

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO  
BIOMEDICINOS MOKSLŲ INSTITUTO  
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS, MIKROBIOLOGIJOS IR  
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

ENDOTELINO-1 IR LĄSTELIŲ ADHEZIJOS MOLEKULIŲ KIEKIO KRAUJYJE SĄSAJOS  
SERGANTIESIEMS SISTEMINE SKLEROZE

ASSOCIATION OF ENDOTHELIN-1 AND CELL SURFACE ADHESION MOLECULES  
LEVELS IN PATIENTS WITH SYSTEMIC SCLEROSIS

Magistrantė MONIKA MAULIŪTĖ \_\_\_\_\_  
(parašas)

Darbo vadovas

doc., dr. Loreta Bagdonaitė \_\_\_\_\_  
(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir  
laboratorinės medicinos katedros vedėja

doc., dr. D. Karčiauskaitė leidžiama ginti \_\_\_\_\_  
(parašas)

Darbo įteikimo data \_\_\_\_\_

Registracijos Nr. \_\_\_\_\_

2018 m., Vilnius

# TURINYS

SANTRUMPOS.....	3
ĮVADAS .....	4
DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI .....	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	6
1.1. SISTEMINĖ SKLEROZĖ .....	6
1.2. SISTEMINĖS SKLEROZĖS PATOGENEZĖ .....	7
1.3. ENDOTELINAS -1.....	9
1.4. ENDOTELINAS – 1 SISTEMINĖS SKLEROZĖS PATOGENEZĖJE .....	11
1.5. TIRPIOS ADHEZIJOS MOLEKULĖS .....	12
1.6. ANTIKŪNAI PRIEŠ IŠSKIRIAMUS IŠ BRANDUOLIO ANTIGENUS IR SISTEMINĖ SKLEROZĖ .....	15
1.7. UŽDEGIMO ŽYMENYS SERGANT SISTEMINE SKLEROZE.....	16
1.8. SISTEMINĖS SKLEROZĖS LABORATORINĖ DIAGNOSTIKA.....	17
2. EKSPERIMENTINĖ DALIS .....	18
2.1. TIRIAMŪJŲ IMTIS IR CHARAKTERISTIKA .....	18
2.2. TYRIMO METODAI.....	18
2.2.1. TIESIOGINĖS DAUGIASLUOKSNĖS „ SUMUŠTINIO “TIPO IMUNOFERMENTINĖS ANALIZĖS METODAS ET-1, VCAM-1 IR ICAM-1 KONCENTRACIJOS NUSTATYMOI.....	19
2.2.2. IMUNOBLOTO METODAS ENA NUSTATYMOI.....	19
2.3. STATISTINĖ DUOMENŲ ANALIZĖ .....	20
3. TYRIMO REZULTATAI .....	21
3.1. ET – 1, VCAM-1 IR ICAM-1 KONCENTRACIJOS TIRIAMŪJŲ KRAUJO SERUME DIAGNOSTINĖ VERTĖ, SERGANT SISTEMINE SKLEROZE .....	21
3.2. ET – 1, VCAM-1 IR ICAM-1 SAŠAJOS SU UŽDEGIMO ŽYMENIMIS (CRB, ENG, ENA), VERTINANT UŽDEGIMINIO PROCESO EIGĄ.....	24
4. REZULTATŲ APTARIMAS .....	27
5. IŠVADOS.....	31
6. SANTRAUKA .....	32
7. SUMMARY .....	34
8. LITERATŪROS ŠALTINIAI .....	36

## SANTRUMPOS

ANA – antikūnai prieš branduolio antigenus

ACA – antikūnai prieš centromeras

DR3 – serotipinė ŽLA reprezentacija

DR5 – serotipinė ŽLA reprezentacija

ECE – endoteliną konvertuojantis enzimas

EGF – epidermio augimo faktorius

ENA - antikūnai prieš išskiriamus iš branduolio antigenus

ET-1 – endotelinas-1

HGF – hepatocitų augimo faktorius

HRP – krienų peroksidazė

ICAM-1- tarpląstelinės adhezijos molekulė-1

IFA - imunofermetinės analizės tyrimo metodas (angl. *enzyme linked immunosorbent assay - ELISA*)

IL-1- interleukinas-1

IL-6 – interleukinas 6

PAH – plaučių arterinė hipertenzija

PDGF - trombocitų sintezuojamas augimo veiksnys

SSc – sisteminė sklerozė

TGF- $\beta$  – transformuojantis augimo veiksnys beta

TNF- naviko nekrozės veiksnys

VCAM-1 – kraujagyslių ląstelių adhezijos molekulė-1

VUL SK LMC – Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Laboratorinės medicinos centras

ŽLA – žmogaus leukocitų antigenas

## ĮVADAS

Sisteminė sklerozė (SSc) yra lėtinė, autoimuninė, jungiamojo audinio liga pažeidžianti odą ir vidaus organus. Nepaisant per pastarąjį dešimtmetį pasiektos pažangos SSc diagnostikoje ir gydyme, invalidizacija ir mirtingumas nuo SSc išlieka didžiausias, tarp visų jungiamojo audinio ligų.

Progresuojanti sisteminė sklerozė – tai liga, susijusi su išplitusia odos, smulkiųjų kraujagyslių sienų bei vidaus organų jungiamojo audinio skleroze. SSc - reta liga, ja serga mažiau negu 1 proc. populiacijos, Lietuvoje šia liga diagnozuota apie 200 žmonių. Iki šio nėra aiški SSc etiologija. Ligą išprovokuoti gali tiek genetinė predispozicija, tiek aplinkos veiksniai (ultravioletinė spinduliuotė, cheminės medžiagos, virusinės infekcijos), tiek šių komponentų sąveika. Moterys SSc serga 3 – 5 kartus dažniau negu vyrai. SSc jaunų žmonių liga, dažniausiai ši liga diagnozuojama 30 – 50 metų amžiaus asmenims, tai ligos sergamumo pikas.

Sisteminės sklerozės diagnozė nustatoma remiantis klinikinių požymių, laboratorinių žymenų ir fizinės būklės visuma. Tačiau iki šiol nėra nustatyti specifiniai laboratoriniai žymenys, kurie galutinai leistų patvirtinti SSc diagnozę ir įvertinti ligos aktyvumą bei prognozę. Šiuo metu pagrindinė laboratorinių tyrimų paskirtis diagnozuojant SSc – „atmesti“ kitus galimus autoimuninius susirgimus.

Sergant sisteminė skleroze, padidėja adhezijos molekulių ekspresija endotelio ląstelių paviršiuje, o kraujyje didėja tirpiųjų šių molekulių formų koncentracija, kurią įmanoma įvertinti laboratoriniais tyrimų metodais, tiriant kraujo serumą. Atsižvelgiant į biologinę funkciją ir mokslinių tyrimų duomenis ET-1 laikomas vienas pagrindinių SSc patogenezės komponentų. Dideli ET-1 ir jo receptorių kiekiai yra ekspresuojami tiek endotelio ląstelių, tiek cirkuliuoja SSc sergančių pacientų kraujyje. Tirpių adhezijos molekulių ir ET-1 nustatymas SSc sergančiųjų kraujyje galėtų būti vieni iš laboratorinių žymenų padedančių įvertinti SSc aktyvumą ir ligos prognozę.

Šio mokslinio tiriamojo darbo metu, buvo siekiama įvertinti endotelino – 1 (ET-1), kraujagyslių ląstelių adhezijos molekulių - 1 (VCAM-1) ir tarpląstelinės adhezijos molekulių – 1 (ICAM-1) kiekio kraujyje diagnostinę vertę ir įtaką sisteminės sklerozės patogenezėje.

## DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

### DARBO TIKSLAS:

Įvertinti endotelino – 1 (ET-1), kraujagyslių ląstelių adhezijos molekulių - 1 (VCAM-1) ir tarpląstelinės adhezijos molekulių – 1 (ICAM-1) kiekio kraujo serume diagnostinę vertę ir įtaką ligos patogenezėje, pacientams sergantiems sistetine skleroze.

### DARBO UŽDAVINIAI:

1. Nustatyti endotelino - 1, kraujagyslių ląstelių adhezijos molekulių - 1 (VCAM-1) ir tarpląstelinės adhezijos molekulių – 1 (ICAM-1) koncentracijos, tiriamųjų kraujo serume, diagnostinę vertę, sisteminės sklerozės atveju.
2. Nustatyti endotelino – 1, kraujagyslių ląstelių adhezijos molekulių - 1 (VCAM-1) ir tarpląstelinės adhezijos molekulių – 1 (ICAM-1) sąsajas su uždegimo žymenimis (CRP, ESR, ANA, ENA), vertinant uždegiminio proceso eigą.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. SISTEMINĖ SKLEROZĖ

Sisteminė sklerozė (SSc) yra polietiologinė, nevienalytė, heterogeniška, daugelį organų pažeidžianti autoimuninė liga [1]. Nepaisant per pastarąjį dešimtmetį pasiektos pažangos SSc diagnostikoje ir gydyme, invalidizacija ir mirtingumas nuo SSc išlieka didžiausias, tarp visų jungiamojo audinio ligų [2]. Progresuojanti sisteminė sklerozė – tai liga, susijusi su išplitusia odos, smulkiųjų kraujagyslių sienų bei vidaus organų jungiamojo audinio skleroze.

Pirmą kartą detaliai į sisteminę sklerozę panašią ligą aprašė Curzio dar 1754 metais. 1847 metais Gintrac jau pasiūlė terminą skleroderma. Žodis „skleroderma“, kilęs iš graikų kalbos, reiškiančio - „kieta oda“. Pagal šiuolaikinį apibrėžimą, SSc - tai pirminė idiopatinė vidaus organų ir odos fibrozė, susijusi su sutrikusia fibroblastų funkcija ir padidėjusia kolageno sinteze. Tai sisteminė jungiamojo audinio liga, pasireiškianti vidaus organų bei odos fibroze, kolageno hiperprodukcija, mikrocirkuliacijos sutrikimais, uždegimo sukeltais pakitimais, endotelio proliferacija, smulkiųjų kraujagyslių sienelių uždegimu, bei humoralinio ir ląstelinio imuniteto pakitimais. Sisteminė sklerozė - tikslesnis šios ligos pavadinimas, nes procesas pasireiškia ne vien dermoje.

Sisteminė sklerozė – įvardinama kaip uždegiminė liga, tačiau iki šiol uždegimą sukeliančios priežastys yra neaiškios. Dažniausiai ši liga priskiriama autoimuninių ligų grupei. SSc sergančio asmens imuninė sistema kovoja su organizmo antigeninėmis struktūromis. Uždegiminis procesas sukelia audinių edemą, padidėjusį fibrozinio audinio sintezės aktyvumą. Sergant šia liga oda tampa blizganti ir kieta. Sisteminė sklerozė – lėtai progresuojanti liga. Šiai ligai būdingas odos sustandėjimas ir vidaus organų pažeidimai. SSc - reta liga. Nors SSc serga mažiau negu 1 proc. populiacijos, tačiau pasaulyje šia liga serga apie 2,5 milijono žmonių. Lietuvoje SSc diagnozuota apie 200 asmenų. Per metus pasaulyje nustatoma iki 3 naujų ligos atvejų 100 000 gyventojų. Moterų sergamumas šia liga yra 3 - 4 kartus didesnis negu vyrų [3]. SSc dažniausiai pasireiškia ir diagnozuojama 30 – 50 metų amžiaus moterims, tai ligos sergamumo pikas. Vyrų dažniausiai suserga būdami vyresnio amžiaus (>60 metų). Sergamumas šia liga tarp vaikų žemas, registruojami pavieniai atvejai.

Tiksli ligą sukianti priežastis iki šiol nėra išaiškinta ir žinoma. Ligą gali išprovokuoti daugybė veiksnių: virusinės infekcijos, vaistai, cheminės medžiagos (vinilchloridas, epoksidinė derva), radiacija, ultravioletinė spinduliuotė. Reikšmės turi ir genetiniai faktoriai: aptinkamas šeiminis sergamumas, nustatytas ryšys su II klasės ŽLA DR3 ir DR5 genotipais. SSc 1,6 proc. dažniau pasireiškia šeimose, kuriuose yra ar buvo sergančiųjų SSc, lyginant su bendra gyventojų

populiacija [4]. Padidėjusią ir nepagrįstą jungiamojo audinio sintezę lemia imuninė sistema. Provokacinis veiksnys, lemiantis imuninės sistemos stimuliaciją, gali būti bet kuris aplinkos veiksnys ar genetinis faktorius. Normalią organų audinių struktūrą pamažu ima keisti jungiamasis audinys, dėl struktūrinių audinių pokyčių atsiranda nuolat progresuojantys organų veiklos sutrikimai. Sergant SSc ypač pažeidžiamos odos kraujagyslės, todėl oda įgauna būdingą SSc specifinį vaizdą. SSc metu nekontroliuojama fibrozė pažeidžia ne tik odą, bet ir kitus vidaus organus, sukelti komplikacijas, kurios yra viena pagrindinių mirties nuo SSc priežasčių.

SSc yra lėtinė sisteminė autoimuninė liga, pažeidžianti odą, plaučius, širdį, virškinimo traktą, inkstus ir skeleto raumenų sistemą. Skiriamos dvi pagrindinės SSc formos, priklausomai nuo odos pažeidimo lygio: difuzinė ir ribota. Difuzinė sisteminė sklerozė daugiausiai apima centrinės kūno dalis t. y. liemenį, krūtinę, šlaunis. Difuzinei SSc būdingi odos pokyčiai virš alkūnų ar kelių, ankstyvas organų pažeidimas, Scl – 70 autoantikūnų aptikimas, greitas organų disfunkcijos progresavimas, 10 metų išgyvenamumo rodiklis siekia tik 40 proc. Ribotos sisteminės sklerozės pažeidimai daugiausia pasireiškia periferinėse kūno dalyse pvz.: pėdose, plaštakose, veide. Ribotai SSc būdingi odos pokyčiai virš alkūnių ar kelių, tai lėčiau progresuojanti SSc forma, nustatomi CENP-B autoantikūnai, vėlyvos komplikacijos, kurios dažniausiai susijusios su plaučių arterine hipertenzija (PAH), trofinėmis opomis, o 10 metų išgyvenamumo rodiklis yra didesnis nei 70 proc. [5].

