbation and remission periods.
3. To assess the correlation between the expression of platelet P-selectin and inflammation markers CRP and leukocyte count in patients with psoriasis and other common inflammatory skin disorders.
4. To estimate the correlation between platelet P-selectin values and soluble P-selectin values, measured in the same patient suffering from inflammatory skin disease.

Scientific novelty of the study

The study of platelet P-selectin expression in the larger psoriasis patients' cohort during therapy was carried out for the first time. P-selectin expression was investigated also for the first time in patients with common inflammatory dermatoses like bacterial skin infections, leg ulcers, urticaria, localised eczema, prurigo nodularis and erythrodermic eczema.

Next, the determined P-selectin values were for the first time compared with traditional inflammation markers like CRP and leukocyte count in patients with inflammatory skin disorders.

Furthermore, in this study, for the first time, the analyses of associations between PASI, separate PASI components and expression of platelet P-selectin in psoriasis patients were carried out.

Practical value of the study

Primarily, the results of our pilot study proved the state of platelet activation in inflammatory conditions: we could determine an increased P-selectin expression in patients with exacerbated psoriasis and common inflammatory dermatoses. Hence, the revealed data enabled us to verify the systemic and pro-inflammatory role of the cell adhesion molecule P-selectin in patients with inflammatory skin disorders.

Secondarily, our performed study has demonstrated that during exacerbation of inflammatory skin diseases elevated platelet P-selectin expression decreases in a remission period. The same phenomenon was shown in patients with psoriasis, and confirmed by a significant correlation between PASI and P-selectin. Therefore, cell adhesion molecule P-selectin might be an objective biomarker evaluating clinical disease severity and success of therapy in patients with psoriasis.

Finally, we could demonstrate a reliable correlation between the values of P-selectin assessed in the same patient with inflammatory skin disease by two different methods, i.e. platelet P-selectin, measured by flow-cytometry, and soluble P-selectin, measured by ELISA method.

Defensive statements of the dissertation

1. The blood platelets are activated in patients with exacerbated psoriasis as well as in patients with exacerbated common inflammatory skin diseases.
2. Expression of platelet P-selectin is closely associated with the clinical severity of the chronic inflammatory disease psoriasis.
3. The values of platelet P-selectin are associated with values of inflammation markers in patients with psoriasis.

Materials and methods

Participants of the study. The subject of this study was a group of 147 patients with exacerbated common inflammatory dermatoses like psoriasis (47), bacterial skin infections (13), leg ulcers (10), urticaria (13), localised eczema (28), prurigo nodularis (11) and erythrodermic dermatoses (25), which were hospitalised and enrolled into the study in the course of one year. The patients were at an average 46 years (from 18 till 95), and were hospitalized because of exacerbation in dermatological in-patient clinic for average 7 ± 3 days. In the group of 47 patients with psoriasis, 41 subjects presented with psoriasis vulgaris, 3 with psoriasis guttata, 1 with psoriasis pustulosa, 1 with psoriasis inversa and 1 with psoriasis palmoplantaris. The control group consisted of 41 healthy volunteers at an average 51 years (from 18 till 78) without dermatological pathology.

Determination of disease severity. Severity of cutaneous inflammation in patients with skin disorders in exacerbation and remission periods was assessed: (i) clinically, based on changes of skin rash, erythema, or ulcer's size, and by (ii) laboratory tests, based on values of CRP, leukocytes count, and also P-selectin. Clinical severity of psoriasis was evaluated in exacerbation and remission periods according to the Psoriasis Area and Severity Index (PASI) score, which was also analyzed in details, i.e. the grade of erythema, infiltration, and scaling.

Study materials and investigations. The blood for investigation was collected from patients with skin diseases (n=147) twice: in exacerbation and in remission periods, i.e. before the anti-inflammatory treatment, and again in average 7 days, after the treatment

with the clinical recovery or when considerable improvement of a dermatological disease was achieved. The simultaneously obtained 3 samples of blood from every patient were used for the measurement of inflammation markers: (i) CRP, (ii) total leukocyte count, and (iii) P-selectin level. The same parameters were measured twice in the control subjects (n=41): on day 0 and day 4, in order to exclude a possible day-to-day variability of inflammation markers and P-selectin in persons without health complaints. To assess soluble form of P-selectin, we collected plasma samples of patients who expressed willingness for additional investigations (n=17).

Leukocyte count and CRP measurements in the blood were performed in the centralized laboratory using automated haematology analyzers. Platelet activation was determined with respect to platelet α -granule degranulation and platelet surface expression of P-selectin (CD62P antigen). Platelet P-selectin was determined using flow cytometric analysis, and soluble P-selectin in plasma was determined using commercial human sP-selectin immunoassay (ELISA).

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using BIAS statistical software for Windows version 8.4, www.bias-online.de. P values were determined using the two-tailed t-test; a value of $p < 0.05$ was considered to be statistically significant.