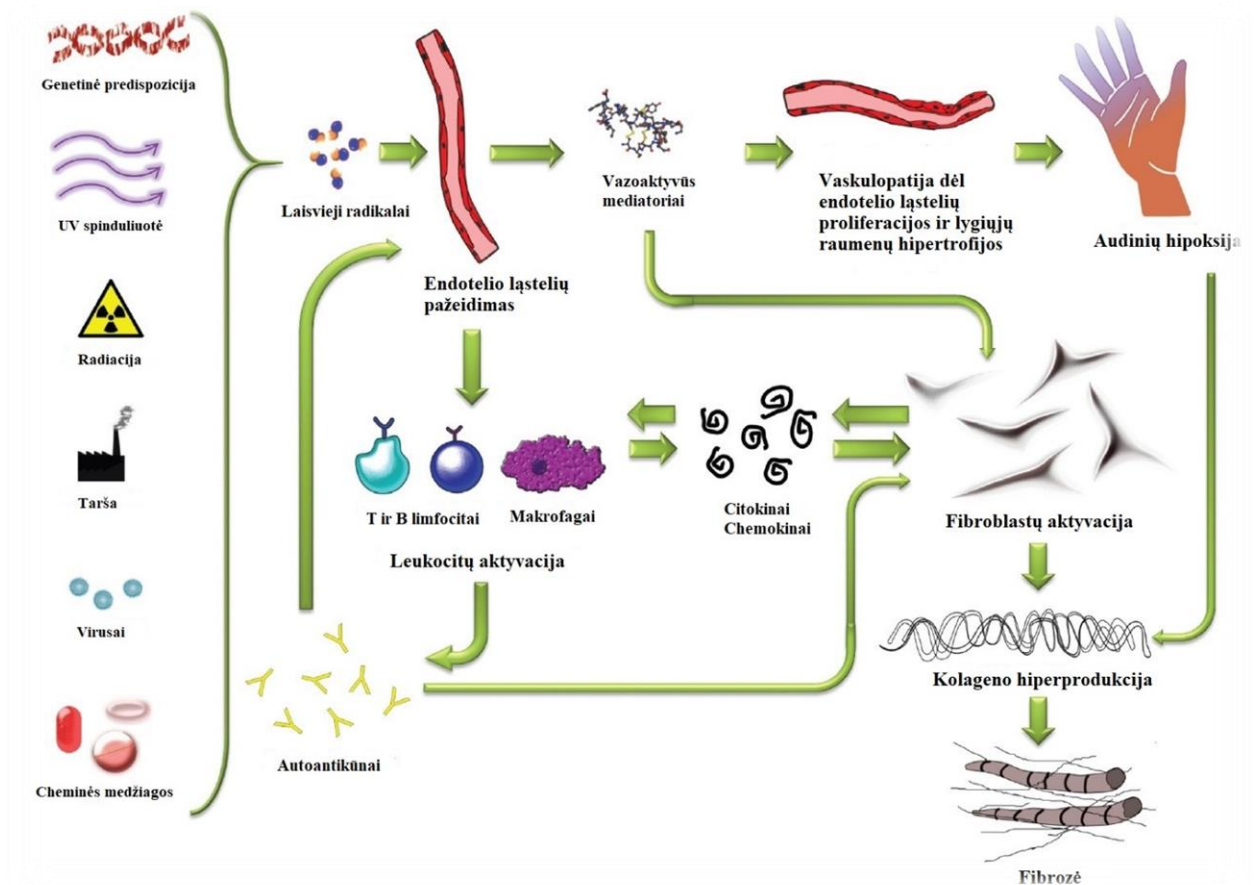
Plaučių arterinė hipertenzija (PAH) yra pagrindinė SSc sukelta mirties priežastis. PAH tai greitai progresuojanti plaučių kraujagyslių liga, kuriai būdingas smarkus kraujagyslių susiaurėjimas, kuris sukelia patologiškai aukštą spaudimą plaučių arterijose. Ši būklė nustatoma, kai spaudimas plaučių arterijoje padidėjęs daugiau nei 25 mmHg ramybėje ir daugiau nei 30 mmHg fizinio krūvio metu. PAH pasireiškia 10 - 12 proc. visų SSc pacientų. Mirtingumas siekia net 50 proc. per 3 metus nuo nustatytos PAH diagnozės [6]. PAH simptomai yra nespecifiniai, todėl dažnai priskiriami kitiems SSc sukeltiems simptomams, dėl to PAH dažniausiai diagnozuojama tik vėlyvoje stadijoje. Kol kas ši SSc sukelta komplikacija nepagydoma.

## 1.2.SISTEMINĖS SKLEROZĖS PATOGENEZĖ

Ligos patogenezėje visų pirma pasireiškia kraujagyslių pažeidimas ir uždegimo aktyvacija, o tik po to fibrozė. Sutrikusi vazodilatatorių bei vazokonstriktorių pusiausvyra sutrikdo normalią kraujo cirkuliaciją. Išemijos – reperfuzijos epizodai lemia oksidacinį stresą, kuris dar labiau didina kraujagyslių pažeidimą. Pirminis kraujagyslių pažeidimas yra endotelio ląstelių pažeidimas, kurį sukelia T ląstelių gaminami citokinai, proteoliziniai fermentai, plazminių ląstelių sekretuojami autoantikūnai nukreipti prieš endotelio ląstelių antigenus. Uždegiminis kraujagyslių pažeidimas

sukelia endotelio ląstelių aktyvaciją ir disfunkciją, tai lemia padidėjusią kraujagyslių endotelio ląstelių adhezijos molekulių ir leukocitų adhezijos molekulių sekreciją. Pakitusi vazoaktyvių mediatorių sekrecija aktyvuoja trombocitus ir fibrinolizinius procesus. Aktyvuoti trombocitai išskiria tromboksaną A2, PDGF ir TGF- $\beta$ , kurie sukelia vazokonstrikciją, prisideda prie fibroblastų aktyvavimo ir miofibroblastų diferenciacijos. Aktyvuotos endotelio ląstelės ima sekretuoti vazoaktyvius mediatorius, tokius kaip prostaciklinas ir endotelinas – 1 (ET-1).

Daugybė citokinų ir biologiškai aktyvių mediatorių yra siejami su SSc patogenezė. Detalus SSc patogenezės mechanizmas vis dar nėra pilnai ištirtas ir aiškus, tačiau pagrindiniai pažeidimai parodo, kad SSc procese dalyvauja mažiausiai keturi ląstelių tipai: fibroblastai, ląstelinio imuniteto ląstelės - T limfocitai, humoralinio imuniteto ląstelės – endoteliocitai ir B limfocitai [5]. Ligos eigoje atsiranda autoantikūnų, pažeisti audiniai infiltruojami limfocitais ir monocitais, daugiausiai makrofagais bei T limfocitais, vystosi lėtinis uždegimas [3] (1 paveikslas).



**1 paveikslas.** Sisteminės sklerozės patogenezės mechanizmas [4].

SSc metu tiek Th1 tiek Th2 limfocitai gali sintetinti T ląstelių citokinus. Citokinų perteklius nustatomas ir pacientų kraujyje bei odoje. Citokinai skatina fibroblastų proliferaciją, makrofagai pradeda sintetinti IL-1 bei TNF- $\alpha$ , kurie veikia fibroblastus stimuliuodami kolageno, IL-6, PDGF



sintezę. Endoteliocitai skatinami gaminti ląstelių adhezijos molekules ICAM-1 ir VCAM-1 bei IL-1 ir IL-6 [3]. B limfocitai SSc metu esti aktyvinti, virtę plazminėmis ląstelėmis, gebančiomis sintetinti autoantikūnus. B limfocitų aktyvaciją gali parodyti laboratoriniai rodikliai, pavyzdžiui hipergamaglobulinemija, autoantikūnų aptikimas ir padidinta CD19+ ekspresija periferiniame kraujyje [4].

Imunologinė sisteminės sklerozės patogenezės hipotezė - iki šiol tiksliai nežinomi veiksniai (UV spinduliuotė, radiacija, cheminės medžiagos, virusai) aktyvina T limfocitus, kurių išskiriami citokinai telkia makrofagus ir plazmines ląsteles. Jų išskiriami mediatoriai (histaminas, augimo faktoriai) skatina sustiprėjusią kolageno sintezę bei fibroblastų augimą. Neimuninis SSc mechanizmas – anksčiau įvardyti veiksniai aktyvina smulkiųjų kraujagyslių endotelį ir trombocitus. Iš smulkiųjų kraujagyslių endotelio ir pradėjusių agreguotis trombocitų išsiskyrę augimo ir chemotaksiniai faktoriai aktyvina fibroblastus. Susiaurėjus daugeliui smulkiųjų kraujagyslių, pasireiškia audinių išemija ir formuojasi fibrozė. Ligos patogenezėje galimai svarbūs abu mechanizmai.

### 1.3.ENDOTELINAS -1

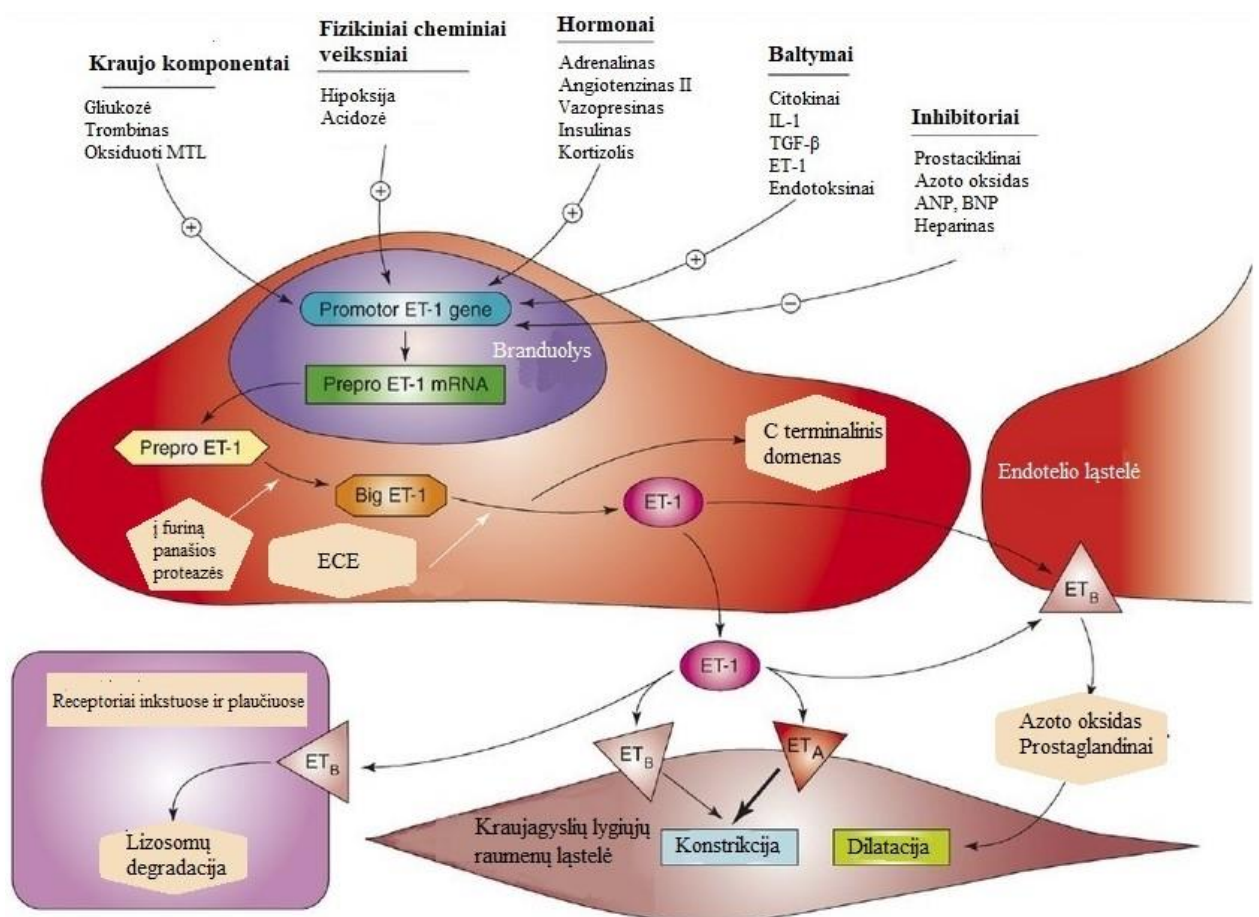
Endotelino sistema pirmą kartą išgryninta ir sekvenuota 1980 – ujų pabaigoje iš kultivuoatų endotelio ląstelių [8]. Endotelinų sekrecija yra reguliuojama genų lygmeniu. Endotelinų raišką sustiprina fiziniai veiksniai: hipovolemija, hipoksija, šalčio poveikis, stresas, hormonai: angiotenzinas II, adrenalinas, insulinas, antidiurezinis hormonas, kortizolis, vietiniai veiksniai: augimo faktoriai, citokinai (IL – 1), aktyvuoti trombocitai, endotoksinai, trombinas, oksiduoti mažo tankio lipoproteinai. Endotelino geno ekspresiją slopina azoto oksidas (NO), prostaglandinai (PGE1, PGE2), heparinas, hepatocitų augimo faktorius (HGF), epidermio augimo faktorius (EGF), natriuretiniai peptidai [9] (2 paveikslas).

Endotelinų šeimai priklauso trys endotelino izoformos – ET-1, ET-2 ir ET-3. Tai peptidai, sudaryti iš 21 aminorūgšties liekanos. Visi trys turi bendrus receptorius, bet pasižymi skirtingu giminingumu. Endotelinai skatina uždegimą, kraujagyslių vidinio dangalo proliferaciją, vidurinio kraujagyslių dangalo hipertrofiją, raumeninių ląstelių migraciją į smulkiąsias arterioles, fibroblastų proliferaciją bei fibrozę [9].

ET biosintezė prasideda nuo pirmtakų molekulės, pro - ET, kuri susideda iš 212 aminorūgščių. Pro – ET hidrolizuojamas neutralia endopeptidaze, susidaro aktyvus prekursorius „didysis ET-1“. „Didysis ET-1“ verčiamas pilnaverčiu baltymu metaloproteinazės endoteliną konvertuojančiu fermentu – 1 (ECE – 1) [10].

Endotelinas – 1 yra vazokonstriktinis, priešūždegiminis ir proliferacinis endotelio ląstelių sekretuojamas peptidas, svarbus kraujagyslių funkcijos reguliavimui. Endotelinas - 1 yra stipriausias žinomas vazokonstriktinis peptidas gaminamas įvairių ląstelių, didžioji dalis ET-1 sintezuojama endotelijoje, epitelio ląstelėse, monocituose, makrofaguose ir fibroblastuose. Didžiausia geba sintetinti ET-1 pasižymi smulkiųjų venų endotelis, vainikinių širdies kraujagyslių ir smegenų arterijų endotelis. ET-1 ekspresija yra indukuojama TGF -  $\beta$ , jo signalai perduodami per A ir B fibroblastų endotelino receptorius, kurie stimuliuoja fibroblastų migraciją, miofibroblastų diferenciaciją ir lygiųjų raumenų proliferaciją. Skiriami dviejų tipų ET-1 receptoriai:

- 1) ET A – daugiausia lygiuosiuose raumenyse;
- 2) ET B – randama lygiuosiuose raumenyse ir endotelio ląstelėse.



2 paveikslas. ET-1 sintezės reguliacija ir veikimo vietos [12].

ET-1 dažniausiai pasižymi parakriniu veikimu. Tyrimai su endoteliniais ir specifiniais endotelino receptorių antagonistais rodo, kad šie peptidai yra svarbūs kraujagyslių fiziologijoje [12]. ET-1 dalyvauja ir autokriniėje endotelinių ląstelių reguliacijoje, skatindamas azoto oksido (NO) ir prostaciklino susidarymą. ET-1, išskirtas po endotelio ląstelių aktyvinimo ir/arba sužalojimo, vaidina svarbų vaidmenį fibroziniame bei vaskulopatiniame jungiamojo audinio ligų procese [7]. ET-1 dalyvauja fibrozės kaskadoje stimuliuodamas fibroblastų kolageno gamybą ir inhibuodamas matrikso metaloproteinazės – 1 aktyvumą.

ET-1 poveikis organams ir organų sistemoms gali būti suskirstytas į trumpalaikį (hormonų sekrecija, raumenų susitraukimas, ląstelių transporto kontrolė) ir ilgalaikį poveikį (genų ekspresijos kontrolė, poveikis ląstelių hipertrofijai, mitogenezei ir kt.). ET-1 yra parakrininis mediatorius, kuris stimuliuoja pagumburio ir hipofizės hormonų sekreciją, taip pat aldosterono, adrenalino ir širdies natriuretinio peptido išsiskyrimą.

#### 1.4.ENDOTELINAS – 1 SISTEMINĖS SKLEROZĖS PATOGENEZĖJE

Atsižvelgiant į biologinę funkciją ir mokslinių tyrimų duomenis ET-1 laikomas vienu pagrindinių SSc patogenezės komponentų. Dideli ET-1 ir jo receptorių kiekiai yra ekspresuojami tiek endotelio ląstelių, tiek cirkuliuoja SSc sergančių pacientų kraujyje. Pacientų sergančių SSc kraujo serume yra nustatomos padidintos ET-1 koncentracijos, lyginant su sveikų pacientų kontrolinėmis grupėmis [8] [17]. Pacientams sergantiems SSc, kurių vidaus organai pažeisti SSc, ET-1 koncentracija kraujo serume yra žymiai didesnė negu pacientų, kuriems dar nėra sisteminių organų pažeidimų [10]. ET – 1, kuris sekretuojamas aktyvintose ir pažeistose endotelio ląstelėse, atlieka svarbų vaidmenį fibrozės bei jungiamojo audinio vaskuliarizacijos procese [7].

2013 m. Italų mokslininkų atliktas bandomasis tyrimas patvirtino, kad SSc sergantiems pacientams serumo ET-1 koncentracija viršija rekomenduojamą referentinę vertę ir yra susijusi su ligos sunkumu ir komplikacijų rizika. Tyrimo metu buvo analizuojami SSc sergančių pacientų kraujo serumo mėginiai, nustatyta, jog nėra statistiškai reikšmingo ryšio tarp ET-1 koncentracijos ir tiriamųjų amžiaus, ANA, ANCA titrų. Bet nustatytas statistiškai reikšmingas teigiamas ryšys tarp ET-1 koncentracijos ir SSc klinikinio pasireiškimo [11]. Padidėjusi ET-1 koncentracija siejama su plaučių arterine hipertenzija (PAH), inkstų funkcijos nepakankumu, trofinėmis opomis [12].

ET-1 yra stiprus vazokonstriktorius, stiprus mitogenas fibroblastams ir lygiųjų raumenų ląstelėms, stiprus matrikso biosintezės stimulatorius. ET – 1, greičiausiai, vaidina pagrindinį vaidmenį plėtojant struktūrinį kraujagyslių sutrikimą ir organų fibrozę SSc patogenezėje.

Stimuliuodamas kraujagyslių lygiųjų raumenų ET - A receptorius, ET – 1, veikia kaip vazokonstriktorius ir kaip vazodilatatorius veikdamas endotelio ląstelių ET – B receptorius. Padidėjus ET-1 sekrecijai ir sumažėjus NO ir PGI<sub>2</sub>, ET-1 dalyvauja kraujagyslių tonuso reguliacijos procese. Tyrimų duomenimis provokacija šalčiu statistiškai reikšmingai padidino ET-1 koncentraciją pacientams sergantiems SSc lyginant su kontroline sveikų tiriamųjų grupe [20]. Vis dėlto keletos tyrimų metu nenustatytas ryšys tarp ET-1 koncentracijos bandymo pradžioje ir atlikus provokacinį šalčio tyrimą pacientams, kuriems yra pasireiškęs Reino fenomenas [22]. Tikėtina, kad padidėjusi ET-1 koncentracija, labiau gali būti endotelio pažeidimo žymeniu, o ne kraujagyslių susiaurėjimo rodikliu. ET-1 dalyvauja struktūriniame proliferaciniame kraujagyslių pažeidime, o ne vazokonstrikcijoje.

ET-1 yra stiprus mitogenas ir veikia kartu su kitais augimo faktoriais, įskaitant kraujagyslių endotelio augimo faktorių (VEGF), ir gali veikti kaip ko-mitogenas įvairių ląstelių atžvilgiu. ET-1 skatina glikoproteinų, trobospondino, fibronektino sintezę ir sekreciją. Be to, ET-1 padidina neutrofilų ir trombocitų sukibimą su kraujagyslių sienelėmis taip sukeldamas oksidacinį stresą ir kraujagyslių pažeidimą, dėl kurio atsirada endotelio disfunkcija [18]. ET-1 sukelia intimos proliferaciją ir kraujagyslių sienelės sustorėjimą pacientams sergantiems SSc. ET-1 vaidmuo dalyvaujant kraujagyslių pažeidimo procesuose demonstruojamas tyrime su transgeninėmis pelėmis [19]. Transgeninių pelių endotelio ląstelės gausiai ekspresuoja ET-1 ir tai sukelia kraujagyslių sienelių hipertrofiją ir oksidacinį stresą, kas lemia endotelio disfunkciją, taip pat žymiai padidėja ET – B receptorių, palyginti su laukinio tipo pelėmis.

### 1.5. TIRPIOS ADHEZIJOS MOLEKULĖS

Adhezijos molekulėmis vadinami įvairūs ląstelių membranų baltymai, tarpininkaujantys vykstant ląstelių sukibimui tarpusavyje arba prikibimui prie tarpląstelinio užpildo. Adhezija (lot. adhaesio – prilipimas, sukibimas) yra gyvybiškai būtina organizmo ląstelių savybė. Dėl šios funkcijos galima ląstelių diferenciacija ir augimas, migracija, audinių funkcionavimas bei vientisumo palaikymas.

Ląstelių adhezijos molekulės dalyvauja SSc patogenezėje [24]. Adhezijos molekulės dalyvauja vystantis uždegiminiam procesui, trombocitams ir leukocitams judant audinių pažeidimo vietos link. Sergant sistetine skleroze, padidėja adhezijos molekulių ekspresija endotelio ląstelių paviršiuje, o kraujyje didėja tirpiųjų šių molekulių formų koncentracija, kurią įmanoma įvertinti laboratoriniais tyrimų metodais, tiriant kraujo serumą.

Kraujagyslių ląstelių adhezijos molekulė – 1 (VCAM-1) yra glikoproteinas, kurio molekulinė masė 90 kDa, struktūra panaši į ICAM-1. VCAM-1 priklauso imunoglobulinų

superšeimai. VCAM-1 genas turi šešis arba septynis imunoglobulinų domenus ir yra ekspresuojamas tiek didžiosiose, tiek mažosiose kraujagyslėse tik tada, kai endotelio ląsteles stimuliuoja citokinai. VCAM-1 tarpininkauja limfocitų, monocitų, eozinofilų ir bazofilų sukibimui su kraujagyslių endotelium. VCAM-1 palaiko limfocitų, monocitų, natūralių žudikių, eozinofilų ir bazofilų sukibimą per sąveiką su vėlyvuju leukocitų antigenu – 4 (VLA – 4). VCAM-1 ir VLA – 4 sąveika palaiko tvirtą ne neutrofilinių leukocitų prisijungimą prie endotelio. VCAM-1 taip pat dalyvauja leukocitų sukibimo procesuose už kraujagyslių, stimuliuodama limfocitų adheziją prie kaulų čiulpų stromos ląstelių ir B limfocitų adheziją prie limfmazgių folikulinių dendritinių ląstelių. Ramybės būsenoje VCAM-1 ant endotelio ląstelių paviršiaus ekspresuojamas silpnai, tačiau ekspresiją labai suaktyvina citokinai, pavyzdžiui, TNF –  $\alpha$ , IL – 1 $\beta$ , IL – 4 ar INF –  $\gamma$ . VCAM-1 sekreciją taip pat skatina hiperglikemija, homocisteinas, oksiduoti mažo tankio lipoproteinai bei laisvieji radikalai. Yra išskirta tirpi VCAM-1 forma. Tirpių VCAM-1 molekulių randama sveikų asmenų kraujyje, o padidėjusią koncentraciją galima nustatyti sergant šiomis ligomis: vėžiu, autoimuninėmis ligomis, infekcinėmis ir kitomis lėtinėmis ligomis. VCAM-1 sintetinamas ne tik išskirtinai endotelio ląstelių, jis taip pat ekspresuojamas folikulinių dendritinių ląstelių, blužnies ir čiobrialiaukės makrofagų, Kupferio ląstelių kepenyse nesat uždegimo. Dėl plataus paplitimo žmogaus audiniuose ir organuose VCAM-1 dalyvauja daugelyje patofiziologinių mechanizmų ir yra siejamas su tam tikromis ligomis.

Tarpląstelinės sąveikos adhezijos molekulė – 1 (ICAM-1) tai adhezijos molekulė, priklausanti imunoglobulinų superšeimai. Šiai šeimai priskiriami baltymai, kurių molekulinėje sandaroje yra pasikartojančių struktūrų, panašių į imunoglobulinuose randamus domenus. Šie domenai sudaryti iš tankiai „supakuotų“ peptidų  $\beta$  vijų, kurias stabilizuoja disulfidinės jungtys.

ICAM-1 transmembraninis glikoproteinas, kurio molekulinė masė svyruoja nuo 60 iki 114 kDa, priklausomai nuo prijungtų gliukozės molekulių skaičiaus. Svarbiausi ICAM-1 ligandai yra  $\beta$ 2 integrinai: makrofagų – 1 antigenas (MAC – 1) ir su limfocitų funkcija susijęs antigenas – 1 (LFA – 1), kurie yra ekspresuojami leukocitų paviršiuje. ICAM-1 randama įvairių leukocitų ir nehematogeninių ląstelių paviršiuje. ICAM-1 yra integrino LFA-1 ligandas. Dalyvauja ląstelių migracijoje. ICAM-1 nėra specifiška endoteliui, randama daugelyje ląstelių tipų – monocitų, limfocitų, epitelinių, lygiųjų raumenų, širdies raumens ląstelių, keratinocitų, eozinofilų, fibroblastų, dendritinių ląstelių, hepatocitų, kamieninių ląstelių – paviršiuje. ICAM-1 ekspresiją stimuliuoja tokie citokinai kaip IL – 1, TNF –  $\alpha$ , INF –  $\gamma$ . Ekspresiją taip pat skatina bakterijų endotoksinai bei oksiduoti mažo tankio lipoproteinai.

Adhezijos molekulių ekspresiją galima tirti endotelio ląstelėse, tačiau daug patogiau tirti jų tirpiąsias formas kraujo serume (sICAM-1, sVCAM-1). Tam gali būti taikomos įvairios

metodikos, pavyzdžiui, imunofermentinės analizės metodas (IFA), tirpiųjų adhezijos molekulių koncentracijos nustatymui kraujo plazmoje arba serume. Tirpi adhezijos molekulė – tai užląstelinė atitinkamos adhezijos molekulės dalis, kuri, veikiant fermentams proteazėms, „nukerpama“ ties įėjimo į plazminę membraną vieta. Apie 10 proc. ląstelės paviršiaus baltymų yra pašalinami tokios proteolizės būdu, tai yra svarbus baltymų skaičių ląstelės paviršiuje reguliuojantis mechanizmas, galintis vykti įvairiose organizmo ląstelėse. sICAM-1 koncentracija kraujo serume atspindi endotelio uždegimą sergant SSc. Ši molekulė, nepaisant to, kad yra aktyvacijos žymuo, sukelia uždegimo kaskadą endotelio ląstelėse, skatindama citokinų gamybą ir kitų adhezijos molekulių ekspresiją [13]. 2018 metais Andrea Delle Sedie ir kitų autorių atlikto tyrimo duomenimis, pacientų sergančių SSc, sVCAM-1 ir sICAM-1 koncentracijos padidėjimas kraujo serume yra lygiagretus, tačiau ryšys nustatytas tik tarp sICAM-1 molekulių koncentracijos ir uždegimo žymenų (CRP, ESR) [14]. Remiantis tyrimo duomenimis galime teigti, kad sICAM-1 gali būti susiję su lėtiniu uždegimu sergant SSc.

sVCAM-1 ir sICAM-1 adhezijos molekulės plačiai naudojamos kaip endotelio disfunkcijos žymenys. Adhezijos molekulių svarba SSc patogenezėje išskiriama ne viename moksliniame tyrime [14] [15]. Ankstyvojoje SSc stadijoje pacientams ir ypač tiems, kuriems liga aktyviai progresuoja, nustatoma padidėjusi tirpių adhezijos molekulių koncentracija kraujo serume. Netgi ligos pradžioje, SSc pacientų odoje randamas padidėjęs adhezijos molekulių kiekis [16]. Tirpios adhezijos molekulių formos aptinkamos ir kraujyje. sVCAM-1 padidėjimas kraujo serume, sergant SSc, gali būti susijęs su organų pažeidimo mastu [13]. Tirpios adhezijos molekulės, VCAM-1, ICAM-1, išskiriamos endotelinių ląstelių, aktyvuoja endotelio ląsteles ankstyvose SSc stadijose ir koreliuoja su tam tikrų organų pažeidimu ir komplikacijomis [17]. sVCAM-1 ir sICAM-1 ryšys su SSc sunkumu nustatytas daugelyje mokslinių studijų [19] [17], tačiau ne visose [16].

Endotelio ląstelių pažeidimas sukelia adhezijos molekulių ekspresiją, tai sukelia tolimesnį endotelio pažeidimą dalyvaujant uždegimą sukeliančioms ląstelėms. Ankstinių tyrimų duomenimis nustatyta, kad pacientų sergančių SSc fibroblastai pasižymi padidėjusia ICAM-1 ekspresija, o tai rodo padidėjusį potencialą prisijungti prie uždegiminių ląstelių [17].

## 1.6. ANTIKŪNAI PRIEŠ IŠSKIRIAMUS IŠ BRANDUOLIO ANTIGENUS IR SISTEMINĖ SKLEROZĖ

Iš branduolio išskiriami antigenai yra tirpūs branduolio komponentai, kurie yra autoantikūnų taikiniai. Šiuo metu žinoma per 100 antikūnų prieš išskiriamus iš branduolio antigenus (ENA), tačiau klinikinėje praktikoje dažniausiai nustatomi antikūnai prieš šiuos keturiolika antigenų: nRNP, Sm, SS - A (SS - A natyviniis ir Ro - 52), SS - B, Scl-70, PM - Scl, CENP-B, PCNA, ds - DNR, nukleosomas, histonus, ribosominį P baltymą ir AMA - M2. ENA autoantikūnų tyrimas gali būti taikomas tokių ligų kaip sisteminė raudonoji vilkligė, Sjogren'o sindromas, polidermatomiozitas ir SSc diagnostikai.

Serumo autoantikūnų aptikimas prieš iš branduolio išskiriamus antigenus yra SSc serologinis žymuo. Sergant SSc, šie autoantikūnai aptinkami 95 proc. pacientų [32]. Išskiriami 3 pagrindiniai SSc specifiniai autoantikūnai, kiti – retesni, nespecifiniai, nenustatyti arba kliniškai nereikšmingi [33]. SSc būdingi autoantikūnai retai nustatomi pacientams sergantiems kitomis jungamojo audinio ligomis ir dar rečiau aptinkami pacientams, kurie neserga autoimuninėmis ligomis. SSc sergantiems pacientams retai nustatomas daugiau negu vienas autoantikūnas [34]. Anti – ENA antikūnų reikšmė SSc patogenezėje nėra aiškiai nustatyta, tačiau šie autoantikūnai gali būti siejami su ligos prognoze ir klinikine išraiška. Anti – ENA nustatymas yra naudingas ankstyvos ir tikslios diagnozės nustatymui.

Antikūnai prieš topoizomerazę I (Scl-70) aptinkami 25 – 75 proc. pacientų sergančių skleroderma, ypač sergant SSc. Pacientai, kuriems pasireiškia Reino sindromas ir aptinkami antikūnai prieš Scl-70, dažniausiai susiduria su tipine difuzine progresuojančia sisteminė skleroze. Scl – 70 antigenas buvo identifikuotas kaip funkciškai aktyvus fermento DNR topoizomerazės I degradacijos produktas. 70 kDa molekulinės masės antigenas yra lokalizuotas nukleoplazmoje ir ypač didelė jo koncentracija yra branduolyje. Fermentas dalyvauja DNR dvigubos grandinės replikacijoje ir transkripcijoje.

Antikūnai prieš centromeras pirmą kartą buvo aprašyti 1980 metais. Išskiriami keli centromerų baltymai – A, B, C ir D. Tačiau pagrindinis taikinyss SSc patogenezėje yra B centromerų baltymas. Antikūnai prieš centromerų baltymą B (CENP – B) aptinkami net 80 – 95 asmenų sergančių ribota SSc forma [32] [33]. Jie nustatomi tik 8 – 10 proc. pacientų, sergančių difuzine ligos forma. CENP – B autoantikūnų nustatymo jautrumas sergant SSc svyruoja nuo 20 iki 40 proc., kai tuo tarpu specifiškumas siekia net 97 proc. [33]. CENP-B autoantikūnai yra siejami su ribota SSc ir geresne ligos prognoze, palyginus su kitais SSc būdingais autoantikūnais.

Antikūnai prieš RNR polimerazę III (RNAP III) aptinkami 5 – 23 proc. pacientų sergančių SSc [36]. Šių autoantikūnų aptikimas siejamas su sunkia ligos eiga ir bloga ligos prognoze, galima didesne inkstų ir širdies pažeidimo rizika. SSc sergantiems pacientams, kuriems nustatomi autoantikūnai prieš RNAP III, dažniausiai nėra aptinkami SSc būdingiausi autoantikūnai, tokie kaip CENP – B ir Scl-70 [33].