Results

Platelet P-selectin expression in patients with psoriasis and inflammatory skin disorders. Increased median P-selectin expression on platelets was observed in patients with exacerbated inflammatory dermatoses before treatment, compared to a control group of healthy persons (3.01% [IQR 1.77-4.94], vs. 1.46% [IQR 0.57-2.01], $p < 0.001$). The median platelet activation was more than twice as high in patients with severe inflammatory skin diseases: erythrodermic eczemas - 4.32% [IQR 3.03-5.02], leg ulcers - 4.08% [IQR 2.42-5.39], psoriasis - 3.66% [IQR 2.59-6.7], bacterial skin infections - 3.22% [IQR 2.21-4.87], compared to the controls, $p < 0.001$. Statistically significant elevated levels of P-selectin expression were also found in patients with urticaria (2.04%

[IQR 1.13-3.94, $p<0.01$]) and localized eczema (1.62% [IQR 0.95-3.3, $p<0.05$]), but not in those with prurigo nodularis (1.76% [IQR 0.69-1.99], $p>0.05$). When platelet P-selectin was re-assessed a day prior to discharge, , when remission was achieved, and it could be demonstrated to be significantly reduced from median 3.01% to a median 1.5% of platelets among patients with inflammatory skin disorders ($p<0.000001$).

Correlation of platelet P-selectin expression with PASI and PASI components in psoriasis patients. Analysis of platelet P-selectin in exacerbation period of disease revealed median 3.66% [IQR 2.59-6.5] P-selectin positive platelets in psoriasis patients, in contrast to median 1.46% [IQR 0.57-2.01] positive platelets ($p<0.001$) in the control group of healthy persons. Clinical remission achieved with successful anti-psoriatic therapy with was followed by a decrease in the median PASI from 17.2 [IQR 13.5-22.5] to 6 [IQR 3.9-9.5], as well as in the levels of median P-selectin from 3.66% [IQR 2.59-6.5] to 1.75% [IQR 0.96-3.06], $p<0.001$, although these remained higher compared to that of the control group. Next the results demonstrated a highly significant correlation between PASI and platelet P-selectin ($r=0.51$, $p<0.000001$). The investigated correlation between the changes of both parameters revealed that during in-patient treatment the reduced PASI and P-selectin levels correlated significantly ($r=0.4$, $p=0.006$). Furthermore, we analyzed P-selectin correlation with different components of severity assessment within PASI. These analyses documented the best and statistically significant correlation between the change in P-selectin expression and the change in the PASI component reflecting erythema ($r=0.6$, $p=0.00009$), followed by infiltration ($r=0.42$, $p=0.009$);), whereas no such correlation could be determined with a scaling ($r=0.21$, $p=0.2$).

Platelet P-selectin correlation with CRP and leukocyte count in patients with psoriasis and common inflammatory skin disorders. During exacerbation of disease before treatment we found median 0.4 mg/dl [IQR 0.22-0.94] CRP in psoriasis patients, in contrast to median 0.16 mg/dl [IQR 0.08-0.35] CRP in the control group of healthy

persons. Next, in patients with psoriasis we could demonstrate correlation between platelet P-selectin and CRP ($r=0.46$, $p=0.00008$), but not in patients with other common inflammatory dermatoses. Our analysis could not determine association between P-selectin and leukocyte count in the examined cohort of patients. Furthermore, a detailed analysis of psoriasis patients could show no correlation between CRP and PASI ($r=0.056$).

Comparison of platelet P-selectin and soluble P-selectin values measured in patients with inflammatory skin disorders. We carried out P-selectin evaluation on platelets via flow-cytometry, as described above, and conducted parallel analysis of the levels of soluble P-selectin in plasma of 17 patients with inflammatory skin disorders like psoriasis, bacterial skin infections, leg ulcers, localised eczema, and erythrodermic eczema. Our measurements revealed a highly significant correlation between the results of both methods ($r=0.63$, $p<0.01$).

Conclusions

1. Increased platelet P-selectin expression is detected in exacerbated psoriasis and common inflammatory skin diseases. The improved skin condition under successful anti-inflammatory treatment results in reduced platelet P-selectin expression.

2. In case of psoriasis, the values of changes in platelet P-selectin are significantly associated with the changes in PASI and PASI inflammatory components, measured in exacerbation and remission periods. Therefore, P-selectin expression might be a nonspecific but sensitive and objective biomarker in patients with psoriasis.

3. Exacerbated psoriasis is characterised by elevated levels of CRP and platelet P-selectin, which correlate with each other, thereby confirming platelet P-selectin as a valuable biomarker for systemic inflammation in psoriasis. There was no correlation between CRP, leukocyte count and P-selectin in patients with common inflammatory skin diseases, as also no correlation between P-selectin and leukocyte count in psoriasis patients.

4. The results of two different methods used parallel in the same patient with inflammatory skin disorder to measure the level of P-selectin correlate significantly: the values of platelet surface P-selectin, measured by flow cytometry are associated with the values of plasma soluble P-selectin, measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method.

Recommendations

- P-selectin might be a useful objective biomarker for evaluation of clinical severity of psoriasis and efficacy of anti-psoriatic therapy, and thus it could serve as a valuable tool in clinical trials.

- Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), as a more practical method than flow cytometry, could be used for routine evaluation of P-selectin levels.

- In view of study results and given that P-selectin also plays an important role in atherosclerosis, it would be appropriate to investigate further risk for cardiovascular events in psoriasis patients with elevated P-selectin expression.