Autoantikūnų prieš Scl-70, CENP-B ir RNAP III aptikimas paciento kraujo serume yra vienas iš siūlomų, 2013 metais Amerikos reumatologijos kolegijos (ACR) ir Europos lygos prieš reumatines ligas (EULAR), sudarytų, SSc klasifikavimo kriterijų [40]. Pacientams sergantiems SSc nustatomi ir kiti ENA subtipai, kurie nėra specifiški ir aptinkami sergant kitomis reumatinėmis autoimuninėmis jungiamojo audinio ligomis [36].

### 1.7. UŽDEGIMO ŽYMENYS SERGANT SISTEMINE SKLEROZE

Tokie uždegimo žymenys kaip eritrocitų nusėdimo greitis (ENG) ir C reaktyvusis baltymas (CRB) daugelio autoimuninių ir reumatinių ligų atvejų yra mažai jautrūs ir nespecifiški. Jie gali būti naudingi nustatant uždegiminio proceso eigą ir sunkumą, kuris gali lemti tam tikrą sisteminę jungiamojo audinio ligą. ENG nustatymas yra taikomas uždegiminių ligų atrankai, ypač kai pacientas turi neaiškių bendro pobūdžio nusiskundimų. Vienas aiškiausių ENG padidėjimo mechanizmų – ūmiai uždegimo fazei būdingų baltymų, ypač fibrinogeno, koncentracijos padidėjimas kraujo serume, tačiau ENG padidėjimas stebimas ir kitų lėtinių uždegiminių ligų atveju.

Autoimuninių reakcijų metu vyksta fagocitozė, makrofagai išskiria signalines molekules ir citokinus, ypač IL - 6, jis kepenų ląstelėse sukelia ūmios fazės baltymų, ypač CRB sintezę, skatina leukocitozę, ypač neutrofilų gamybą. CRB yra ūmios fazės baltymas, infekcinio proceso uždegimo žymuo. Sveikstant ENG gali būti padidėjęs keletą savaičių. CRB koncentracija dažniausiai koreliuoja su ENG, tačiau CRB koncentracija kinta kas 6 valandas, t.y. CRB pokyčiai greitesni nei ENG, tačiau sisteminių jungiamojo audinio ligų diagnostikoje ENG laikomas patikimesniu biologiniu žymeniu. Klinikinių studijų duomenimis, pacientų sergančių SSc, padidėjusi CRB koncentracija ir yra susijusi su prastesne ligos prognoze [37] [38] [39]. 2012 metais Kanadoje atlikto tyrimo duomenimis, ištyrus 1043 pacientus, kuriems diagnozuota SSc, 25 proc. pacientų CRB koncentracija buvo padidėjusi. Šios studijos metu, nustatyta, kad padidėjusi CRB koncentracija būdinga pacientams sergantiems difuzine SSc forma, susijusi su sunkesniu odos ir plaučių pažeidimu [37]. Tyrimų rezultatai rodo, kad CRB koncentracija gali būti naudojama kaip prognostinis žymuo, nustatant SSc pacientų pogrupį, kuriam reikalingas intensyvesnis stebėjimas ir gydymas [39].



## 1.8.SISTEMINĖS SKLEROZĖS LABORATORINĖ DIAGNOSTIKA

Sisteminės sklerozės diagnozė nustatoma remiantis klinikinių požymių, laboratorinių žymenų ir fizinės būklės visuma [12]. Tačiau iki šiol nėra nustatyta specifinių laboratorinių rodiklių, kurie galutinai patvirtintų SSc diagnozę. Šiuo metu pagrindinė laboratorinių tyrimų paskirtis diagnozuojant SSc – „atmesti“ kitus galimus autoimuninius susirgimus ir įvertinti vidaus organų pažeidimų laipsnį ir sunkumą. Liga diagnozuojama remiantis klinikiniais požymiais ir specifiniais autoantikūnų tyrimais - ANA, ENA.

Autoantikūnų tyrimai atliekami tiek diagnozuojant ligą, tiek stebint jos eigą, gydymo efektyvumą bei diferencijuojant nuo kitų autoimuninių reumatinių būklių. Autoantikūnai šiuo metu yra vieni patikimiausių biologinių žymenų SSc diagnostikoje, klasifikacijoje ir tolimesnėje ligos klinikinių požymių pasireiškimo prognozėje [13]. 80 - 90 proc. SSc pacientų nustatomas vienas iš SSc specifinių ar su SSc susijusių serumo autoantikūnų ir retais atvejais daugiau negu vienas iš šių specifinių autoantikūnų [36]. Vienas iš pagrindinių, atliekamų SSc mokslinių tyrimų, uždavinių yra sukurti visuotinę ligos aktyvumo matavimo ir vertinimo priemonę, kuri atspindėtų nuolatinę ligos būseną ir atsaką į gydymą.

## 2. EKSPERIMENTINĖ DALIS

### 2.1. TIRIAMŪJŲ IMTIS IR CHARAKTERISTIKA

Mokslo tiriamojo darbo tikslui ir uždaviniams pasiekti buvo pasitelkta 30 tiriamųjų imtis, pacientai buvo tirti ir gydyti Vilniaus Universiteto ligoninės Santaros klinikose (VUL SK). Tiriamųjų imtį sudarė, Vilniaus Universiteto ligoninės Santaros klinikų reumatologijos skyriaus, pacientai, sergantys sistemine skleroze. Sistemine skleroze šiems pacientams buvo diagnozuota remiantis, 2013 metais Amerikos reumatologijos kolegijos (ACR) ir Europos lygos prieš reumatinę ligą (EULAR), sudarytais klasifikavimo kriterijais [43]. Tiriamoji medžiaga – veninio kraujo serumo mėginiai.

Pacientų daugumą sudarė moterys – 87 proc., vyrai sudarė – 13 proc. Tiriamųjų amžiaus vidurkis buvo  $52,5 \pm 8,7$  metai. 84 proc. tiriamųjų diagnozuota ribota SSc forma, tik 16 proc. pacientų sirgo difuzine SSc. Pagal ligos pasireiškimą ir klinikinius simptomus pacientai pagal ligos trukmę buvo suskirstyti į tris grupes: sergantys SSc mažiau negu 5 metus (57 proc.); sergantys nuo 5 iki 10 metų (27 proc.); sergantys daugiau negu 10 metų (57 proc.). 37 proc. tiriamųjų buvo nustatyta PAH.

### 2.2. TYRIMO METODAI

Antikūnų prieš išskiriamus iš branduolio antigenus nustatymui taikytas imunobloto metodas (*Euroimmun*, Vokietija): atlikta kokybinė reakcija autoantikūnams aptikti prieš 14 skirtingų autoantigenų: nRNP/Sm, SS – A (SS – A natyvinį ir Ro - 52), SS – B, Scl – 70, PM – Scl, CENP – B, PCNA, ds – DNR, nukleosomas, histonus, ribosominį P baltymą ir AMA – M2.

Tirpių adhezijos molekulių VCAM-1 ir ICAM-1 koncentracija nustatyta IFA metodu (*IBL International*, Vokietija). Vidutinė tiekėjo nurodoma sveikų asmenų ICAM-1 koncentracija kraujo serume  $<504$  ng/ml. Rekomenduojama vidutinė referentinė sveikų asmenų VCAM-1 koncentracija  $<772$  ng/ml.

ET-1 koncentracija išmatuota IFA metodu (*BioSource<sup>TM</sup>*, *Biomedica*, Austrija). Tikėtina vidutinė tiekėjo nurodoma ET-1 koncentracija sveikų pacientų kraujo serume  $<0,65$  pg/ml.

CRB koncentracija nustatyta nefelometrijos metodu (*Dade Behring*, BNII, Vokietija), rekomenduojama referentinė CRB koncentracija  $<5$  mg/l.

ENG įvertintas Westergreno metodu. Šiame tyrime normalia ENG verte pasirinkta  $<30$  mm/h atsižvelgiant į lyčių pasiskirstymą (87 proc. moterų) ir tiriamųjų amžiaus vidurkį ( $53 \pm 9$  metai).

## 2.2.1. TIESIOGINĖS DAUGIASLUOKSNĖS „SUMUŠTINIO“ TIPO IMUNOFERMENTINĖS ANALIZĖS METODAS ET-1, VCAM-1 IR ICAM-1 KONCENTRACIJOS NUSTATYIMUI

ET-1 koncentracija, pacientų kraujo serume, nustatyta naudojantis tiesioginės daugiasluoksnės „sumuštinio“ tipo IFA metodu (*Sandwich ELISA*). Tai ypač jautrus ir specifiškas tyrimo metodas, jau tapęs rutiniu tiek moksliniuose, tiek klinikiuose *in vitro* tyrimuose. IFA metodo esmė yra ta, jog norint, paciento kraujo serume, nustatyti tam tikrų antigenų koncentraciją, ją galima išmatuoti panaudojus tam tikrą žymę, t. y. fermentą krienų peroksidazę (HRP).

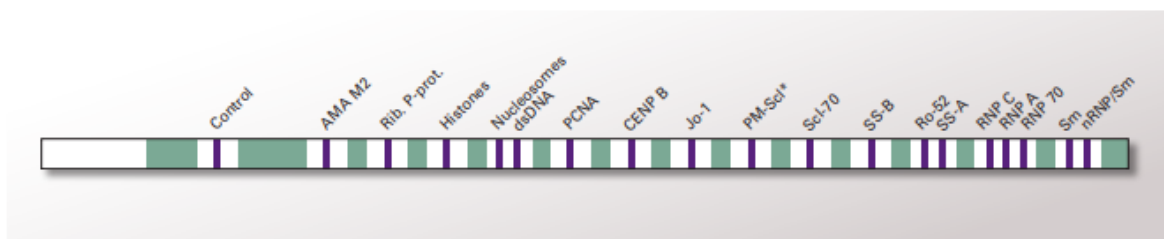
Tyrimo metu naudoti du skirtingi antikūnai, atpažįstantys nepersidengiančius skirtingus to paties antigeno epitopus. Fiksuotas pirmų antikūnų kiekis yra sujungtas su netirpia matrica, plastikinės mikrotitravimo plokštelės šulinėliais. Į šulinėlius dedamas tiriamas paciento kraujo serumas su nežinoma antigeno (ET-1, VCAM-1, ICAM-1) koncentracija, šalia titruojami standartiniai tirpalai su žinoma antigenų koncentracija. Tiriamas kraujo serumas, kuriame yra ieškomų antigenų, reaguoja su šulinėlio dugne fiksuotais specifiniais antikūnais. Antigenai rišasi prie šulinėlio dugne esančių antikūnų, neprisirėję antigenai nuplaunami.

Į šulinėlius dedamas konjugatas, fermentu žymėti monokloniniai antikūnai prieš žmogaus IgG klasės imunoglobulinus. Šie antikūnai yra sujungti su fermentu krienų peroksidaze (HRP). Kuo daugiau šulinėliuose bus prie pirminių antikūnų prisirėšusių antigenų, tuo daugiau prie šių antigenų prisirėš antrinių žymėtų antikūnų. Į reakcijos tirpalą dedamas substratas - tetrametilbenzidinas (TMB). Fermentas skaldo chromogeninį substratą, gaunama spalvinė reakcija, kuri vertinama matuojant reakcijos tirpalo optinį tankį spektrofotometru. Dėl vykstančios imunofermentinės reakcijos kinta reakcijos tirpalo spalva. Spalvos intensyvumas yra proporcingas serumo mėginyje esančių antigenų koncentracijai. Pagal standartinių antigenų rišimąsi nubraižomos standartinės kalibracinės kreivės, iš kurių išskaičiuojamos tiriamų antigenų koncentracijos.

## 2.2.2. IMUNOBLOTO METODAS ENA NUSTATYIMUI

Siekiant nustatyti ENA autoantikūnus kraujo serume, atlikta pusiau kokybinė reakcija su žmogaus IgG klasės autoantikūnais prieš 14 skirtingų antigenų: nRNP, Sm, SS-A (SS-A natyvinis ir Ro-52), SS-B, Scl-70, PM-Scl, CENP-B, PCNA, ds-DNR, nukleosomas, histonus, ribosominį P baltymą ir AMA-M2. Tyrimui naudotos juostelės padengtos lygiagrečiomis išgrynintų antigenų linijomis (3 paveikslas). Pirmame reakcijos etape juostelės yra sudrėkinamos ir inkubuojamos kartu su paciento kraujo serumu. Jeigu tiriamame kraujo serume yra specifinių ENA

autoantikūnų, t.y. mėginiai yra teigiami, tuomet specifiniai IgG klasės antikūnai susiriša su atitinkama antigeno vieta. Po inkubacijos naudojamas buferinis tirpalas, skirtas pašalinti visus reakcijoje nedalyvaujančius serumo komponentus, su antigenais nesusirišusius IgG. Antros reakcijos metu, pirmojoje reakcijoje surištų antikūnų aptikimui, yra atliekama inkubacija su konjugatu – fermentu krienų peroksidaze (HRP) žymėtais monokloniniais antikūnais prieš žmogaus imunoglobulinus. Sukeliama spalvinė reakcija, kurios intensyvumas proporcingas tiriamojo kraujo serume esamų antikūnų koncentracijai. Imunobloto metodas pasižymi ypač aukštu jautrumu ir specifiškumu. Ant tyrimo juostelių yra kontrolinis ruoželis. Inkubavimas atliktas tinkamai, jeigu kontroliniame ruoželyje matoma ryški spalvinė reakcija.



**3 paveikslas.** Lygiagrečiomis išgrynintų antigenų linijomis padengta ENA tyrimo juostelė [45].

### 2.3. STATISTINĖ DUOMENŲ ANALIZĖ

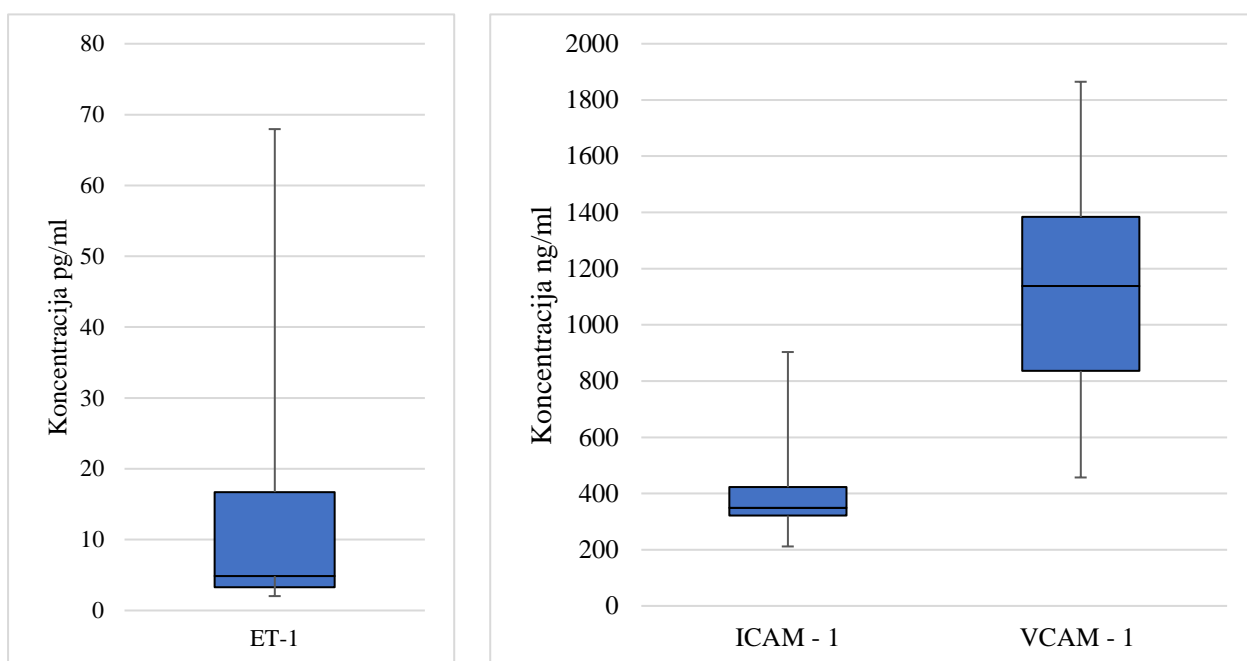
Statistinė duomenų analizė buvo atlikta naudojant *Microsoft Office Excel 2013*, *IBM SPSS Statistics 21* programinės įrangos paketus. Kokybiniai duomenys apibūdinami absoliučiuoju skaičiumi ir procentine išraiška. Parametrinių duomenų apibūdinimui naudotas aritmetinis vidurkis ir standartinis nuokrypis. Neparametriai duomenys apibūdinomi vidutine, minimalia ir maksimalia reikšmėmis. Kolmogorovo – Smirnovo kriterijus naudotas nustatant normalųjį kintamųjų skirstinį. Vertinant parametrų skirtumus tarp grupių naudotas nepriklausomas T-testas (*Independent Sample T-test*), kelių grupių vidurkiams palyginti naudota vienfaktorinė dispersinė analizė (ANOVA). Sąsajų tarp biologinių žymenų (ET-1, ICAM-1, VCAM-1) įvertinimui naudotas *Spearman*’o koreliacijos koeficientas. Duomenų skirtumai laikyti statistiškai reikšmingais, kai paklaidos tikimybės  $p$  reikšmė buvo mažesnė už 0,05 ( $p \leq 0,05$ ).

### 3. TYRIMO REZULTATAI

#### 3.1. ET – 1, VCAM-1 IR ICAM-1 KONCENTRACIJOS TIRIAMŪJŲ KRAUJO SERUME DIAGNOSTINĖ VERTĖ, SERGANT SISTEMINE SKLEROZE

Mokslo tiriamojo darbo tikslui ir uždaviniams pasiekti buvo nustatyta ICAM-1, VCAM-1 ir ET-1 koncentracija tiriamųjų kraujo serumo mėginiuose.

Vidutinė ET-1 koncentracija tiriamųjų kraujo serume buvo 4,86 pg/ml, minimali reikšmė – 0,435 pg/ml, maksimali – 67,95 pg/ml (4 paveikslas). Net 83 proc. tiriamųjų kraujo serume nustatyta ET-1 koncentracija viršijo reagentų gamintojo rekomenduojamą vidutinę referentinę vertę (< 0,65 pg/ml).

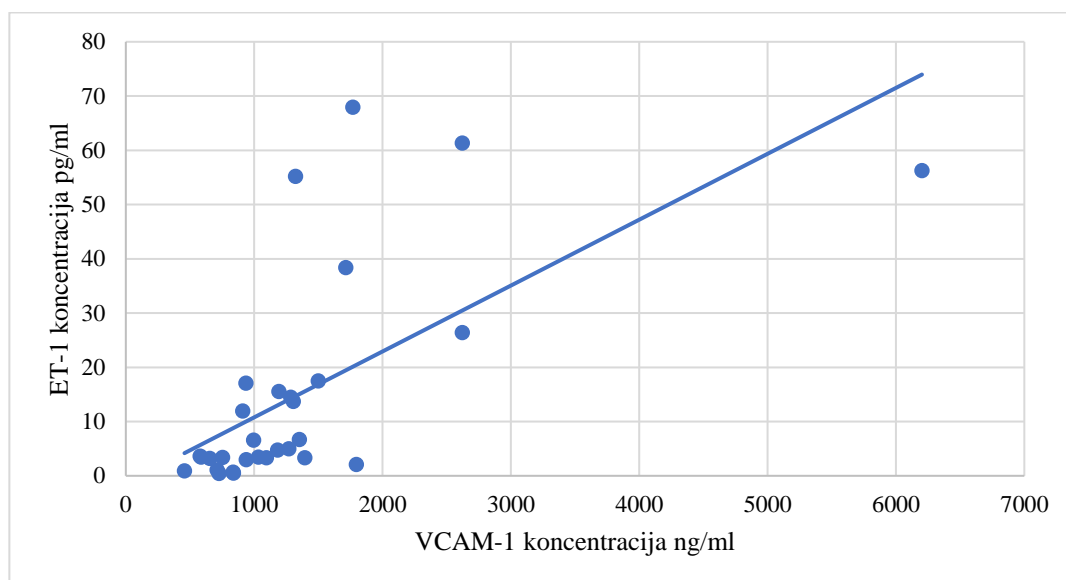


**4 paveikslas.** ET-1 ir tirpių adhezijos molekulių (ICAM-1, VCAM-1) koncentracija tiriamųjų kraujo serume.

Vidutinė VCAM-1 koncentracija – 1137,75 ng/ml, mažiausia nustatyta koncentracija – 457,0 ng/ml, didžiausia - 6202,5 ng/ml. Reagentų gamintojo nurodyta vidutinė referentinė sveikų asmenų VCAM-1 koncentracija < 772 ng/ml. Daugiau negu pusės, net 77 proc. tiriamųjų VCAM-1 koncentracija kraujo serume buvo didesnė negu 772 ng/ml.

Vidutinė ICAM-1 koncentracija tiriamųjų kraujo serume buvo 372,39 ng/ml (SD = 106,19). Tikėtina tiekėjo nurodoma sveikų asmenų vidutinė referentinė ICAM-1 reikšmė < 504 ng/ml. Tik 10 proc. tiriamųjų kraujo serume nustatyta ICAM-1 koncentracija viršijo gamintojo nurodytą vidutinę koncentraciją. Likusių pacientų ICAM-1 koncentracija buvo žemesnė už rekomenduojamą vidutinę referentinę reikšmę (4 paveikslas).

Tyrimo metu nustatyta statistiškai reikšminga, vidutinio stiprumo, teigiama priklausomybė tarp ET-1 ir tirpių adhezijos molekulių VCAM-1 koncentracijos tiriamųjų kraujo serume ( $r = 0,687$ ;  $p < 0,001$ ) (5 paveikslas). Statistiškai reikšmingo ryšio tarp ET-1 ir tirpių adhezijos molekulių ICAM-1 koncentracijos nenustatyta ( $r = 0,13$ ;  $p = 0,945$ ).



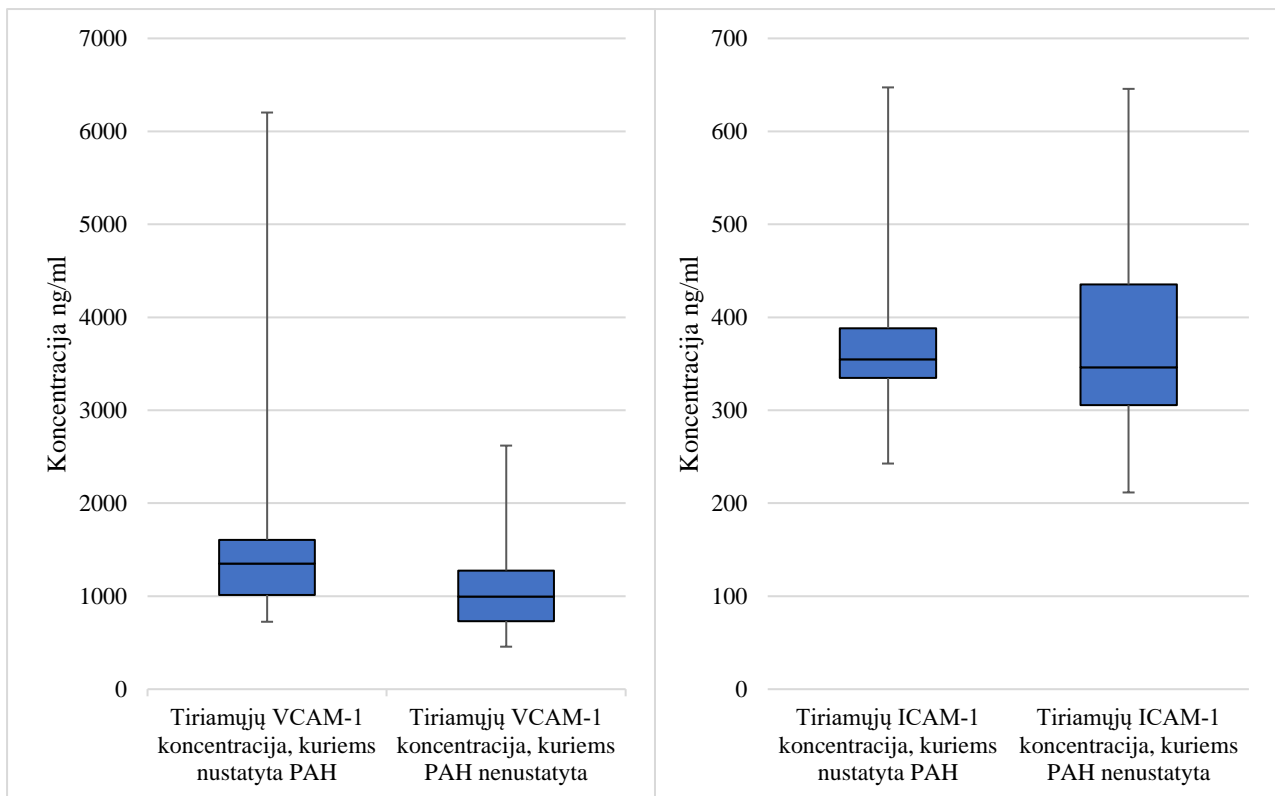
**5 paveikslas.** ET-1 ir VCAM-1 koreliacija tiriamųjų kraujo serume.

Tyrimo metu nenustatyti statistiškai reikšmingi ET-1, ICAM-1 bei VCAM-1 koncentracijų skirtumai pagal ligos trukmę (1 lentelė).

**1 lentelė.** ET-1 ir tirpių adhezijos molekulių (ICAM-1, VCAM-1) koncentracijų skirtumai tarp grupių pagal ligos trukmę.

	ET-1 (pg/ml)		VCAM-1 (ng/ml)		ICAM-1 (ng/ml)	
	<i>vidutinė koncentracija</i>	<i>p</i>	<i>vidutinė koncentracija</i>	<i>p</i>	<i>vidutinė koncentracija</i>	<i>p</i>
<b>Ligos trukmė</b>	<5 metų	4,75	1180,50		325,00	
	5 – 10 metų	5,03	924,25	0,193	411,950	0,191
	>10 metų	14,50	1322,00		344,30	

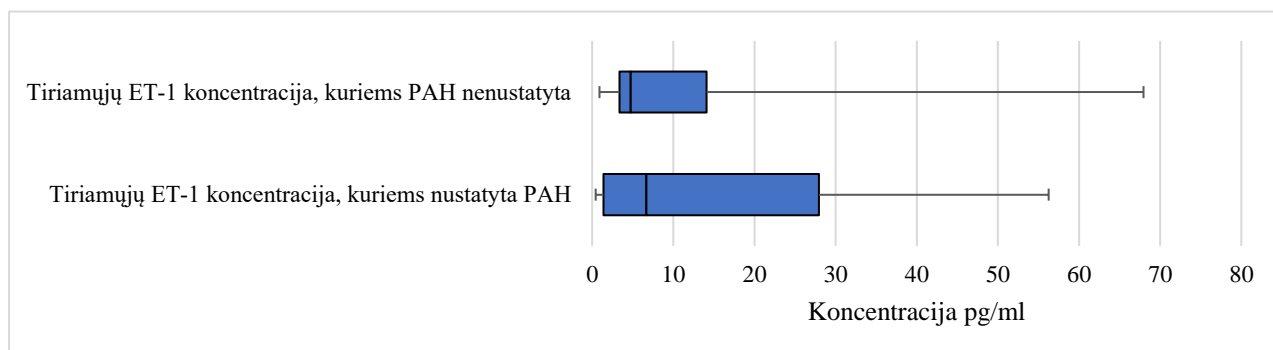
Tyrimo metu bandyta nustatyti tirpių adhezijos molekulių koncentracijos skirtumus tarp pacientų kuriems diagnozuota PAH, ir kuriems, PAH nenustatyta (6 paveikslas). Tačiau statistiškai reikšmingų skirtumų nustatyti nepavyko (2 lentelė). Skirtumų buvo bandoma rasti ir tarp ET-1 koncentracijos bei PAH diagnozės (7 paveikslas). Pacientų, kuriems nustatyta PAH, ET-1 koncentracija statistiškai reikšmingai nesiskyrė nuo pacientų, kuriems PAH nenustatyta (2 lentelė).



**6 paveikslas.** Tirpių adhezijos molekulių (ICAM-1, VCAM-1) koncentracijų skirtumai tarp pacientų grupių, atsižvelgiant į PAH.

**2 lentelė.** ET-1 ir tirpių adhezijos molekulių (ICAM-1, VCAM-1) koncentracijų skirtumai tarp pacientų, atsižvelgiant į PAH.

PAH	ET-1 (pg/ml)		VCAM-1 (ng/ml)		ICAM-1 (ng/ml)	
	<i>vidutinė koncentracija</i>	<i>p</i>	<i>vidutinė koncentracija</i>	<i>p</i>	<i>vidutinė koncentracija</i>	<i>p</i>
nustatyta (n = 11)	6,68	0,863	1352,50	0,074	354,80	0,747
nenustatyta (n = 19)	4,75		995,00		346,10	

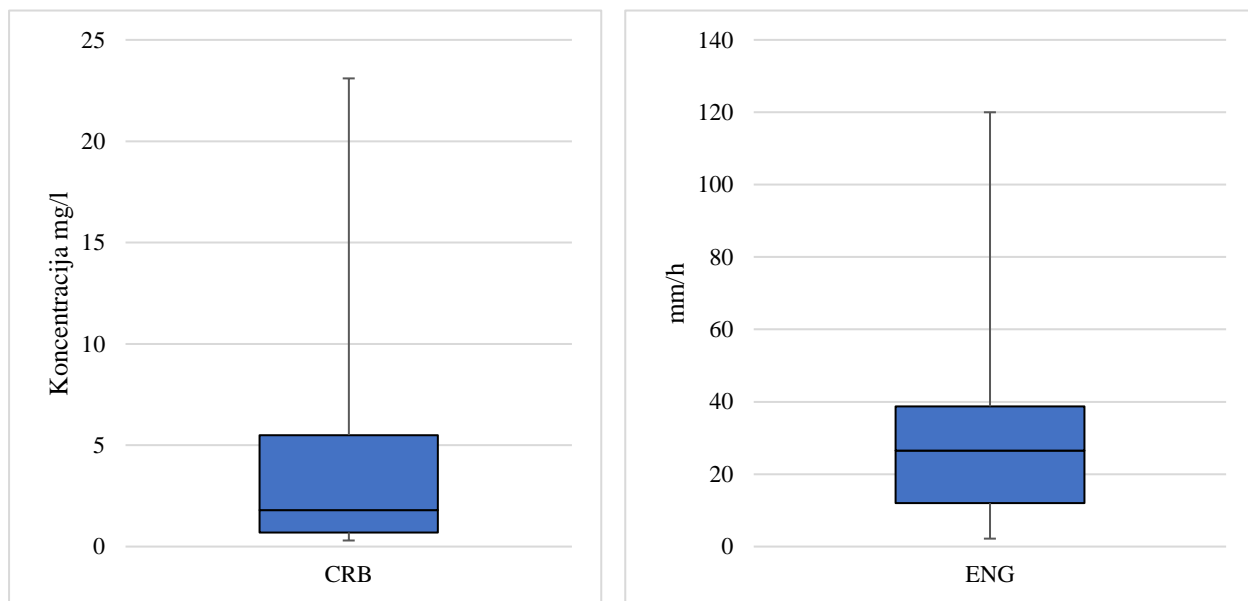


**7 paveikslas.** ET-1 koncentracijos skirtumai tarp pacientų, atsižvelgiant į PAH.

### 3.2. ET – 1, VCAM-1 IR ICAM-1 SAŠAJOS SU UŽDEGIMO ŽYMENIMIS (CRB, ENG, ENA), VERTINANT UŽDEGIMINIO PROCESO EIGĄ

Tiriamąo darbo metu, iškeltiems uždaviniams pasiekti, tiriamųjų kraujo serume, buvo nustatyti uždegimo žymenys: CRB, ENG, ENA.

Beveik pusės - 43 proc. tiriamųjų ENG rodiklis viršijo rekomenduojamą referentinę vertę ( $\geq 30$  mm/h). Vidutinė nustatyta ENG reikšmė 29 mm/h; SD = 23,13 (8 paveikslas).



**8 paveikslas.** CRB koncentracija ir ENG reikšmė tiriamųjų kraujo serume.

Tyrimo metu nustatyta, kad 27 proc. pacientų kraujo serume CRB koncentracija buvo didesnė negu 5 mg/l. Rekomenduojama referentinė CRB koncentracija  $<5$  mg/l. Vidutinė tiriamųjų CRB koncentracija 1,8 mg/l, minimali nustatyta koncentracija - 0,30 mg/l, maksimali – 23,10 mg/l (8 paveikslas).

Tiriamųjų kraujo serume nustatytas statistiškai reikšmingas, silpnas, teigiamas ryšys tarp ET-1 ir CRB koncentracijos ( $r = 0,387$ ;  $p = 0,035$ ). Statistiškai reikšmingas ryšys tarp ET-1 ir ENG nenustatytas ( $r = 0,348$ ;  $p = 0,064$ ) (3 lentelė).

Tyrimo metu reikšmingo VCAM-1 ryšio su CRB koncentracija ( $r = 0,218$ ;  $p = 0,256$ ) ir ENG ( $r = 0,170$ ;  $p = 0,368$ ) nenustatyta. Tyrimo metu nustatytas silpnas, teigiamas ICAM-1 ir ENG ryšys ( $r = 0,369$ ;  $p = 0,045$ ). ICAM-1 ir CRB koncentracijos ryšys nenustatytas ( $r = 0,306$ ;  $p = 0,107$ ) (3 lentelė).

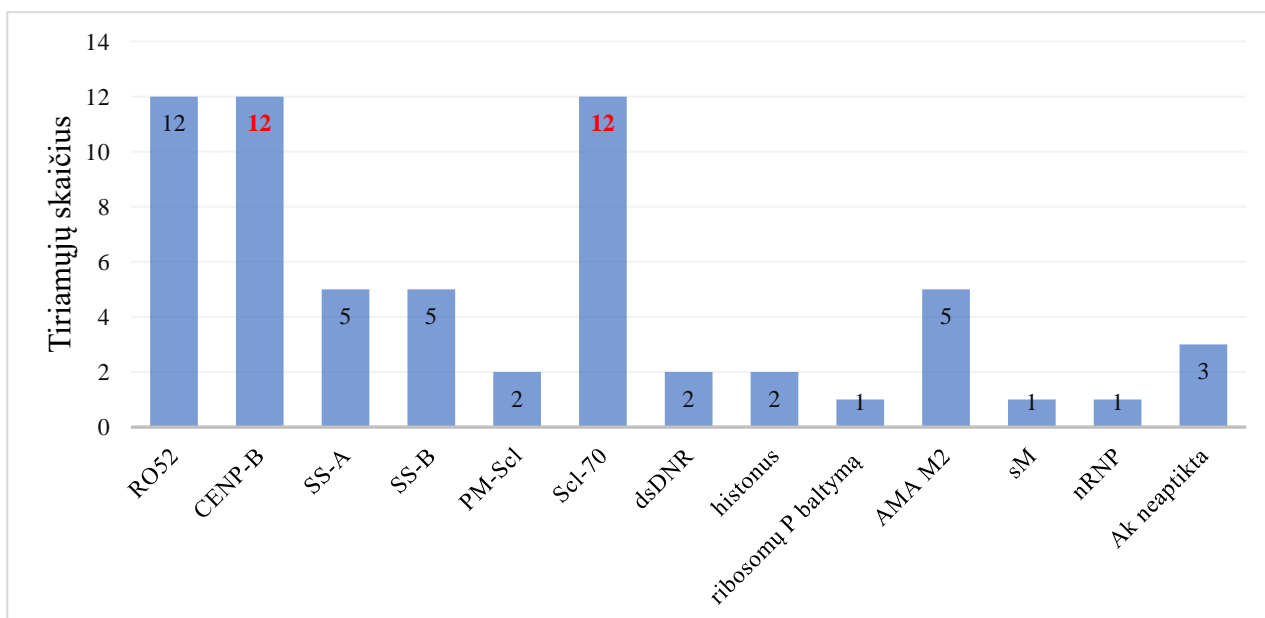


**3 lentelė.** ET-1 ir tirpių adhezijos molekulių (ICAM-1, VCAM-1) ryšys su uždegimo žymenimis.

		<i>r</i>	<i>p</i> reikšmė
<b>ET-1</b>	<i>CRB</i>	0,387	0,035*
	<i>ENG</i>	0,348	0,064
<b>VCAM-1</b>	<i>CRB</i>	0,218	0,256
	<i>ENG</i>	0,170	0,368
<b>ICAM-1</b>	<i>CRB</i>	0,306	0,107
	<i>ENG</i>	0,369	0,045*

\* - statistiškai reikšmingas ryšys

Tiriamoje pacientų grupėje dažniausiai nustatyti autoantikūnai prieš CENP-B (n = 12), Ro – 52 (n = 12) ir Scl – 70 (n = 12) (9 paveikslas). Autoantikūnų prieš kitus iš branduolio išskiriamus antigenus aptikta mažiau, tačiau net 60 proc. tiriamųjų nustatytas daugiau negu vienas ENA autoantikūnų tipas. 3 tiriamiesiems ENA autoantikūnai neaptikti. Literatūros duomenimis Scl-70 ir CENP-B autoantikūnai yra laikomi specifiskiausiai SSc patogenezėje. Tyrimo metu šių autoantikūnų pasiskirstymo dažnis tarp tiriamųjų buvo vienodas. 40 proc. pacientų nustatyti Scl-70, kitiems 40 proc. tiriamųjų aptikti CENP-B autoantikūnai. Nei vienam iš trisdešimties pacientų nebuvo nustatyti abu autoantikūnai kartu.



**9 paveikslas.** ENA autoantikūnų aptikimo dažnis tiriamųjų kraujo serume.

Tyrimo metu nenustatyti statistiškai reikšmingi skirtumai tarp ET-1 ( $p = 0,780$ ), VCAM-1 ( $p = 0,478$ ) koncentracijų ir tiriamųjų grupių, kuriems nustatyti CENP-B, ir kuriems šie autoantikūnai neaptikti. Rastas reikšmingas skirtumas tarp CENP-B autoantikūnų turinčių ir neturinčių pacientų grupių bei ICAM-1 koncentracijos ( $p = 0,002$ ). Tiriamųjų, kurių kraujo serume

buvo nustatyti CENP-B autoantikūnai, ICAM-1 koncentracija buvo žemesnė negu likusių pacientų, kuriems šie autoantikūnai nenustatyti. Reikšmingi skirtumai tarp pacientų grupių, turinčių Scl-70 autoantikūnus ir neturinčių bei ET-1 ( $p = 0,525$ ), ICAM-1 ( $p = 0,325$ ) ir VCAM-1 ( $p = 0,799$ ) nenustatyti. Statistiškai reikšmingas skirtumas nustatytas tarp Scl-70 autoantikūnų turinčių tiriamųjų grupės ir ENG ( $p = 0,029$ ) (4 lentelė). Pacientų, kuriems nustatyti Scl-70 autoantikūnai, ENG reikšmės buvo didesnės, negu tiriamųjų grupės, kuriems šie autoantikūnai neaptikti.

**4 lentelė.** ET-1, tirpių adhezijos molekulių ir uždegimo žymenų koncentracijų skirtumai tarp tiriamųjų, atsižvelgiant į CENP-B ir Scl-70 autoantikūnų aptikimą.

	<b>CENP-B</b>			<b>Scl-70</b>		
	Antikūnai aptikti (n = 12)	Antikūnai neaptikti (n = 18)	p reikšmė	Antikūnai aptikti (n = 12)	Antikūnai neaptikti (n = 18)	p reikšmė
<b>ET-1</b> (pg/ml)	3,55	6,60	0,780	9,28	3,63	0,525
<b>VCAM-1</b> (ng/ml)	934,75	1190,50	0,478	1045,00	1180,50	0,799
<b>ICAM-1</b> (ng/ml)	308,06	409,64	0,002*	396,17	356,54	0,325
<b>CRB</b> (g/l)	2,40	1,50	0,818	3,55	1,80	0,199
<b>ENG</b> (mm/h)	25,27	30,85	0,534	39,92	21,40	0,029*

X – žymens vidutinė reikšmė, \* - statistiškai reikšmingas skirtumas

## 4. REZULTATŲ APTARIMAS

Šio tiriamojo darbo tikslas buvo įvertinti endotelino – 1 (ET-1), kraujagyslių ląstelių adhezijos molekulių - 1 (VCAM-1) ir tarpląstelinės adhezijos molekulių – 1 (ICAM-1) kiekio kraujo serume diagnostinę vertę ir įtaką ligos patogenezėje, pacientams sergantiems sisteminė skleroze.

SSc reta liga, Lietuvoje šia liga serga apie 200 žmonių. Būtent dėl šios priežasties mūsų tiriamųjų imtį sudarė tik 30 pacientų, kuriems diagnozuota SSc. Mokslinės literatūros duomenimis moterys SSc serga 3 – 4 kartus dažniau negu vyrai [3], todėl ir mūsų tyrimo metu tiriamųjų daugumą sudarė moterys (87 proc.). SSc jaunų ir vidutinio amžiaus asmenų liga, dažniausiai susergama 20 – 50 metų amžiaus [6]. Mūsų tyrime dalyvavusių tiriamųjų amžiaus vidurkis buvo 52 metai.

Endotelio disfunkcijos ir fibrozės pasireiškimas SSc metu rodo, kad endotelio ląstelių sekretuojamos medžiagos, tokios kaip ET – 1, gali būti svarbūs sisteminės sklerozės patogenezės veiksniai ir diagnostikos žymenys [45]. ET-1 yra endogeninis vazokonstriktorius, sekretuojamas kraujagyslių endotelio ląstelių. ET-1 skatina endotelio proliferaciją, fibrozę ir kraujagyslių uždegimą. Mūsų atlikto tyrimo metu net 83 proc. tiriamųjų kraujo serume nustatyta ET-1 koncentracija viršijo reagentų gamintojo rekomenduojamą referentinę vidutinę vertę (< 0,65 pg/ml). Toks ET-1 koncentracijos padidėjimas SSc metu gali lemti odos storėjimą, fibrozę ir kraujagyslių pažeidimą [46]. Panašūs rezultatai gauti ir kitų atliktų studijų metu. Šių tyrimų metu nustatyta ženkliai didesnė ET-1 koncentracija pacientams sergantiems SSc. 2013 metais atlikto tyrimo metu taip pat nustatyta, jog pacientų sergančių SSc, ET-1 koncentracija yra statistiškai reikšmingai didesnė negu kontrolinės sveikų asmenų grupės [47]. Remiantis kitų mokslinių studijų duomenimis taip pat gaunami panašūs rezultatai: ET-1 koncentracija buvo reikšmingai didesnė SSc sergančių tiriamųjų grupėje [46]. Mūsų atliktame tyrime dalyvavo tik SSc sergantys pacientai, tad rezultatų analizė, tarp sveikų asmenų ir sergančių SSc pacientų grupės, nebuvo atlikta. Tyrimo metu gauti rezultatai sutampa su kitų autorių atliktų tyrimų duomenimis. Pritaikius ET-1 koncentracijos, pacientų kraujo serume, nustatymo tyrimą klinikinėje praktikoje, ši biologinių žymenį būtų galima naudoti kaip SSc laboratorinį diagnostinį rodiklį.

Tirpios adhezijos molekulės (ICAM-1, VCAM-1) yra laikomos potencialiais SSc biologiniais žymenimis, kadangi jų koncentracija kraujyje yra susijusi su endotelio aktyvumu bei pažeidimu ir gali atspindėti endotelio aktyvacijos būseną [31]. Adhezijos molekulių svarba sergant SSc aprašyta ne viename moksliniame tyrime, tačiau daugelio jų rezultatai grindžiami nedidelėmis tiriamųjų imtimis [6] [26] [48]. Mūsų atlikto tyrimo metu, ICAM-1 koncentracija, pacientų kraujo

serume, neviršijo reagentų gamintojo rekomenduojamos vidutinės koncentracijos. Tačiau tarptautiniame klinikinės imunologijos žurnale, 2014 metais publikuoto straipsnio duomenimis, ICAM-1 koncentracija, tiriamųjų sergančių SSc grupėje, buvo reikšmingai didesnė negu kontrolinės tiriamųjų grupės [48]. Reikšmingai didesnė ICAM-1 koncentracija nustatyta ir kito tyrimo metu [6]. Mūsų atlikto tyrimo metu nustatyta vidutinė VCAM-1 koncentracija (1351,82 ng/ml) buvo beveik dvigubai didesnė už reagentų gamintojo rekomenduojamą referentinę vidutinę koncentraciją (< 772,2 ng/ml). Nors kitų autorių atlikto tyrimo duomenimis, skirtumų, tarp VCAM-1 koncentracijos sveikų ir SSc sergančių, tiriamųjų grupėse nenustatyta [6]. Tačiau 2018 metais Italijos mokslininkų atlikto tyrimo metu nustatyta, jog tiriamųjų sergančių SSc ICAM-1 ir VCAM-1 koncentracija yra reikšmingai didesnė negu sveikų kontrolinių asmenų grupėje [26]. Kaip ir mūsų atlikto tyrimo rezultatai taip ir daugelio kitų atliktų mokslinių tyrimų duomenys prieštaringi. Vis dėl to reikalingi tolimesni tyrimai ir tirpių adhezijos molekulių analizė SSc patogenezėje, kad būtų galima šiuos biologinius žymenis naudoti ligos diagnostikoje ir tolimesnėje ligos klinikinių požymių pasireiškimo prognozėje.

Daugelyje mokslinių tyrimų ieškoma ET-1, VCAM-1 ir ICAM-1 koncentracijų sąsajų tarp ribota ir difuzine SSc sergančių pacientų grupių [26] [31] [47]. Šio tyrimo metu, deja, negalėjome atlikti šių biologinių žymenų koncentracijų palyginimo tarp ribota ir difuzine SSc sergančių pacientų grupių, kadangi difuzinė SSc buvo diagnozuota tik 5 tiriamiesiems.

Šio tyrimo metu nustatyta statistiškai reikšminga, vidutinio stiprumo, teigiama priklausomybė tarp ET-1 ir VCAM-1 koncentracijos tiriamųjų kraujo serume ( $r = 0,687$ ;  $p < 0,001$ ). Mokslinių tyrimų duomenimis ET-1 stimuliuoja VCAM-1 sekreciją [50] [51]. Tokie mokslinių tyrimų duomenys sutampa su mūsų tyrimo rezultatais ir patvirtina tiek ET-1 tiek VCAM-1 dalyvavimą SSc patogenezėje. Atlikto tyrimo metu statistiškai reikšmingo ryšio tarp ET-1 ir tirpių adhezijos molekulių ICAM-1 koncentracijos nenustatyta. Kitų autorių tyrimų duomenimis ET-1 skatina ICAM-1 sekreciją, tad šių dviejų žymenų koncentracija tarpusavyje yra susijusi [53] [54]. Tačiau kito tyrimo duomenys prieštaringi. Tiriamųjų imtį sudarė pacientai sergantys 1 tipo cukriniu diabetu su ankstyva diabetine retinopatija, šio tyrimo metu nenustatyti statistiškai reikšmingi ryšiai tarp ET – 1, VCAM-1 ir ICAM-1 koncentracijos [54].

Viena pagrindinių mirties nuo SSc priežasčių yra įvardijama plaučių arterinė hipertenzija (PAH). Didelį mirtingumą nuo šios SSc komplikacijos lemia tai, kad PAH dažniausiai nustatoma vėlyvose stadijose ir ši būklė yra nepagydoma. Mūsų atlikto tyrimo metu 37 proc. tiriamųjų buvo diagnozuota PAH. Tyrimo metu bandėme nustatyti ar skiriasi ET-1 ir tirpių adhezijos molekulių koncentracija tarp pacientų grupių priklausomai nuo PAH diagnozės. Tačiau statistiškai reikšmingų skirtumų nustatyti nepavyko. Šių biologinių žymenų koncentracijos, tarp pacientų

grupių, ženkliai nesiskyrė. Mūsų atlikto tyrimo duomenys sutampa ir su kitų autorių atlikto tyrimo rezultatais. Šio tyrimo autorių duomenimis ICAM-1 ir VCAM-1 nėra specifiški PAH žymenys [6].

Literatūros duomenimis Scl-70 ir CENP-B autoantikūnai yra specifiškiausi SSc patogenezėje ir diagnostikoje, šie autoantikūnai aptinkami 20 – 40 proc. SSc sergančių asmenų [32] [36] [56]. Scl-70 ir CENP-B autoantikūnai siejami su skirtingomis SSc formomis, Scl-70 būdingesni difuzinei ligos formai, CENP-B dažniau nustatomi sergant ribota SSc. Mūsų atlikto tyrimo metu dažniausiai nustatyti autoantikūnai prieš CENP-B (40 proc.), Ro – 52 (40 proc.) ir Scl – 70 (40 proc.), gauti rezultatai patvirtina kitų autorių atliktų tyrimų duomenis. Beveik pusei tiramųjų nustatyti Ro – 52 autoantikūnai nėra specifiški SSc, jie nustatomi tik 15 – 30 proc. pacientų, dažniausiai kartu su kitais SSc specifiškais autoantikūnais [32] [36] [57]. Dažniausiai šie autoantikūnai nustatomi asmenims sergantiems sisteminė raudonąja vilklige, Sjogreno sindromu, autoimuniniu miozitu [56] [58] [59]. Autoantikūnų prieš kitus iš branduolio išskiriamus antigenus aptikta mažiau, tačiau net 60 proc. tiriamųjų nustatyti keli ENA autoantikūnų tipai. 10 proc. tiriamųjų ENA autoantikūnai neaptikti. Kadangi SSc būdingiausi Scl-70 ir CENP-B autoantikūnai, atliekant statistinę duomenų analizę tyrimo metu bandyta nustatyti ar yra ryšys tarp šių autoantikūnų, ET-1 ir adhezijos molekulių koncentracijos. Tyrimo metu nenustatyti statistiškai reikšmingi skirtumai tarp pacientų grupių, kai CENP-B autoantikūnai aptinkami ar nenustatomi, bei ET-1 ( $p = 0,780$ ) bei VCAM-1 ( $p = 0,478$ ). Rastas reikšmingas skirtumas tarp CENP-B autoantikūnų ir ICAM-1 koncentracijos ( $p = 0,002$ ). Pacientų, kuriems buvo nustatyti CENP-B autoantikūnai, ICAM-1 koncentracija buvo mažesnė negu pacientų, kuriems šie autoantikūnai neaptikti. Reikšmingi skirtumai tarp pacientų grupių, priklausomai nuo Scl-70 autoantikūnų bei ET-1, ICAM-1 ir VCAM-1 koncentracijų nenustatyti.

Europos sklerodermos studijų grupė (EScSG) rekomenduoja SSc aktyvumą vertinti pagal ligos aktyvumo indeksą, kurio vienas kriterijų  $ENG > 30$  mm/h [60]. Mokslinių tyrimų duomenys apie CRB koncentraciją sergant SSc prieštaringi [61]. Kai kurių mokslinių tyrimų duomenimis nenustatyta reikšmingo CRB koncentracijos padidėjimo sergant SSc [37] [38]. Kitų studijų metu nenustatyti reikšmingi CRB koncentracijos skirtumai tarp SSc sergančių ir kontrolinės sveikų asmenų grupės [62]. Tačiau yra studijų, kurių metu nustatyti reikšmingi skirtumai tarp sveikų ir sergančių SSc asmenų CRB koncentracijos. CRB koncentracija SSc sergančių asmenų kraujyje buvo ženkliai didesnė [63] [64]. Mūsų atlikto tyrimo metu beveik pusės - 43 proc. tiriamųjų  $ENG$  viršijo rekomenduojamą vertę ( $\geq 30$  mm/h), vidutinė tiriamųjų CRB koncentracija buvo tik 4,04 mg/l. Mūsų tyrimo metu 43 proc. tiriamųjų  $ENG$  rezultatai sutapo su EScSG rekomendacijomis skirtomis SSc aktyvumo vertinimui.

2017 metais atlikto tyrimo metu buvo siekiama nustatyti biologinių žymenų, atspindinčių endotelio ląstelių aktyvaciją ar disfunkciją, asociaciją. Šio tyrimo metu nustatytas reikšmingas ryšys tarp CRB ir ET-1 koncentracijos [65]. Mūsų atlikto tyrimo metu nustatytas statistiškai reikšmingas, silpnas, teigiamas ryšys tarp ET-1 koncentracijos ir CRB ( $r = 0,387$ ;  $p = 0,035$ ). Nors tyrimo metu beveik pusei tiriamųjų nustatytas  $ENG > 30$  mm/h, tačiau statistiškai reikšmingo ryšio tarp ET-1 ir ENG nenustatyta ( $r = 0,348$ ;  $p = 0,064$ ).

Mūsų atlikto tyrimo metu reikšmingo VCAM-1 ryšio su CRB koncentracija ( $r = 0,218$ ;  $p = 0,256$ ) ir ENG ( $r = 0,170$ ;  $p = 0,368$ ) nenustatyta. Tyrimo metu nustatytas silpnas, teigiamas ICAM-1 ir ENG ryšys ( $r = 0,369$ ;  $p = 0,045$ ), tačiau sąsajų tarp ICAM-1 ir CRB koncentracijos nenustatyta ( $r = 0,306$ ;  $p = 0,107$ ). Iš dalies panašūs rezultatai gauti ir kitos mokslinės studijos metu, nenustatytas reikšmingas VCAM-1 koncentracijos ryšys su uždegimo žymenimis (CRB, ENG) [26]. Šio tyrimo metu nustatytas teigiamas ryšys tarp ICAM-1 koncentracijos ir uždegimo žymenų, nors mūsų tyrimo metu ryšį nustatėme tik tarp ICAM-1 ir ENG. 2018 metais atlikto tyrimo metu, nenustatyta statistiškai reikšmingų rezultatų tarp tiriamųjų ICAM-1, VCAM -1 koncentracijos ir CRB, ENG rodiklių [6]. Mūsų atlikto tyrimo duomenys šiuo atžvilgiu sutampa su kitų studijų duomenimis.

***Darbo sklaida:*** Mokslo tiriamojo darbo tema, kartu su kitais autoriais – doc., Dr. L. Bagdonaite, doc., Dr. R. Ruginė, N. Gerčiukaite, buvo paruoštas ir pristatytas standinis pranešimas tarptautiniame imunologijos kongrese Lisabonoje ( 11<sup>th</sup> International Congress on Autoimmunity, Lisbon, 2018) .

## 5. IŠVADOS

1. Nustatyta statistiškai reikšminga priklausomybė tarp ET-1 ir VCAM-1 koncentracijos tiriamųjų kraujo serume ( $r = 0,687$ ;  $p < 0,001$ ). Šio tyrimo rezultatai patvirtino ET-1 ir VCAM-1 dalyvavimą sisteminės sklerozės patogenezėje, todėl šių žymenų nustatymas gali būti naudojamas vertinant sisteminės sklerozės uždegiminio proceso aktyvumą bei ankstyvai pacientų, kuriems yra didelė ligos komplikacijų rizika, identifikacijai.

2. a) nustatytas statistiškai reikšmingas ryšys tarp ET -1 ir CRB koncentracijos tiriamųjų kraujo serume ( $r = 0,387$ ;  $p = 0,035$ ). Drauge šie rodikliai galėtų būti naudojami kaip uždegimo aktyvumo žymenys.

b) nustatyta ICAM-1 koncentracijos ir autoantikūnų (CENP - B ) sąsaja ( $p = 0,002$ ) leidžia diferencijuoti ligos išplitimą.

c) priklausomybės tarp VCAM-1 koncentracijos ir uždegimo žymenų (ENG, CRB, ENA) nenustatyta.

## 6. SANTRAUKA

**Temos aktualumas:** Endotelinas - 1 (ET-1) yra siejamas su uždegiminių ir jungiamojo audinio ligų, įskaitant ir sisteminę sklerozę, patogenezę. ET-1 pasižymi ne tik kraujagyslių tonuso moduliacija ir ekstraląstelinio matrikso biosintezės stimuliacija, bet reguliuoja tarpląstelinį adhezijos molekulių - 1 (ICAM-1) ir kraujagyslių ląstelių adhezijos molekulių - 1 (VCAM-1) ekspresiją ląstelių paviršiuje.

**Tyrimo tikslas:** Įvertinti endotelino – 1 (ET-1), kraujagyslių ląstelių adhezijos molekulių - 1 (VCAM-1) ir tarpląstelinės adhezijos molekulių – 1 (ICAM-1) kiekio kraujo serume diagnostinę vertę ir įtaką ligos patogenezėje, pacientams sergantiems sisteminė skleroze.

**Tyrimo uždaviniai:** Nustatyti endotelino – 1, kraujagyslių ląstelių adhezijos molekulių - 1 (VCAM-1) ir tarpląstelinės adhezijos molekulių – 1 (ICAM-1) koncentracijos, tiriamųjų kraujo serume, diagnostinę vertę, sisteminės sklerozės atveju bei įvertinti sąsajas su uždegimo žymenimis (CRB, ENG, ENA), vertinant uždegiminio proceso eigą.

**Tyrimo metodika:** Tiriamųjų imtį sudarė 30, Vilniaus Universiteto ligoninės Santaros klinikų reumatologijos skyriaus, pacientų, sergančių sisteminė skleroze. Tiriamųjų kraujo serume buvo nustatyta ET-1, tirpių adhezijos molekulių (ICAM-1, VCAM-1) koncentracija. Tirti uždegimo žymenys (CRB, ENG, ENA). Antikūnų prieš branduolio išskiriamus antigenus nustatymui taikytas imunobloto metodas (*Euroimmun*, Vokietija). Tirpių adhezijos molekulių VCAM-1 ir ICAM-1 koncentracija nustatyta IFA metodu (*IBL International*, Vokietija). ET-1 koncentracija išmatuota IFA metodu (*BioSource<sup>TM</sup>*, *Biomedica*, Austrija).

**Tyrimo rezultatai:** Net 83 proc. tiriamųjų kraujo serume nustatyta ET-1 koncentracija viršijo rekomenduojamą referentinę vidutinę koncentraciją (< 0,65 pg/ml). Tyrimo metu nustatyta priklausomybė tarp ET-1 ir VCAM-1 koncentracijos tiriamųjų kraujo serume ( $r = 0,687$ ;  $p < 0,001$ ). Sąsajų tarp ET-1 ir ICAM-1 koncentracijos nenustatyta ( $r = 0,13$ ;  $p = 0,945$ ). Tyrimo metu nenustatyta reikšmingų ET-1, ICAM-1 bei VCAM-1 koncentracijų skirtumų priklausomai nuo ligos trukmės. Skirtumų tarp pacientų grupių, priklausomai nuo plaučių arterinės hipertenzijos (PAH) būsenos ir ET-1, VCAM-1 ir ICAM-1 koncentracijų, nenustatyta. Nustatytas reikšmingas ryšys tarp ET-1 ir CRB koncentracijos ( $r = 0,387$ ;  $p = 0,035$ ), sąsajų tarp ET-1 ir ENG nenustatyta ( $r = 0,348$ ;  $p = 0,064$ ). Ryšio tarp VCAM-1 koncentracijos ir uždegimo žymenų (ENG, CRB, ENA) nenustatyta.

**Išvados:** Nustatyta statistiškai reikšminga priklausomybė tarp ET-1 ir VCAM-1 koncentracijos tiriamųjų kraujo serume ( $r = 0,687$ ;  $p < 0,001$ ). Šio tyrimo rezultatai patvirtino ET-1 ir VCAM-1 dalyvavimą sisteminės sklerozės patogenezėje, todėl šių žymenų nustatymas gali būti naudojamas



vertinant sisteminės sklerozės uždegiminio proceso aktyvumą bei ankstyvai pacientų, kuriems yra didelė ligos komplikacijų rizika, identifikacijai. Nustatytas statistiškai reikšmingas ryšys tarp ET-1 ir CRB koncentracijos tiriamųjų kraujo serume ( $r = 0,387$ ;  $p = 0,035$ ). Drauge šie rodikliai galėtų būti naudojami kaip uždegimo aktyvumo žymenys. Nustatyta ICAM-1 koncentracijos ir autoantikūnų (CENP - B) sąsaja ( $p = 0,002$ ) leidžia diferencijuoti ligos išplitimą. Priklausomybės tarp VCAM-1 koncentracijos ir uždegimo žymenų (ENG, CRB, ENA) nenustatyta.

**Raktažodžiai:** endotelinas – 1 (ET-1), tarpląstelinės adhezijos molekulė-1 (ICAM-1), kraujagyslių ląstelių adhezijos molekulė – 1 (VCAM-1), sisteminė sklerozė.

## 7. SUMMARY

**Reason:** It is thought, that endothelin – 1 (ET – 1) has been implicated in the pathogenesis of inflammatory and fibrotic diseases, including systemic sclerosis. In addition to modulating vascular tone and extracellular matrix turnover, ET-1 up - regulates cell surface adhesion molecules - intercellular adhesion molecule – 1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule – 1 (VCAM-1).

**Aim:** To evaluate the diagnostic value of endothelin - 1 (ET-1), vascular cell adhesion molecules - 1 (VCAM-1) and intercellular adhesion molecules - 1 (ICAM-1) in blood serum and to influence the pathogenesis of the disease in patients with systemic sclerosis.

**Objectives:** To determine the diagnostic value of endothelin - 1, vascular cell adhesion molecules - 1 (VCAM-1) and extracellular adhesion molecules - 1 (ICAM-1) in the case of systemic sclerosis and to evaluate the correlation with inflammatory markers (CRP, ESR, ENA), evaluating the course of the inflammatory process.

**Methods:** 30 patients with systemic sclerosis from *Vilnius University Hospital Santaros klinikos* were included in the study. Venous blood serum samples were tested for autoantibodies to extractable nuclear antigens (ENA) by immunoblotting method (*Euroimmun*, Germany); serum levels of ICAM-1, VCAM-1 and ET-1 were assessed by enzyme immunoassay.

**Results:** The study determined the relationship between ET-1 and VCAM-1 concentrations ( $r = 0.687$ ;  $p < 0.001$ ). No interactions between ET-1 and ICAM-1 were detected ( $r = 0.13$ ;  $p = 0.945$ ). No significant differences in the concentrations of ET-1, ICAM-1 and VCAM-1 were detected in the study, depending on the duration of the disease. Differences between patient groups, depending on pulmonary arterial hypertension (PAH) status and ET-1, VCAM-1 and ICAM-1 concentrations, have not been determined. There was a significant correlation between ET-1 and CRB levels ( $r = 0.378$ ;  $p = 0.035$ ); no correlation was found between ET-1 and ENG ( $r = 0.348$ ;  $p = 0.064$ ). The relationship between VCAM-1 concentration and inflammation markers (ESR, CRP, ENA) has not been established.

**Conclusions:** There was a statistically significant relationship between serum ET-1 and VCAM-1 concentrations ( $r = 0.687$ ;  $p < 0.001$ ). The results of this study indicated that ET-1 and VCAM-1 are involved in the pathogenesis of systemic sclerosis and may be assessed together as markers of inflammation and the identification of patients at high risk for disease progression. The study showed a statistically significant relationship between serum CRB and ET-1 concentrations ( $r = 0.378$ ;  $p = 0.035$ ). These markers can be used as signs of inflammatory activity. The correlation between ICAM-1 concentration and CENP-B autoantibodies ( $p = 0.002$ ) allows to differentiate

limited cutaneous systemic sclerosis from diffuse cutaneous systemic sclerosis. There is no relationship between VCAM-1 concentration and inflammation markers (ESR, CRP, ENA).

**Keywords:** endothelin – 1 (ET-1), intercellular adhesion molecule – 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule – 1 (VCAM-1), systemic sclerosis.

## 8. LITERATŪROS ŠALTINIAI

1. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest.* 2007 m. kovo;117(3):557–67.
2. Mayes MD, Lacey JV, Beebe-Dimmer J, Gillespie BW, Cooper B, Laing TJ, ir kt. Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis Rheum.* 2003 m. rugpjūčio;48(8):2246–55.
3. Opitz C, Klein-Weigel PF, Riemekasten G. Systemic sclerosis-A systematic overview: Part 2 - Immunosuppression, treatment of SSc-associated vasculopathy, and treatment of pulmonary arterial hypertension. *Vasa - J Vasc Dis.* 2011 m.;40(1):20–30.
4. Viswanath V, Phiske MM, Gopalani VV. Systemic sclerosis: current concepts in pathogenesis and therapeutic aspects of dermatological manifestations. *Indian J Dermatol.* 2013 m. liepos;58(4):255–68.
5. The Role of Endothelin in the Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *Medscape.* Prieiga per internetą: <<http://www.medscape.org/viewarticle/507846>> [žiūrėta 2018 02 18].
6. Thakkar V, Patterson KA, Stevens W, Wilson M, Roddy J, Sahhar J, ir kt. Increased serum levels of adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 in systemic sclerosis are not specific for pulmonary manifestations. *Clin Rheumatol.* 2018 m. balandžio 23 d.;
7. Balbir-Gurman A, Braun-Moscovici Y. Scleroderma – New aspects in pathogenesis and treatment. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2012 m. vasario;26(1):13–24.
8. Denton CP. Systemic sclerosis: from pathogenesis to targeted therapy. *Clin Exp Rheumatol.* 2015 m. rugpjūčio;33(4 Suppl 92):S3-7.
9. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells | *Nature.* Prieiga per internetą: <<https://www.nature.com/articles/332411a0>> [žiūrėta 2018 02 12].
10. Dhaun N, Pollock DM, Goddard J, Webb DJ. Selective and mixed endothelin receptor antagonism in cardiovascular disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2007 m. lapkričio;28(11):573–9.
11. Kisanuki YY, Emoto N, Ohuchi T, Widyantoro B, Yagi K, Nakayama K, ir kt. Low blood pressure in endothelial cell-specific endothelin 1 knockout mice. *Hypertens Dallas Tex 1979.* 2010 m. liepos;56(1):121–8.
12. Swigris JJ, Brown KK. The role of endothelin-1 in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *BioDrugs Clin Immunother Biopharm Gene Ther.* 2010 m.;24(1):49–54.
13. Krhac M, Derek L, Unic A. Endothelins - clinical perspectives. *Biochem Medica* Prieiga per internetą: <[http://www.academia.edu/23507357/Endothelins\\_-\\_clinical\\_perspectives](http://www.academia.edu/23507357/Endothelins_-_clinical_perspectives)> [žiūrėta 2018 02 25].
14. Levin ER. Endothelins. *N Engl J Med.* 1995 m. rugpjūčio 10 d.;333(6):356–63.
15. Mayes MD. Endothelin and endothelin receptor antagonists in systemic rheumatic disease. *Arthritis Rheum.* 2003 m. gegužės;48(5):1190–9.
16. Sulli A, Soldano S, Pizzorni C, Montagna P, Secchi ME, Villaggio B, ir kt. Raynaud's phenomenon and plasma endothelin: correlations with capillaroscopic patterns in systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 2009 m. birželio;36(6):1235–9.

17. Morelli S, Ferri C, Poletti E, Bellini C, Gualdi GF, Pittoni V, ir kt. Plasma endothelin-1 levels, pulmonary hypertension, and lung fibrosis in patients with systemic sclerosis. *Am J Med.* 1995 m. rugsėjo;99(3):255–60.
18. Kuryliszyn-Moskal A, Klimiuk PA, Sierakowski S. Soluble adhesion molecules (sVCAM-1, sE-selectin), vascular endothelial growth factor (VEGF) and endothelin-1 in patients with systemic sclerosis: relationship to organ systemic involvement. *Clin Rheumatol.* 2005 m. balandžio;24(2):111–6.
19. Cozzani E, Javor S, Laborai E, Drosera M, Parodi A. Endothelin-1 levels in scleroderma patients: a pilot study. *ISRN Dermatol.* 2013 m.;2013:125632.
20. Abraham DJ, Vancheeswaran R, Dashwood MR, Rajkumar VS, Pantelides P, Xu SW, ir kt. Increased levels of endothelin-1 and differential endothelin type A and B receptor expression in scleroderma-associated fibrotic lung disease. *Am J Pathol.* 1997 m. rugsėjo;151(3):831–41.
21. Nakamura H, Matsuzaki I, Hatta K, Nagase H, Nobokuni Y, Kambayashi Y, ir kt. Blood endothelin-1 and cold-induced vasodilation in patients with primary Raynaud's phenomenon and workers with vibration-induced white finger. *Int Angiol J Int Union Angiol.* 2003 m. rugsėjo;22(3):243–9.
22. Smyth A, Bell A, Bruce I, McGrann S, Allen J. Digital vascular responses and serum endothelin-1 concentrations in primary and secondary Raynaud's phenomenon. *Ann Rheum Dis.* 2000 m. lapkričio;59(11):870–4.
23. Dong F, Zhang X, Wold LE, Ren Q, Zhang Z, Ren J. Endothelin-1 enhances oxidative stress, cell proliferation and reduces apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: role of ETB receptor, NADPH oxidase and caveolin-1. *Br J Pharmacol.* 2005 m. birželio;145(3):323–33.
24. Endothelium-Restricted Overexpression of Human Endothelin-1 Causes Vascular Remodeling and Endothelial Dysfunction Circulation. Prieiga per internetą: <<http://circ.ahajournals.org/content/110/15/2233>> [žiūrėta 2018 02 12].
25. Rabquer BJ, Hou Y, Del Galdo F, Kenneth Haines G, Gerber ML, Jimenez SA, ir kt. The proadhesive phenotype of systemic sclerosis skin promotes myeloid cell adhesion via ICAM-1 and VCAM-1. *Rheumatol Oxf Engl.* 2009 m. liepos;48(7):734–40.
26. Wolf SI, Howat S, Abraham DJ, Pearson JD, Lawson C. Agonistic anti-ICAM-1 antibodies in scleroderma: activation of endothelial pro-inflammatory cascades. *Vascul Pharmacol.* 2013 m. rugpjūčio;59(1–2):19–26.
27. Delle Sedie A, Riente L, Maggiorini L, Pratesi F, Tavoni A, Migliorini P, ir kt. Potential biomarkers in patients with systemic sclerosis. *Int J Rheum Dis.* 2018 m. sausio;21(1):261–5.
28. Mostmans Y, Cutolo M, Giddelo C, Decuman S, Melsens K, Declercq H, ir kt. The role of endothelial cells in the vasculopathy of systemic sclerosis: A systematic review. *Autoimmun Rev.* 2017 m. rugpjūčio;16(8):774–86.
29. Chora I, Guiducci S, Manetti M, Romano E, Mazzotta C, Bellando-Randone S, ir kt. Vascular biomarkers and correlation with peripheral vasculopathy in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev.* 2015 m. balandžio;14(4):314–22.
30. Manetti M, Guiducci S, Romano E, Rosa I, Ceccarelli C, Mello T, ir kt. Differential expression of junctional adhesion molecules in different stages of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2013 m. sausio;65(1):247–57.
31. Liakouli V, Cipriani P, Marrelli A, Alvaro S, Ruscitti P, Giacomelli R. Angiogenic cytokines and growth factors in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev.* 2011 m. rugpjūčio;10(10):590–4.

32. Cossu M, Andracco R, Santaniello A, Marchini M, Severino A, Caronni M, ir kt. Serum levels of vascular dysfunction markers reflect disease severity and stage in systemic sclerosis patients. *Rheumatol Oxf Engl*. 2016 m.;55(6):1112–6.
33. Autoantibodies in systemic sclerosis - ScienceDirect. Prieiga per internetą: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S156899721200122X>> [žiūrėta 2018 02 13].
34. Koenig M, Dieudé M, Senécal J-L. Predictive value of antinuclear autoantibodies: the lessons of the systemic sclerosis autoantibodies. *Autoimmun Rev*. 2008 m. rugsėjis;7(8):588–93.
35. Reveille JD, Solomon DH, American College of Rheumatology Ad Hoc Committee of Immunologic Testing Guidelines. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: anticentromere, Scl-70, and nucleolar antibodies. *Arthritis Rheum*. 2003 m. birželio 15 d.;49(3):399–412.
36. Villalta D, Imbastaro T, Di Giovanni S, Lauriti C, Gabini M, Turi MC, ir kt. Diagnostic accuracy and predictive value of extended autoantibody profile in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev*. 2012 m. gruodžio 1 d.;12(2):114–20.
37. Kayser C, Fritzler MJ. Autoantibodies in Systemic Sclerosis: Unanswered Questions. *Front Immunol*. Prieiga per internetą: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4397862/>> [žiūrėta 2018 03 19].
38. Muangchan C, Harding S, Khimdas S, Bonner A, Canadian Scleroderma Research group, Baron M, ir kt. Association of C-reactive protein with high disease activity in systemic sclerosis: results from the Canadian Scleroderma Research Group. *Arthritis Care Res*. 2012 m. rugsėjis;64(9):1405–14.
39. Ohtsuka T. Relation between elevated high-sensitivity C-reactive protein and anti-mitochondria antibody in patients with systemic sclerosis. *J Dermatol*. 2008 m. vasaris;35(2):70–5.
40. Lis-Święty A, Widuchowska M, Brzezińska-Wcisło L, Kucharz E. High acute phase protein levels correlate with pulmonary and skin involvement in patients with diffuse systemic sclerosis. *J Int Med Res*. 2018 m. balandis;46(4):1634–9.
41. Masi AT. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum*. 1980 m.;23(5):581–90.
42. Bălănescu P, Lădaru A, Bălănescu E, Băicuș C, Dan GA. Systemic sclerosis biomarkers discovered using mass-spectrometry-based proteomics: a systematic review. *Biomark Biochem Indic Expo Response Susceptibility Chem*. 2014 m. rugpjūtis;19(5):345–55.
43. Hasegawa M. Biomarkers in systemic sclerosis: Their potential to predict clinical courses. *J Dermatol*. 2016 m. sausis;43(1):29–38.
44. van den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, ir kt. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis*. 2013 m. lapkričio;72(11):1747–55.
45. Euroimmun product catalog. Prieiga per internetą: <<http://www.euroimmunus.com/pdf/Product-Catalog-2014.pdf>> [žiūrėta 2018 04 03].
46. Hajjalilo M, Noorabadi P, Tahsini Tekantapeh S, Malek Mahdavi A. Endothelin-1,  $\alpha$ -Klotho, 25(OH) Vit D levels and severity of disease in scleroderma patients. *Rheumatol Int*. 2017 m. spalio;37(10):1651–7.
47. Jing J, Dou TT, Yang JQ, Chen XB, Cao HL, Min M, ir kt. Role of endothelin-1 in the skin fibrosis of systemic sclerosis. *Eur Cytokine Netw*. 2015 m. kovas;26(1):10–4.

48. Kawashiri S, Ueki Y, Terada K, Yamasaki S, Aoyagi K, Kawakami A. Improvement of plasma endothelin-1 and nitric oxide in patients with systemic sclerosis by bosentan therapy. *Rheumatol Int.* 2014 m. vasario;34(2):221–5.
49. Vettori S, Cuomo G, Iudici M, D'Abrosca V, Giacco V, Barra G, ir kt. Early systemic sclerosis: serum profiling of factors involved in endothelial, T-cell, and fibroblast interplay is marked by elevated interleukin-33 levels. *J Clin Immunol.* 2014 m. rugpjūčio;34(6):663–8.
50. Yalçınkaya Y, Adın-Çınar S, Artım-Esen B, Kamalı S, Pehlivan Ö, Öcal L, ir kt. Capillaroscopic findings and vascular biomarkers in systemic sclerosis: Association of low CD40L levels with late scleroderma pattern. *Microvasc Res.* 2016 m.;108:17–21.
51. Lin C-C, Lin W-N, Hou W-C, Hsiao L-D, Yang C-M. Endothelin-1 induces VCAM-1 expression-mediated inflammation via receptor tyrosine kinases and Elk/p300 in human tracheal smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2015 m. rugpjūčio 1 d.;309(3):L211-225.
52. Ishizuka T, Takamizawa-Matsumoto M, Suzuki K, Kurita A. Endothelin-1 enhances vascular cell adhesion molecule-1 expression in tumor necrosis factor alpha-stimulated vascular endothelial cells. *Eur J Pharmacol.* 1999 m. kovo 19 d.;369(2):237–45.
53. Xu SW, Denton CP, Dashwood MR, Abraham DJ, Black CM. Endothelin-1 regulation of intercellular adhesion molecule-1 expression in normal and sclerodermal fibroblasts. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998 m.;31 Suppl 1:S545-547.
54. Schwarting A, Schlaak J, Lotz J, Pfers I, Meyer zum Büschenfelde KH, Mayet WJ. Endothelin-1 modulates the expression of adhesion molecules on fibroblast-like synovial cells (FLS). *Scand J Rheumatol.* 1996 m.;25(4):246–56.
55. al UN et. The levels of the circulating cellular adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1 and endothelin-1 and the flow-mediated vasodilatation values in patients w... - PubMed - NCBI . Prieiga per internetą: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24088748> > [žiūrėta 2018 04 24].
56. Wielosz E, Dryglewska M, Majdan M. Serological profile of patients with systemic sclerosis. *Postepy Hig Med Doswiadczalnej Online.* 2014 m. rugpjūčio 18 d.;68:987–91.
57. Murng SHK, Thomas M. Clinical associations of the positive anti Ro52 without Ro60 autoantibodies: undifferentiated connective tissue diseases. *J Clin Pathol.* 2018 m. sausio;71(1):12–9.
58. Henriksson G. Presymptomatic autoantibodies in Sjögren's syndrome: what significance do they hold for the clinic? *Expert Rev Clin Immunol.* 2014 m. liepos;10(7):815–7.
59. Rastin M, Mahmoudi M, Sahebari M, Tabasi N. Clinical & immunological characteristics in systemic lupus erythematosus patients. *Indian J Med Res.* 2017 m. rugpjūčio;146(2):224–9.
60. Valentini G, Bencivelli W, Bombardieri S, D'Angelo S, Della Rossa A, Silman AJ, ir kt. European Scleroderma Study Group to define disease activity criteria for systemic sclerosis. III. Assessment of the construct validity of the preliminary activity criteria. *Ann Rheum Dis.* 2003 m. rugsėjo;62(9):901–3.
61. Muangchant C, Pope JE. The significance of interleukin-6 and C-reactive protein in systemic sclerosis: a systematic literature review. *Clin Exp Rheumatol.* 2013 m. balandžio;31(2 Suppl 76):122–34.
62. Khurma V, Meyer C, Park GS, McMahon M, Lin J, Singh RR, ir kt. A pilot study of subclinical coronary atherosclerosis in systemic sclerosis: coronary artery calcification in cases and controls. *Arthritis Rheum.* 2008 m. balandžio 15 d.;59(4):591–7.

63. Alekperov RT, Baranov AA, Abaĭtova NE. [Clinical associations of C-reactive protein in systemic sclerosis]. Ter Arkh. 2006 m.;78(6):30–5.
64. Liu X, Mayes MD, Pedroza C, Draeger HT, Gonzalez EB, Harper BE, ir kt. Does C-reactive protein predict the long-term progression of interstitial lung disease and survival in patients with early systemic sclerosis? Arthritis Care Res. 2013 m. rugpjūcio;65(8):1375–80.
65. Endothelin-1 and Interleukin-6 Serum Levels Are Associated with More Severe Vasculopathy in Patients with Systemic Sclerosis - ACR Meeting Abstracts. Prieiga per internetu: <<http://acrabstracts.org/abstract/endothelin-1-and-interleukin-6-serum-levels-are-associated-with-more-severe-vasculopathy-in-patients-%E2%80%A8with-systemic-sclerosis/>> [žiūrėta 2018 04 28].



## **PADĖKA**

Nuoširdžiai dėkoju darbo vadovei VU MF Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedros doc., Dr. L. Bagdonaitei už patarimus ir suteiktas žinias, nuolatinę pagalbą viso baigiamojo darbo metu, VUL SK LMC klinikinės imunologijos laboratorijos medicinos biologei Nijolei Gerčiukaitei už praktines žinias ir pagalbą atliekant eksperimentinę tyrimo dalį.